



HAL
open science

Caractérisation génétique du genre *Iris* évoluant dans la méditerranée orientale

Nour Abdel Samad

► **To cite this version:**

Nour Abdel Samad. Caractérisation génétique du genre *Iris* évoluant dans la méditerranée orientale. Biologie végétale. Université Paris Saclay (COmUE); Université Saint-Joseph (Beyrouth), 2016. Français. NNT : 2016SACLS250 . tel-01445348

HAL Id: tel-01445348

<https://theses.hal.science/tel-01445348>

Submitted on 24 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLS250



THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème

- Spécialité de doctorat (Biologie)

Par

Mlle Nour Abdel Samad

Titre de la thèse
(CARACTERISATION GENETIQUE DU GENRE *IRIS* EVOLUANT DANS LA
MEDITERRANEE ORIENTALE)

Thèse présentée et soutenue à « Beyrouth », le « 21/09/2016 » :

Composition du Jury :

M., Tohmé, Georges
Mme, Garnatje, Teresa
M., Bacchetta, Gianluigi
Mme, Nadot, Sophie
Mlle, El Chamy, Laure
Mme, Siljak-Yakovlev, Sonja
Mme, Bou Dagher-Kharrat, Magda

CNRS (Liban)
Institut Botànic de Barcelona (Espagne)
Università degli Studi di Cagliari (Italie)
Université Paris-Sud (France)
Université Saint-Joseph (Liban)
Université Paris-Sud (France)
Université Saint-Joseph (Liban)

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de
thèse



**UNIVERSITE SAINT-JOSEPH
FACULTE DES SCIENCES**

THESE DE DOCTORAT

DISCIPLINE : Sciences de la vie

SPÉCIALITÉ : Biologie de la conservation

Sujet de la thèse :

**Caractérisation génétique du genre *Iris* évoluant
dans la Méditerranée Orientale.**

Présentée par : **Nour ABDEL SAMAD**

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR ÈS SCIENCES

Soutenue le 21/09/2016

Devant le jury composé de :

Dr. Georges TOHME

Président

Dr. Teresa GARNATJE

Rapporteur

Dr. Gianluigi BACCHETTA

Rapporteur

Dr. Sophie NADOT

Examineur

Dr. Laure EL CHAMY

Examineur

Dr. Sonja SILJAK-YAKOVLEV

Directeur de thèse

Dr. Magda BOU DAGHER KHARRAT

Directeur de thèse

Titre : Caractérisation Génétique du Genre *Iris* évoluant dans la Méditerranée Orientale.

Mots clés : *Iris*, *Oncocyclus*, région Est-Méditerranéenne, relations phylogénétiques, status taxonomique.

Résumé : Le genre *Iris* appartient à la famille des Iridacées, il comprend plus de 280 espèces distribuées à travers l'hémisphère Nord. La section *Oncocyclus* (Siems.) Baker de ce genre est confinée au Sud-ouest de l'Asie et comprend plus de 65 espèces au statut taxonomique souvent discuté.

Le genre *Iris* présente un taux d'endémisme relativement élevé par rapport à d'autres groupes taxonomiques de son aire de répartition géographique et plusieurs de ses taxons présentent une valeur patrimoniale. Cependant, la cueillette excessive ainsi que la destruction de leurs habitats naturels menace un grand nombre de ces espèces.

Le présent travail de thèse porte sur un groupe de taxons des iris de la section *Oncocyclus* ayant évolué à l'est de la région méditerranéenne. L'objectif principal de ce travail est d'affirmer le statut taxonomique des espèces et de clarifier les relations phylogénétiques qui les relient, une étape nécessaire au développement de stratégies de conservation appropriées pour ce groupe.

L'approche scientifique est basée sur de nombreux outils moléculaires et génétiques tels que : l'analyse de la taille du génome, l'étude du caryotype, l'organisation du génome basée sur la localisation des gènes ribosomiques et l'étude de la structuration de la diversité génétique et la phylogénie basée sur des marqueurs moléculaires chloroplastiques. Ainsi, les régions *trnL-F* et *matk* de tous les iris du Liban et 26 taxa d'*Oncocyclus* de la région Est-Méditerranéenne ont été séquencées pour élucider les relations phylogénétiques. Les deux techniques Feulgen et FISH ont été appliquées sur plusieurs espèces *Oncocyclus* du Liban pour comparer leurs caryotypes et déterminer le nombre et la localisation des gènes ribosomiques sur leurs chromosomes.

Les études ont été accompagnées par des travaux de terrain afin de suivre l'évolution de la dynamique des taxons endémiques du Liban en vue de leur préservation.

Title: Genetic Characterization of *Iris* Genus evolving in the East Mediterranean Region.

Keywords: East Mediterranean region, *Iris*, *Oncocyclus*, phylogenetic relationships, taxonomic status.

Abstract: The genus *Iris* belongs to the Iridaceae family which includes over 280 species distributed throughout the Northern Hemisphere. The *Oncocyclus* section (Siems.) Baker of this genus is confined to the Southwest Asia and includes more than 65 species which their taxonomic status is often discussed.

The genus *Iris* has a relatively high rate of endemism compared to other taxonomic groups of its geographic range and several of its taxa have a heritage value. However, overharvesting and the destruction of their natural habitats threaten many of these species.

This thesis focuses on a group of taxa of the iris section *Oncocyclus* evolving in the east Mediterranean region, The main objective of this work is to affirm the taxonomic status of the species and to clarify the phylogenetic relationships that connect them, a necessary step in the development of appropriate conservation strategies for this group.

The scientific approach is based on many molecular and genetic tools such as the analysis of genome size, the study of the karyotype, genome organization based on the location of ribosomal genes and the study of the structure genetic diversity and phylogeny based on chloroplast molecular markers. Thus, the *trnL-F* and *matK* regions of all Lebanese irises and 26 taxa of *Oncocyclus* of the East Mediterranean region were sequenced to elucidate phylogenetic relationships. Both techniques Feulgen and FISH were applied to several *Oncocyclus* species of Lebanon to compare their karyotype and determine the number and the location of ribosomal genes on their chromosomes.

Studies were accompanied by field work to monitor the dynamics of Lebanon's endemic taxa for their preservation.

Remerciements

**Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.**

Marcel Proust

**La recherche n'avancerait-elle pas plus vite, si au lieu de recruter des
chercheurs, on engageait des trouveurs ?**

- Le chat -

Au risque d'employer une métaphore un peu hasardeuse, une thèse m'apparaît comme un écosystème en soi, dont la dynamique d'idées change au cours du temps, influencées par de nombreuses perturbations, parfois négatives quand elles sont trop intenses, mais aussi formatrices car même la plus faible des perturbations stimule la régénération d'idées. Elle est aussi très diversifiée en problématiques de recherche, en études, ce qui la rend forte face aux menaces. Dès que j'ai commencé à coloniser mon sujet, j'ai apporté de plus en plus d'énergie, la thèse est devenue de plus en plus stable jusqu'à atteindre un équilibre, comme un iris qui raidit ses pétales contre les brises matinales et défie les rayons brûlants du soleil. Néanmoins, la thèse n'est pas uniquement le travail personnel du doctorant ; elle bénéficie des interactions établies avec les encadreurs, les collègues, les proches et les diverses rencontres imprévues... Ainsi je me dois et j'ai le plaisir de remercier :

Monsieur le Vice-recteur aux affaires académiques de l'Université Saint-Joseph, **Pr. Toufic Rizk**,
Monsieur le Doyen, **Pr. Richard Maroun** pour leur soutien et leur encouragement.

En restant dans les murs de la Faculté des Sciences, je voudrais remercier les nombreuses personnes qui, tous les jours, m'ont offert leur bonjour accompagné de leur sourire. En particulier, je désire remercier ma sœur et mon amie **Marianne Beainy** et **Dr. Mireille Kallassy**.

Dr. Teresa Garnatje et **Dr. Gianluigi Bachetta** ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et je les en remercie, de même que pour leur participation au Jury. Ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce manuscrit, et je leur en suis très reconnaissante.

Dr. Sophie Nadot, vous m'avez fait l'honneur de participer au Jury de soutenance; je vous en remercie profondément.

Dr. Sonja Siljak-Yakovlev, ma directrice de thèse, mon idole, ma mère de substitution. Merci, Chef, de m'avoir accompagné sur ce chemin, rempli d'embûches, de m'avoir guidée et enseignée les réflexes du bon chercheur. Vous m'avez appris à me poser les bonnes questions et à y répondre avec le maximum de rigueur. Merci encore de m'avoir montré l'exemple dans la préparation et la rédaction de mes papiers et travaux. Votre écoute, votre générosité, votre patience, votre optimisme et votre extraordinaire force de travail font de vous un exemple ... dont j'espère encore pouvoir longtemps profiter !

Pr. Magda Bou Dagher-Kharrat, merci de m'avoir permis de mener ma barque vers un nouvel horizon, la recherche ! Vos paroles : Une thèse, c'est un travail de longue haleine, un défi que l'on se donne à soi-même.

En signe de reconnaissance. Je me demande parfois comment vous rendre, en partie du moins, le trésor de sollicitude que vous avez manifesté à mon égard, toutes ces petites ou grandes attentions qui m'ont facilité la vie et l'ont agrémentée. Vous me répondrez peut-être que cette générosité porte en elle-même sa récompense, mais je tiens tout de même à exprimer ma gratitude...

Merci **Dr. Oriane Hidalgo**, la chercheuse brillante dont les grandes capacités ont éclairé tant d'étudiants et de collègues. Merci à la "fantastiqueuse" spécialiste de phylogénie extrêmement douée pour tous ses logiciels et outils.

Pr. Georges Tohmé et **Pr. Henriette Tohmé** :

Merci d'être ce que vous êtes, incomparables ! Malgré vos honneurs et vos succès, vous demeurez des chercheurs infatigables et généreux, généreux dans tous les sens du terme. Vous utilisez vos succès pour le mettre au service de votre discipline, la biologie, mais surtout vous engagez toutes vos recherches avec l'idée force de garantir l'avenir de la flore libanaise.

Dr. Edouard Makhoul, amoureux des fleurs sauvages du Liban, je tiens à vous remercier d'avoir bien voulu nous aider et enrichir nos connaissances.

Odile Robin, l'experte en biologie moléculaire et la cytogénétique, tes solides compétences, tes multiples encouragements répétés : Nour ne t'inquiète pas, tu vas t'en sortir comme une chef ! Ton sourire éclaircit le labo, ton énergie et ta bonne humeur sont hyper communicatives, la chaleur humaine est la plus agréable des chaleurs. Tu es toujours capable ! Tu donnes sans rien attendre en retour, tu penses toujours aux autres.

Au « résident permanent » de nos iris, qui nous a fait une visite sans invitation, **M. Champignon endophyte** qui nous a rappelé le fameux proverbe : A quelque chose malheur est bon !

Un grand merci à **Elie Saliba** qui a partagé avec moi la phase « moléculaire » de cette thèse. L'ADN le « roi » de cette phase est un matériau capricieux et rebelle. Mais pas pour le roi de la PCR, Elie, qui a

essayé plusieurs fois et finit pas réussir ! «C'est en essayant continuellement qu'on finit par réussir, en d'autres termes, plus ça rate, plus on a de chances que ça marche » (Devise Shadok).

Plus que précieuse, leur aide fut déterminante :

- **Dr. Layla Saad**, votre thèse de doctorat et vos articles étaient d'une importance capitale et m'ont donné une excellente base pour mes recherches.

- **M. Frédéric Dépalle**, l'amoureux et le spécialiste des iris, vous m'avez fait les plus beaux cadeaux : les feuilles précieuses des iris *Oncocyclus*.

- **M. Nasser Chreif** et **M. Raghed Al Hassan** pour votre aide apportée à la préparation des visites de terrain.

- **Dr. Spencer Brown**, le roi de la cytométrie en flux, je n'oublierai jamais vos histoires magnifiques de l'Australie et des Aborigènes, qui ont fait des longues heures de travail, des moments agréables et éducatifs.

- **Dr. Joan Vallès**, pour vos remarques judicieuses, pour votre chaleur, humanisme, délicatesse, vous avez été de bon conseil et cela toujours avec calme et sourire.

- Mon amie **Dr. Rana El Zein** pour tes conseils et critiques pertinents lors de la rédaction de cette thèse m'ont été d'une aide précieuse.

Je souhaite ensuite intégrer dans ces remerciements, **le Ministère de l'Education et de l'Enseignement Supérieur du Liban** qui m'a encouragée à poursuivre mon chemin et **mes collègues et mes élèves dans les deux écoles officielles secondaires de Baakline et Niha**, qui m'ont toujours épaulée, en particulier lors des périodes difficiles.

Mes remerciements vont aussi à **mes parents** qui m'ont toujours accompagnée tout en posant ces questions fameuses et récurrentes : Tout va bien ? Tu avances ? Votre aide a fait de vous des experts en biologie moléculaire et de la flore libanaise... et m'a permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Je n'oublierai jamais ces phrases quand je cherchais l'aide et le réconfort : Nous sommes prêts ! Ne t'inquiète pas ! Vous m'avez appris le respect des gens et de la nature, l'amour du Liban et de ses paysages, l'attachement au territoire et ses trésors. Vous êtes mes stars !

Quand la Lumière s'établit en nous et nous apporte l'illumination et la connaissance, c'est la Joie indescriptible, rayonnante...

La joie est toujours associée à la lumière : là où est la lumière est la joie.

Merci ma sœur, mon amie, ma moitié.

Nous, **Farah** et Nour, Joie et Lumière, continuerons le chemin ensemble...

"Le souvenir, c'est la présence invisible." Victor Hugo.

Une pensée pour toi qui ne m'a jamais quitté, qui m'accompagne dans mon chemin de lumière... Ta présence silencieuse soutient mes pas, encourage mon espérance, reste à mes côtés et pose ses mains sur mon visage quand je t'appelais à mon aide, je sais que tu es très fier de ta sœur !

Raghid, la vie sans toi est comme un iris qui a affronté un orage et a perdu ses couleurs mais il pousse chaque printemps en espérant un jour, après les larmes, les emprunter d'un arc en ciel.

Ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail doctoral : **mes deux familles Abdel Samad et Achkar.**

A mes cher(ère)s ami(e)s : Notre amitié m'est apparue aussi belle et aussi vivifiante qu'un printemps tout neuf. Quand j'ai eu besoin d'une main secourable, de paroles de réconfort ou d'une oreille attentive, vous avez été toujours présent(e)s.

Au Liban...Le Liban de Gebran khalil Gebran qui est :

... une vérité simple et nue; comme elle se mire dans le bassin d'une fontaine, elle ne voit que son visage serein et épanoui.

...un gazouillement de merles, frissonnement de chênes et de peupliers. Il est écho de flûtes dans les grottes et les cavernes.

...fait de collines qui s'élèvent avec prestance et magnificence vers le ciel azuré.

...fait de vallées silencieuses et mystérieuses dont les versants recueillent le son des carillons et le frisson des ruisseaux.

Je termine ces remerciements par saluer, le personnage central de ce propos, dixit le magnifique « *Iris L.* » qui a colonisé avec plaisir mon champs neuronal pendant plusieurs années :

Place à nos fleurs embrasées,
Dont les teintes irisées

Nous ont - honneur précieux ! -
Valu le nom symbolique
Qu'avait, dans l'Olympe antique,
La messagère des Dieux !

Ils paraissent tout étonnés
Un matin d'avril d'être nés.

Ces fleurs honteuses d'être nues
Ont les frayeurs des ingénues.

Le vol léger d'un gai pinson
Leur fait passer un lent frisson.

Contre les brises matinales
Elles raidissent leurs pétales.

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification du genre <i>Iris</i> (British Iris Society 1997)	28
Tableau 2 : Les <i>Iris</i> du Liban	37
Tableau 3 : La classification IUCN (International Union for the Conservation of Nature, 1997) des <i>Oncocyclus</i> . E : En Danger ; Ex : Extinct ; I : Infréquent ; R : Rare ; V : Vulnérable.....	38
Tableau 4: Les différents types d'espèces classées selon leur étendue géographique, leur spécificité d'habitat et leur taille de populations. Modifié de Pullin, 2002, d'après Rabinowitz. En grisé, le seul moyen pour une espèce d'être commune.	44
Tableau 5 : Liste des iris menacés dans le monde, leurs origines, leurs statuts et les études réalisées sur ces iris.	57
Tableau 6 : L'origine du matériel végétal.....	68
Tableau 7 : Résultats de la taille du génome. Le nombre chromosomique, le nombre de loci ADNr 35S et les données écologiques sont indiqués selon la disponibilité de ces données.....	86
Tableau 8 : Principales données sur les caryotypes des taxa d' <i>Iris</i>	98
Tableau 9: La synthèse des résultats de l'approche cytogénétique moléculaire des taxa d' <i>Iris</i>	101

Listes des figures

Figure 1: L’histoire tectonique du bassin méditerranéen (Magri <i>et al.</i> 2007).....	18
Figure 2: Points-chauds (<i>hotspots</i>) régionaux de biodiversité végétale de la région méditerranéenne (d’après Médail & Quézel 1997, complété).....	21
Figure 3: Le relief du Liban (République Libanaise, Conseil du Développement et de la Reconstruction) et sa topographie (source Jaradi R.).....	23
Figure 4: Carte des précipitations (isohyètes) du Liban (Plassard 1972).....	24
Figure 5 : <i>Iris persica</i> (section <i>Scorpiris</i>)	29
Figure 6 : Un groupe d’ <i>Iris sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> (section <i>Oncocyclus</i>).....	29
Figure 7 : Le village de Yammouneh, où pousse l’ <i>Iris persica</i>	29
Figure 8 : Le village d’Ehmej, où pousse l’ <i>Iris sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	29
Figure 9 : La barbe de l’ <i>Iris antilibanotica</i>	31
Figure 10 : Morphologie de la fleur d’un <i>Iris lortetii</i>	31
Figure 11 : Le fruit et la graine d’ <i>Iris sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	32
Figure 12 : La distribution géographique du genre <i>Iris</i> (Kohlein 1987) et de la section <i>Oncocyclus</i> (Killens, British Iris Society 1997).	33
Figure 13: Photos des <i>Iris Oncocyclus</i> du Liban	39
Figure 14 : Etablissement du statut de conservation d’un taxon et étapes vers leur conservation (modifié d’après Schemske <i>et al.</i> 1994 & Marrero-Gomez <i>et al.</i> 2003).	65
Figure 15 : Des racines poussant sur un rhizome d’ <i>Iris bismarckiana</i>	80
Figure 16: Un histogramme sur les valeurs 2C des 63 populations différentes des espèces d’ <i>Iris</i>	88
Figure 17: Phylogénie des espèces <i>Oncocyclus</i> (Wilson <i>et al.</i> 2016) tracée sur la carte géographique et montrant la reconstruction de la taille du génome ancestrale (à gauche) avec des images illustrant la diversité du phénotype floral parmi des iris <i>Oncocyclus</i> (à droite). A. <i>I. antilibanotica</i> . B. <i>I. atropurpurea</i> (crédit: Mat Knight & Zachi Evenor). C. <i>I. cedreti</i> . D. <i>I. mariae</i> (crédit: Hedva Sanderovitz). E. <i>I. paradoxa</i> (crédit: CT Johansson). F. <i>I. sari</i> (crédit: Zeynel Cebeci). G. <i>I. sprengeri</i> (crédit: Kohran 1923). H. <i>I. westii</i>	89
Figure 18: Histogrammes obtenus par cytométrie en flux. A. à partir de l’analyse d’ <i>I. korolkovii</i> (16,03 pg / 2C, pic 2) en utilisant <i>Pisum sativum</i> (9,09 pg / 2C, pic 1) en tant qu’étalon. B. à partir du co-traitement d’ <i>I. acutiloba</i> subsp. <i>lineolata</i> (16,73 pg / 2C, pic 1) et <i>I. sprengeri</i> (19,20 pg / 2C, pic 2).....	90
Figure 19: La région ITS et les deux amorces universelles ITS-4 et ITS-5 utilisées.....	91
Figure 20: Les gels électrophorétiques montrant les produits PCR de 66 échantillons.	92
Figure 21: 1. Les séquences des espèces d’ <i>Iris</i> publiées sur NCBI; 2. Les séquences des espèces de champignons endophytes publiées sur NCBI; 3. Nos séquences des espèces d’ <i>Iris</i>	93
Figure 22: La nouvelle amorce utilisée ITS-N1.....	94
Figure 23: Un gel électrophorétique montrant les produits PCR de quelques échantillons.....	94
Figure 24: La phylogénie consensus de 83 séquences des taxa d’ <i>Iris</i> obtenue par l’analyse bayésienne de l’ensemble de données combinées des <i>matK-trnK</i> et <i>trnL-trnF</i> . En haut à gauche : boxplots avec des valeurs variables individuelles pour les espèces, représentant la distribution des valeurs de la taille du génome à travers les sous-genres et les sections du genre <i>Iris</i>	97
Figure 25: A-K: plaques métaphasiques des taxa d’ <i>Iris</i> après FISH à double cible à l’aide de deux sondes d’ADNr 5S (signaux verts) et 35S (signaux rouges). C1 représente la coloration CMA (signaux jaunes). A'- K ': idiogrammes avec emplacement de 5S (vert) et 35S (rouge) gènes d’ARNr. A': <i>I. sofarana</i> subsp.	

<i>sofarana</i> (Falougha), B': <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Hazzerta) C': <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> , D': <i>I. cedreti</i> , E': <i>I. westii</i> , F': <i>I. bismarckiana</i> , G': <i>I. lortetii</i> , H': <i>I. antilibanotica</i> , I' : <i>I. persica</i> , J': <i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i> , K': <i>I. mesopotamica</i> . Barre d'échelle 10 µm.	103
Figure 26 : La période de floraison des <i>Oncocyclus</i> Libanais.	105
Figure 27 : Les résultats du nitrate d'argent des 2 espèces d' <i>Oncocyclus</i> endémiques du Liban, <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Falougha et Hazzerta) et <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> et <i>I. mesopotamica</i> montrant le nombre de nucléoles et son pourcentage (le nombre de nucléoles était mesuré dans 100 cellules de chaque espèce).	106
Figure 28 : Les nucléoles d' <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	107
Figure 29 : Les nucléoles d' <i>I. mesopotamica</i>	107

Liste des abréviations

%	Pourcentage
°C	Degree Celsius
3H, 35S, 125I, 32P	Iodine-125, Phosphore 32, Sulfure 35, Tritium
ACP	Amplification en chaîne par polymérase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNcp	Acide Désoxyribonucléique chloroplastique
ADNr	Acide Désoxyribonucléique Ribosomal
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AgNO ₃	Nitrate d'argent
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i>
ARN	Acide Désoxyribonucléique
ARNr	Acide Désoxyribonucléique Ribosomique
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome: chromosome artificiel bactérien</i>
CDR/ECODIT-IAURIF	Council for Development and Reconstruction/Environment Consultancy Firm-Institut d'aménagement et d'Urbanisme de la Région Ile-de-France
CMA ₃	Chromomycine A3
CV _{CL}	Indice d'asymétrie interchromosomal
CY3	Cyanine 3
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Nucleoside triphosphates containing deoxyribose (deoxyadenosine triphosphate, deoxycytidine triphosphate, deoxyguanosine triphosphate (dGTP), deoxythymidine triphosphate)
Eco RI	<i>Restriction endonuclease enzyme isolated from species E. coli</i>
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization
<i>I.</i>	Genre <i>Iris</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers</i>
IUCN	<i>Internation Union for Conservation of Nature</i>
JC	Jesus Christ
MA	Million d'années
matk	Maturase Kinase
M _{CA}	Indice d'asymétrie intrachromosomal
mg	milligram
min.	minute
mL	milliliter
mM	millimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NOR	<i>Nucleolus Organizer Region</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction : réaction en chaîne par polymérase</i>
pg	Picogramme
pH	Power of Hydrogen
PNUD	Programme des Nations Unies pour le développement
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA : amplification aléatoire d'ADN polymorphe
RBGK	Royal Botanic Gardens, Kew
SC	Species concept
SD	Ecart-type
Spp.	Species
SSC	Standard Saline Citrate
SSCT	Standard Saline Citrate Tween
Subsp.	Subspecies
TBE	Tris, Borate, EDTA
TE-RNase	Tris EDTA Ribonucléase A
<i>trnL</i>	Cloroplast tRNA gene
<i>trnL-F</i>	Cloroplast Noncoding intergenic spacer region
valeur 2C	La quantité d'ADN dans un noyau diploïde
WWF	World Wide Fund for Nature
μ/n/p	micro = 10 ⁻⁶ / nano=10 ⁻⁹ /pico=10 ⁻¹²

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des tableaux.....	7
Listes des figures.....	8
Liste des abbréviations.....	10
Chapitre I : Introduction.....	14
Chapitre II : Généralités.....	17
I- Biodiversité et endémisme dans la région méditerranéenne	17
I-1 Géographie, climat et histoire	18
I-2 Richesse floristique : origines et distribution	20
II. Le Liban et sa flore	22
III. Le genre <i>Iris</i>	27
III.1- Description botanique et classification :.....	27
III.2- Distribution géographique :	28
IV. Section <i>Oncocyclus</i>	30
IV.1- Description botanique :.....	30
IV.2- Distribution géographique	32
IV.3- Taxonomie :.....	34
IV.4- Habitat, climat, saisonnalité et croissance	35
IV.5- Le genre <i>Iris</i> au Liban	36
IV.6- Les <i>iris Oncocyclus</i> du Liban.....	37
IV.7- Les menaces :	40
V. La génétique au service de la conservation.....	42
V.1- Conservation des espèces.....	42
VI. Les iris menacés dans le monde :.....	57
VI.1- La conservation <i>ex situ</i> :.....	61
VI.2- La conservation <i>in situ</i> :	62
VI.3- Conservation des iris au Liban :	64
VII. Objectif de la thèse :	66
Chapitre III: Matériel et Méthodes.....	68
III.1- Matériel végétal	68
III.2- Méthodes	72

III.2.1- Mesure de la taille du génome par cytométrie en flux :.....	72
III.2.2- Amplification de la région ITS et des deux régions chloroplastiques <i>matK</i> et <i>trnL-F</i> :.....	72
III.2.3- Cytogénétique :.....	80
Chapitre IV : Résultats et Discussion	86
1- Taille du génome	86
2- Reconstruction phylogénétique moléculaire.....	91
3- Nombre chromosomique et analyse du caryotype.....	98
4- Cartographie de l'hétérochromatine et des gènes ribosomiques.....	101
5- Résultats de la coloration au nitrate d'argent	106
5- Remarques finales.....	108
Chapitre V : Les perspectives	110
Références:.....	113
Annexe 1 : Solutions utilisées.....	136
Annexe 2 : Le protocole et les produits utilisés pour la préparation de la sonde de l'hybridation <i>in situ</i>	142
Annexe 3: Tépaies scannés des iris <i>Oncocyclus</i> du Liban.....	143
Annexe 4: Les plaques métaphasiques et les caryotypes de 4 espèces d' <i>Iris</i> : A : <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Hazzerta), B : <i>I. mesopotamica</i> , C : <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Falougha), D : <i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	146
Annexe 5 : Les données morphométriques pour chaque caryotype.....	147
Annexe 6 : Les fiches d'information sur des produits utilisés	155
Annexe 7: Evaluation élaborée par la liste rouge de l'IUCN sur le status de l' <i>Iris sofarana</i> Foster au Liban	158
Annexe 8: Article: Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora.....	159
Annexe 9: Article: Unlocking the karyological and cytogenetic diversity of <i>Iris</i> from Lebanon: <i>Oncocyclus</i> section shows a distinctive profile and relative stasis during its continental radiation	160

A plant's name is the key to its literature. Van Steenis (1957)

One of the greatest assets of a sound classification is its predictive value. Mayr (1969)

Chapitre I : Introduction

Notre planète est en pleine crise d'extinction de la biodiversité. Dans la dernière édition de la Liste Rouge Mondiale (version 2015.4), sur les 79837 espèces étudiées, 23250 sont classées menacées d'extinction (IUCN 2016). Les impacts humains du développement, la déforestation, la pollution et les changements climatiques sont en train de détruire les habitats des faunes et des flores dans le monde entier.

Le déclin des espèces commence par des extinctions locales c.à.d elles disparaissent de quelques portions de leurs habitats. A ce stade, leur absence peut affecter les communautés écologiques, mais elles ne seront pas inscrites par l'IUCN ou toute autre autorité jusqu'à ce que l'espèce dans son ensemble devienne menacée.

La connaissance du statut taxonomique des taxons est un prerequisite à toute action de conservation des espèces. Donc les plantes doivent être largement acceptées et reconnues par des noms scientifiques qui reflètent leurs positions dans la hiérarchie de la classification.

La préservation de la biodiversité végétale dépend de la taxonomie, parce que les mesures adéquates pour sa conservation ne peuvent être appliquées qu'avec une connaissance approfondie des espèces et de leur écologie.

La flore du bassin Méditerranéen constitue un mélange riche d'espèces à feuilles persistantes et à feuilles caduques adaptées à toute la gamme des climats de la Méditerranée et à l'environnement physique.

Malgré des milliers d'années d'occupation humaine, d'exploitation des terres et de modification continue de la structure de la végétation naturelle et de la composition en plantes, la flore méditerranéenne est toujours l'une des plus riches au monde (Regato 2001).

Le nombre d'espèces endémiques à la Méditerranée est aussi très élevé : 13000 plantes endémiques (la moitié de la flore) poussent dans la région, ce qui en fait la deuxième région la plus riche en plantes à fleurs endémiques dans le monde, derrière les Andes tropicales.

Un des problèmes principaux de la conservation des plantes en Méditerranée est que beaucoup de plantes endémiques ne le sont que sur des habitats petits et isolés et sont considérées comme menacées. La récolte irrationnelle et l'exportation de plantes aromatiques et de bulbes pour des usages cosmétiques, médicaux et ornementaux ont sérieusement endommagé la flore endémique de la Méditerranée (Regato 2001). Environ 5000 espèces de plantes méditerranéennes (17% de la

flore totale), appartenant à 87 familles dans 18 pays, sont classées comme menacées, rares ou vulnérables par l'Union mondiale pour la nature (UICN) et sont inscrites sur la liste rouge des plantes en voie de disparition.

L'Étude de la biodiversité du Liban, mise en œuvre par le Ministère de l'Agriculture a été réalisée en 1996 (Abi Saleh *et al.* 1996) grâce à l'appui financier du Fond Mondial pour l'Environnement (Global Environmental Facility ou GEF), à l'assistance technique du programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) et à l'appui administratif du Programme des Nations Unies pour le Développement (PNUD).

Malgré les affinités que présente la végétation libanaise avec celle du pourtour méditerranéen, sa diversité tient de la rencontre de plusieurs éléments floristico-géographiques sur le territoire libanais. Selon l'étude citée ci-dessus, on compte aujourd'hui 92 espèces endémiques au Liban. Certaines sont abondantes mais d'autres (38) sont rares et menacées de disparition.

L'étude de la biodiversité du Liban s'est basée principalement sur l'ouvrage magistral de Paul Mouterde intitulé « Nouvelle flore du Liban et de la Syrie » (Mouterde 1966), dont la dernière édition est parue à titre posthume en 1983. Cet ouvrage est considéré comme une référence de base pour la connaissance de la flore du Liban et de la Syrie. Or, il y a quarante ans la plaine de la Bekaa, par exemple, était peu cultivée et l'usage des herbicides était quasi-absent. La flore dans la région a donc irrévocablement changé depuis. Par conséquent, une multitude de plantes abondantes à l'époque sont aujourd'hui au bord de l'extinction, tandis que d'autres à répartition jadis limitée se trouvent actuellement sur la liste des espèces envahissantes. Malgré les études faites sur la flore libanaise (Abi Saleh *et al.* 1996, El-Haber & El-Haber 1993, Mouterde 1966, Tohmé & Tohmé 1981), l'actualisation des connaissances sur l'état de la flore au Liban demeure une véritable nécessité.

L'existence d'une douzaine d'espèces d'***Iris* au Liban** dont 4 endémiques strictes, toutes menacées d'extinction, justifie le choix de ce groupe pour prendre urgemment des mesures pour leur conservation.

Cependant, les différents taxons appartenant à ce genre restent difficiles à identifier en se basant uniquement sur les caractères morphologiques. L'identification génétique de ces taxons et l'affinement de leur statut taxinomique devrait permettre l'adoption de meilleures stratégies de conservation.

L'élucidation des rapports phylogénétiques des différents taxons appartenant à ce genre est

essentielle pour comprendre l'histoire évolutive des événements qui sont à la base de l'origine et de la diversification de ce genre.

En conservation, on accorde beaucoup d'importance à la documentation sur la répartition et surtout sur la variabilité génétique à différents niveaux hiérarchiques au sein des espèces (au sein des individus, au sein des populations, parmi les populations et parmi les régions). Une diversité génétique élevée est un gage de survie et de pérennité pour les espèces. Elles seraient théoriquement plus aptes à s'adapter face à des changements environnementaux plus ou moins importants (réchauffement climatique, tolérance à la pollution, ...). Les tests des marqueurs génétiques comprennent une variété de techniques pour analyser ces relations génétiques et le niveau de diversité.

Ce travail de thèse est constitué de cinq chapitres, répartis comme suit :

Le **chapitre I**, présente le contexte général et national de l'étude : la biodiversité et l'endémisme dans la région méditerranéenne, le Liban et sa flore.

Le **chapitre II**, porte sur le genre *Iris* en général, les iris du Liban en particulier et la section *Oncocyclus* dans le monde et au Liban, la génétique au service de la conservation et l'objectif de la thèse.

Le **chapitre III**, présente le matériel végétal et les méthodes utilisées : la cytométrie en flux, les deux techniques FISH et Feulgen et la phylogénie basée sur des marqueurs moléculaires et chloroplastiques.

Le **chapitre IV**, développe les résultats et les discute.

Le **chapitre V**, expose les perspectives de ce travail de thèse. A la lumière de toutes les données obtenues dans le cadre de ce travail, des perspectives dressent le bilan des différents résultats et soulignent l'importance d'une conservation évolutive et biogéographique du genre *Iris*.

Chapitre II : Généralités

I- Biodiversité et endémisme dans la région méditerranéenne

Le bassin méditerranéen abrite une grande diversité d'habitats et d'espèces. Myers *et al.* 2000 a désigné la région comme un point chaud (*hotspot*) de la biodiversité, en raison de sa riche biodiversité végétale et son statut menacé. Ce *hotspot* est une des plus grandes zones de plantes endémiques sur Terre et comprend plusieurs épices de la diversité végétale. Ces facteurs combinés font du bassin méditerranéen le troisième le plus riche *hotspot* dans le monde en termes de biodiversité végétale (Mittermeier *et al.* 2004).

Deux circonstances principales ont contribué à la grande biodiversité et les paysages spectaculaires du *hotspot* : (i) son emplacement à l'intersection de deux continents majeurs, l'Eurasie et l'Afrique et (ii) et la grande diversité topographique et différences d'altitude se situant entre le niveau de la mer et de 4165 mètres à l'ouest (Maroc) et 3756 mètres à l'est (Turquie). Son climat est unique, caractérisé par des hivers frais et humides et des étés chauds et secs. Néanmoins, les précipitations se situent entre 100 millimètres et 3 000 millimètres, ce qui entraîne une haute diversité de végétation dans la région. Les raisons évoquées ci-dessus, collectivement, ont abouti à la diversité et un endémisme végétal exceptionnellement élevé.

Environ 13 000 espèces végétales sont endémiques au *hotspot* ; pourtant, beaucoup d'autres sont découvertes chaque année (Plantlife International 2010, rapport non publié). Les « points-chauds » de biodiversité se caractérisent à la fois par des niveaux exceptionnels de richesse spécifique et d'endémisme et par des niveaux critiques de pertes d'habitats (d'au moins 70%). D'où la nécessité d'intensifier les efforts de recherche et de conservation qui doivent s'articuler actuellement autour des espèces les plus menacées.

Mais l'évaluation de la biodiversité végétale méditerranéenne semble difficile car la correspondance directe entre les frontières biogéographiques et les frontières politiques d'un état n'existent pas. Les niveaux taxonomiques adoptés varient aussi fortement selon que les taxonomistes optent pour une approche limitative ou globale. De plus, certaines évaluations effectuées ne considèrent que l'espèce, alors que d'autres prennent compte des espèces et sous-

espèces, les variétés et les formes douteuses, ce qui rend ardu l'établissement de bilans comparatifs (Médail & Quézel 1997).

I-1 Géographie, climat et histoire

La formation du bassin méditerranéen a débuté avec la convergence des plaques continentales il y a 120 Ma rapprochant l'Afrique de l'Europe. Ce qui a créé les montagnes périméditerranéennes entourant la Méditerranée (Figure 1). Les continents ont atteint l'apparence actuelle durant le Miocène-Pliocène, avec l'orogénèse des Alpes et le changement du niveau de la mer (Meulenkamp & Sissingh 2003).

La crise de salinité du Messinien qui s'est traduite par l'assèchement de la Méditerranée a créé un ensemble de conditions environnementales favorables à certains taxons et défavorables pour d'autres. Dans ce contexte, les îles méditerranéennes auraient joué le rôle de passage dans un environnement défavorable permettant la migration de certains taxons d'une rive à l'autre de la Méditerranée. Cet assèchement s'est brutalement achevé il y a 5,33 Ma (Krijggsman *et al.* 1999), quand la jonction entre l'océan Atlantique et la Méditerranée a été restituée, phénomène connu sous le nom de « Zanclean flood ».

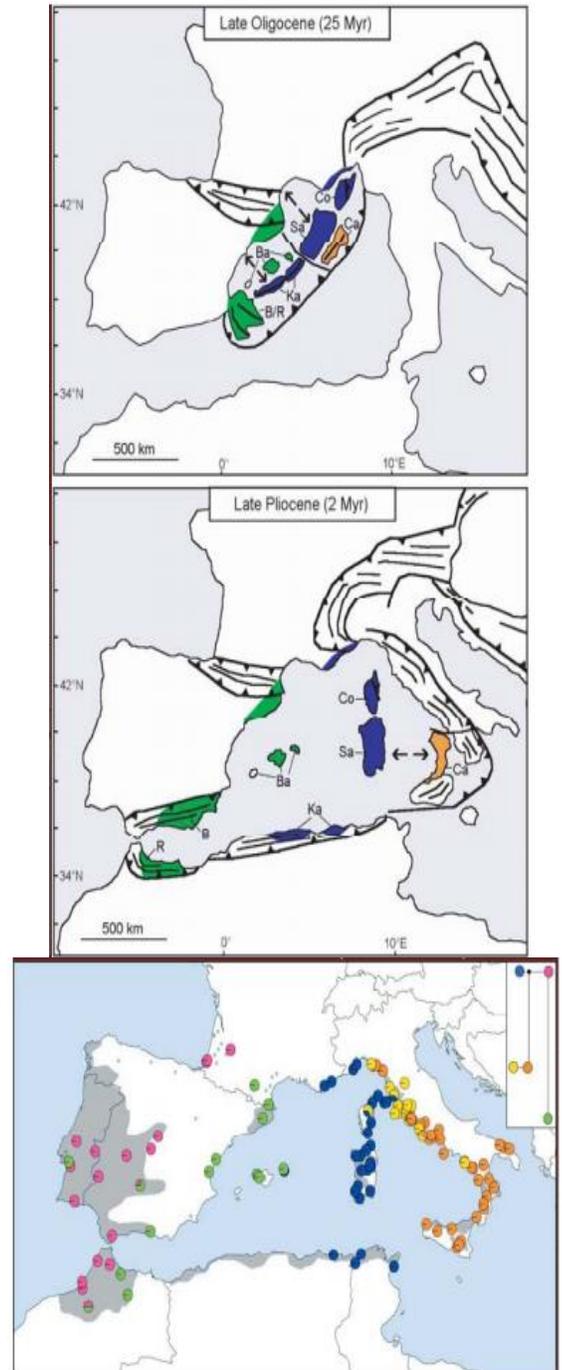


Figure 1: L'histoire tectonique du bassin méditerranéen (Magri *et al.* 2007)

Le bassin méditerranéen couvre 2,085,292 kilomètres carrés. Il s'étend sur 34 pays et territoires de Madère aux Açores à l'ouest jusqu'au nord de l'Irak à l'Est. Il comprend le Nord de l'Italie et de l'extrême sud du Maroc. La majorité de la Péninsule Ibérique et toutes les montagnes de l'Atlas au Maroc sont incluses dans ce *hotspot*. Dans le Sud de la Méditerranée, seules les parties étroites (<200 kilomètres carrés) côtières de l'Algérie, la Tunisie, la Lybie et l'Égypte appartiennent au bassin. Les régions du Moyen-Orient couvrent une grande partie des montagnes du Liban, d'Israël et de la Syrie et s'étendent de loin à l'intérieur que dans le nord Ira. Près de 30% de la Turquie fait partie de ce point chaud. Le *hotspot* s'étend aussi vers les pays des Balkans, couvrant les lacs karstiques et les rivières s'étendant à partir du niveau de la mer jusqu'à 1800 mètres au Mont Dinara.

La gamme altitudinale est énorme avec les montagnes de l'Atlas culminant à plus de 4000 mètres et la mer Morte descendant 420 mètres en dessous du niveau de la mer, le point le plus bas sur Terre. Les deux plus hauts sommets sont les montagnes du Haut Atlas (4165 mètres) au Maroc et Taurus (3756 mètres) en Turquie.

La partie marine du bassin méditerranéen comprend 2,500,000 kilomètres carrés, qui s'étend de 5,5°O à 36°E le long de 4000 kilomètres, et de 30 à 46°N. Le nom de la mer se réfère à *Mediterraneum*, qui signifie « mer au milieu des terres ». Les connexions uniques avec les mers et les océans qui l'entourent sont à travers l'étroit Déroit de Gibraltar (14 km de large et 320 mètres de profondeur) sur l'océan Atlantique, et par le Canal de Dardanelles (encore plus étroite et à seulement 70 mètres de profondeur), sur la mer Noire, ainsi que par l'artificiel canal de Suez avec la mer Rouge depuis 1869 (Hofrichter 2001). Le déroit de Sicile divise la mer en deux bassins principaux - le bassin de la Méditerranée occidentale (avec une plus grande influence de l'Atlantique) et de la Méditerranée orientale - qui restent dans une certaine mesure déconnectés (Cartes & Carrassón 2004).

Le bassin méditerranéen a donné lieu à quelques-unes des plus grandes civilisations de la planète. Les populations humaines denses ont été dispersées à travers le *hotspot* depuis plusieurs millénaires. Bien que le *hotspot* couvre une vaste zone, une grande partie de la végétation dans le bassin a été fortement modifiée par l'habitation humaine. Le bassin de la Méditerranée a le plus

faible pourcentage de végétation restante d'un *hotspot* (environ 5 pour cent). De nombreuses forêts ont été converties à l'agriculture.

Il serait illogique de se concentrer uniquement sur les habitats vierges car il y avait une coévolution significative à travers le *hotspot* avec des habitats semi-transformés contenant de nombreuses espèces rares et taxons menacés. La population actuelle du bassin est plus de 300 millions et elle est en augmentation. Les populations du nord et de l'est du bassin méditerranéen sont relativement stables mais le nombre augmente rapidement en Afrique du Nord, avec environ 160 millions aujourd'hui et probablement 206 millions d'ici 2025 (Derneği 2010).

Malheureusement, moins de 5% de la superficie totale du *hotspot* est sous une certaine forme de protection. Le faible niveau de protection, le niveau extrêmement bas de l'habitat naturel restant, la menace élevée et l'endémisme exceptionnellement élevé rendent le *hotspot* du bassin méditerranéen parmi les "plus chauds" de tous les points chauds de la biodiversité.

I-2 Richesse floristique : origines et distribution

La biodiversité méditerranéenne unique est rassemblée particulièrement dans les zones refuges où des espèces végétales ont pu persister durant les périodes glaciaires-interglaciaires du Pléistocène (Feliner 2014, Médail & Diadema 2006, Médail & Diadema 2009) (Figure 2). Les topographies très hétérogènes de la région méditerranéenne ont permis à beaucoup d'espèces de trouver un habitat convenable lors de changements climatiques (Hewitt 1999, Vogel *et al.* 1999). L'organisation et l'originalité de la biodiversité méditerranéenne actuelle existent grâce aux zones refuges (Petit *et al.* 2003, Tzedakis *et al.* 2002).

Dix zones principales sont des centres de diversité végétale (Médail & Quézel 1997). Elles comprennent environ 44% des endémiques du bassin. Ce sont le Haut et le Moyen Atlas en Afrique du Nord, le Rif Bétique au sud de l'Espagne et deux bandes côtières du Maroc et de l'Algérie, les Alpes Maritimes et Liguriennes à la frontière entre la France et l'Italie, les îles tyrrhéniennes, le sud et le centre de la Grèce, le sud de la Turquie et Chypre, Israël et le Liban, la Cyrénaïque en Libye et les îles de la Macaronésie.

La richesse en espèces du bassin Méditerranéen est souvent attribuée à l'histoire géographique et géologique complexe de cette région du monde. Des barrières géographiques se sont installées puis effacées en réponse aux changements du niveau des eaux et aux variations climatiques, notamment

celles liées aux diverses glaciations du Pléistocène. De telles barrières et changements climatiques drastiques ont été avancés pour expliquer des taux de spéciation et d'endémisme élevés (Médail & Diadema 2009). La flore méditerranéenne est donc le résultat de différenciations locales à partir d'espèces ancestrales, de multiples migrations de végétaux et processus d'hybridation ou d'introgession, répétées au fil du temps.

Selon Blondel *et al.* (2010), les quatre principaux facteurs qui influent sur les populations, les espèces, les habitats et les paysages hétérogènes de la Méditerranée sont biogéographiques, géologiques, historiques et humains.

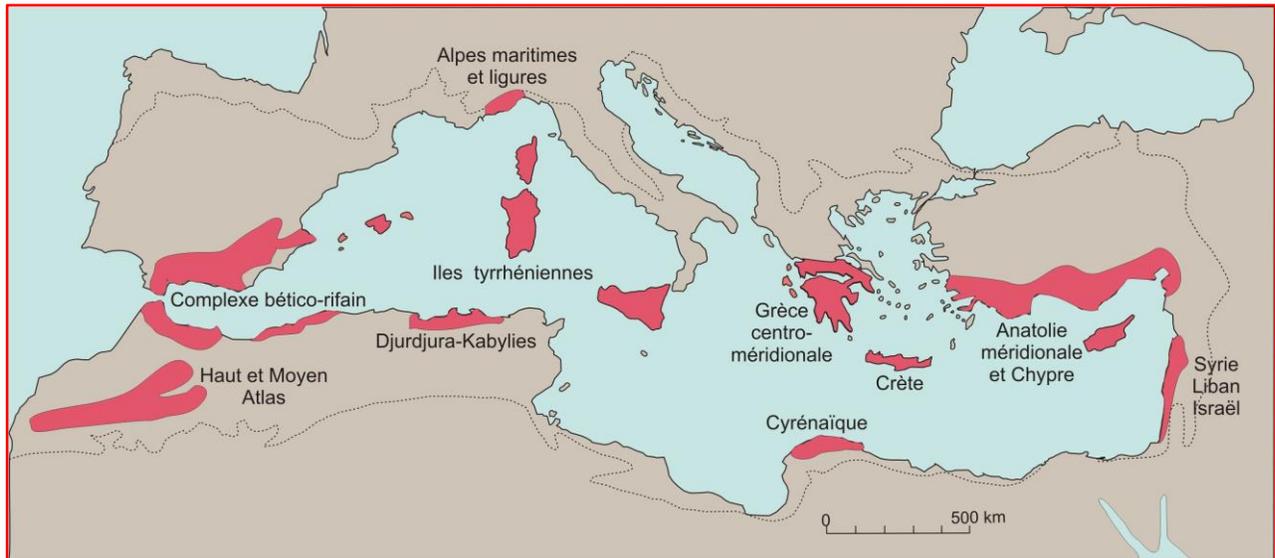


Figure 2: Points-chauds (*hotspots*) régionaux de biodiversité végétale de la région méditerranéenne (d'après Médail & Quézel 1997, complété)

II. Le Liban et sa flore

Le Liban se trouve à l'extrémité orientale du bassin méditerranéen. Il fait partie de la région qui occupe la jonction entre l'Europe, l'Asie et l'Afrique, avec une longueur d'environ 220 km, une largeur de 40 à 70 km et une superficie de 10452 km². La richesse biologique du Liban est intimement liée à la géomorphologie, à différentes influences climatiques régionales et aux microclimats. La géomorphologie couplée à une grande variabilité de sol, pluviométrie et température, a engendré une diversité et une richesse floristique élevées. La présence de hautes montagnes comme le Mont-Liban présente des zones subalpine et alpine est en grande partie responsable du nombre élevé d'espèces endémiques de l'ensemble Liban-Syrie qui, de plus, est localisé à la limite sud de la sphère d'influence euro-sibérienne (Zohary 1973).

Sur le plan de la topographie : (Figure 3).

La région 1 : La zone côtière inclut le littoral et le plateau continental, les plaines côtières et les contreforts du Mont-Liban jusqu'à des altitudes de 250 mètres. Le littoral libanais est d'environ 250 km de longueur (CDR/ECODIT-IAURIF 1997).

La région 2 : La chaîne occidentale ou chaîne du Liban mesure 170 km de long. Elle s'étend tout au long de la côte du Nord-Est au Sud-Ouest délimitant une plaine côtière dont la largeur varie suivant la plus ou moins grande proximité de cette chaîne du littoral. Le Mont-Liban atteint son maximum à 3088 mètres à Kornet es-Saouda dans le nord.

La région 3 : La plaine de la Békaa, est une dépression de terre qui sépare les chaînes du Mont Liban et de l'Anti-Liban. Elle correspond à un couloir fertile 8-12 km de largeur et d'environ 120 km du Nord au Sud. La plaine de Békaa est drainée par le fleuve Aassi au Nord et par le fleuve Litani au Sud.

La région 4 : La chaîne orientale de l'Anti-Liban, elle a comme la chaîne du Mont-Liban, une longueur de 170 km, mais, elle est en général moins élevée que celle-ci. Son sommet le plus important est le Mont Hermon ou Jabal Ach-Chaikh qui a une altitude de 2814 m.

La région 5 : Le Sud-Liban est un plateau élevé qui s'étend sur une courte distance dans les terres des rives occidentales du sud du Liban aux contreforts du Mont Hermon dans l'est. De nombreux cours d'eau saisonniers coulent d'Est en Ouest et se déversent dans la mer Méditerranée traversent cette région.

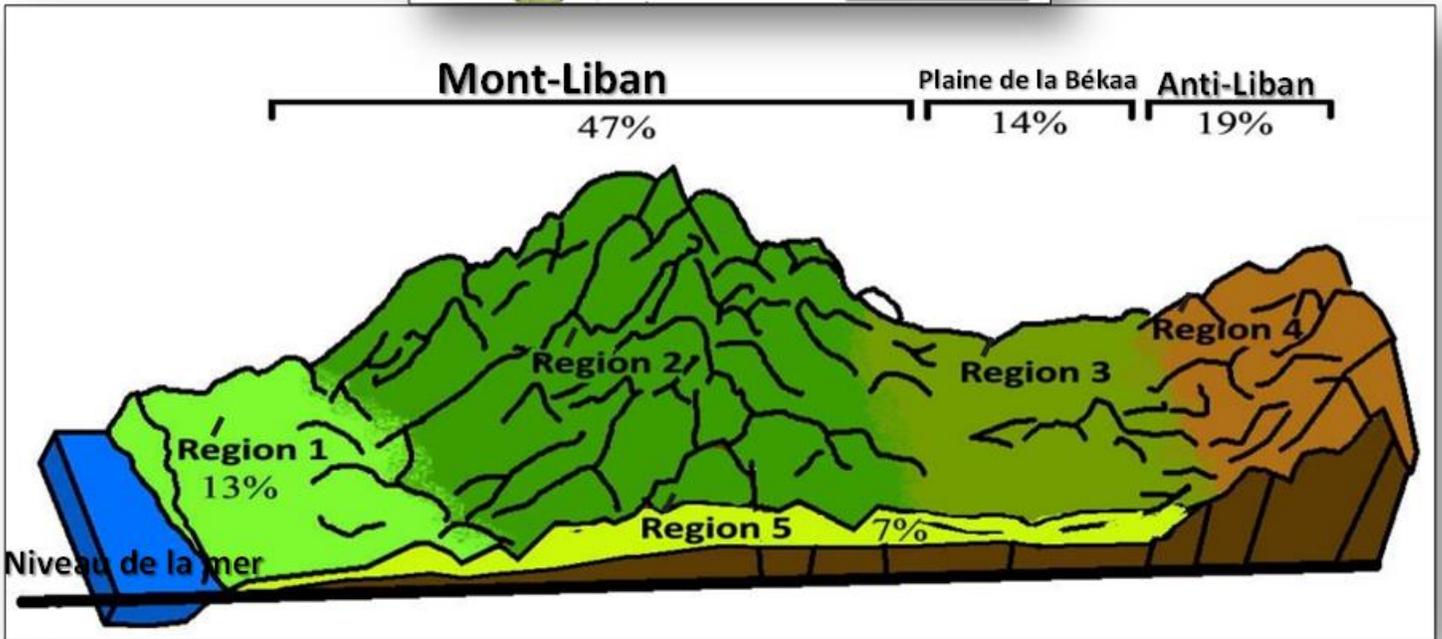
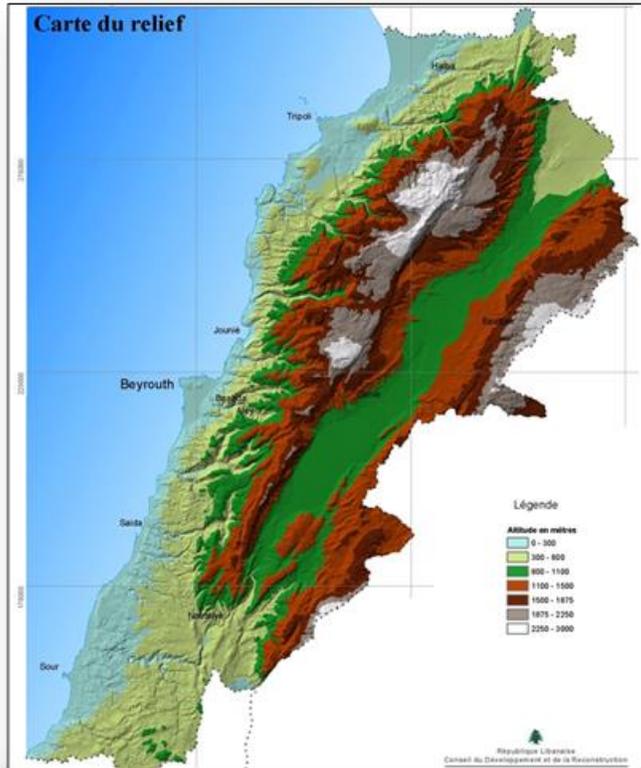


Figure 3: Le relief du Liban (République Libanaise, Conseil du Développement et de la Reconstruction) et sa topographie (source Jaradi R.)

En ce qui concerne le climat, c.à.d. particulièrement la température et la pluviosité, le Liban possède une transition progressive des conditions méditerranéennes aux conditions méditerranéennes continentales et sub-désertiques de l'ouest à l'est avec une pluviométrie moyenne annuelle allant de plus de 1400 mm / an à moins de 200 mm / an (Figure 4). Il est caractérisé par un climat de type méditerranéen avec des étés chauds et secs et des hivers plus courts, pluvieux mais à température modérée par les influences marines, alors que le printemps et l'automne marquent toutefois la transition entre les deux saisons principales. Cependant en raison de l'existence des deux chaînes de montagnes en particulier de la chaîne occidentale, et de la disposition de celles-ci par rapport aux vents dominants, le Liban présente de nombreuses variantes du climat méditerranéen: Le climat méditerranéen humide tout au long de la côte, le climat méditerranéen humide de type montagnard sur les pentes et les sommets, le climat méditerranéen continental est celui de la Békaa et enfin le climat de steppe qui règne sur le nord de la Békaa.

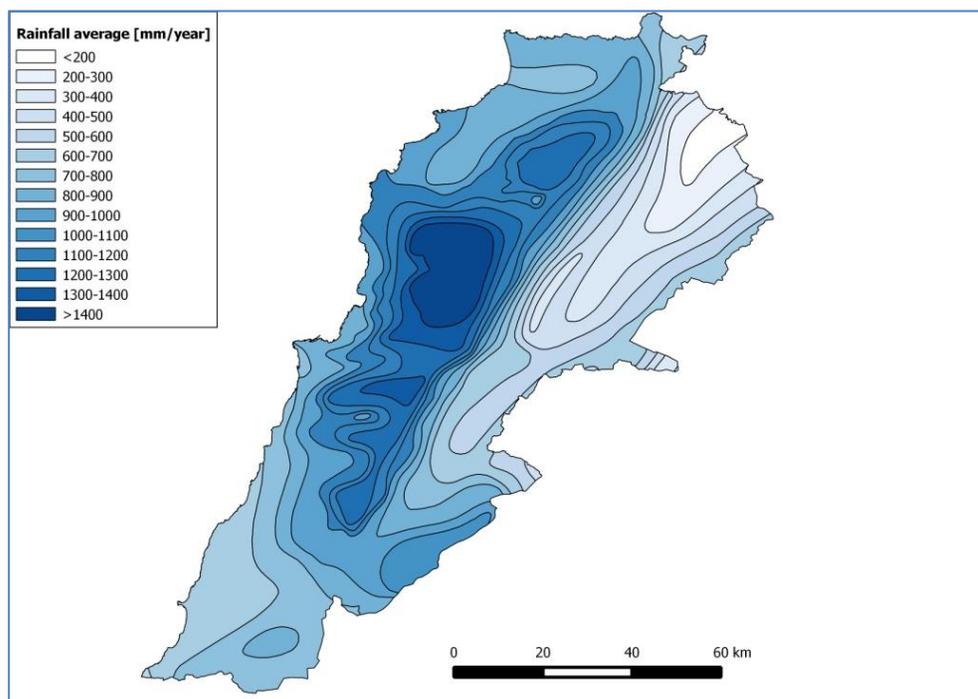


Figure 4: Carte des précipitations (isohyètes) du Liban (Plassard 1972)

L'effet d'isolement caractérisant les hauts sommets des deux chaînes de montagnes (Qamoua, Quornet es Sauda, Ehden, Sanin et le mont Hermon) se prononce sur la zone alpine et constitue un réservoir pour les espèces endémiques (Bou Dagher Kharrat *et al.* 2013). En conséquence, plus de cent espèces spécifiques du Mont Hermon et de la chaîne de l'Anti-Liban ont été comptés (Médail & Quézel 1997). Quelle est l'origine de cet endémisme ?

Les chaînes du Mont-Liban et de l'Anti-Liban sont situées à la limite sud de la sphère d'influence de la zone biogéographique euro-sibérienne (Zohary 1973). Au cours de la période Quaternaire, le refroidissement progressif et la sécheresse du climat ont causé l'extinction de nombreuses espèces. Les plantes méditerranéennes ont persisté pendant cette période dans les refuges glaciaires isolés qui sont reconnus pour être les sources pour une re-colonisation future. De nos jours, de nombreux auteurs stipulent que les montagnes au Liban ont agi comme un refuge et des stations relictuelles pour de nombreuses espèces pendant les périodes de glaciation du Quaternaire (Bou Dagher-Kharrat *et al.* 2007, Douaihy *et al.* 2011, Médail & Diadema 2009, Petit *et al.* 2002, Taberlet *et al.* 1998).

Cet endémisme significatif est expliqué par la situation de la région sur les frontières de diverses influences biogéographiques, par la diversité géomorphologique et topographique et l'effet de l'isolement des grandes chaînes de montagnes qui abritent une grande variété de niches écologiques sur de courtes distances.

Le Liban occupe 0,007% de la surface terrestre du monde, mais abrite 1,11% des espèces végétales (Tohmé & Tohmé 2007). Il abrite environ 2600 espèces de plantes terrestres. 8,5% d'entre elles sont endémiques (endémique du Liban, de la Syrie et de la Palestine) et 3,5% sont strictement endémiques du Liban. Par rapport à sa taille, le Liban possède l'une des plus fortes densités de diversité florale dans le bassin méditerranéen, qui à son tour est l'une des régions les plus biologiquement diverses dans le monde (Médail & Quézel 1997). De même, la végétation du Liban a un rapport espèces/surface exceptionnellement élevé de 0,25 espèces par km², comparativement à un ratio de 0,0081 par km² pour l'Afrique du Sud, 0,0044 pour le Brésil, 0,0021 pour l'Égypte, 0,022 pour la Jordanie, 0,015 pour l'Espagne, 0,017 pour la Syrie et 0,011 pour la Turquie. La diversité de la faune du Liban est également élevée par rapport à la superficie du pays en comparaison avec les pays voisins (0,028 espèces / km² pour le Liban ; 0,019 pour la Syrie, et 0,017 pour la Libye, et 0,46 pour la Jordanie).

Quarante neuf pour cent du nombre total d'espèces végétales qui vivent au Liban (1279 espèces) sont spécifiques aux pays du Moyen-Orient (Tohmé & Tohmé 2014). D'autres taxons sont cosmopolites et se trouvent en Europe, Afrique du Nord, le bassin méditerranéen et en Asie centrale, etc. Selon Tohmé & Tohmé (2014), 804 plantes sont endémiques à la région méditerranéenne, 108 sont strictement endémiques au Liban, 154 sont endémiques au Liban et en Syrie, 104 sont endémiques au Liban, en Syrie et en Turquie, 59 sont endémiques au Liban, en Syrie et en Palestine, 29 sont endémiques au Liban et en Turquie et 21 sont endémiques au Liban et à la Palestine. La plupart de ces plantes endémiques occupent les sommets du Mont-Liban. Ils appartiennent à 25 familles différentes: Apiaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cistaceae, Crassulaceae, Cyperaceae, Dipsacaceae, Ericaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Iridaceae, Liliaceae, Lamiaceae, Linaceae, Malvaceae, Orobanchaceae, Papaveraceae, Primulaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Violaceae. Plus de 40% de la flore endémique du Liban est estimé comme rare et / ou menacée (Khouzami *et al.* 1996). Une nouvelle évaluation en se concentrant sur les espèces endémiques selon les critères de l'UICN est en cours. Cela devrait contribuer à la définition des priorités afin de conserver cette riche flore.

Le Liban est intégré principalement dans la région méditerranéenne, mais des portions du territoire présentent une affinité irano-touranienne (*Citrus*, *Haplophyllum*, *Artemisia*, *Astragalus*, ...) ou saharo-Sindienne (*Capparis*, ...), et parfois dans le Nord, certaines enclaves de flore mésophile avec affinité mi-européenne (*Fagus*, *Tilia*, *Sorbus*, *Acer*, ...). Il y a aussi des phytochories plus complexes où les espèces, appelées "de liaison" sont distribuées dans deux régions biogéographiques.

Selon le travail d'Abi Saleh (1978), les montagnes méditerranéennes du Liban dans leurs aspects vers la mer peuvent être différenciées selon l'altitude dans les zones Thermo-Méditerranéenne, Eu-méditerranéenne, Supra-Méditerranéenne, Montagneux Méditerranéenne et Oro-Méditerranéenne. L'ensemble pré-steppe méditerranéen est également représenté de 1000 m sur les pentes du Mont-Liban et du nord de l'Anti-Liban.

III. Le genre *Iris*

Les iris ont de belles fleurs qui ont fasciné les botanistes, les horticulteurs et les amateurs depuis les temps anciens. L'admiration portée à ce genre est très ancienne, de nombreux documents anciens ont fait référence aux iris (L'Égypte ancienne, la Perse, la Bible et les livres sur les plantes médicinales écrits par Dioscoride au 6^{ème} siècle).

Les iris ont une immense importance médicinale, dans le traitement du cancer (antiproliférative des cellules cancéreuses), l'inflammation et les infections bactériennes et virales (Nadkarni 1967). Les rhizomes des espèces d'*Iris* sont aussi utilisés dans l'assaisonnement, et dans la fabrication des dentifrices et de certains parfums (Naves *et al.* 1947, Schinz *et al.* 1947).

Plus de 300 espèces d'*Iris* sont connues ; sans prendre en compte toutes les sous-espèces, les variétés, les hybrides naturels et les cultivars (De Munk & Schipper 1993).

III.1- Description botanique et classification :

Le genre *Iris* L. comprend environ 280 espèces réparties dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord avec quatre espèces en Afrique du Nord. Les *Iris* sont des plantes monocotylédones géophytes, dont les fleurs sont à symétrie tertiaire, avec trois tépales externes (les labelles) plus ou moins dilatés, et trois tépales internes (les étendards) généralement dressés. Les *Iris* ont généralement des feuilles volubiles basales unifaciales et un périanthe coloré fusionné distalement à la base d'un tube avec trois sépales horizontaux et trois pétales dressés. Le gynécée contribue également à la fleur de l'iris colorée avec des branches du style qui sont fusionnés à la base et un pétaloïde distalement allant au-delà du petit stigmate transverse comme une crête bifide. Les étamines sont insérées à la base des labelles. Le style présente des branches dilatées, pétaloïdes et bifides (Mouterde 1966).

La classification des taxons du genre *Iris* est une tâche difficile à cause du nombre et de la diversité des espèces, du grand nombre de formes ou de diversité morphologique et des hybrides naturels.

La classification retenue ici est la plus récente (Tableau 1), elle correspond à la classification de la *British Iris Society* (1997) et compte 6 sous-genres et 8 sections.

La classification subgénérique actuelle par Mathew (1989) est en grande partie basée sur le travail de Dykes (1913), Lawrence (1953) et Taylor (1976) et met l'accent sur des caractères tels que la barbe des sépales et / ou crêtes, élaïosomes de graines (cf. paragraphe IV- Section *Oncocyclus*), et le type de l'organe de stockage souterrain.

Tableau 1: Classification du genre *Iris* (British Iris Society 1997)

Genre	Sous-genre	Section
<i>Iris</i> L.	<i>Iris</i> L.	<i>Iris</i> L.
		<i>Psammiris</i> (Spach) J. Taylor
		<i>Oncocyclus</i> (Siemssen) Baker
		<i>Regelia</i> Lynch
		<i>Hexapogon</i> (Bunge) Baker
		<i>Pseudoregelia</i> Dykes
	<i>Limniris</i> Tausch	<i>Limniris</i> Tausch
		<i>Lophiris</i> (Tausch) Tausch
	<i>Nepalensis</i> (Dykes)	
	<i>Xiphium</i> (Miller) Spach	
	<i>Scorpiris</i> Spach	
<i>Hermodactyloides</i> Spach		

Les arils sont les espèces barbues des terres semi-arides du Moyen-Orient et de l'Asie centrale, ils comprennent les sections *Oncocyclus* et *Regelia*. Les « Arils » sont nommés ainsi car les graines ont un «élaïosome» : un appendice blanc ou crème à l'une des deux extrémités (cf. paragraphe IV- Section *Oncocyclus*).

III.2- Distribution géographique :

D'un point de vue géographique, le genre *Iris* se retrouve à travers les zones tempérées et tropicales de l'hémisphère Nord. Les iris « sans barbe » (apogons) sont les plus répandus (Figure 5) alors que les iris barbues (eupogons) (Figure 6) sont localisés sur une zone plus limitée (du sud de l'Europe à l'Asie du Sud-Ouest, jusqu'au Cachemire à l'est et jusqu'à la péninsule arabique au Sud) (De Munk & Schipper 1993, Köhlein 1987).

Presque toutes les espèces se trouvent dans les zones tempérées et tropicales de l'hémisphère Nord, dans des régions sèches, semi-désertiques, ou dans les zones montagneuses rocheuses les plus froides (Figures 7 et 8), (Kamenetsky 2012) et dans d'autres habitats comme les pentes herbeuses, les prairies, les tourbières et les berges.



Figure 5 : *Iris persica* (section *Scorpiris*)



Figure 6 : Un groupe d'*Iris sofarana* subsp. *kasruwana* (section *Oncocyclus*)



Figure 7 : Le village de Yammouneh, où pousse l'*Iris persica*.



Figure 8 : Le village d'Ehmej, où pousse l'*Iris sofarana* subsp. *kasruwana*

On s'est intéressé à étudier la section *Oncocyclus* car c'est une section assez diversifiée comprenant un grand nombre de taxons endémiques stricts, répandus sur un petit territoire, dans des habitats difficiles d'accès dans le Sud-Ouest de l'Asie. Ving neuf espèces appartenant à la section *Oncocyclus* sont menacées d'extinction (Walter & Gillet 1998). Rassembler des données sur cette section de nature génétique, taxonomique et phylogénétiques ne peut être qu'appréciable pour la suavegarde de ces espèces qui représente en même temps un très bon modèle pour étudier l'évolution de ses espèces.

IV. Section *Oncocyclus*

IV.1- Description botanique :

Oncocyclus est un mot grec, avec « *onco* » la masse, et « *cyclus* » le cercle, cette nomenclature fait référence à l'unique tache sombre sur les labelles des fleurs des iris *Oncocyclus*. D'un point de vue botanique, les espèces *Oncocyclus* étant caractérisées par une tige simple et uniflore. Les fleurs sont grandes et portent sur chaque labelle une barbe de poils (trichomes), ainsi une tache «onco» sombre signal à l'entrée du tunnel de la pollinisation et un élaïosome sur les semences appelé « élaïosome » (Avishai 1977, Avishai & Zohary 1980, Dykes 1913, Rix 1997) (Figure 9). Les labelles et les étendards contiennent à la fois des pigments jaunes et pourpres, le jaune prévalant surtout dans les barbes mais pouvant parfois dominer toute la fleur (Mathew 1989, Saad & Khuri 2003). La plupart des *Oncocycles* ont des fleurs pourpres uniformément colorées, ou présentant un réseau de veines et de points sur un fond plus pâle. Les étendards sont très développés, de même teinte ou plus clairs que les labelles (Mouterde 1966). Les tépales externes ont un onglet peu rétréci, couvert de poils ou de pubescence occupant généralement toute sa largeur. Les tépales internes sont toujours larges, très développés, tantôt de même teinte, tantôt de teinte plus claire que les tépales externes (Figure 10 et Annexe 3). Le fruit est une capsule allongée. Les graines présentent un élaïosome blanchâtre, souvent aussi large que la graine elle-même, qui joue probablement un rôle dans la dispersion des diaspores par les fourmis (Figure 11). Ces iris se caractérisent aussi par un rhizome épais, compact et généralement court, ainsi que par une croissance clonale assez lente (Köhlein 1987, Mathew 1989, Mouterde 1966).



Figure 9 : La barbe de l'*Iris antilibanotica*

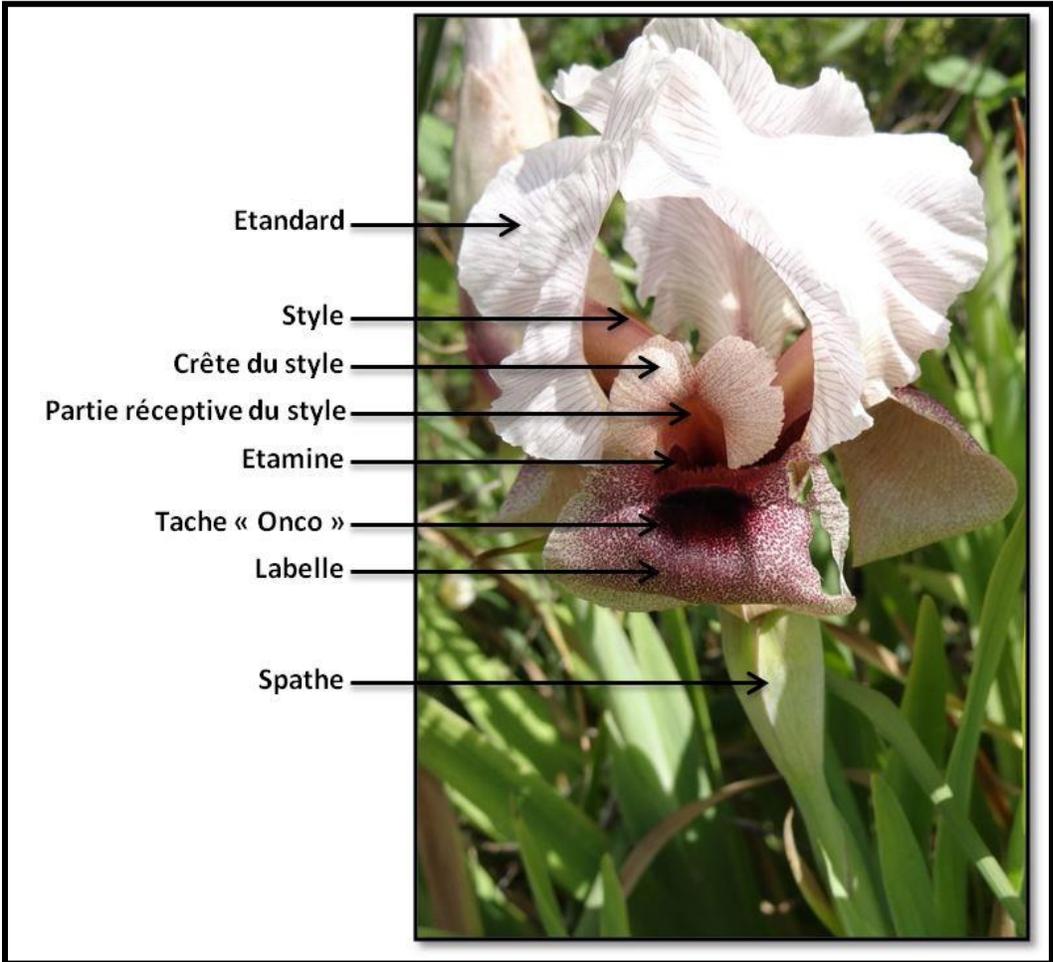


Figure 10 : Morphologie de la fleur d'un *Iris lortetii*

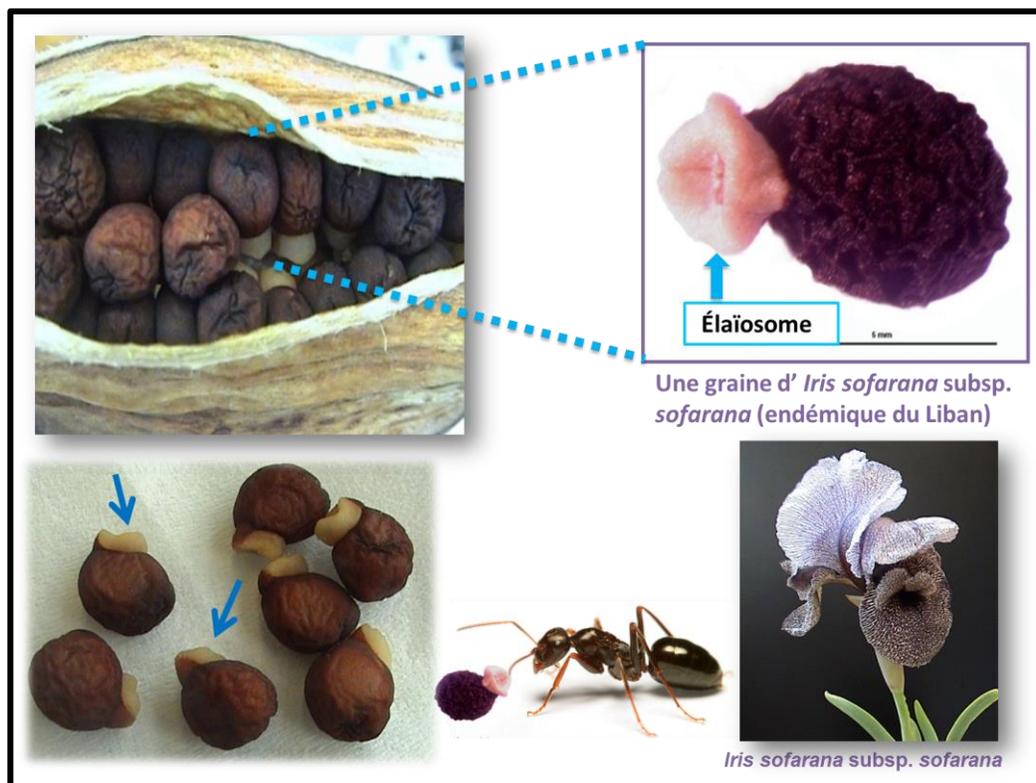


Figure 11 : Le fruit et la graine d'*Iris sofarana* subsp. *sofarana*

IV.2- Distribution géographique

Les iris *Oncoclylus* caractérisés par de grandes fleurs voyantes sont originaires du Moyen-Orient et de la Transcaucasie (Figure 12). La majorité des espèces de ce groupe sont endémiques strictes, qui poussent en petites populations ou sont dispersées localement à travers des collines rocheuses, des steppes et des déserts, du Nord de la région de Caucase vers le Sud jusqu'à l'Iran, à l'Ouest, jusqu'au l'Est de la Turquie, et au Sud, jusqu'au Sud de la Turquie (Wilson *et al.* 2016).

Sept des agrégats (*Susiana*, *Iberica*, *Acutiloba*, *Paradoxa*, *Lorteti*, *Maculata*, *Haynei*) ont été décrits dans la section *Oncoclylus* sur la base de la morphologie florale, la couleur de la fleur et

la micromorphologie des poils à l'entrée du tube ou tunnel de pollinisation et nommés selon la première espèce découverte de chaque agrégat (Avishai & Zohary 1980).

La section *Oncocyclus* (Siemss.) Baker appartient au sous-genre *Iris*.

Elle fait partie du groupe des *eupogons* ou «*Iris barbus*». Ces derniers ont une distribution beaucoup plus restreinte que les *Iris* « sans barbe » (*apogons*), qui se retrouvent dans la quasi-totalité de l'hémisphère Nord (Köhlein 1987) (Figure 12).

Les *Oncocycles* les plus anciens semblent venir des régions du sud-ouest de la mer Caspienne, les espèces du Levant étant des types plus récents (Davis 1946). Une carte de répartition des iris de la section *Oncocyclus* est présentée dans la figure 12.

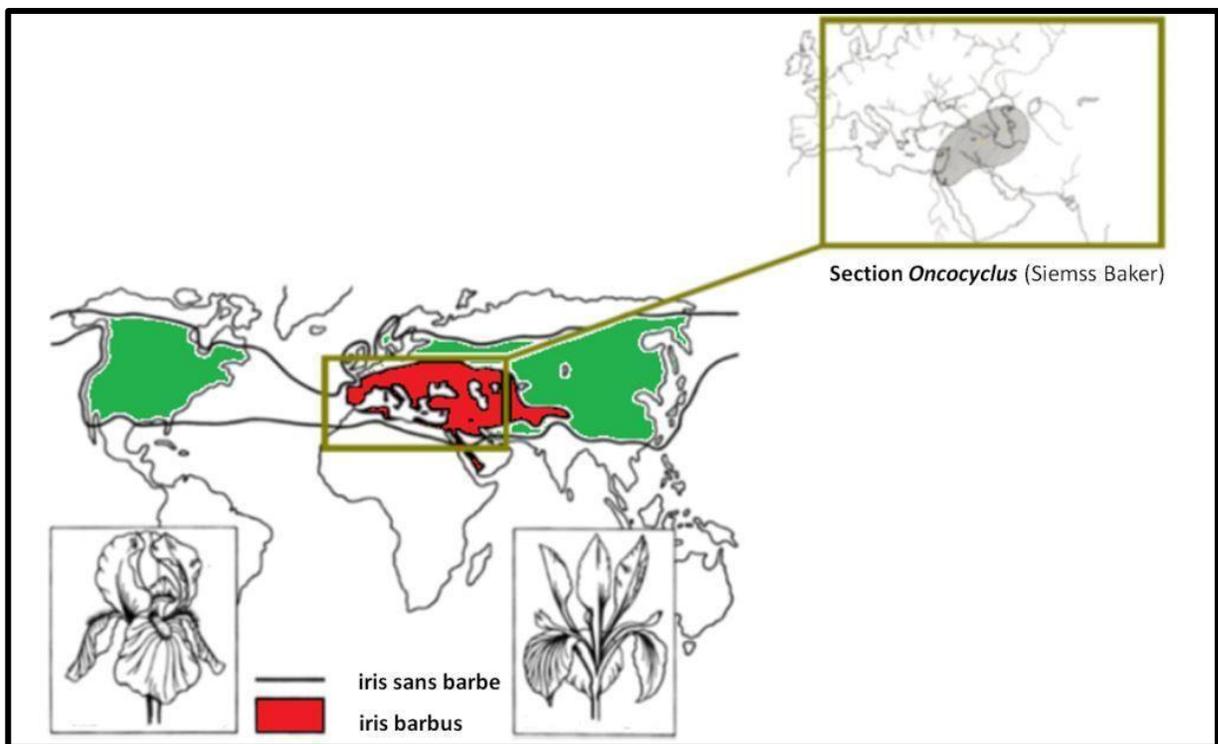


Figure 12 : La distribution géographique du genre *Iris* (Köhlein 1987) et de la section *Oncocyclus* (Killens, British Iris Society 1997).

IV.3- Taxonomie :

Les formes des iris très diversifiées d'une région à une autre, proviennent vraisemblablement d'une parenté commune peu ancienne. Elles ne sont séparées les unes des autres que par des caractères mineurs de taille, de forme des feuilles, de couleur, ce qui, logiquement, permettrait de les rattacher toutes à une seule espèce collective, soit *Iris susiana* L. (Saad & Khuri 2003), le représentant du groupe dans l'horticulture dès les siècles passés, soit *Iris sari* Schott, une des premières formes spontanées décrites.

En réalisant un herbier, les fleurs perdent leurs caractéristiques de couleur dès le début du séchage. Il arrive aussi que les noms donnés par des botanistes du siècle passé soient devenus obsolètes. Le spécialiste qui les étudiait avait en vue un iris mis en culture quelque part en Europe, de provenance orientale mal précisée. Ces cultures une fois déperies, seule la description parfois trop succincte en garde le souvenir, ce qui fait que la conservation en herbier d'un spécimen-type est elle-même décevante. Les technologies modernes nous offrent de nouvelles solutions, comme la photocopie, qui nous permet de conserver intacte la silhouette des échantillons et le scan qui apporte la couleur des fleurs. L'indication capitale, irremplaçable, est celle des sites. Ce qui les définit est en effet la zone où chacune d'entre elles, depuis la potentielle dislocation de l'espèce primitive, a pris ses caractéristiques actuelles.

Au niveau de la nomenclature et de la systématique, la section *Oncocyclus* est sans doute la plus compliquée du genre *Iris* (Köhlein 1987). Les travaux d'Avishai & Zohary (1980) montrent d'ailleurs que les différentes espèces de cette section, dont le nombre de chromosomes est constant ($2n = 20$), ne sont isolées que par des barrières géographiques, écologiques et saisonnières d'une part, et par les préférences des pollinisateurs d'autres part. Ils ont en effet montré que les croisements, entre la plupart des espèces reconnues dans cette section, donnent lieu à des hybrides viables et fertiles.

Il semble en fait qu'il existe un grand nombre de formes locales, plus ou moins isolées des autres, auquel on a souvent donné des noms spécifiques (*Iris sofarana* f. *franjieh*, *Iris sofarana* f. *westii*...). De même, des hybrides naturels ont souvent été considérés, à tort, comme des espèces (Saad & Khuri 2003) (comme *I. schelkownikowii* Fomin., *I. grossheimii* Woron. ...). C'est sans doute la raison pour laquelle les révisions taxonomiques de ce groupe ne font que réduire le nombre d'espèces.

Sur les 60 espèces décrites par Avishai en 1977, Mathew n'en cite plus que 41 en 1989, et Rix (1997) réduit ce nombre à 32 en en considérant 9 comme des hybrides naturels. Notons que la plupart des auteurs reconnaissent des « agrégats d'espèces » au sein de la section, sans un véritable statut taxonomique (Avishai & Zohary 1980, Köhlein 1887, Rix 1997, Sapir *et al.* 2003).

IV.4- Habitat, climat, saisonnalité et croissance

Seules des généralités peuvent être évoquées concernant l'écologie de cette section, vu sa diversité et le peu d'études qui en ont été faites (Köhlein 1987, Saad & Khuri 2003).

Les données écologiques associées à des spécimens d'herbier sont limitées, avec seulement 4-8% y compris les données concernant l'altitude, l'habitat et / ou le type de sol, ce qui est typique pour les spécimens d'herbier (Dulloo *et al.* 1999). Il n'existe pas d'exigences spécifiques de l'habitat, à l'exception d'un bon drainage du sol, traduit par la présence des iris sur des pentes rocailleuses avec une exposition sud. Les iris colonisent différents types de sols et aucune différence de sol n'a été trouvée entre les zones hébergeant l'iris par rapport aux zones où ils étaient absents (Saad 2006). Cependant, il existe des exemples d'adaptation des *Oncocyclus* à des types de sol spécifiques, tels que l'*Iris basaltica* (West 1963), qui pousse sur le basalte. Une telle spécificité n'est pas repérée dans la section *Oncocyclus* au Liban, où ils semblent se développer seulement à haute altitude, mais aussi dans les zones adjacentes en Jordanie et en Israël, certaines espèces poussent jusqu'au niveau de la mer comme *I. atropurpurea* et *I. jordana* qui se retrouve même dans des régions sous le niveau de la mer (près du Le lac de Tibériade, mer de Galilée) (Rix 1997).

Dans les habitats / biotopes où on les trouve, les iris sont présents parmi des « formations herbacées ouvertes » et de « steppes ouvertes avec plantes éparses » (Avishai 1977, Avishai & Zohary 1980). Ces formations végétales se trouvent dans les zones semi-arides, et dans les aires de transition avec le désert. Des *Oncocycles* se retrouvent aussi sur les arêtes montagnardes, notamment au Liban, ainsi que sur les hauteurs du Golan (Saad & Khuri 2003, Sapir *et al.* 2003).

Dans leur aire d'origine, les Oncocycles sont soumis à un climat méditerranéen sec. Ils subissent donc des étés chauds et secs, des hivers relativement froids et secs, et des printemps parfois humides (Köhlein 1987, Rix 1997).

Beaucoup d'espèces passent l'hiver sous un manteau de neige, et sont alors dans un état de dormance plus ou moins profond. Les espèces les plus méridionales ne sont pas recouvertes de neige, mais l'air froid et sec ralentit fortement leur croissance jusqu'au début du printemps. Donc, même au sud d'Israël, la floraison n'a pas lieu avant mars ou avril. Dans les montagnes ou plus au nord, la floraison a lieu de mai à juin, après la fonte des neiges (Saad 2003). En été, les Oncocycles entrent dans une longue période de dormance. La croissance racinaire, et parfois un début de croissance foliaire, commencent en automne avec les premières pluies, quand le sol est encore suffisamment chaud. Cette croissance sera ralentie par les basses températures hivernales, et sera très réduite jusqu'au printemps suivant (Mathew 1989).

IV.5- Le genre *Iris* au Liban

Le nombre exact des taxons d'*Iris* indigènes au Liban est difficile à définir, car la taxonomie des *Iris* dans la région souffre d'un manque de données, des études phylogénétiques et une ambiguïté taxonomique. Selon Mouterde (1966), 14 espèces d'*Iris* sont indigènes du Liban. Cependant, ce travail a besoin d'une mise à jour (Tableau 2), d'où l'importance de notre étude génétique qui aide à lever l'ambiguïté qui règne sur la taxonomie des iris libanais.

Tableau 2 : Les *Iris* du Liban

Sous-genre	Section	Taxon	Distribution
<i>Iris</i>	<i>Oncocyclus</i> (Siemssen) Baker	<i>Iris antilibanotica</i> Dinsm.	Liban, Syrie
		<i>Iris bismarckiana</i> Damman & Sprenger	Liban, Syrie, Israël
		<i>Iris cedreti</i> Dinsm.	Liban
		<i>Iris sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> Foster	Liban
		<i>Iris sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> Dinsm.	Liban
		<i>Iris lortetii</i> Barbey ex Boiss.	Liban
	<i>Iris</i> (Lawrence) Mathew	<i>Iris westii</i> Dinsm.	Liban
		<i>Iris mesopotamica</i> Dykes	Région Méditerranéenne
	<i>Iris albicans</i> Lange.	Cosmopolite	
<i>Hermodactyloides</i>	<i>Hermodactyloides</i> Spach	<i>Iris histrio</i> Reichenb.	Région Méditerranéenne
<i>Scorpiris</i>	<i>Scorpiris</i> Spach	<i>Iris palaestina</i> Baker	Liban, Israël
		<i>Iris persica</i> L.	Liban, Syrie
<i>Limniris</i>	<i>Limniris</i> Series <i>Laevigatae</i> (Diels) Lawrence	<i>Iris pseudacorus</i> L.	Cosmopolite
	<i>Limniris</i> Series <i>Unguicularis</i> (Diels) Lawrence	<i>Iris unguicularis</i> Poiret <i>cretensis</i> Dinsm.	Région Méditerranéenne

IV.6- Les iris *Oncocyclus* du Liban

Les iris *Oncocyclus* du Liban comprennent sept taxons, dont quatre strictement endémiques (Figure 13 et Tableau 2). On trouve ces derniers sur le Mont-Liban, à des altitudes élevées de 1300 m à 2000 m. Ces iris ont des distributions distinctes et limitées, sans connexion (Mouterde 1966, Köhlein 1987, Mathew 1989, Rix 1997, Saad & Khuri 2003).

Selon les auteurs, le statut taxonomique de ces taxons varie : si le statut d'espèce d'*I. cedreti* n'a jamais été contesté et que ses diverses descriptions concordent, il n'en est pas de même pour *I. westii* et *I. sofarana* subsp. *kasruwana*, qui oscillent entre le statut d'espèce et de sous-espèce d'*I. sofarana* (Saad & Khuri 2003).

Quoiqu'il en soit, la dernière classification IUCN (1997) (Walter & Gillet 1998) des *Oncocyclus* endémiques du Liban qui date de 1997 montre à quel point il est urgent de protéger ces iris (Tableau 3). Dans le cadre de la présente étude, les deux espèces *I. antilibanotica* et *I. westii* reportées comme éteintes (ex) ont été retrouvées. Il est à noter que dans le cadre d'un projet financé par le Critical Ecosystem Partnership Fund, notre laboratoire mène actuellement les investigations nécessaires pour mettre à jour le statut de conservation IUCN des ces iris. Le statut d'*Iris sofarana* est déjà publié (Bou Dagher *et al.* 2016) (Annexe 7).

Les Oncocycles libanais sont menacés, à plus ou moins court terme, par l'urbanisation grandissante de certaines zones du Mont-Liban, par l'herbivorie, l'utilisation pour l'agriculture de terres autrefois « incultes » et la cueillette, etc.

Les populations originales, autrefois très denses, ont été considérablement réduites au cours des cent dernières années à cause des différentes menaces citées ci-dessus et parce qu'il n'y a aucune loi au Liban qui protège ces espèces.

La connaissance de la biologie, la biogéographie et la taxonomie des espèces endémiques avance progressivement (Mousavi *et al.* 2016, Pacifici *et al.* 2015). De plus, l'écologie de la pollinisation de ces taxons est largement connue (Monty *et al.* 2006), ce qui pourrait favoriser l'élaboration d'une stratégie de conservation optimale. La connaissance du système de pollinisation, et des espèces animales associées, peut fournir des informations cruciales sur les facteurs limitant la reproduction, ainsi que les variations génétiques, tant spatiales que temporelles (Kearns *et al.* 1998, Larson & Barrett 1998, Velterop 2000, Wesselingh & Arnold 2000).

Tableau 3 : La classification IUCN (International Union for the Conservation of Nature, 1997) des *Oncocyclus*. E : En Danger ; Ex : Extinct ; I : Infréquent ; R : Rare ; V : Vulnérable.

Noms	Pays	Status IUCN 1997
<i>Iris antilibanotica</i> Dinsm.	Syrie	Ex
<i>Iris cedreti</i> Dinsm.	Liban	E
<i>Iris lortetti</i> Barbey	Israël- Liban	E-I
<i>Iris sofarana</i> Foster	Liban	E
<i>Iris westii</i> Dinsm.	Liban (Mashghara-Jezzine)	Ex

Figure 13: Photos des *Iris Oncocyclus* du Liban



Iris antilibanotica
blanc



Iris antilibanotica
mauve



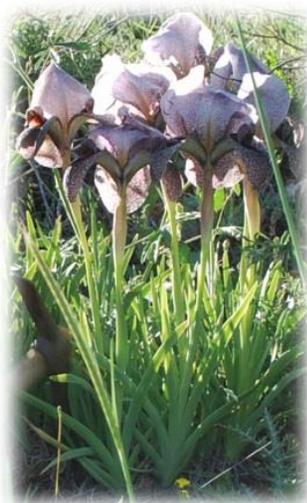
Iris bismarckiana



Iris lortetii



Iris cedreti



Iris sofarana subsp.
sofarana (Hazzerta)



Iris sofarana subsp.
sofarana
(Falougha)



Iris sofarana subsp.
Kasruwana (Ehmej)



Iris sofarana subsp.
kasruwana
(Hammana)



Iris westii

IV.7- Les menaces :

La cueillette de la fleur et la collection de plantes entières sont probablement les premières causes de la pression humaine sur les populations sauvages des *Oncocyclus*. La première mention de la culture des *Oncocyclus* date du 4^{ème} siècle avant JC quand le Pharaon égyptien Tutmosis III a introduit ces plantes après son expédition en Asie (Archibald 1999). Au début du Vingtième Siècle, les rhizomes ont été fortement prélevés en Turquie et au Moyen-Orient pour être vendus en Europe de l'Ouest (Archibald 1999).

Actuellement, on assiste à une prise de conscience de la nécessité de préserver les iris *Oncocyclus* dans plusieurs pays. En Jordanie, par exemple, l'iris noir (*Iris nigricans*) est l'emblème national du pays et les iris dits « Royaux » sont devenus le symbole de la protection de la nature en Israël. Certains taxons d'iris sont protégés en Turquie (*I. sprengeri*) et en Arménie (*I. paradoxa*) (Archibald 1999, Gazit-Ginsburg 1974, Shmida *et al.* 2002, Tan *et al.* 2003).

Les herbiers fournissent souvent des informations précieuses sur la répartition historique des espèces d'*Iris* au Liban. Ainsi, ces herbiers comprennent 58% des informations historiques et sont représentatifs de 66% des populations existantes des iris *Oncocyclus*. Cependant, la localisation des populations est mieux documentée dans la littérature que dans les herbiers. Le travail sur le terrain réalisé par Saad *et al.* (2009) indique un déclin des populations des iris *Oncocyclus*, avec deux populations apparemment disparues et deux qui peuvent avoir disparu sur les 12 historiquement rapportées, et ils n'ont pas pu localiser des nouvelles populations.

Au Liban, la principale menace pour les populations d'*Iris* est la perte d'habitat due à l'expansion des stations des sports d'hiver et les infrastructures telles que les nouveaux bâtiments et les réseaux routiers. L'activité humaine conduit ainsi à la fragmentation de l'habitat convenable. En conséquence, les populations d'iris *Oncocyclus* libanais sont fragmentées et représentent les vestiges de populations historiques plus grandes ou étendues. Les conséquences de la fragmentation sont la réduction du nombre des individus d'une population et du flux génétique entre les populations (Dudash & Fenster 2000) et l'efficacité de la pollinisation (Duncan *et al.* 2004). La petite taille des populations résiduelles les rend plus enclins à une

stochasticité démographique, environnementale et génétique (Fischer & Matthies 1998, Lande 1998, Oostermeijer *et al.* 2003). Le pâturage par les chèvres et les moutons domestiques est une autre menace pour les iris *Oncochilus* lorsque les gousses sont vertes et charnues (Saad *et al.* 2009) bien que Arafah *et al.* (2002) ont rapporté un pâturage sur toutes les parties de la plante.

V. La génétique au service de la conservation

V.1- Conservation des espèces

La réaction des scientifiques face à la crise d'extinction des espèces s'est manifestée vers la fin des années 1960 sous la forme d'une discipline hybride : la biologie de la conservation. Son but est d'associer science et gestion pour le maintien de la diversité du vivant sur la planète (Soulé 1986). C'est donc une discipline de crise fondée sur les principes de l'écologie, mais aussi de l'anthropologie, de l'économie, de la sociologie, etc. Cette discipline a obtenu graduellement le corpus théorique et prédictif d'une discipline scientifique propre mais elle se définit aussi comme une science de l'action. Elle est basée principalement sur l'analyse des processus de maintien de la biodiversité, à différents niveaux spatio-temporels et a comme but de présenter des éléments concrets pour la gestion conservatoire et durable des espèces et des milieux.

La conservation peut être considérée à différents niveaux (population, méta-population, communauté, écosystème et du paysage), mais le but commun est l'espèce. La population est un groupe d'individus de la même espèce et la métapopulation est l'ensemble des populations qui sont liées par des phénomènes de migration. Les études sur les communautés portent sur un ensemble d'espèces. La préservation d'un écosystème, consiste à protéger sa richesse mais aussi à maintenir les relations fonctionnelles entre ces espèces. Le paysage est l'ensemble de communautés d'espèces. Il est une zone de plusieurs kilomètres carrés, et se distingue par une combinaison caractéristique des écosystèmes interactifs.

V.1.1- L'espèce et la population : des concepts théoriques et pragmatiques

Plusieurs définitions sur le concept d'espèce ont été fournies (concept biologique, concept évolutionniste, concept phylogénétique). Nous adoptons comme définition celle de l'espèce biologique de Mayr (1982). L'espèce biologique est une communauté d'êtres vivants réellement ou potentiellement interféconds et produisant des descendants eux-mêmes interféconds. Ainsi, les différentes espèces sont isolées reproductivement et présentent une destinée évolutive indépendante qui est propre à chacune. Dans certains groupes de plantes (Fougères, Orchidées) où les phénomènes d'hybridation sont courants, cette définition n'est pas toujours adéquate.

La plupart des travaux de conservation sont focalisées sur l'espèce car c'est une unité de mesure de la biodiversité plus pratique que l'écosystème ou les gènes. De plus, l'IUCN

(Union Internationale pour la Conservation de la Nature et Ressources naturelles) et de nombreux pays utilisent l'espèce comme base de leur législation. En pratique, l'espèce reste l'outil privilégié de la conservation à travers le monde car c'est une unité légale, généralement facile à identifier et plus évocatrice pour le public.

Etudier une espèce exige de joindre les différents ensembles de sa population et dans ce contexte, la notion de population est aussi un outil réaliste pour les gestionnaires. La population peut être définie comme un groupe d'individus de même espèce présentant une ségrégation spatiale, génétique et démographique avec d'autres groupes. La ségrégation spatiale est la disjonction géographique des deux populations. Sur le plan génétique, les individus d'une population ont des caractéristiques génétiques communs qui ne sont pas partagées par les individus d'une autre population. Sur le plan démographique, les individus d'une population partageant des caractéristiques démographiques communes qui diffèrent des autres caractéristiques démographiques des populations. Il peut toutefois exister des flux d'individus ou de gènes entre populations qui peuvent avoir un rôle fondamental en terme de conservation. La migration peut permettre de sauver certaines populations en déclin.

La population représente donc un objet d'étude primordial en biologie de la conservation. Les plus petites populations présentent plus de risques d'extinction que les grandes, car le hasard intervient au niveau génétique, démographique et environnemental (Caughley 1994). La notion de taille, minimum de population viable (MVP : minimum viable population) a constitué l'un des premiers indicateurs de la viabilité d'une population (Boyce 1992, Nunney & Campbell 1993, Soulé 1986). Tout en focalisant la conservation sur l'espèce et la population, il est souvent essentiel de s'intéresser aussi à des échelles supérieures à celles de la population ou de la métapopulation. Dans les notions d'espèce clef de voûte, d'espèce emblématique et d'espèce parapluie (Simberloff 1998), la conservation d'une unique espèce est justifiable d'autant plus qu'elle favorise la conservation d'autres espèces, à l'échelle d'un type d'habitat, d'une communauté ou d'un écosystème. L'espèce parapluie est une espèce dont la restauration de l'habitat peut contribuer automatiquement à la conservation d'autres espèces. Toutefois, une des critiques à ce type d'approche est que les mesures de conservation prises dans le cadre de la conservation d'une unique espèce, qu'elle soit emblématique, clef de voûte ou parapluie pourront être néfastes à d'autres espèces.

V.1.2- Les cibles de la conservation

Rareté et menaces

Un reproche plus général à la conservation d'une unique espèce est l'amalgame qui peut exister entre la rareté d'une espèce et son caractère menacé. L'étude de la rareté a pour but de comprendre ce qui réduit l'abondance et la distribution d'une espèce rare. C'est pourquoi, des espèces taxonomiquement proches mais à distributions différentes peuvent être comparées pour déterminer des caractéristiques biologiques à la rareté (Lavergne *et al.* 2004). Néanmoins, les cibles prioritaires de la conservation sont les espèces en déclin et menacées, qu'elles soient rares ou communes. Le nombre important d'espèces rares et le manque de connaissances sur ces espèces mènent généralement à les considérer comme menacées. Toutefois, une espèce rare n'est pas forcément menacée. Il existe différents types de rareté liées aux propriétés essentielles des espèces et qui peuvent être classés en se basant sur trois critères : l'étendue géographique, la spécificité de l'habitat et la taille des populations (Rabinowitz 1981, Pullin 2002, Tableau 4).

Tableau 4: Les différents types d'espèces classées selon leur étendue géographique, leur spécificité d'habitat et leur taille de populations. Modifié de Pullin, 2002, d'après Rabinowitz. En grisé, le seul moyen pour une espèce d'être commune.

Etendue géographique	Espèce à grande aire de répartition		Espèce à petite aire de répartition	
	Habitat peu spécifique	Habitat très spécifique	Habitat peu spécifique	Habitat très spécifique
Spécificité de l'habitat				
Taille des populations élevées	Localement abondante avec une grande aire de répartition et dans plusieurs habitats	Localement abondante avec une grande aire de répartition dans un habitat spécifique	Localement abondante dans plusieurs habitats avec une aire de répartition réduite	Localement abondante dans un habitat spécifique avec une aire de répartition réduite

Taille des populations faibles	Localement réduite avec une grande aire de répartition et dans plusieurs habitats	Localement réduite avec une grande aire de répartition dans un habitat spécifique	Localement réduite dans plusieurs habitats avec une aire de répartition réduite	Localement réduite dans un habitat spécifique avec une aire de répartition réduite
--------------------------------	---	---	---	--

L'endémisme est une des manifestations de la rareté. C'est un caractère propre à une unité systématique dont l'aire de répartition est bien délimitée et réduite dans le monde (dernière colonne du Tableau 4).

Il faut distinguer entre la rareté liée aux propriétés intrinsèques d'une espèce et aux changements environnementaux naturels, d'une rareté liée et/ou causée par les activités humaines. Certaines espèces sont naturellement rares et subsistent ainsi sur de très longues périodes. Dans les cas où la rareté est accrue par les activités humaines, les menaces qui pèsent sur une espèce peuvent être facilement identifiées sur le terrain et l'établissement rapide des mesures de conservation devient possible. C'est le cas d'un déclin des populations causé par un pâturage, des incendies, l'assèchement d'une zone humide, ou encore à un aménagement touristique proche des populations. Dans ces cas, il est souvent facile de remédier au déclin des populations en minimisant les menaces ou en restaurant l'habitat. Néanmoins, si l'arrêt des nuisances ou la réhabilitation de l'habitat ne mènent pas à restaurer des populations viables, des études plus avancées deviennent indispensables. Donc pour pouvoir remédier au déclin des populations, il faut tout d'abord identifier ses mécanismes. Du point de vue de la conservation, c'est la nature et le degré de menaces qui ont causé la rareté qui font d'une espèce rare une cible pour la conservation (critères IUCN). Un des défis importants de la biologie de la conservation est de promouvoir l'évaluation des menaces qui pèsent sur une espèce et d'utiliser les connaissances scientifiques pour l'application pratique de la conservation.

V.1.3- Les moyens de la conservation

a- Identification

La taxonomie est la science qui a pour objectif de décrire les organismes vivants et de les regrouper en taxons pour les identifier puis les nommer. La taxonomie complète la systématique qui est la science qui organise le classement des taxons et leurs relations. De plus, les taxonomistes ont également participé à la connaissance de l'histoire naturelle des espèces, ce qui aide les études de biologistes et autres spécialistes de l'environnement. La taxonomie contribue aussi à la reconnaissance et la caractérisation de la biodiversité, et la conservation des espèces (Janzen 1993, Mace 2004). Il existait jusqu'à 2002 environ 6000 taxonomistes dans le monde, et cette science reste l'une des moins reconnues et des plus sous-financées malgré son importance (Wilson 2002).

L'identification de nouvelles espèces végétales est toujours aussi pertinente aujourd'hui que la découverte de nouveaux gènes et de nouvelles fonctions des gènes, et est cruciale pour les efforts de conservation dans les pays en développement. Des nombres énormes d'espèces végétales attendent toujours une description formelle. Les compétences nécessaires pour répondre à ce défi et leur capacité à attirer des financements ne devraient pas être rejetées. La communauté botanique est en passe de combler rapidement les lacunes entre le travail de l'herbier et la métagénomique, malgré la diminution des fonds (Kemler 2015). Un bon endroit pour commencer la relance de l'intérêt pour une éducation botanique, et donc renforcer cette communauté, serait d'inclure des espèces végétales impressionnantes dans des programmes télévisés sur la nature, plutôt que sur la mégafaune charismatique (Trias-Blasi & Vorontsova 2015).

b- Etude écologique

Etude écogéographique

Une étude écogéographique est le processus de collecte des données écogéographiques. Elle est définie comme «une collecte d'informations écologiques, géographiques, taxonomiques et génétiques et processus de synthèse, où les résultats sont prédictifs et peuvent être utilisés pour aider à la formulation des priorités de conservation et de collection » (Castañeda-Álvarez *et al.* 2011, Maxted 1995). Elle est généralement basée sur la collecte d'informations à partir des spécimens d'herbier, les obtentions des banques de gènes, des bases de données, de la littérature, et toutes les autres sources de données possibles et, si possible, doivent être complétées par la collecte de nouvelles données si le taxon est mal connu. Elle constitue une étape clé pour le développement de stratégies pour la conservation des ressources phytogénétiques. Un petit nombre d'études écogéographiques ont été menées au Liban et elles ont ciblé surtout certaines espèces cultivées (Ferguson *et al.* 1998, Maxted 1995, Talhouk *et al.* 2001).

Analyse démographique

La première étape de l'élaboration de programmes de restauration ou renforcement d'espèces menacées exige des connaissances sur la démographie (Miller & Duncan 2003, Pavlik *et al.* 1993). En plus de la description et l'explication du comportement populationnel des plantes, les études démographiques doivent constituer une double avenue pour étudier les phénomènes à deux niveaux d'organisation: au niveau individuel (ou sous-populationnel) et au niveau de la communauté (ou supra-populationnel). Les études démographiques à long terme peuvent être utilisées pour repérer et interpréter la variabilité au niveau individuel concernant ces composantes de la forme darwinienne individuelle telles que la survie différentielle, la croissance et la fécondité (Sarukhán *et al.* 1984). L'étude démographique est une des approches les plus indispensables pour l'évaluation de la viabilité des populations chez les plantes menacées (Lande 1988, Schemske *et al.* 1994). Des études démographiques détaillées peuvent montrer des stades critiques du cycle de vie et permettre des prédictions sur l'avenir du développement des populations (Menges 1992). Ces connaissances sont essentielles aux efforts de conservation des plantes rares et menacées (Fiedler *et al.* 1998, Nordbakken *et al.* 2004). Néanmoins, ces analyses sont longues, en particulier chez les espèces vivaces et sont généralement difficiles à mener face à des menaces à court terme.

Caractérisation des habitats

L'habitat est une zone avec la combinaison de ressources nécessaires (par exemple, la nourriture, la couverture, l'eau) et les conditions environnementales (la température, les précipitations, la présence ou l'absence de prédateurs et des concurrents) qui favorise l'occupation par des individus d'une espèce donnée (ou d'une population) et permet à ces individus de survivre et de se reproduire (Johnson & O'Neil 2001). Il comprend l'interaction entre les sols, l'hydrologie, la végétation et le climat. Un habitat fournit les fonctions et processus écologiques nécessaires pour préserver les communautés biologiques qui y vivent pour la totalité ou une partie de leur cycle de vie. La description de l'habitat d'une espèce menacée est très importante pour l'étude des populations à un niveau plus fin. En fait, l'hétérogénéité des microhabitats agit sur le succès reproducteur d'une espèce en affectant la taille des individus, la compétition, les pollinisateurs, la phénologie, la taille de la population et/ou la structure génétique (Albert *et al.* 2001).

c- Reproduction et dispersion

La connaissance de la reproduction est essentielle à notre compréhension des causes de la rareté et de la conservation des taxons de végétaux rares (Ayensu 1981, Drury 1974, 1980; Harper 1979, Kruckeberg & Rabinowitz 1985). Les plantes herbacées vivaces qui ne se reproduisent pas végétativement dépendent des graines pour introduire de nouveaux individus dans les populations. Les fleurs doivent donc être pollinisées pour former les fruits, les ovules doivent être fécondés, soutenues avec des nutriments, et d'échapper à la prédation pour former des graines viables. Les graines doivent être dispersées à des substrats convenables pour la croissance, où elles doivent germer. Tout lien faible ou rupture de cette chaîne d'événements limite la capacité de la plante de se reproduire et, si constant sur l'espace et le temps, peut contribuer à la rareté d'une espèce et à entraver sa conservation. La connaissance du mode de reproduction, des pollinisateurs et des vecteurs de dispersion est nécessaire pour développer une méthode de gestion efficace. L'analyse de la dispersion peut également contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans la rareté et la vulnérabilité d'une espèce (Olivieri & Vitalis 2001). L'analyse du succès reproducteur est essentielle pour prédire l'avenir des espèces végétales en déclin. L'étude de la biologie de la reproduction des plantes rares s'avère donc très importante pour leur conservation (Kruckeberg & Rabinowitz

1985). Beaucoup de chercheurs ont étudié les composantes simples ou combinées de l'écologie de la reproduction des plantes rares, telles que la fréquence de la floraison et la reproduction végétative (Morely 1982), la pollinisation (Deyrup & Menges 1997, Karron 1987, Macior 1978), le système de reproduction (Planisek 1983, Karron 1989), la prédation des graines (Gisler & Meinke 1997), la germination des graines (Baskin & Baskin 1979 ;1997, Baskin & Quarterman 1969, Clark *et al.* 1997, Florance 1997, Halse 1988, Jacobs 1993), le système d'élevage et la germination (Clampitt 1987, Menges 1995), et la production de semences et la prédation (Menges *et al.* 1986). Cependant, peu d'études de plantes rares décrivent les limites de la reproduction, à tous les stades à partir de la production de fleurs, par la dispersion de semences susceptibles de germer (Massey & Whitson 1980, mais voir Crowder 1978, Pavlik *et al.* 1993).

d- Génétique moléculaire au service de la conservation

Les programmes pour les espèces en danger dans le monde (par exemple, l'IUCN) identifient et protègent des espèces, sous-espèces et des populations menacées et en voie de disparition. Bien que ces désignations peuvent être controversées dans une perspective évolutive, elles peuvent «favoriser ou empêcher» le rétablissement des espèces ou des groupes spécifiques vu que les ressources attribuées à leur rétablissement sont souvent prioritaires en fonction de leur statut taxonomique (voir Ball & Avise 1992, O'Brien & Mayr 1991, Ryder 1986). Inversement, la reconnaissance qu'une espèce, sous-espèce, ou une population ne se distingue pas des taxons étroitement liés non menacés, permettra l'utilisation des ressources pour des besoins plus critiques.

Les études morphologiques ne sont pas suffisantes pour expliquer les relations systématiques entre les espèces. Il est devenu indispensable d'utiliser des marqueurs moléculaires pour résoudre les problèmes taxonomiques et évolutifs. Le progrès dans les domaines de la biologie moléculaire et de la technologie génétique, surtout les technologies de séquençage d'ADN, est devenu très utile pour une détermination rapide et précise des relations phylogénétiques (Catalán *et al.* 1997, Saarela *et al.* 2007).

Récemment, les espaceurs transcrits internes (ITS) du 18S ribosomique 26S-5.8S-cistron sont devenus la région cible la plus utilisée dans le génome nucléaire pour les études sur l'évolution des groupes de plantes diverses (Baldwin *et al.* 1995, Álvarez & Wendel 2003, Hughes *et al.* 2006). Les quatre principales raisons de cette utilisation généralisée selon (Baldwin *et al.* 1995) sont :

La disponibilité de plusieurs ensembles d'amorces de PCR universelles qui fonctionnent avec une grande diversité de groupes taxonomiques (Gardes & Bruns 1993, White *et al.* 1990),

La structure multicopie facilite l'amplification de la PCR même des spécimens d'herbier,

La taille modérée de l'ITS (< 700 pb) permet généralement l'amplification et le séquençage sans amorces internes même si elles sont remarquablement longues exceptions dans plusieurs groupes de gymnospermes (Gernandt *et al.* 2001).

A cause de leurs niveaux de variation, les ITS fournissent souvent des marqueurs moléculaires assez convenables pour les études évolutives au niveau de l'espèce. Il s'agit surtout des sujets tels que l'origine de taxons polyploïdes, l'hybridation, l'introgession et, surtout, l'inférence phylogénétique (divergence de séquence jusqu'à 40% dans les comparaisons paires entre les taxons congénères signalés dans les premières études (Zimmer *et al.* 1980).

Il existe aussi d'autres avantages des séquences ITS qui sont leur héritage biparental par rapport à l'héritage uniparental de l'ADN des organites, et l'uniformité intragénomique assumée à cause de la homogénéisation active des copies de répétition au sein et entre loci qui se produisent dans ces régions multicopies, dite évolution concertée (Arnheim 1983, Zimmer *et al.* 1980). D'autre part, chez les hybrides et les introgressants dans lesquels l'évolution concertée n'a pas des copies homogénéisées, les ITS peuvent contribuer à l'identification des progéniteurs ou lignages impliqués (Sang *et al.* 1995).

L'intron *trnL* (UAA) et l'espaceur intergénique entre l'exon *trnL* (UAA) 3' et le gène *trnF* (GAA) semblent être bien adaptés pour déduire la phylogénie entre les taxons étroitement liés: (i) ADNcp double brin peut être facilement amplifié pour une large gamme taxonomique des espèces végétales, et (ii) la taille de ces régions non codantes est assez petite pour nous permettre d'obtenir toute la séquence en utilisant seules les amorces d'amplification. Avec l'utilisation de ces régions, il est maintenant possible d'étendre l'utilisation de l'ADNcp et essayer de résoudre les relations phylogénétiques au niveau intragénérique si nécessaire en liaison avec d'autres régions de la molécule, par exemple, une région codante comme *matK* (Gielly & Taberlet 1994).

Un grand nombre d'études sur la conservation ont montré comment les outils moléculaires peuvent être utilisés pour traiter les problèmes spécifiques de conservation. Les études qui ont utilisé plusieurs techniques moléculaires pour aborder les questions liées ont fourni une évaluation plus précise que celles qui ont utilisé une seule technique. Les techniques moléculaires fournissent également un aperçu du rôle des individus dans une population, les relations entre les populations et les différences entre les espèces. La plus grande compréhension des informations moléculaires se produit, cependant, quand elles sont utilisées en conjonction avec des données écologiques, démographiques, comportementaux, et les données physiologiques collectées sur le terrain.

e- La cytogénétique

La cytogénétique est un outil important dans l'évaluation de la biodiversité. La caractérisation de la biodiversité est essentielle pour la conservation, et à ce titre la cytogénétique peut apporter des informations précieuses sur le nombre chromosomique, sur le caryotype, le niveau de ploïdie ou sur la taille du génome. Chester *et al.* (2010) ont déjà prévu que les méthodes cytogénétiques utilisées dans l'amélioration des plantes et dans l'étude de la biodiversité seront nécessaires dans un avenir proche.

Les espèces peuvent être identifiées au moyen de caractères diagnostiques à différents niveaux de l'organisme / organisation du génome (Ráb *et al.* 2006). La variation génétique est une caractéristique fondamentale de la plupart des biotes. Récemment, des progrès dans les technologies génétiques ont permis des enquêtes profondes de la variation génétique entre des groupes vivants distincts ou même des groupes éteints. Ces méthodes ont permis l'exploration de diverses questions liées à la biodiversité et sa conservation. Parmi ces approches, des études cytogénétiques ont révélé être un outil utile dans plusieurs cas, en identifiant les caractéristiques chromosomiques du génome d'une espèce. En effet, dans certaines situations, des changements dans le nombre et la structure de chromosomes ont été corrélés avec un certain nombre de nouvelles caractéristiques morphologiques et environnementaux conduisant à la divergence et l'adaptation (Hoffmann & Rieseberg 2008). Par rapport à divers autres marqueurs génétiques, la cytogénétique peut révéler un ensemble de caractères, qui ne sont pas accessibles par d'autres méthodes et ainsi explorer un autre niveau de composante génétique de la biodiversité.

Pendant de nombreuses années, les méthodes classiques de caryotypage ont été utilisées pour déterminer le nombre de chromosomes et leur morphologie ainsi que la présence de systèmes de chromosomes sexuels différenciés morphologiquement chez de nombreuses espèces animales et végétales. Cette approche a contribué de manière significative à la connaissance actuelle de la diversité et / ou la stabilité chromosomique parmi beaucoup de taxons distincts. L'avènement des techniques de banding chromosomiques (c-à-d C-, G-, R-, Q- et H-banding et colorations aux AgNOR₃, DAPI et CMA₃) utilisées pour la différenciation des régions spécifiques le long des chromosomes, a pu démontrer de nombreux changements importants au niveau du caryotype des espèces étudiées. L'utilisation combinée récente des études cytogénétiques, génétiques et moléculaires raffinées nous a aidés à comprendre le lien entre

l'organisation génomique et la biologie fonctionnelle, l'adaptation des espèces et la survie de l'espèce, et ainsi a commencé une nouvelle ère de la génomique et de la phylogénomique évolutives. Des avancées majeures dans la cytogénétique ont été soulevées dans les deux dernières décennies, avec l'application de détection *in situ* de séquences d'ADN sur les chromosomes, parties de chromosomes ou de l'ADN génomique tout entier. Les techniques des hybridations *in situ* les plus anciennes, réalisées dans les années 1960, utilisaient des sondes radioactives marquées avec des radio-isotopes (par exemple, ³H, ³⁵S, ¹²⁵I et ³²P). Depuis le début des années 1980, les sondes ont commencé à être marquées avec des molécules non radioactives. Bien que plusieurs méthodes basées sur des réactions enzymatiques en utilisant la phosphatase alcaline, la bêta-galactosidase ou la peroxydase de raifort étaient disponibles, la méthode la plus couramment utilisée dans les années suivantes a été basée sur l'utilisation d'éléments fluorescents; par conséquent, la technique a été nommée Fluorescence *In Situ* Hybridation ou FISH (Pinkel *et al.* 1986).

Une des applications les plus importantes de la technique FISH a été son utilisation dans la cartographie physique de séquences d'ADN sur les chromosomes. Son développement a conduit à l'avancement des études chromosomiques, non seulement pour les analyses de cartographie et génomiques physiques, mais aussi comme un outil pour les études évolutives et phylogénétiques. Avec la technique de FISH, il est possible de cartographier l'emplacement des séquences d'ADN sur les chromosomes des espèces proches pour montrer non seulement leur conservation probable mais aussi leur diversification lors des processus évolutifs. Ainsi, l'avènement de FISH a permis le passage de la «cytogénétique classique» (noir et blanc) à la "cytogénétique moléculaire" (couleur) et la combinaison avec les données génomiques récemment à l'ère phylogénomique, ce qui a permis l'intégration de l'information moléculaire de séquences d'ADN avec son emplacement physique le long des chromosomes et des génomes (Schwarzacher 2003).

La caractérisation simple du caryotype chez certaines espèces peut être suffisante pour identifier les variantes intra et inter-cytotype et de caractériser les espèces. Cependant, dans la plupart des cas, juste les descriptions de caryotype semblent être concluantes lorsqu'elles ne sont pas couplées avec d'autres méthodes capables de générer des marqueurs chromosomiques plus précises pour la cytotaxonomie ou les applications phylogénétiques. En partie, cela découle de l'incapacité à discerner ni les mécanismes impliqués dans l'évolution du caryotype de certains groupes (homologies par rapport aux convergences) ni la

genèse de nouvelles structures chromosomiques. Dans certains groupes, le caryotype et les aspects cytogénétiques associées à la structure chromosomique, identifiés par des techniques cytogénétiques conventionnelles, montrent un grand nombre d'espèces partageant le même motif caryotypique, ce qui limite leur utilisation à des inférences taxonomiques et phylogénétiques (Molina 2007, Neto *et al.* 2011). En revanche, l'organisation moléculaire et la cartographie cytogénétique de nombreux gènes pourraient être un ensemble de données significatives pour la caractérisation des segments particuliers de biotes, fournissant des informations très importantes pour la phylogénomique. De manière remarquable, une fraction substantielle de tout génome eucaryote est constituée de séquences d'ADN répétitives, notamment satellites, minisatellites et microsatellites et éléments transposables (Jurka *et al.* 2005). Ces séquences d'ADN répétitives sont censées résulter de nombreux mécanismes, à partir de l'amplification de séquence directe par recombinaison inégale des régions d'ADN homologues à l'écoulement inverse de l'information génétique en utilisant une molécule d'ARN intermédiaire. En raison de la hypervariabilité de répétitions en tandem, ces segments génomiques sont très polymorphes et considérés comme de bons marqueurs moléculaires pour le génotypage des individus et des populations (Jeffreys *et al.* 1985). Aujourd'hui, de nombreuses études ont été menées en utilisant des séquences d'ADN répétitives en tandem comme sondes pour la cartographie cytogénétique de FISH dans les organismes vivants distincts; ces séquences comprennent des répétitions de séquences simples, de l'ADN satellite, clones BAC, et les gènes d'ARNr. En général, ces sondes fournissent des signaux très visibles en raison de leur répétition abondante et de la distribution dans le génome, et ils pourraient même générer un caryotype FISH unique pour chaque espèce (par exemple, Badaeva *et al.* 2007), permettant une vision évolutive et phylogénétique des espèces apparentées. Contrairement aux gènes fonctionnels, des séquences d'ADN répétitives sont considérées comme ayant évolué dans des conditions différentes, échappé aux pressions sélectives qui agissent sur les segments non répétitives (Charlesworth *et al.* 1994). En ce sens, ils constituent de bons marqueurs chromosomiques pour détecter des événements récents de différenciation. En résumé, le développement et l'amélioration des analyses cytogénétiques ont considérablement élargi les méthodes d'études chromosomiques et ont joué un rôle important dans la caractérisation précise de la structure des génomes. La disponibilité actuelle d'un nombre toujours croissant de génomes eucaryotes entièrement séquencés a ouvert de nouvelles "avenues" pour faire avancer la cytogénétique. Couplée avec l'application de la bioinformatique, l'intégration de l'analyse des chromosomes et des données

génomiques représente des outils prometteurs pour l'avenir de la cytogénétique. Cependant, l'information classique concernant le nombre et la morphologie de chromosomes et les données de marquage n'est pas obsolète et devrait donc toujours être utile pour élucider les aspects fondamentaux et appliqués de la cytotaxonomie et de l'évolution du caryotype.

f- Cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été initialement développée pour des applications médicales, mais plus tard, elle est devenue utile dans différents domaines pour des applications telles que le comptage des cellules, le tri et la détection par biomarqueur. Bien que le premier document sur l'analyse des noyaux de plantes en utilisant la cytométrie en flux a été publié en 1973 (Heller 1973) la percée dans l'analyse de l'ADN de plantes par la cytométrie en flux est venue à la fin des années 1980, lorsque les chercheurs ont commencé à appliquer cette technologie de façon persistante sur les plantes. Fondamentalement, les botanistes utilisent la cytométrie en flux pour mesurer la teneur en ADN dans les noyaux de plantes.

La valeur C de l'ADN nucléaire et la taille du génome sont des caractères importants de la biodiversité avec une signification biologique fondamentale et de nombreuses utilisations (Bennett & Leitch 1995, Bennett *et al.* 2000). La valeur C de l'ADN d'un organisme est la quantité d'ADN nucléaire dans son noyau gamétique non répliqué (Swift 1950), quel que soit le niveau de ploïdie du taxon. La première valeur C estimée pour quelques plantes a été faite dans les années 1950 en utilisant des méthodes d'extraction chimique fastidieuses. Le développement ultérieur d'autres techniques, y compris la microdensitométrie de Feulgen, la cytométrie en flux et la cytométrie de l'image de l'ADN, ont permis une estimation de l'ADN à la fois plus facile et plus rapide, de sorte que les données de la valeur C soient désormais disponibles pour plus de 8500 espèces de plantes. Les informations sur les valeurs C sont utilisées dans un large éventail de domaines biologiques (par exemple, voir Bennett *et al.* 2000 et Bennett & Leitch 2011). L'intérêt pour ces données, à en juger par le nombre de nouvelles estimations publiées, est resté élevé au cours des dernières années (Bennett & Leitch 2011). En effet, de plus en plus les données sont utilisées pour les analyses comparatives à grande échelle (par exemple, y compris les études de la relation entre la taille du génome et chromosomes B (Levin *et al.* 2005), la durée du cycle cellulaire (Francis *et al.* 2008), la taille et la masse des semences (Beaulieu *et al.* 2007), la forme de la croissance des plantes et de la distribution (Ohri 2005), la taille des cellules de la feuille et la densité stomatique (Beaulieu *et al.* 2008, Hodgson *et al.* 2010), les modèles d'envahissement

(Kubešová *et al.* 2010, Lavergne *et al.* 2010) et les modes de l'évolution de la taille du génome (Beaulieu *et al.* 2010, Leitch *et al.* 2005; 2009; 2010, Leitch & Leitch 2013).

Avec la capacité de la cytométrie de flux pour analyser un grand nombre d'individus à l'intérieur et entre les populations, les données de taille du génome sont maintenant de plus en plus utilisées pour aider à résoudre les problèmes taxonomiques. Celles-ci ont inclus des exemples où la taille du génome a été utilisée pour fournir de nouveaux éclairages sur les relations des espèces ainsi que pour la reconnaissance de nouvelles entités taxonomiques, en soutenant les existantes ou en les rejetant. La taille du génome a également été utilisée comme un guide fiable dans la séparation d'espèces étroitement liées et leurs hybrides. En effet, la taille du génome a été montrée pour être plus robuste et moins subjective que les caractères morphologiques qui variaient plus ou moins continuellement entre les espèces et leurs hybrides (Bennett & Leitch 2011).

La taille du génome, son niveau de ploïdie, ainsi que son organisation sont des indicateurs de spéciation et de la dynamique de l'évolution de l'espèce. Ce type de données permet également d'aborder certaines questions concernant la réponse du génome aux stress environnementaux. La mesure de la taille du génome (valeur-C) est d'une importance fondamentale pour l'étude de la biodiversité (Bennett *et al.* 2000). Le nombre chromosomique et les réarrangements chromosomiques sont utilisés pour étudier les phénomènes de spéciation et l'évolution au sein des groupes d'espèces voisines. Ces données sont considérées comme indicatrices de la biodiversité. Nous avons également exploré la répartition de la diversité génétique dans ce groupe et les mécanismes qui l'engendrent afin de bien cerner l'intérêt et les cibles pertinentes d'un éventuel effort de conservation.

VI. Les iris menacés dans le monde :

Dans le cadre de ce travail, nous avons réalisé une compilation des iris menacés dans le monde en précisant leurs origines, leurs statuts ainsi que les études réalisées sur ces iris (Tableau 5).

Tableau 5 : Liste des iris menacés dans le monde, leurs origines, leurs statuts et les études réalisées sur ces iris.

Nom de l'iris	Pays	Statut	Etudes réalisées	Référence
<i>I. pumila</i>	Croatie	endémique et menacée	régénération par embryogenèse somatique	Radojević <i>et al.</i> 1987
<i>I. lacustris</i>	Grands Lacs- Etats Unis	menacée	Nouveaux sites	Hart 1990
<i>I. lacustris</i>	Grands Lacs- Etats Unis	menacée	Habitat et écologie	Van Kley & Wujek 1993
<i>I. lacustris</i>	Grands Lacs- Etats Unis	menacée	Allozymes	Simonich & Morgan 1994
<i>I. rossii</i>	Japon	rare	Méthode de production de plants avec la culture <i>in vitro</i>	Furuya 1999
<i>I. lacustris</i>	Grands Lacs- Etats Unis	menacée	diversité des isozymes	Hannan & Orick 2000
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	analyse de structure spatiale	Kostrakiewicz 2000
<i>I. nigricans</i>	Jordanie	endémique et menacée	régénération par embryogenèse somatique	Shibli & Ajlouni 2000
<i>I. sibirica</i>	Croatie	rare et menacée	Nouveaux sites	Delić <i>et al.</i> 2001
<i>I. haynei</i> , <i>I. atrofusca</i>	Israël	Oncocycles rares et endémiques	variation génétique (RAPD) et phénotypique	Arafah <i>et al.</i> 2002
<i>I. sp.</i>	Sibérie	menacées	relations phylogénétiques (ADN chloroplastique)	Makarevitch <i>et al.</i> 2003
<i>I. aphylla</i>	Pologne	en voie de disparition	diversité génétique par RAPD	Wróblewska <i>et al.</i> 2003
<i>I. croatica</i> , <i>I. illyrica</i> , <i>I. adriatica</i>	Croatie	rare, vulnérable, menacée	Collecte de données	Cigić <i>et al.</i> 2004
<i>Oncocyclus</i>	Israël	Oncocycles rares et	pollinisation	Sapir <i>et al.</i> 2005

		endémiques		
<i>I. petrana</i> , <i>I. atrofusca</i> , <i>I. vartanii</i>	Jordanie	menacée	propagation in-vitro	Al-Gabbiesh <i>et al.</i> 2006
<i>I. taochia</i>	Pakistan	rare et endémique	propriétés autoécologiques	Kandemir 2006
<i>I. cedreti</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	Liban	Oncocycles rares et endémiques	système de pollinisation bimodale	Monty <i>et al.</i> 2006
<i>I. odaesanensis</i> , <i>I. koreana</i> , <i>I. dichotomata</i>	Corée	menacées et endémiques	analyse du caryotype	Park <i>et al.</i> 2006
<i>I. cedreti</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> and <i>I. westii</i>	Liban	Oncocycles rares et endémiques	variation démographique spatio-temporelle et de la stratégie de reproduction	Saad <i>et al.</i> 2006
<i>I. bismarckiana</i>	Israël	rare et menacée	fragmentation et pollinisation	Segal <i>et al.</i> 2006
<i>I. aphylla</i>	Pologne	en voie de disparition	diversité génétique par RAPD	Wróblewska & Brzosko 2006
<i>I. halophila</i>	Roumanie	rare	culture in-vitro	Holobiuc & Blindu 2006-2007
<i>I. nigricans</i>	Jordanie	endémique et menacée	variation génétique par RAPD	Al-Khasawneh <i>et al.</i> 2010
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	variation génétique (Allozyme)	Kostrakiewicz & Wróblewska 2007
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	structure des populations dans des conditions d'habitat différentes	Kostrakiewicz 2008
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	variation génétique (Allozyme)	Kostrakiewicz & Wróblewska 2008
<i>I. cedreti</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> and <i>I. westii</i>	Liban	Oncocycles rares et endémiques	étude écogéographique-collecte de données	Saad <i>et al.</i> 2006, 2009
<i>Oncocyclus</i>	Israël	Oncocycles rares et endémiques	dormance des graines	Dorman <i>et al.</i> 2009
<i>I. pseudopallida</i>	Péninsule des Balkans	endémique	régénération par embryogenèse somatique	Jevremović <i>et al.</i> 2009
<i>I. adriatica</i>	Croatie	endémique quasi menacée	propagation in-vitro	Kereša <i>et al.</i> 2009
<i>I. cedreti</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> and <i>I. westii</i>	Liban	Oncocycles rares et endémiques	étude de la variation morphologique et moléculaire par RAPD	Saad <i>et al.</i> 2009

<i>I. atrofusca</i>	Nord du Néguev en Israël	parmi les espèces les plus menacées d' <i>I. Oncocyclus</i> en Israël	approche complexe ex situ - in situ	Volis <i>et al.</i> 2009
<i>I. atrofusca</i>	Israël	parmi les espèces les plus menacées d'iris <i>Oncocyclus</i> en Israël	approche complexe ex situ - in situ	Volis <i>et al.</i> 2010
<i>Iris atrofusca</i>	Israël	parmi les espèces les plus menacées d' <i>I. Oncocyclus</i> en Israël	Translocation	Volis <i>et al.</i> 2010
<i>I. aphylla</i>	Pologne	rare et menacée	distribution de cytotype et l'histoire de la colonisation	Wróblewska <i>et al.</i> 2010
<i>I. pumila</i>	Serbie	endémique et menacée	fidélité clonale régénérée après conservation par vitrification	Jevremović <i>et al.</i> 2011
<i>I. aucheri</i> , subsp. <i>aintabensis</i> , subsp. <i>histrion</i> , <i>I. pamphylica</i> , <i>I. bakeriana</i>	Turquie	distribution restreinte	écologie	Kandemir <i>et al.</i> 2011
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	effet des espèces dominantes sur le nombre et la structure d'âge	Kostrakiewicz 2011
<i>I. stenophylla</i> subsp. <i>allisonii</i>	Turquie	endémique et menacée	micropropagation in vitro	Nasircilar <i>et al.</i> 2011
<i>I. dichotoma</i>	Corée	menacée	induction du cal et régénération à partir de la feuille, du rhizome, et des cals racinaires dérivés de l'explant	Kee-Hwa <i>et al.</i> 2012
<i>I. atropurpurea</i>	Israël	endémique et menacée	reproduction	Sapir & Mazzucco 2012
<i>I. odaesanensis</i>	Corée	rare	régénération de plantes à partir de cals via organogenèse	Bae <i>et al.</i> 2013
<i>I. pumila</i>	Ukraine	menacée	diversité génétique (ISSR, IRAP, REMAP, RGAP et LP-PCR)	Bublyk <i>et al.</i> 2013
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	variation écologique	Kostrakiewicz-Gierałt 2013
<i>I. pumila</i>	Ukraine	menacée	effet de la fragmentation de l'habitat	Kunakh 2013
<i>I. aphylla</i>	Roumanie	rare et menacée	propagation <i>in vitro</i> par des explants de feuilles et de bourgeons axillaires	Marinescu & Teodorescu 2013

<i>I. aphylla</i>	Roumanie	rare et menacée	propagation <i>in vitro</i> par des explants de feuilles et de bourgeons axillaires	Violeta <i>et al.</i> 2013
<i>I. atropurpurea</i>	Israël	endémique et menacée	pollinisation	Watts <i>et al.</i> 2012
<i>I. pamphylica</i>	Turquie	endémique et menacée	propagation in-vitro	Nasircilar & Deniz 2014
<i>I. bismarckiana</i>	Jordanie	très rare	régénération par embryogenèse somatique	Oran & Al-Gabbiesh 2014
<i>I. sari, I. schachtii</i>	Turquie	endémiques	régénération <i>in vitro</i> à partir d'embryons immatures	Uzun <i>et al.</i> 2014
<i>I. aphylla, I. camilla, I. carthaliniae, I. graminea, I. elegantissima, I. grossheimii, I. hungarica, I. iberica, I. imbricate, I. lycotis, I. musulmanica, I. prilipkoana, I. pseudacorus, I. timofejewii</i>	Géorgie	rares et endémiques	conservation <i>in situ</i>	Nadiradze & Eradze 2014
<i>I. odaesanensis, I. rossii</i>	Corée	rare	Structure clonale et génétique	Chung <i>et al.</i> 2015
<i>I. pamphylica</i>	Turquie	endémique et menacée	propriétés taxonomiques et écologiques	Deniz <i>et al.</i> 2015
<i>I. atrofusca</i>	Israël	parmi les espèces les plus menacées d' <i>Iris Oncocyclus</i> en Israël	AFLP and phénotypique	Volis <i>et al.</i> 2015
<i>I. helena</i>	Azerbaïdjan	en voie de disparition	conservation <i>ex situ</i>	Allahverdioglu & Velioglu
<i>I. aphylla</i> subsp. <i>hungarica</i>	Roumanie	en danger critique	collecte de données	Marinescu & Alexiu

A partir de cette compilation, nous avons remarqué que la plupart de ces iris menacés dans le monde sont endémiques et rares. La plupart des 57 études réalisées entre 1987 et 2015 ont été menées en Pologne (9), Israël (9), Turquie (5), Roumanie (4).

Vingt cinq types d'études ont été utilisés sur les iris menacés dans le monde entre 1987 et 2015 dont la micropropagation in-vitro (15% des études réalisées), la diversité génétique par RAPD (10%), les allozymes (7%), la fragmentation de l'habitat (7%), la pollinisation (7%), la régénération par embryogenèse somatique (7%), les études écogéographiques (5%), les conservations *ex situ - in situ* (3%).

Donc nous pouvons remarquer d'après tout ce qui est mentionné au-dessus que les iris menacés sont très peu étudiés. Nous avons choisi de mettre l'accent sur ce point pour dire qu'il est essentiel de mener des études sur toutes les espèces menacées d'*Iris*, pour pouvoir achever le but final : La protection.

VI.1- La conservation *ex situ* :

Les pressions environnementales telles que l'agriculture, l'érosion, surpâturage des prairies, et l'urbanisation sont la cause d'une perte significative des espèces végétales et de leurs habitats. Donc, une attention particulière devrait être accordée à protéger et à préserver la flore endémique qui se trouve normalement dans des zones limitées (Fay 1992, Sarasan *et al.* 2006). Plusieurs méthodes *ex situ* sont utilisées pour la conservation des espèces sauvages comme : La culture dans les jardins botaniques, la création des banques de semences, la cryoconservation (graines, pollen ou de tissus congelés dans l'azote liquide), le stockage des tissus, la culture *in vitro* des tissus (Raven 2013).

La conservation des espèces endémiques par culture de tissus végétaux *in vitro* a attiré l'attention des chercheurs (Corral *et al.* 2011, Mallon *et al.* 2010, Piovan *et al.* 2010). *In vitro*, les techniques font la production rapide et fiable d'une grande quantité d'individus d'une petite quantité de matériel végétal, et sont donc préférés comme un moyen efficace pour la conservation des plantes endémiques et des populations sauvages (Corral *et al.* 2011).

L'utilisation de la méthode de culture cellulaire et tissulaire est devenue populaire dans la reproduction des iris car elle augmente considérablement les facteurs de multiplication des plantes et améliore la qualité de plantation précieuse. En outre, la régénération par la culture de tissu est de plus en plus utilisée pour la conservation des espèces rares et endémiques, qui

représentent une composante importante de la génétique des plantes et la gestion des ressources (Pense 2013).

La multiplication *in vitro* des espèces d'*Iris* est possible et a été rapportée pour *I. ensata* (Boltenkov *et al.* 2007, Yabuya *et al.* 1991), *I. germanica* (Shimizu *et al.* 1997, Wang *et al.* 1999a ; 1999b), *I. nigricans* (Shibli & Ajlouni 2000), *I. pumila* (Jevremovic & Radojevic 2002), *I. ensata*, *I. setosa*, *I. sanguinea* (Boltenkov & Zarebno 2005), *I. hollandica* (Fidalgo *et al.* 2005), *I. atrofusca*, *I. petrana*, *I. vartanii* (Al-Gabbiesh *et al.* 2006), *I. adriatica* (Keresa *et al.* 2009), *I. sari* and *I. schachtii* (Uzun 2014).

VI.2- La conservation *in situ* :

L'objectif principal et à long terme de la conservation *in situ* des espèces cibles est de protéger, de gérer et de surveiller les populations sélectionnées dans leurs habitats naturels afin que les processus évolutifs naturels peuvent être maintenus, permettant ainsi une nouvelle variation à générer dans le pool de gènes qui permettra aux espèces de s'adapter à l'évolution des conditions environnementales. La conservation *in situ* couvre un large éventail d'activités allant de la préparation et la mise en œuvre des plans de rétablissement d'espèces uniques détaillées dans le cas des espèces qui sont en danger critique, grâce à la vigilance et de surveillance pour les espèces qui sont rares, non menacées ou seulement vulnérables, à diverses formes et degrés d'intervention de gestion qui affectent soit les populations d'espèces concernées ou les habitats / zones dans lesquelles ils se produisent, ou les deux. La conservation *in situ* des espèces est généralement opposée à la conservation *ex situ*, mais existe différents types de situations intermédiaires qui font une transition entre les deux. Il est temps de traiter la conservation des espèces *in situ* dans la Méditerranée comme un problème grave qui exige une stratégie éclairée, cohérente et chiffrée.

Dans la pratique, la conservation des espèces *in situ* dépend de façon critique sur l'identification des habitats dans lesquels ils se produisent et protéger à la fois l'habitat et les espèces par le biais de divers types de gestion et / ou de surveillance. Dans le cas des espèces menacées, leur conservation *in situ* exige également que les menaces qui pèsent sur eux soient enlevées ou au moins contenues.

Ainsi, bien que la conservation *in situ* soit essentiellement un processus de conservation d'espèces, elle implique aussi nécessairement la protection de l'habitat.

La conservation *in situ* des espèces cibles couvre un certain nombre d'activités interdépendantes, y compris :

- La préparation et la mise en œuvre des plans de conservation ou de gestion d'espèces uniques détaillées.
- Dans le cas de ces espèces qui sont en danger critique, la préparation et la mise en œuvre des plans de rétablissement détaillés qui peut impliquer le renforcement des populations ou plus extrêmes cas réintroduction (translocation) des populations.
- Les plans de gestion multi-espèces et de récupération.
- Surveillance de l'état des habitats.
- La protection de l'habitat.
- Le suivi des résultats des interventions de gestion pour les espèces qui sont rares, menacées et vulnérables.
- La conservation génétique dans le cas des espèces d'importance économique (Heywood 2014).

Tous ces éléments sont dépendants de l'obtention des informations sur la taxonomie, la diversité génétique, la distribution, l'écologie, la démographie, la variation, l'ethnobotanique et l'état de conservation des populations des espèces cibles, souvent appelée surveillance éco-géographique (Guarino *et al.* 2005, Hunter & Heywood 2011: chapitre 6).

Dans la pratique, divers types de situations intermédiaires existent entre conservation *in situ* et *ex situ*, tel que :

Quasi *in situ*

Les termes « complexe *ex situ-in situ* ... de conservation » et de « quasi- *in situ* conservation » ont été introduites par Volis *et al.* (2009) et Volis & Blecher (2010a, b) pour décrire leur approche comme un pont entre la conservation *ex situ* et *in situ* de sorte que les collections *ex situ* sont maintenues dans un environnement naturel ou semi-naturel tout en préservant la diversité génétique à la fois neutre et adaptative. Il a été appliqué aux populations d'*Iris atrofusca* (section *Oncocyclus*) dans le nord du Néguev, en Israël.

VI.3- Conservation des iris au Liban :

Les études déjà menées sur les iris Oncocycles au Liban ont permis de développer des connaissances sur divers aspects de l'écologie, la biologie, la taxonomie, la génétique des iris Oncocycles endémiques du Liban en vue de promouvoir le développement de stratégies de conservation (Saad 2006).

L'établissement du statut de conservation des iris Oncocycles au Liban et les étapes vers leur conservation (modifié d'après Marrero-Gomez *et al.* 2003 & Schemske *et al.* 1994) sont montrées dans la Figure 14. Parmi ces étapes, les études génétiques s'avèrent très importantes pour la conservation des espèces menacées et notamment les iris. La caractérisation génétique précise des ressources disponibles (populations, individus, etc.) est cruciale dans le développement de tout programme de conservation, afin de déterminer quelles populations sont prioritaires pour la conservation (Petit *et al.* 1998) et d'identifier les populations qui ont besoin être propagées *ex situ* (Mistretta 1994). Notre travail sur les divers outils génétiques et de biologie moléculaire afin de préciser le statut taxonomique des espèces d'iris menacés au Liban et pour élucider leurs relations phylogénétiques tels que : l'analyse de la taille du génome, l'étude du caryotype, l'organisation du génome basée sur la localisation des gènes ribosomiques et l'étude de la structuration de la diversité génétique et la phylogénie basée sur des marqueurs moléculaires nucléaires et chloroplastiques constitue une base de données importante pour leur conservation.

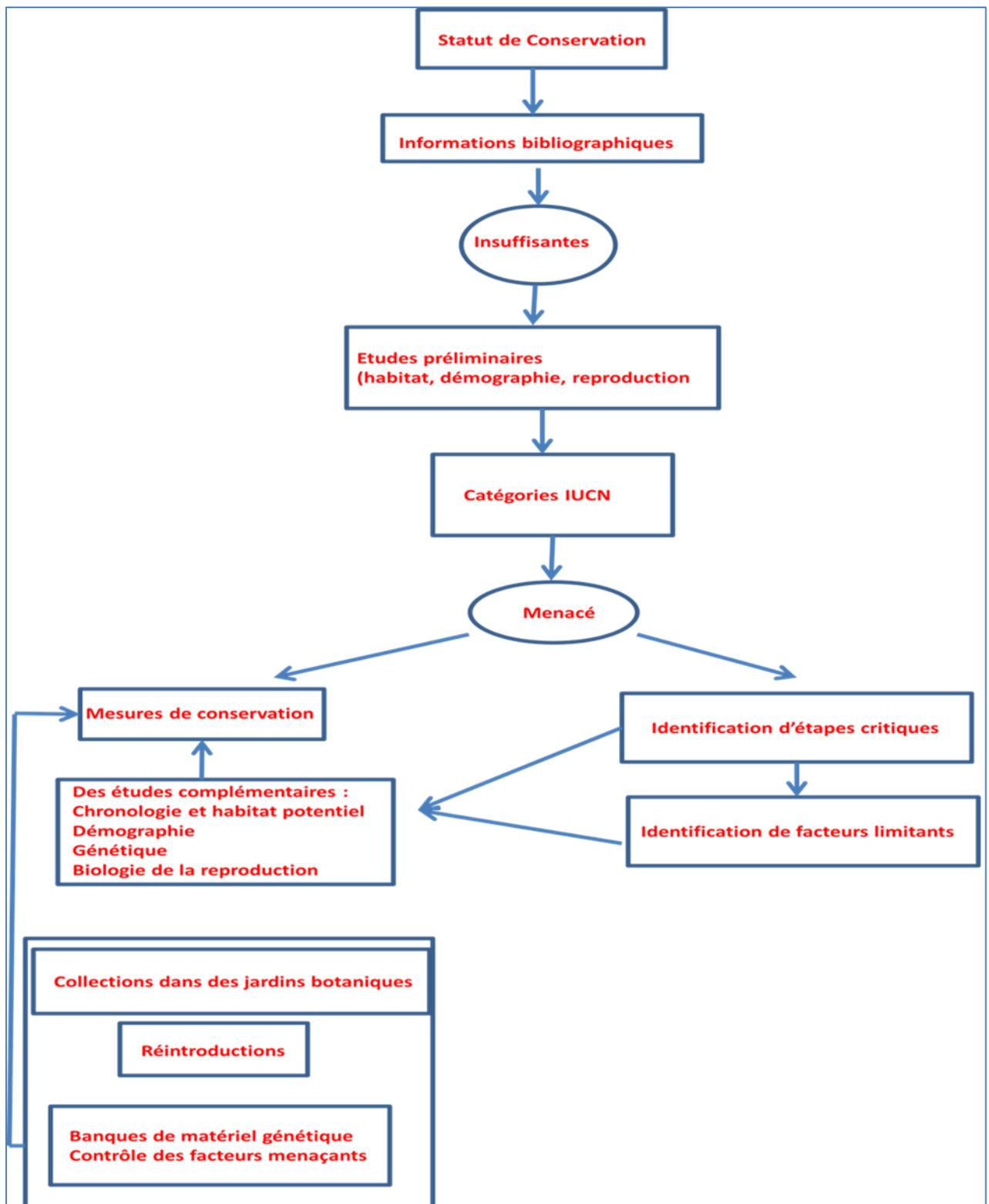


Figure 14 : Etablissement du statut de conservation d'un taxon et étapes vers leur conservation (modifié d'après Marrero-Gomez *et al.* 2003 & Schemske *et al.* 1994).

VII. Objectif de la thèse :

La présente étude porte sur le complexe d'espèces d'*Iris* évoluant dans les pays de la Méditerranée Orientale: Liban, Syrie, Jordanie, Palestine/Israël, Arménie, Turquie et Iran.

Le taux d'endémisme au sein de ce genre est relativement élevé. Malheureusement, la cueillette excessive ainsi que la destruction de leurs habitats menacent un grand nombre de ces espèces. Ce qui les rend une cible pour les stratégies de conservation nationales et régionales.

L'objet principal de notre étude est un groupe de taxons des iris de la section *Oncocyclus*. Cette section présente à elle seule 55% de toutes les espèces menacées du genre *Iris* (Walter & Gillet 1998), ce qui les classe en tête de liste des espèces à protéger. Une évaluation approfondie de la distribution, de la viabilité de la population et de sa diversité génétique est cependant essentielle afin de développer des stratégies de conservation appropriées pour protéger ces plantes emblématiques ayant très souvent une valeur patrimoniale prononcée.

Les *Oncocyclus* endémiques du Liban sont actuellement formés par un complexe de quatre taxons étroitement apparentés et représentés par des populations distinctes dans les hautes altitudes (1200 jusqu'à 1900 m) de la chaîne montagneuse du Mont-Liban. Il s'agit notamment d'*I. sofarana* Foster subsp. *sofarana*, *I. sofarana* subsp. *kasruwana* Dinsmore, *I. cedreti* Dinsmore ex Chaudhary et *I. westii*. Ces espèces appartiennent toutes à la *Sofarana* agrégat comme défini par Avishai et Zohary (1980) en se basant essentiellement sur des caractères morphologiques.

La variation morphologique (couleur des tépales, nombre de feuilles, taille de l'individu...) entre ces taxons entraîne souvent une grande confusion pour les distinguer en utilisant des clés d'identification proposées par différents auteurs (Chaudhary 1972, 1974, Dinsmore 1934, Kohlein, 1987, Mathew 1989, Mouterde 1966, Post 1933, Rix 1997). En fait, la délimitation des espèces de ce groupe a été fondée sur quelques spécimens d'herbier, sans tenir compte de la variation naturelle des populations.

Des études éparses ont été menées (Avishai & Zohary 1977, Goldblatt *et al.* 1984) pour démystifier le statut taxonomique de ce groupe. Saad et ses collaborateurs (2003), à titre d'exemple, se sont intéressés à l'étude d'*Iris sofarana* du Liban. Toutefois, une confusion persiste quant à l'identité de taxons proches tels qu'*I. sofarana* subsp. *sofarana* et

I. sofarana subsp. *kasruwana* et même *Iris cedreti* (Tohmé & Tohmé 2004). D'autres taxons existant dans le sud du Liban : *I. bismarckiana* Damman & Sprenger et *I. lortetii* Barbey ex Boiss. sont proches morphologiquement mais plus éloignés géographiquement des *Oncocyclus* endémiques méritent également d'être étudiés afin d'élucider leur statut taxonomique précis.

Divers outils génétiques et de biologie moléculaire ont été employés dans ce travail afin de préciser le statut taxonomique de ces espèces et pour élucider leurs relations phylogénétiques tels que: l'analyse de la taille du génome, l'étude du caryotype, l'organisation du génome basée sur la localisation des gènes ribosomiques et l'étude de la structuration de la diversité génétique et la phylogénie basée sur des marqueurs moléculaires nucléaires et chloroplastiques (Abdel Samad *et al.* 2016, accepté, Annexe 9).

Notre étude est une des premières contributions scientifiques pour la conservation des ressources génétiques des iris endémiques du Liban et de la méditerranée orientale, une étape essentielle pour la définition, l'implémentation et la gestion d'aires protégées.

Chapitre III: Matériel et Méthodes

III.1- Matériel végétal

Dans la présente étude, toutes les espèces d'*Iris* au Liban (13 espèces et une sous-espèce) sont collectées ; l'ADN et les feuilles vertes de 26 *Oncocylus* de la Syrie, Jordanie, Palestine/Israël, Arménie, Turquie, Iran, ont été fournis par M. László Csiba de Kew, « Royal Botanic Gardens» et par M. Frédéric Dépalle de sa collection personnelle. La provenance du matériel, l'origine des populations étudiées sont répertoriées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : L'origine du matériel végétal

Sous-genre	Section/Sous-genre	Espèces	Origine	Collecté par
<i>Iris</i>	<i>Oncocyclus</i>	<i>I. acutiloba</i>	Azerbaïdjan, Jeyrankechmaz	Dépalle F.
		<i>I. acutiloba</i> subsp. <i>lineolata</i>	Arménie (RBGK 2012-1109)	Kew
		<i>I. antilibanotica</i>	Liban, Kheibeh-Baalbeck	Abdel Samad N.
		<i>I. assadiana</i>	Syrie, Sadad	Dépalle F.
		<i>I. atropurpurea</i>	Israël, Palmahim (RBGK 1998-2808)	Kew
		<i>I. bismarckiana</i>	Liban, Sarada	Abdel Samad N.
		<i>I. bismarckiana</i>	Jordanie, Ajloun	Dépalle F.
		<i>I. camillae</i>	Azerbaïdjan, Tovuz	Dépalle F.
		<i>I. cedreti</i>	Liban, Bcharré	Abdel Samad N.
		<i>I. cedreti</i>	Liban, les cèdres	Dépalle F.
		<i>I. damascena</i>	Syrie, Damas	Dépalle F.
		<i>I. haynei</i> var. <i>jordana</i>	Jordanie, Umm Qais	Dépalle F.
		<i>I. iberica</i> subsp. <i>elegantissima</i>	Turquie, Erzurum, entre Kirekli Pass et Tortum, 80km avant Erzurum (RBGK 1999-4347)	Kew
		<i>I. kirkwoodi</i>	Syrie, St Simeon	Dépalle F.
		<i>I. kirkwoodii</i> subsp. <i>kirkwoodii</i>	Turquie, Antakya Prov., Nurdaglari (RBGK 1994-2407)	Kew
		<i>I. lortetii</i>	Liban, Mays el Jabal	Abdel Samad N.
<i>I. lortetii</i> 2	Israël, Ayelet-Hashahar	Dépalle F.		

	<i>I. lineolata</i>	Arménie, Gandja	Dépalle F.
	<i>I. mariae</i>	Israël, sede boker	Dépalle F.
	<i>I. paradoxa</i> f. <i>mirabilis</i>	Iran, Ayerandibi	Dépalle F.
	<i>I. meda</i>	Iran, Baqloujeh Sardar	Dépalle F.
	<i>I. nigricans</i>	Palestine, Bani Naim	Dr .Khalid Sawalha
	<i>I. paradoxa</i>	Arménie, Akhkhlu, Dilijan (Dilizhan) – Idzhevan (Idjevan) (RBGK 1977-4470)	Kew
	<i>I. petrana</i>	Jordanie, Shawbak	Dépalle F.
	<i>I. petrana</i>	Inconnue (RBGK 1990-3180)	Kew
	<i>I. samariae</i>	Israël, Majdal	Dépalle F.
	<i>I. sari</i>	Inconnue (RBGK 2011-1955)	Kew
	<i>I. schelkownikowii</i>	Azerbaïdjan, Mingachevir	DépalleF.
	<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	Liban, Chabrouh	Bou Dagher-Kharrat M.
	<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana2</i>	Liban, Ehmej	Abdel Samad N.
	<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	Liban, Dahr El-Baydar	Abdel Samad N.
	<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana2</i>	Liban, Hazzerta	Abdel Samad N.
	<i>I. sprengeri</i>	Turquie, Nigde, S d'Aksaray, base de Hasan Laginr Taspinar (RBGK 2011-1958)	Kew
	<i>I. westii</i>	Liban, Tawmet Jezzine	Abdel Samad N.
	<i>I. yeruchamensis</i>	Israël, Yerocham	Dépalle F.
	<i>I. yebrudii</i> subsp. <i>yebrudii</i>	Syrie, Yebrud	Dépalle F.
Regelia	<i>I. afghanica</i>	Afghanistan	Dépalle F.

	<i>Iris</i>	<i>I. albicans</i>	Liban, Aley	Abdel Samad N.
		<i>I. mesopotamica</i>	Liban, Mrouje	Bou Dagher-Kharrat M.
<i>Limniris</i>	<i>Limniris</i>	<i>I. longipetala</i>	Iran, Jazvanaq	Dépalle F.
		<i>I. pseudacorus</i>	Liban, Kfarzabad	Bou Dagher-Kharrat M.
		<i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	Liban, Baadarane	Abdel Samad N.
<i>Scorpiris</i>	<i>Scorpiris</i>	<i>I. palaestina</i>	Liban, Joun	Abdel Samad N.
		<i>I. persica</i>	Turquie C9 Siirt; Eruh-Sirnak arasi, Segirik Karakolu civari (RBGK 2014-1875)	Kew
		<i>I. regis-uzziae</i>	Israël (RBGK 1987-2212)	Kew
		<i>I. tauri</i>	Liban, Quaa	Abdel Samad N.
<i>Hermodactyloides</i>	<i>Hermodactyloides</i>	<i>I. histrio</i>	Liban, Barouk	Abdel Samad N.

III.2- Méthodes

III.2.1- Mesure de la taille du génome par cytométrie en flux :

La taille du génome a été mesurée en utilisant la méthode de cytométrie en flux décrite par Doležel *et al.* (2007). Afin de mesurer la quantité d'ADN des iris du Liban à l'aide d'un cytomètre en flux, entre 1 à 5 individus par population de chaque espèce ont été analysés pour obtenir la quantité d'ADN moyenne. Au moins 5000 à 10000 noyaux ont été analysés pour chaque échantillon. Au moment de l'analyse, des étalons internes avec la quantité d'ADN connue, ont été rajoutés à l'échantillon (*Triticum aestivum* 'Chinese Spring' : 2C = 6x = 30,9 pg; 43,7% GC). La quantité d'ADN (2C) connue de ces étalons est utilisée pour la quantification de l'ADN de l'échantillon. La technique consiste à couper les feuilles de l'échantillon et de l'étalon à l'aide d'une lame rasoir dans une boîte de Pétri, avec 600 µl de tampon Galbraith (Galbraith *et al.* 1983) pour l'extraction des noyaux. Les noyaux en suspension ont été ensuite filtrés à travers une maille de nylon (taille de pores 48 µm), afin d'éliminer les fragments et les grands débris tissulaires. Les noyaux sont ensuite colorés avec de l'iodure de propidium à 50 µg/ml. La quantité d'ADN (2C) est calculée en utilisant la liaison linéaire entre les signaux fluorescents provenant des noyaux colorés de l'échantillon inconnu et l'étalon interne connu selon la formule suivante :

$$2C_{\text{échantillon Iris}} = \frac{\text{Intensité fluorescente}_{\text{échantillon}}}{\text{Intensité}_{\text{étalon interne}}} * 2C_{\text{étalon (connue)}}$$

III.2.2- Amplification de la région ITS et des deux régions chloroplastiques *matK* et *trnL-F*:

Broyage:

Tout le matériel (pilons, mortiers, spatule) est autoclavé. Les morceaux de jeunes feuilles vertes sont coupés et déposés dans un mortier pré-refroidi 3 fois avec de l'azote liquide. Un volume d'azote liquide est ajouté, le mélange est broyé avec le pilon pendant au moins 2 minutes. Un

volume d'azote liquide est ajouté si c'est nécessaire. A l'aide d'une spatule, la poudre (blanche/verte) est rassemblée avant qu'elle ne sèche et transférée dans un tube ou deux si la quantité est suffisante. Les tubes sont déplacés directement dans l'azote liquide et gardés à -80°C jusqu'au jour de l'extraction de leur ADN. Le matériel est nettoyé 3 fois avec de l'éthanol absolu entre deux broyages consécutifs.

Extraction de l'ADN :

Dans chaque tube, 1 ml du mix du tampon d'extraction déjà préparé, est ajouté. Le tube est transféré directement dans le bain-marie, incubé au bain-marie à 60°C pendant 45 minutes et vortexé chaque 5 minutes. Les échantillons sont sortis du bain-marie. 1 ml/tube de 3*(24/1 chloroforme (SIGMA-ALDRICH-2883306)-isoamylalcool (AMRESCO-0944) est ajouté. Le tube est bien agité à la main jusqu'à l'obtention d'un liquide verdâtre puis centrifuger à 13000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant est prélevé et transvasé dans la deuxième série de tubes (attention à ne pas perturber l'interface). 1 ml de chloroforme-isoamylalcool est rajouté à chaque tube, ce dernier est centrifugé à 13000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant est plus clair et plus propre. Le surnageant est transféré dans la 3^{ème} série de tubes en notant le volume. Un volume égal d'isopropanol (SIGMA-ALDRICH- 437522) est ajouté à chaque tube. L'ADN se précipite et apparaît en retournant le tube plusieurs fois à la main. Les tubes sont centrifugés à 8000 tr/min pendant 15-20 min, l'ADN se précipite. Le surnageant est éliminé. 1 ml/tube d'éthanol 75% froid (1^{er} lavage) est ajouté au culot. Le tube est agité pour décoller le culot puis centrifugé à 8000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant est éliminé à nouveau et le culot est gardé. 1 mL d'éthanol 100% froid (2^{ème} lavage) est ajouté à chaque tube. Les tubes sont centrifugés pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot est séché à l'air libre pendant 30 min.

Le culot d'ADN est resuspendu dans 100-150 µl de la solution TE-RNase froide (selon la taille du culot). Les échantillons d'ADN sont incubés au bain-marie à 37°C pendant la nuit.

Amplification par PCR:

Un mix commun d'un volume de 50 µl par tube est préparé et mis dans la glace. Un témoin est aussi préparé en substituant l'ADN par H₂O : aucune amplification ne doit alors être détectée pour ce témoin, ce qui permet de vérifier que les préparations ne contiennent pas de contaminants. Les tubes sont alors placés dans un thermocycleur (Perkin Elmer, GeneAmp® PCR System 9700).

Amplification de la région ITS-1, 5.8S et ITS2 par PCR

Mix commun	1 tube
Eau stérile	35,8
5x Phire Reaction Buffer	10
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**à 10 mM (100 µM final)	1
ITS-4 (20 µM) (Emofinis MWA Operon H13342)	0,25
ITS-5 (20 µM) (Emofinis MWA Operon H13341)	0,25
Phire Hot Start II DNA Polymerase (F122-S)	1
Volume final	48,3µl



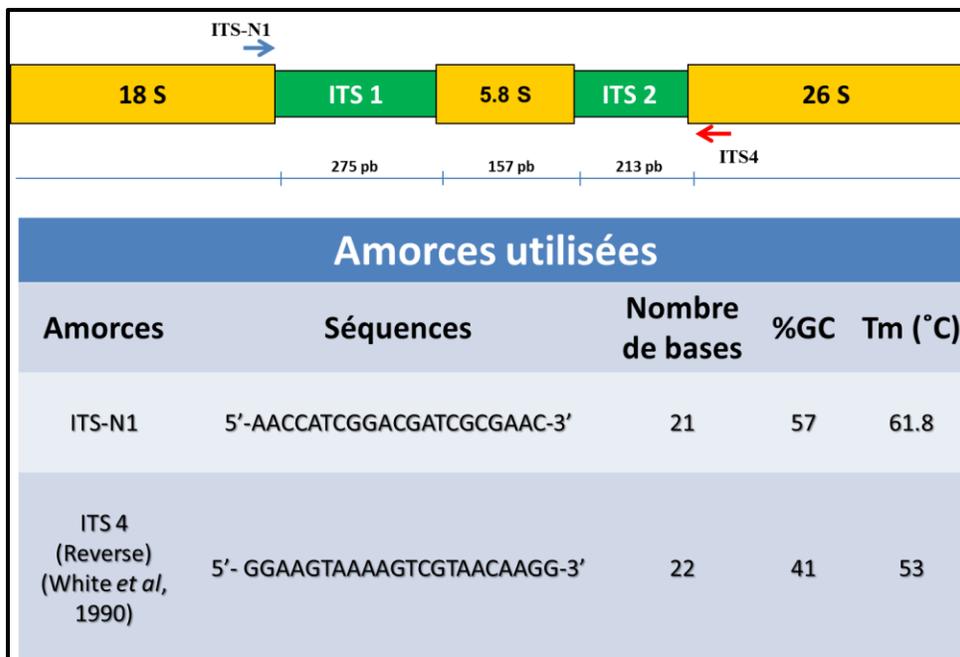
Amorces	Séquences	Tm
ITS 5 (Forward) (White <i>et al</i> , 1990)	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC	69
ITS 4 (Reverse) (White <i>et al</i> , 1990)	5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	53

L'ADN est dénaturé à 98°C pendant 30 sec. Ensuite 35 cycles successifs formés de ces 3 mêmes étapes sont réalisés: une dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 5 sec., puis une hybridation des amorces sur les ADN matrice simple brin à 58°C pendant 5 sec. suivie par une élongation des brins d'ADN à 72°C pendant 15 sec. Une étape terminale est faite à 72°C pendant 1 min. ce qui permet de compléter la synthèse des molécules en cours d'élongation. La PCR est terminée par

une étape finale à 4°C jusqu'à l'infini, le moment où on récupère les échantillons. Les échantillons sont prélevés et gardés à -20°C jusqu'au moment d'utilisation.

Amplification de la région ITS par le couple d'amorces ITS-N1/ITS4

Mix commun	1 tube
Eau stérile	35,8
5x Phire Reaction Buffer	10
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**à 10 mM (100 µM final)	1
ITS-4 (100 µM) (Emofinis MWA Operon H13342)	0,1
ITS-N1 (100 µM) (Emofinis MWA Operon H13341)	0,1
Phire Hot Start II DNA Polymerase (F122-S)	1
Volume final en µl	48



L'ADN est dénaturé à 98°C pendant 30 sec. Ensuite 35 cycles successifs formés de ces 3 mêmes étapes sont réalisés: Une dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 5 sec., puis une hybridation des

amorces sur les ADN matrice simple brin à 57°C pendant 5 sec. Suivie par une élongation des brins d'ADN à 72°C pendant 15 sec. Une étape terminale est faite à 72°C pendant 1 min. ce qui permet de compléter la synthèse des molécules en cours d'élongation. La PCR est terminée par une étape finale à 4°C jusqu'à l'infini, le moment où on récupère les échantillons. Les échantillons sont prélevés et gardés à -20°C jusqu'au moment d'utilisation.

Amplification de la région *matK* et *trn* chloroplastique par PCR

1 ^{er} Mix	1 tube
Eau stérile	35,8
5x Phire Reaction Buffer	10
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**à 10 mM (100 µM final)	1
MatK19F (100 µM) (Emofinis MWA Operon)	0,1
trnK-2R (100 µM) (Emofinis MWA Operon)	0,1
Phire Hot Start II DNA Polymerase (F122-S)	1
Volume final en µl	48

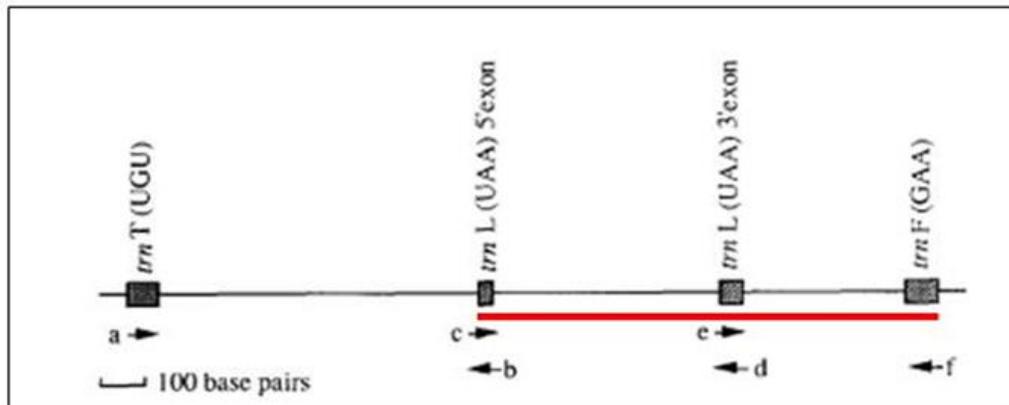
MatK19F : 5'-CGTTCTGACCATATTGCACTATG-3' **Tm= 58,9°C**

(Molvray *et al.* 2000)

trnK-2R : 5'-AACTAGTCGGATGGAGTAG-3' **Tm= 54,5°C**

(Johnson & Soltis 1995)

2 ^{ème} Mix	1 tube
Eau stérile	35,8
5x Phire Reaction Buffer	10
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**à 10 mM (100 µM final)	1
trn-C (100 µM) (Emofinis MWA Operon)	0,1
trn-f (100 µM) (Emofinis MWA Operon)	0,1
Phire Hot Start II DNA Polymerase (F122-S)	1
Volume final en µl	48



trn-C 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'

Tm= 59,4°C

trn-F 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'

Tm=55,3°C

(Taberlet 1991)

L'ADN est dénaturé à 98°C pendant 30 sec. Ensuite 35 cycles successifs formés de ces 3 mêmes étapes sont réalisés: Une dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 30 sec., puis une hybridation des amorces sur les ADN matrice simple brin à 53°C pendant 5 sec. Suivie par une élongation des brins d'ADN à 72°C pendant 15 sec. Une étape terminale est faite à 72°C pendant 20 sec. ce qui permet de compléter la synthèse des molécules en cours d'élongation. La PCR est terminée par une étape finale à 4°C jusqu'à l'infini, le moment où on récupère les échantillons. Les échantillons sont prélevés et gardés à -20°C jusqu'au moment d'utilisation.

Purification des produits d'amplification PCR :

Une quantité suffisante de TBE 1 X (à peu près 500 ml) et un gel d'agarose de 1% ou 2% sont préparés. 1 ou 2g d'agarose en poudre sont dissous dans 100 ml de TBE 1x dans une bouteille de verre. La bouteille est chauffée pendant 2 minutes à la micro-onde pour faire fondre l'agarose complètement. Après elle est laissée pour refroidir jusqu'à 60°C puis 10 µl de bromure d'éthidium (SIGMA E1510) est ajouté. Le plateau de l'électrophorèse est ajusté à l'horizontale, le gel est coulé jusqu'à une épaisseur de 1 cm. Le peigne est mis en faisant attention à ne pas faire de bulles. La solution est laissée pour se solidifier pendant 30 à 45 min. à température

ambiante, puis le peigne est enlevé et le gel est placé dans la cuve à électrophorèse remplie de TBE. Récupérer les échantillons de -20°C. Garder les dans la glace. Les échantillons sont préparés, homogénéisés par un petit coup de doigt puis centrifugés au cas où il y a des bulles d'air. Le contenu des tubes est versé dans les puits correspondants. L'appareil est mis sous tension (135 V) pendant 37 min. L'examen du gel est réalisé sous rayon U.V. suivi d'une acquisition photographique par la caméra.

Reconstruction phylogénétique moléculaire

L'ADN a été isolé de 50-170 mg de feuilles fraîches ou congelées en utilisant une méthode de bromure de cetyltriméthylammonium modifié (CTAB) (Doyle & Doyle 1987). La qualité et la quantité d'ADN ont été vérifiées par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'éthidium (0,5 mg / mL) dans 1xTBE. La région ITS a été amplifiée tout d'abord par les deux amorces ITS-4 et ITS-5, après alignement des séquences, on s'est rendu compte que la région ITS d'un champignon endophyte a été amplifiée au lieu de l'ITS de nos iris. Donc on a eu recours à la fabrication d'une amorce ITS-N1 plus spécifique de l'ITS des iris que celle des champignons endophytes. Les régions plastides *trnL-trnF* et *matK / trnK* ont été amplifiées en utilisant les amorces *trnL-C*, *trnL-F* (Taberlet *et al.* 1991), *MatK19F* (Molvray *et al.* 2000) et *trnK-2R* (Johnson & Soltis 1994). Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume de 50 µl contenant 10 µl de 5x tampon de réaction Phire, 10 mM dNTP, 100 pM d'amorces, 20-50 ng de matrice d'ADN génomique, et 1 ul Phire Hot Start DNA Polymerase II (F122-S). Le programme de PCR avait une étape de séparation des brins initiaux à 98°C pendant 30 sec. suivie par 35 cycles de dénaturation à 98°C pendant 5 sec., un anelage à 57°C pendant 5 sec., et une élongation à 72°C pendant 15 sec., l'étape finale à 72°C pendant 1 min. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur agarose dans un gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'éthidium (0,5 mg / mL) dans 1xTBE. Les produits purifiés PCR ont été séquencés par Eurofins MWG, France en utilisant la méthode de Sanger sur la plate-forme ABI 3730XL.

L'ensemble des données, y compris de nouvelles séquences tout à fait avec des séquences recueillies auprès de GenBank a été aligné en utilisant les paramètres par défaut sur Guidance serveur web (Penn *et al.* 2010) et manuellement ajustés avec le logiciel BioEdit (Hall 1999). Il comprend la région *matK / trnK* pour 117 adhésions (représentant 1842 caractères) et la région *trnL-trnF* pour 94 accessions (1028 caractères). *Dietes robinsoniana* a été incluse dans l'analyse

comme une espèce exogroupe. Une inférence bayésienne (BI) a été réalisée à l'aide MrBayes la version 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) sur le serveur CIPRES (Miller *et al.* 2010) avec des cloisons par région (*trnL-trnF*, *matK-trnK*) et quand c'est applicable par la position de codon. Le meilleur modèle de substitutions nucléotidiques sélectionnées avec jModelTest v.0.1.1 (Posada 2008, Guindon & Gascuel 2003) en utilisant les informations critère Akaike (AIC) a été GTR + I + G pour toutes les partitions de la région. Pour chaque analyse, quatre chaînes de Markov ont été exécutés simultanément pour 30×10^6 générations, et ceux-ci ont été échantillonnés toutes les 700 générations. Les analyses ont été vérifiées pour la convergence dans Tracer v.1.6 (Rambaut & Drummond 2007). Les données des 5000 à 10000 premières générations ont été rejetées comme étant la période de burn-in dans chaque analyse, et les échantillons groupés restants ont été utilisés pour construire les règles de la majorité des arbres de consensus 50% et de calculer la probabilité a posteriori (PP) de noeuds.

Analyses statistiques

Les analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées en utilisant la fonction `prcomp` dans le package `stats` de R v.3.2.2 (R, équipe de base, 2016) sur les données transformées en log et normalisées. Les résultats ont été visualisés avec la fonction `ggbiplot`.

(<https://github.com/vqv/ggbiplot>).

III.2.3- Cytogénétique :

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé les racines poussant sur les rhizomes des iris collectés du Liban. Les rhizomes sont emballés dans des papiers humides et mis à 4°C. Une semaine après, les racines poussent (Figure 15).



Figure 15 : Des racines poussant sur un rhizome d'*Iris bismarckiana*

Les apex racinaires sont détachés des racines à l'aide d'un scalpel avant de subir :

-Un pré-traitement : des racines de 0,5 cm prélevées en milieu de journée, sont par la suite trempées dans de la colchicine à 0,05% (agent mitoclasique) pendant 4h 30 min. à température ambiante; ainsi les divisions mitotiques sont bloquées au stade métaphasique.

-Une fixation : Les tissus racinaires subissent une fixation au moins 24h à 4°C dans une solution d'éthanol acétique (3:1, v/v) pour bloquer les divisions cellulaires permettant ainsi la conservation de l'intégrité structurale des chromosomes.

-Un stockage : Les racines ainsi traitées sont conservées dans de l'éthanol 70% à 4°C, aussi longtemps que voulu, et sont prêtes à subir l'hydrolyse.

-Une hydrolyse : Afin d'effectuer un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelle, et pour la perméabilisation des membranes cellulaires avant les colorations, une hydrolyse de cellules est nécessaire.

Selon la coloration réalisée, deux types d'hydrolyse sont effectués :

- **Pour la coloration de Feulgen ou au nitrate d'argent** : le ramollissement des tissus est effectué avec l'acide chlorhydrique 1N pendant 12 min. à 60°C.
- **Pour l'hybridation *in situ*** : Les racines sont incubées dans du tampon citrate pendant 15 min. (acide citrique + citrate de sodium) pour réhydratation, après décongélation des solutions enzymatiques, les racines y sont ramollies à 37°C pendant 20 min. ou plus. La durée de l'hydrolyse dépend de l'âge et la dureté des racines. Les tissus racinaires ainsi ramollis sont ensuite déposés sur la lame et rincés légèrement à l'aide d'une solution d'acide acétique à 45% fraîchement préparée. L'écrasement s'effectue ensuite dans 1 à 2 gouttes de cette même solution d'acide acétique à l'aide d'un bâtonnet métallique. Afin d'assurer un bon étalement des chromosomes, une pression homogène est exercée sur la lamelle à l'aide du pouce. Ainsi, les lames sont prêtes à être observées au microscope en contraste de phase. Après avoir vérifié la qualité de l'étalement par observation au microscope photonique, les plaques métaphasiques sont repérées et marquées à l'aide d'une lame quadrillée (lame chercheuse). Les lames sont déposées dans congélateur à -80°C pendant la nuit (ou au moins quelques heures), puis la lamelle est décollée à l'aide d'un coup sec de la lame de scalpel. La préparation est rapidement rincée à l'éthanol absolu et séchée verticalement pendant 1 à 2 jours avant la coloration.

1- Coloration de Feulgen :

Après rinçage de 10 min. à l'eau distillée, les méristèmes sont hydrolysés dans de l'HCl 1N pendant 12 min. à 60°C. L'hydrolyse a pour but de ramollir les tissus et de libérer les groupements aldéhydes de l'ADN. La coloration est réalisée selon la technique de Feulgen et Rossenbeck (1924). Les groupements aldéhydes libérés incubés en présence du réactif de Schiff

pendant 30 min. à l'obscurité, donnent une coloration rouge aux chromosomes. L'écrasement est effectué selon la méthode d'Östergreen (1962). Les apex colorés sont sectionnés et déposés sur une lame dans une goutte de carmin acétique. La préparation est recouverte d'une lamelle et écrasée doucement en tapotant à l'aide d'une baguette de bois. Le comptage chromosomique est fait au microscope photonique.

2- Coloration des nucléoles au nitrate d'argent :

Sur la préparation qui a séché pendant plus de 24h, on dépose une grosse goutte d'une solution de nitrate d'argent à 50%. On couvre la préparation avec une lamelle en plastique opaque et on laisse l'imprégnation s'effectuer dans une chambre humide à 60°C pendant 24h. Après 24h on observe si la coloration est de bonne qualité. La préparation est ensuite rincée à l'eau distillée avant d'effectuer un montage dans l'Euparal ou dans l'huile à immersion. L'observation et le comptage des nucléoles sont effectués au microscope photonique.

3- Marquage des bases GC par la chromomycine A₃ :

Le matériel est prétraité, fixé et préparé comme pour l'hybridation *in situ*. La coloration à la chromomycine est effectuée selon Schweizer (1976) avec de légères modifications. Pour réhydrater la préparation, on dépose sur la lame plusieurs gouttes du tampon MacIlvaine pH7+MgSO₄ qu'on laisse incuber pendant 15 min.

On se débarrasse du tampon en secouant la lame. On dépose une grosse goutte de chromomycine A₃ 0,02g/100 mL pendant 90 min. à l'obscurité.

On rince rapidement avec le tampon MacIlvaine pH7 avant d'effectuer une contre coloration des chromosomes par du vert de méthyle à 0.1% pendant 7 min. à l'obscurité. On rince ensuite avec tu tampon MacIlvaine pH 5,5. On égoutte la lame (ne pas laisser sécher complètement). Le montage est ensuite effectué dans une goutte de Citifluor ou dans le cas échéant dans une goutte de glycérol : tampon MacIlvaine pH=7 + MgCl₂ (1 : 1).

L'observation se fait au microscope à épifluorescence Zeiss Axiophot avec le filtre approprié : 07 (excitation 457 nm, émission 530 nm).

4- Technique d'hybridation in situ :

Pour localiser les sites d'ARNr chez les espèces d'*Iris*, nous avons hybridé *in situ* deux types de sondes : la sonde d'ADN ribosomique 18S-5.8S-26S (35S) d'*Arabidopsis thaliana*, représentant un fragment de 4 kb Eco RI, et de l'ADN ribosomique 5S de blé, représentant un fragment de 410 pb BamHI. Les sondes 5S et 35S ont été marquées respectivement avec les fluorochromes Digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics) par la technique de Réaction Polymérisation en Chaîne (PCR), et CY3 (Amersham) par Nick-Translation en suivant les instructions du fabricant du kit Amersham.

Avant de commencer l'application de la technique, les lames contenant les préparations chromosomiques sont lavées avec de l'éthanol à 100%, et laissées sécher à température ambiante. Ensuite 200µl d'RNase (10mg/ml diluée au 1/100^{ème}) sont déposés sur chaque lame. Les lames sont recouvertes de lamelles en plastique en évitant la formation des bulles d'air, et mises dans une chambre humide (boîte tapissée de Kleenex imbibés de 2×SSC) pendant 1h à 37°C.

Après, les lamelles sont enlevées et les lames sont rincées avec du 2×SSC dans un portoir sous agitation lente pendant 5 min. et à température ambiante. 50 à 70 µl de la pepsine (1mg/mL dans HCl 1N) est déposé par lame, les lames sont recouvertes d'une lamelle plastique et mises dans une chambre humide (boîte tapissée de kleenex imbibées de 2×SSC) pendant 30 min. à 37°C.

Ensuite les lames sont lavées dans un portoir avec du 2×SSC sous agitation lente pendant 5 min. à température ambiante, ce lavage est répété 3 fois. Pendant le premier lavage de 5 min, les lamelles sont laissées se décoller seules sur les lames puis retirées à l'aide d'une paire de pince.

Les lames sont déshydratées dans une série d'éthanol dans un portoir sous agitation lente à température ambiante :

- Ethanol à 70% pendant 3 min.
- Ethanol à 90% pendant 3 min.
- Ethanol à 100% pendant 3 min.

Les lames sont placées sur un portoir et laisser sécher pendant une 1h30. Le mélange contenant la sonde est préparé et dénaturé pendant 10 min. à 65°C puis mis immédiatement dans la glace au moins 15 min. 50 µl du mélange contenant la sonde sont déposés sur les lames puis recouvertes avec une lame en plastique. Les lames sont placées (4 par 4) dans une boîte en plastique dont le fond est lavé à l'alcool à 95%. Pour éviter l'entrée de l'humidité, il est possible de scotcher l'ouverture. La boîte est mise dans un bain-marie à 72°C pendant 10 min. (pour la dénaturation des chromosomes sur les lames) puis transférée dans un bain marie à 55°C pendant 5 min. Les lames sont retirées doucement et mises sur un portoir dans la boîte tapissée de Kleenex imbibée de 2×SSC préalablement chauffée à 37°C, température d'hybridation et laissées incuber toute la nuit à 37°C. Les lavages de stringence sont destinés à débarrasser les lames de l'ADN sonde non hybridé spécifiquement. Ils sont réalisés à 42°C avec agitation douce. Une température plus élevée augmente la spécificité d'hybridation, mais diminue l'intensité du signal fluorescent. Mettre dans un bain-marie à 42°C et à faible vitesse d'agitation les tampons à chauffer : 600ml de 2×SSC, 20% formamide, 0,1 ×SSC,

100ml 4×SSCT. Mettre ensuite les lames successivement dans :

- 2×SSC à température ambiante sous agitation pendant 3 min.
- 2×SSC à 42°C pendant 3 ×5 min.
- 20% formamide à 42°C pendant 2×5 min.
- 0,1 ×SSC à 42°C pendant 1 ×5 min.
- 2 ×SSC à 42°C pendant 2× 5 min.
- 4× SSCT à 42°C pendant 5min.
- 4 ×SSCT à température ambiante sous agitation pendant 5 min.

Après le dernier lavage, les lames sont drainées sur un mouchoir et laissées se sécher quelques instants à température ambiante. Les lames sont traitées avec un tampon de détection (tampon préparé extemporanément) : 5% BSA : 0,1g de BSA dans 2 ml 4×SSCT. 100µl de tampon de détection sont déposés sur chaque lame. Les lames sont recouvertes par une lamelle en plastique et laissées 5 min. à température ambiante. L'Anti-Digoxigenin-Fluorescein est sorti et placé dans la glace, la solution d'incubation est incubée en ajoutant 6µl anti-dig dans 444µl de tampon de détection (concentration finale : 20g/ml). 50µl sont déposés par lame, les lames sont recouvertes d'une lamelle en plastique et incubées à 37°C pendant une heure dans une chambre humide (Kleenex avec 2×SSC). Les lavages sont à réaliser 3 fois, à chaque fois pendant 5 min. dans

4×SSCT à température ambiante sous agitation douce. La lamelle en plastique s'élimine toute seule lors du premier lavage, la retirer à l'aide d'une paire de pince. Les lames sont séchées sur un portoir sans les assécher en les protégeant de la lumière. La contre-coloration destinée à colorer entièrement les chromosomes, est effectuée à la température ambiante et à l'obscurité, en utilisant le DAPI ou l'IP dans le milieu de montage VECTASHIED. Les lames sont observées le lendemain. En attendant, elles sont laissées au frigo à l'abri de la lumière. Les observations sont effectuées sur un microscope à épifluorescence Zeiss Axiophot équipé d'un coulisseau portant les filtres d'excitation et d'émission adaptés aux fluorochromes utilisés : 01 DAPI (longueur d'onde d'excitation de 365 nm et d'émission de 480 nm), 09 (FITC) pour dig-oxygénine (excitation 490 nm, émission 525 nm), 15 pour CY3 (excitation 540 nm, émission 580 nm).

Les signaux d'hybridation sont analysés en utilisant une caméra CCD de haute sensibilité (Prinston) couplée à un logiciel d'acquisition et de traitement d'images (MetaVue).

Chapitre IV : Résultats et Discussion

1- Taille du génome

Nous avons fourni des données sur la taille du génome pour les 63 populations d'*Iris* des sous-genres *Hermodactyloides*, *Iris*, *Limniris* et *Scorpiris*, dont 26 espèces de la section *Oncocyclus* (Tableau 7). Dans l'ensemble, les valeurs C variaient de 2,84 fois, allant de 10,66 pg/2C pour *I. bloudowii* Bunge ex Ledeb à 30,31 pg /2C pour *I. hoogiana* Dykes, tous deux appartenant à la section *Regelia* Lynch du sous-genre *Iris*. Parmi la section *Oncocyclus*, les valeurs 2C ne varient que de 1,27 fois, allant de 15,13 pg/2C pour *I. camillae* Grossh. à 19,24 pg/2C pour *I. bismarckiana*. Un histogramme sur les valeurs 2C des 63 populations différentes des espèces d'*Iris* est présenté dans la Figure 16. Des histogrammes de cytométrie en flux présentés dans la Figure 18 sont obtenus à partir de l'analyse d'*I. korolkovii* en utilisant *Pisum sativum* comme étalon et à partir du co-traitement d'*I. acutiloba* subsp. *lineolata* et *I. sprengeri*.

Tableau 7 : Résultats de la taille du génome. Le nombre chromosomique, le nombre de loci ADNr 35S et les données écologiques sont indiqués selon la disponibilité de ces données.

<i>Iris</i> (sous-genre, section, espèce)	2C (SD) en pg	Et ¹	T ²	2n ³	PS ⁴	Origine, altitude (m)
Sous-genre <i>Hermodactyloides</i>						
<i>I. histrio</i>	24,96 (0,51)	3	2	20	3	Liban, Barouk, 1100 m
Sous-genre <i>Iris</i>						
Section <i>Oncocyclus</i>						
<i>I. acutiloba</i> subsp. <i>lineolata</i>	16,73 (0,10)	1	1	20	1	Arménie (RBGK 2012-1109), 1000 m
<i>I. acutiloba</i> subsp. <i>lineolata</i>	15,94	2	2	20	1	Leg. Frédéric Dépalle
<i>I. acutiloba</i>	16,72 (0,17)	2	2	20	1	
<i>I. antilibanotica</i>	16,83 (0,54)	3	2	20*	1	Liban, Khreibeh, 1337 m
<i>I. antilibanotica</i>	17,05 (0,54)	3	2	20*	1	Liban, Khreibeh, 1337 m
<i>I. assadiana</i>	17,44 (0,56)	3	2	20	1	Syrie
<i>I. assadiana</i>	17,61 (0,55)	2	2	20	1	Leg. Frédéric Dépalle
<i>I. atropurpurea</i>	18,53 (0,14)	1	1	20	1	Israël (RBGK 1998-2808)
<i>I. barnumiae</i> x <i>I. paradoxa</i> <i>choschab</i>	f.17,31 (0,05)	1	1	20	1	(Leg. Ray Drew, RBGK)
<i>I. bismarckiana</i>	18,24 (0,59)	3	2	20*	1	Liban, Sarada, 435 m
<i>I. bismarckiana</i>	19,24 (0,54)	2	2	20	1	Jordanie
<i>I. camillae</i>	15,13 (0,49)	3	2	20	1	Azerbaïdjan
<i>I. camillae</i>	16,40 (0,55)	2	2	20	1	
<i>I. cedreti</i>	16,83 (0,5)	3	2	20*	1	Liban, Bcharre, 1900 m
<i>I. damascena</i>	16,44 (0,04)	3	2	20	1	Syrie
<i>I. haynei</i> var. <i>jordana</i>	16,20 (0,52)	3	2	20	1	Jordanie
<i>I. iberica</i> subsp. <i>elegantissima</i>	17,89 (0,18)	1	1	20	1	Turquie (RBGK 1999-4347), 2200 m
<i>I. iberica</i> subsp. <i>iberica</i>	17,25 (0,05)	1	1	20	1	Inconnue (RBGK 2002-2632)
<i>I. kirkwoodii</i> subsp. <i>kirkwoodii</i>	17,83 (0,06)	1	1	20	1	Turquie (RBGK 1994-2407)
<i>I. kirkwoodii</i>	17,50	2	2	20	1	Syrie [1]

<i>I. kirkwoodii</i>	17,25 (0,15)	2	2	20	1	Syrie [2]
<i>I. lortetii</i>	16,53 (0,19)	3	2	20*	1	Liban, Mays el Jabal, 640 m
<i>I. lortetii</i>	16,38 (0,29)	2&3	2	20	1	Israël
<i>I. mariae</i>	15,34 (0,5)	3	2	20	1	Israël
<i>I. meda</i>	15,21 (0,49)	3	2	20	1	Iran [1]
<i>I. meda</i>	15,33 (0,28)	2	2	20	1	Iran [2]
<i>I. mirabilis</i>	15,69 (0,10)	2	2	20	2	Iran
<i>I. nigricans</i>	16,68	3	2	20	1	Palestine, Bani Naim
<i>I. paradoxa</i>	17,32 (0,08)	1	1	20	2	Arménie (RBGK 1977-4470)
<i>I. petrana</i>	18,17 (0,11)	1	1	20	1	Inconnue (RBGK 1990-3180)
<i>I. petrana</i>	18,01 (0,48)	2	2	20	1	Jordanie
<i>I. samariae</i>	16,56 (0,04)	3	2	20	1	Israël
<i>I. sari</i>	18,03 (0,11)	1	1	20	1	Inconnue (RBGK 2011-1955)
<i>I. schelkovnikowii</i>	16,11 (0,04)	2	2	-	1	Leg. Frédéric Dépalle
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	16,36 (0,53)	3	2	20	1	Liban, Chabrouh, 1900 m
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	16,68 (0,53)	3	2	20*	1	Liban, Ehmej, 1217 m
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	16,90 (0,49)	3	2	20*	1	Liban, Hazzerta, 1530 m
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	16,22 (0,37)	3	2	20*	1	Liban, Dahr El-Baydar, 1640 m
<i>I. sprengeri</i>	19,20 (0,16)	1	1	20	1	Turquie (RBGK 2011-1958), 1000 m
<i>I. westii</i>	16,00 (0,75)	3	2	20*	1	Liban, Tawmet Jezzine, 1300 m
<i>I. yeruchamensis</i>	16,54 (0,05)	3	2	-	1	Israël
<i>I. yebrudii</i> subsp. <i>yebrudii</i>	16,20 (0,11)	3	2	20	1	Syrie [1]
<i>I. yebrudii</i>	16,58 (0,17)	2	2	20	1	Syrie [2]
<i>I. sp.</i>	16,00 (0,05)	2	2	-	1	Iran
<i>I. sp.</i>	15,70 (0,08)	2	2	-	1	Azerbaïdjan
Section Regelia						
<i>I. afghanica</i>	14,67 (0,47)	3	2	22	3	Afghanistan
<i>I. bloudovii</i>	10,66 (0,13)	1	1	16, 26	3	Sibérie (RBGK 2004-2257)
<i>I. hoogiana</i>	30,31 (0,13)	1	1	44	3	Tadjikistan (RBGK 2010-2098)
<i>I. korolkovii</i>	16,03 (0,03)	4	1	22- 33- 44	3	Inconnue (RBGK 2010-2101)
<i>I. lineata</i>	29,77 (0,04)	1	1	44	3	Tadjikistan (RBGK 1993-3285)
<i>I. scariosa</i>	13,09 (0,18)	1	1	24	3	Kazakhstan (RBGK 2014-643)
<i>I. stolonifera</i>	30,24 (0,11)	1	1	44	3	Pamir (RBGK 1984-91)
Section Iris						
<i>I. albicans</i>	24,84 (0,65)	3	2	44-48	3	Liban, Aley, 880 m
<i>I. mesopotamica</i>	29,84 (0,79)	2	2	48	3	Liban, Mrouje, 1200 m
Sous-genre Linniris						
<i>I. longipetala</i>	15,84 (0,19)	2	2	86-88	1	Leg. Frédéric Dépalle
<i>I. pseudacorus</i>	11,03 (0,36)	3	2	34	3	Liban, Kfarzabad, 980 m
<i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	17,80 (0,28)	3	2	40*	3	Liban, Baadarane, 1200 m
Sous-genre Scorpiris						
<i>I. palaestina</i>	21,55 (0,52)	3	2	24	3	Liban, Joun, 460 m
<i>I. persica</i>	20,99 (0,05)	1	1	20-24	3	Turquie (RBGK 2014-1875), 1200 m
<i>I. persica</i>	18,89 (0,32)	3	2	24*	3	Liban, Quaa, 700 m
<i>I. persica</i>	19,05	3	2	20-24	3	Liban, Yammouneh
<i>I. regis-uzzaiae</i>	22,80 (0,03)	1	1	20	3	Israël (RBGK 1987-2212), 500 m

¹Étalon: (1) *Allium cepa* 2C=34,89 pg (Doležel *et al.* 1998), (2) *Artemisia arborescens* 2C=11,43 pg (Garcia *et al.* 2006), (3) *Triticum aestivum* 2C=30,90 pg (Marie & Brown 1993), (4) *Pisum sativum* 'Ctirad' 2C=9,09 pg (Doležel *et al.* 1998).

²Tampon: (1) GPB (Loureiro *et al.* 2007) avec 3% de PVP-40 et 8% de triton ajouté, (2) Tampon de Galbraith (Galbraith *et al.* 1983).

³Nombre chromosomique: l'astérisque indique les données déterminées par Abdel Samad *et al.* 2016 (Soumis) sur les mêmes individus mesurés pour la taille du génome ; d'autres données sont mentionnées par « Chromosome counts database » (Rice *et al.* 2015).

⁴Stratégie de Pollination: (1) un abri mimique, (2) la tromperie sexuelle, (3) une autre stratégie de pollinisation (de Vereecken *et al.* 2012).

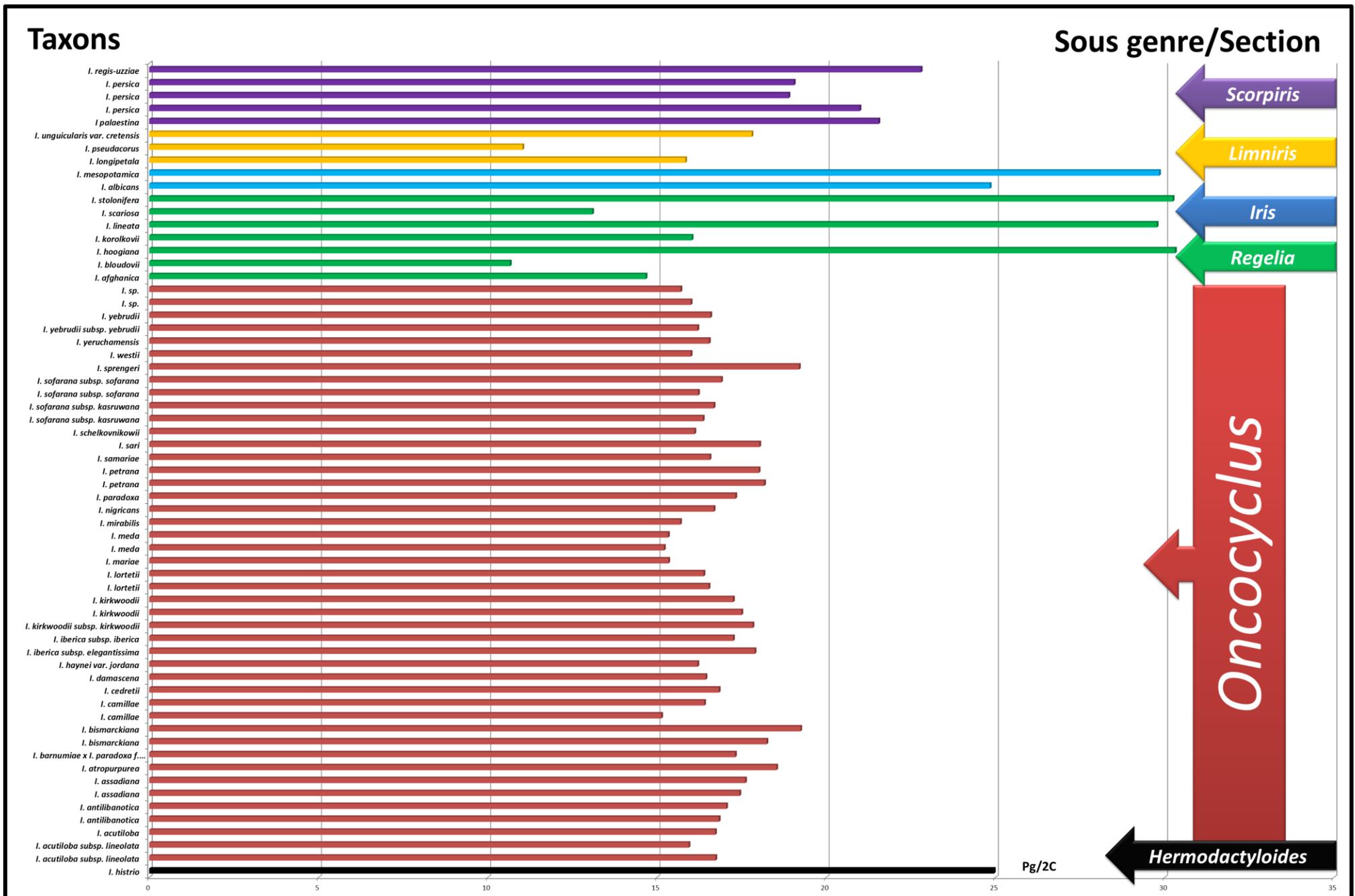


Figure 16: Un histogramme sur les valeurs 2C des 63 populations différentes des espèces d'*Iris*.

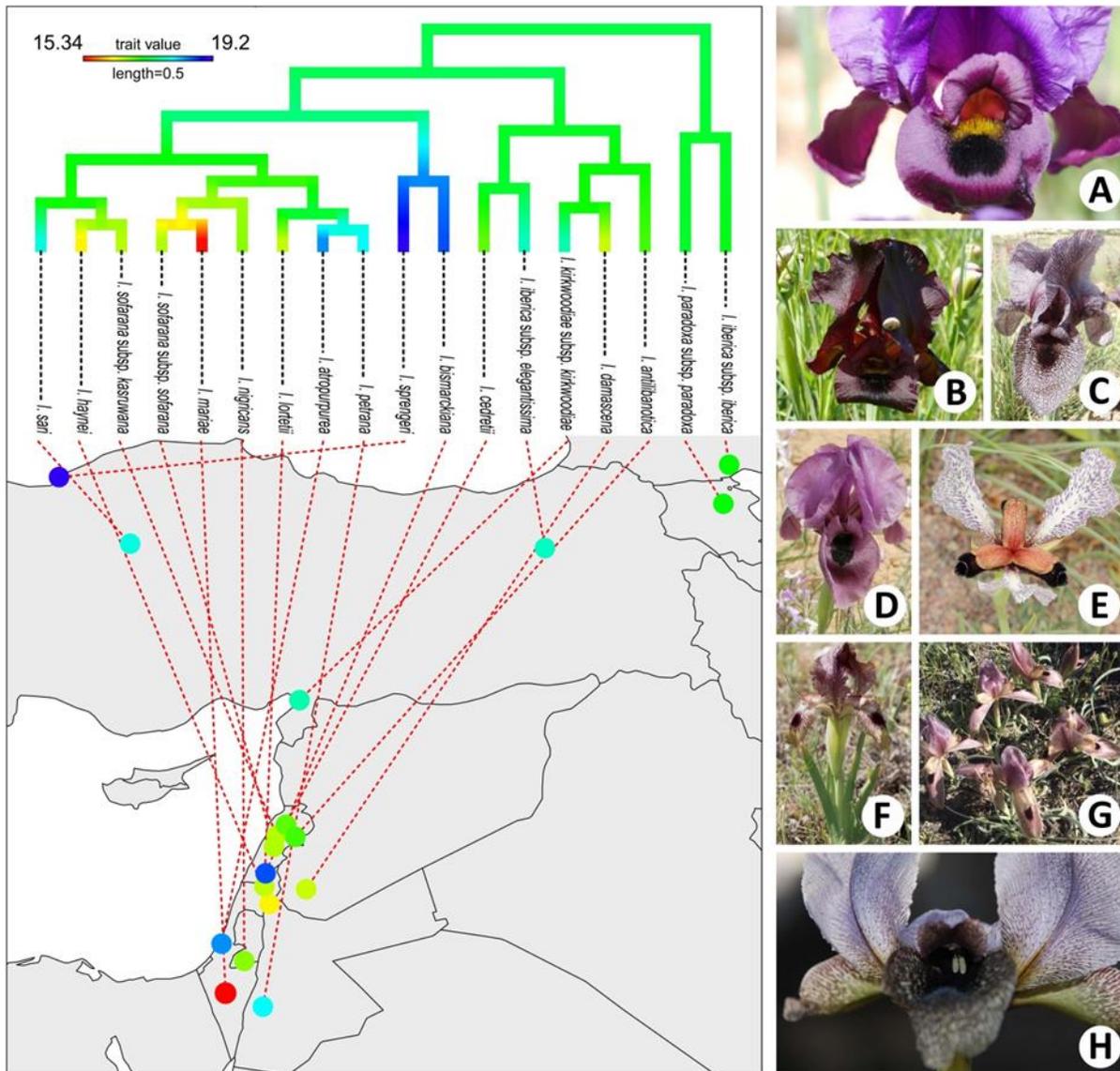


Figure 17: Phylogénie des espèces *Oncocyclus* (Wilson *et al.* 2016) tracée sur la carte géographique et montrant la reconstruction de la taille du génome ancestrale (à gauche) avec des images illustrant la diversité du phénotype floral parmi des iris *Oncocyclus* (à droite). A. *I. antilibanotica*. B. *I. atropurpurea* (crédit: Mat Knight & Zachy Evenor). C. *I. cedreti*. D. *I. mariae* (crédit: Hedva Sanderovitz). E. *I. paradoxa* (crédit: CT Johansson). F. *I. sari* (crédit: Zeynel Cebeci). G. *I. sprengeri* (crédit: Kohran 1923). H. *I. westii*.

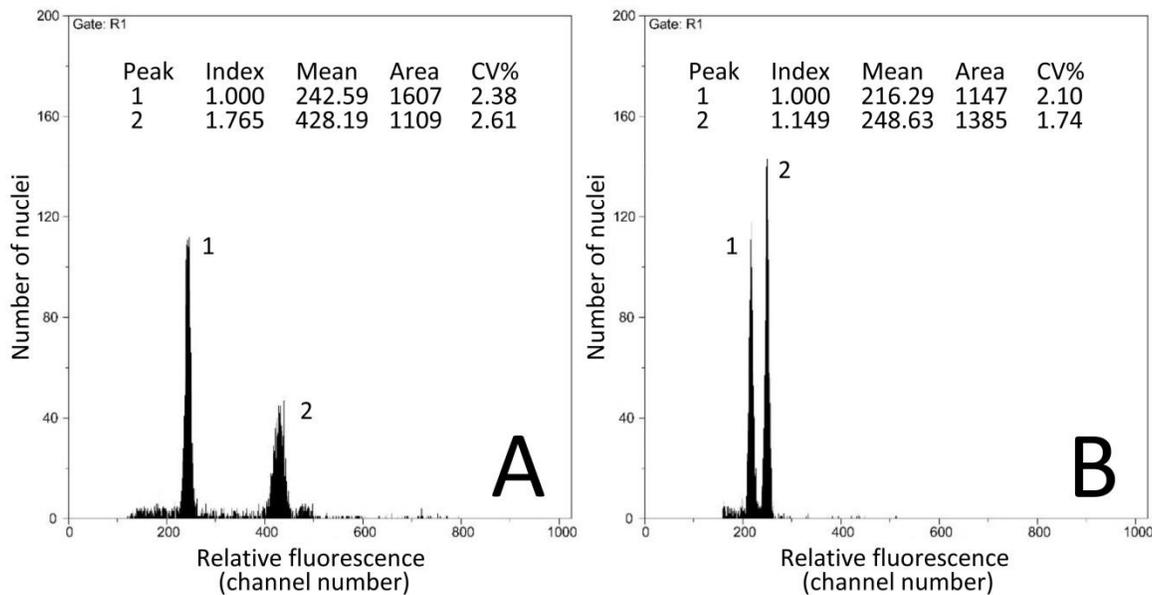


Figure 18: Histogrammes obtenus par cytométrie en flux. A. à partir de l'analyse d'*I. korolkovii* (16,03 pg / 2C, pic 2) en utilisant *Pisum sativum* (9,09 pg / 2C, pic 1) en tant qu'étalon. B. à partir du co-traitement d'*I. acutiloba* subsp. *lineolata* (16,73 pg / 2C, pic 1) et *I. sprengeri* (19,20 pg / 2C, pic 2).

La Figure 16 représente un histogramme sur les valeurs 2C des 63 populations différentes des espèces d'*Iris*. Nous remarquons que la taille du génome est un facteur de différence qui sépare différents sous-genres et sections : sous-genre *Hermodactyloides*, sous-genre *Limniris*, sous-genre *Scorpiris*, section *Oncocyclus*, section *Regelia*, section *Iris*. Pour la section *Oncocyclus*, la valeur la plus fréquente est de 16 pg/2C. Pour la section *Regelia*, les espèces tétraploïdes comme *I. hoogiana* (30,31 pg/2C) ont à peu près la même valeur 2C égale à 30 pg/2C, les espèces diploïdes comme *I. afghanica* (14,67 pg/2C) présentent des valeurs différentes. Les valeurs des espèces mesurées du sous-genre *Scorpiris* sont très proches entre 21 et 22 pg/2C, tandis que celles du sous-genre *Limniris* sont différentes (entre 11 et 17 pg/2C) et de la section *Iris* aussi (entre 25 et 30 pg/2C). Concernant *I. persica*, on remarque une grande différence dans la valeur 2C, entre la population Turque (21 pg/2C pour un échantillon) et celle du Liban (19 pg/2C pour 6 échantillons).

La phylogénie des espèces *Oncocyclus* (Wilson *et al.* 2016) tracée sur la carte géographique et montrant la reconstruction de la taille du génome ancestrale (Figure 17), prouve encore une fois ce qui a été suggéré par plusieurs auteurs (Davis 1946, Gavrilenko 1975, Wilson *et al.* 2016) concernant la région ancestrale des *Oncocyclus*. La Caucasic (Géorgie, Arménie et Azerbaïdjan) est la région ancestrale et le centre de diversification de la section *Oncocyclus*. Les *Oncocyclus* les plus anciens semblent venir des régions du sud-ouest de la mer Caspienne, les espèces du Levant étant des plus récentes (Davis 1946). Mais le sens de variation de la taille du génome pour les espèces du Levant reste inconnu, car elles présentent la plus petite et la plus grande valeur 2C.

Pour la section *Oncocyclus*, la valeur de la taille du génome la plus fréquente est au alentour de 16 pg/2C. Quelques valeurs s'écartent de cette moyenne mais n'en sont pas très loin comme 19 pg/2C pour *I. bismarckiana*. Cette similitude des valeurs 2C parmi les espèces de la section *Oncocyclus* peut être liée à sa répartition géographique restreinte et montre que l'*Oncocyclus* est une section récente qui est en cours d'évolution.

2- Reconstruction phylogénétique moléculaire

Au début de notre étude moléculaire sur les iris, nous avons commencé par l'amplification de la région ITS, en utilisant deux amorces universelles ITS-4 et ITS-5, la taille attendue était de 600 bp (Figure 19). Mais nous avons eu des problèmes de séquençage, 8 de 66 échantillons seulement ont pu être séquencés (Figure 20).

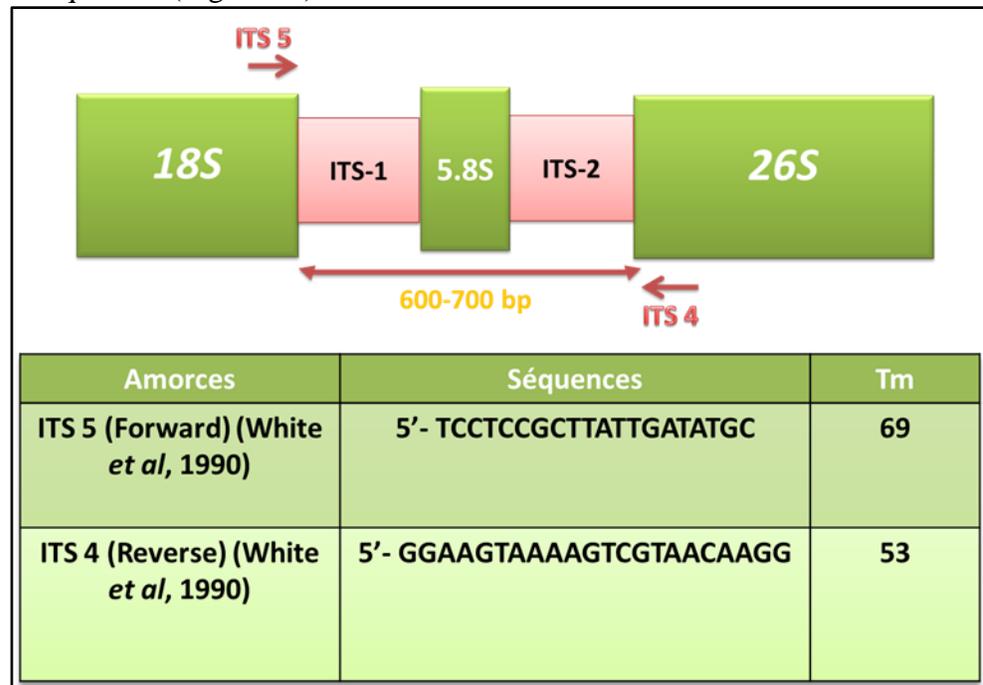


Figure 19: La région ITS et les deux amorces universelles ITS-4 et ITS-5 utilisées.

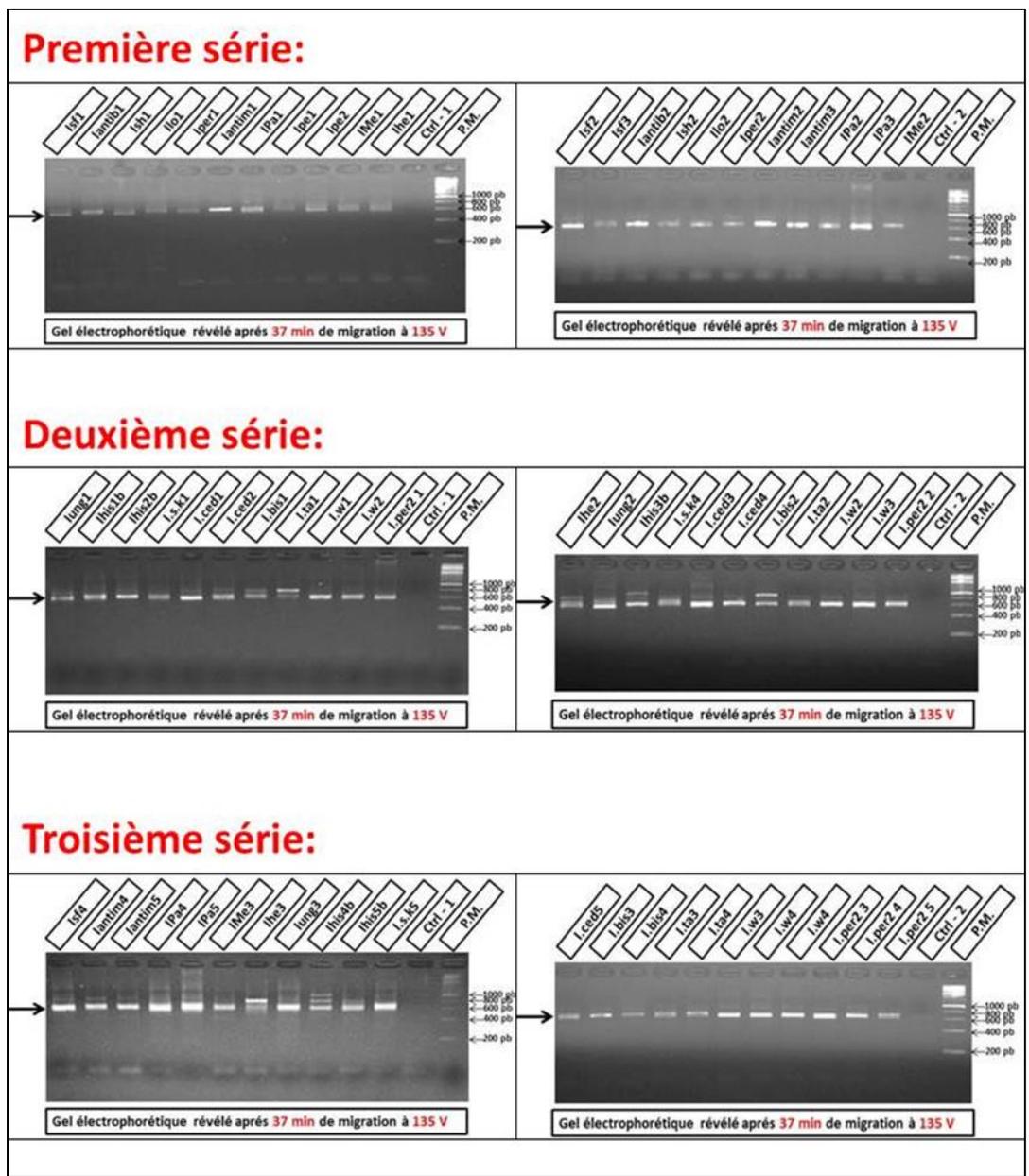


Figure 20: Les gels électrophorétiques montrant les produits PCR de 66 échantillons.

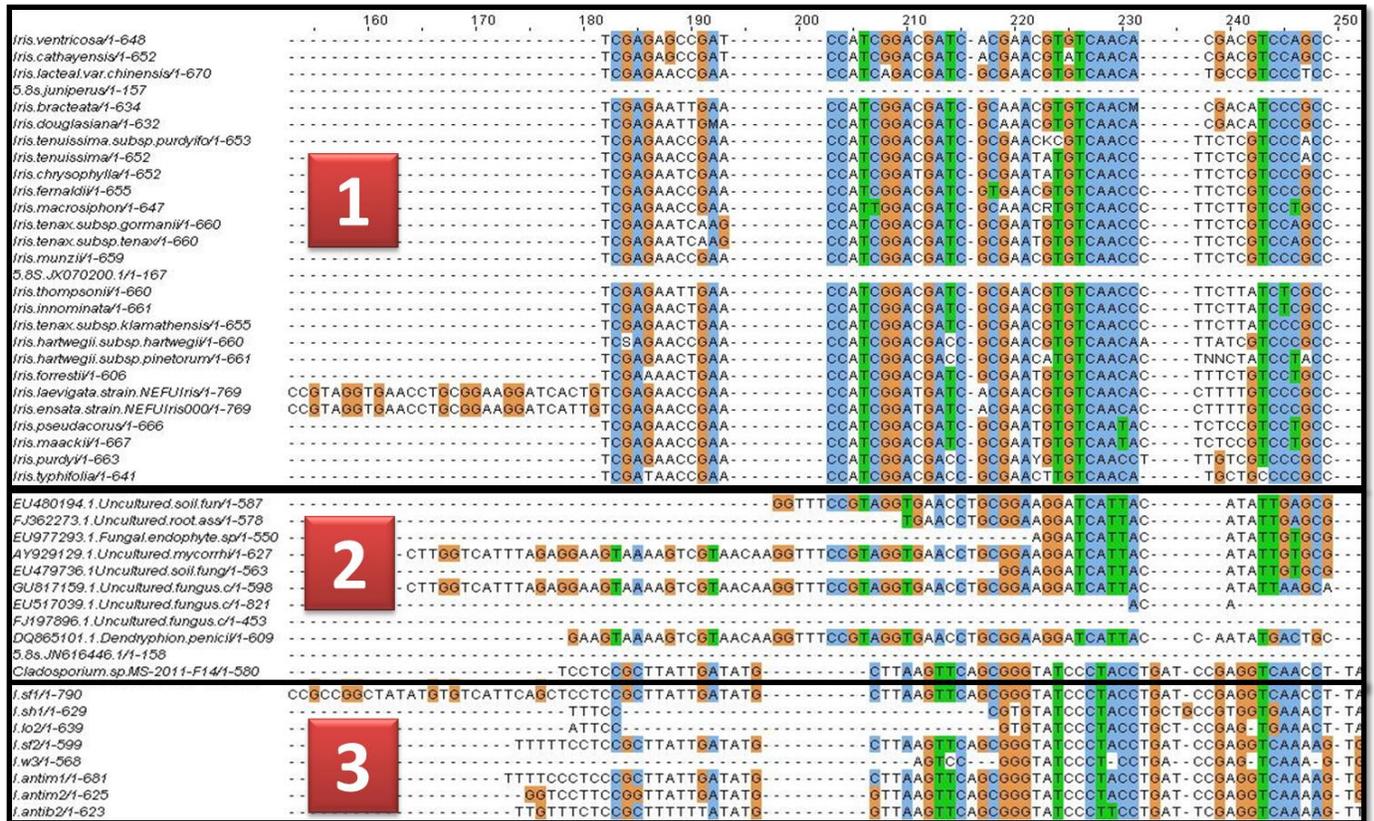


Figure 21: 1. Les séquences des espèces d'*Iris* publiées sur NCBI; 2. Les séquences des espèces de champignons endophytes publiées sur NCBI; 3. Nos séquences des espèces d'*Iris*.

En alignant les 8 séquences sur NCBI, nous avons remarqué la forte ressemblance entre nos séquences et les séquences d'un champignon endophyte (*Cladosporium sp.*, *Dendriphion sp.*) et non pas les séquences des iris déjà publiées (Figure 21), donc les ITS du champignon endophyte qui est présent dans les cellules des iris ont été amplifiés au lieu des ITS de nos iris, car les amorces universelles ont été développées à partir des champignons endophytes. Ainsi, leur haute spécificité pour ces organismes est compréhensible (White *et al.* 1990). La seule solution était de fabriquer une autre amorce spécifique de la région ITS des iris et non pas celle du champignon. La nouvelle amorce fabriquée était nommée ITS-N1 (Figure 22), nous l'avons utilisée cette fois-ci avec l'amorce ITS-4 déjà utilisée. Les résultats étaient positifs (Figure 23) et les produits PCR étaient tous séquencés mais non pas été utilisés dans la construction phylogénétique, car il y avait plusieurs séquences superposées, et cela nécessite la réalisation systématique du clonage pour les isoler. Cela peut être dû à des champignons endophytes mais aussi à la présence de plusieurs copies ITS d'*Iris*, en particulier s'il y a hybridation et introgression entre espèces.

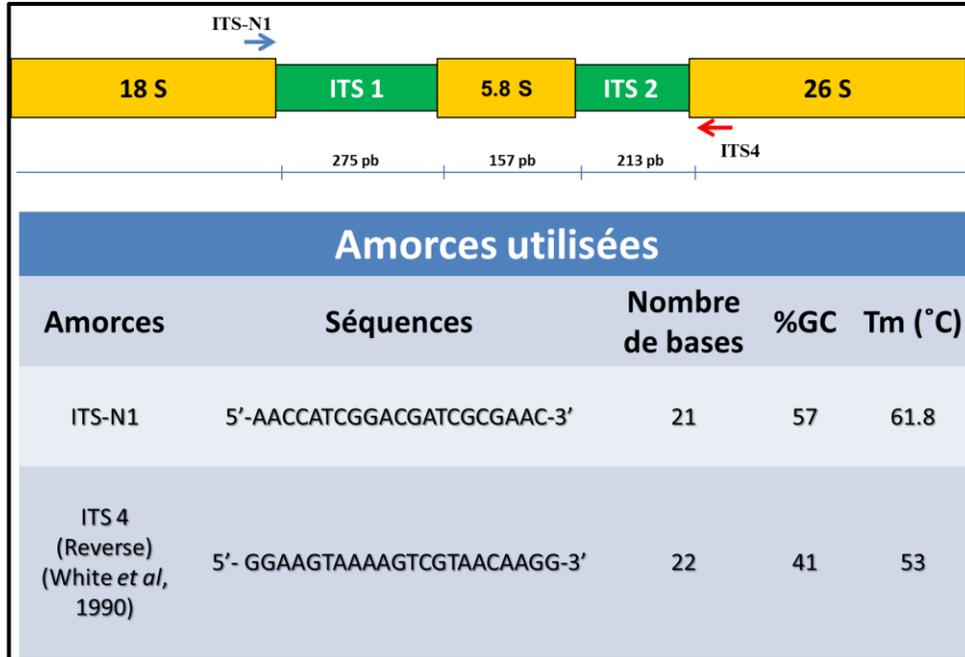


Figure 22: La nouvelle amorce utilisée ITS-N1.

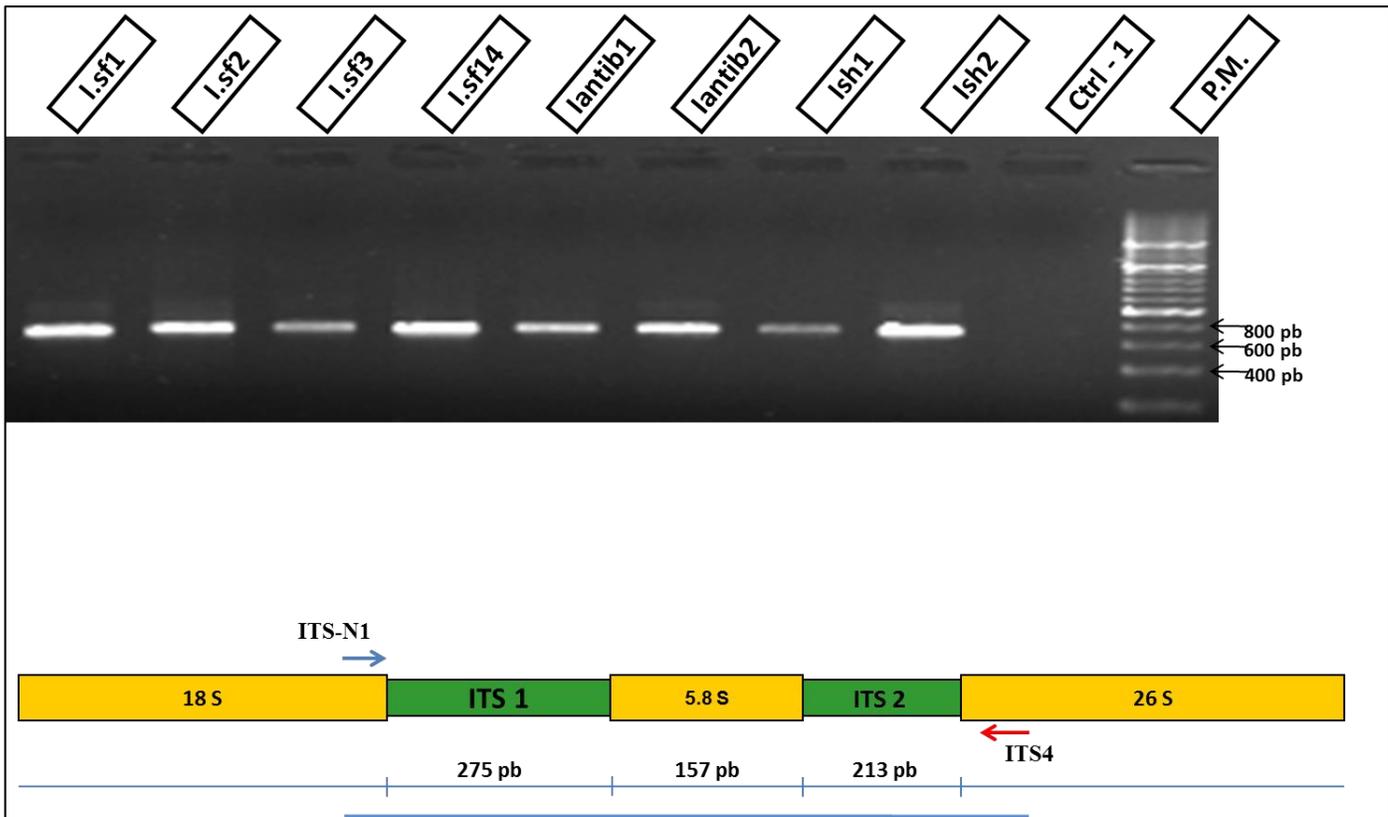


Figure 23: Un gel électrophorétique montrant les produits PCR de quelques échantillons.

L'arbre consensus obtenu par l'analyse bayésienne des marqueurs chloroplastiques est présenté Figure 24. La topologie de cette inférence est largement congruente avec les phylogénies moléculaires récemment publiées dans le genre *Iris* (Ikinci *et al.* 2011, Martinez 2010, Mavrodiev *et al.* 2014, Wilson 2004, 2009, 2011). Nos résultats montrent que les iris du Liban se distribuent entre quatre sous-genres : *Hermodactyloides*, *Iris*, *Scorpiris* et *Siphonostylis*, ces derniers présentant tous une valeur de probabilité postérieure significative (PP > 0.95) attestant de leur monophylie, à l'exception du sous-genre *Iris*, dont le support n'est pas significatif (PP = 0.94). Dans le sous-genre *Hermodactyloides*, les différentes accessions d'*I. histrio* forment un groupe monophylétique (PP = 1), frère d'*I. reticulata*. Dans le sous-genre *Siphonostylis*, *I. unguicularis* subsp. *cretensis* provenant d'une population libanaise apparaît plus proche de *I. lazica* (PP = 1) que de l'autre *I. unguicularis* analysé (Wilson, 2009). Au sein du sous-genre *Scorpiris*, les individus d'*I. persica* des populations libanaises de Yammouneh et Quaa rejoignent *I. regis-uzziae*, *I. aucheri* et *I. nusairiensis* (PP = 0.98), et non pas les deux autres individus de *I. persica* analysés (Ikinci *et al.* 2011 ; Wilson 2011), qui apparaissent dans un autre clade. Enfin, dans le sous-genre *Iris*, *I. mesopotamica* se regroupe avec *I. aphylla* et *I. schachtii* dans la section *Iris* (PP = 1), alors que les *Iris* des sections *Oncocyclus*, *Hexapogon* et *Regelia* forment une polytomie (PP = 1). Ces résultats mettent en évidence des problèmes de circonscription pour certaines espèces (ex. *I. unguicularis* et *I. persica*) qui mériteraient une étude plus approfondie. Mais surtout, ils illustrent l'incapacité des marqueurs moléculaires utilisés à résoudre les relations phylogéniques dans les sections *Oncocyclus* et affines, du fait de la radiation évolutive qui a conduit à une diversification très rapide et une faible divergence moléculaire. Malgré l'utilisation de six marqueurs chloroplastiques et d'un marqueur nucléaire, la plus récente phylogénie de la section *Oncocyclus* présente des supports relativement faibles, et de plus, aucune des cinq espèces représentées par deux entités subspécifiques ou plus apparaît monophylétique (Wilson, Padiernos et Sapir 2016). Il faudrait certainement multiplier les marqueurs par du séquençage de nouvelle génération pour pouvoir espérer résoudre les relations phylogénétiques dans un groupe tel que les iris *Oncocycles*.

Toutes les espèces *Oncocyclus* sont capables de produire des descendance vitales croisées, ainsi, selon le SC (Species Concept, concept d'espèce) biologique, ils sont une seule espèce biologique. Les caractères morphologiques quantitatifs sont continus entre les populations et sont

aussi en corrélation avec les conditions environnementales, la prévention de délimitation des espèces selon un SC écologique et phénétique (Sapir & Shmida 2002).

Bien qu'une conclusion systématique des conclusions ci-dessus puisse suggérer la fusion de la plupart des espèces *Oncocyclus* du Levant sud dans un ou quelques taxons, une approche pratique exigerait le contraire. La biologie de la conservation des plantes est principalement basée sur le niveau de l'espèce (Gärdenfors *et al.* 2001, Maddock & du Plessis 1999, Myers *et al.* 2000), mais chez les iris *Oncocyclus*, ne conservant que quelques morpho-espèces ne serait pas suffisant pour préserver la diversité globale (Corien & Avishai 2001). Il est également important de conserver la diversité morphologique et écologique actuelles des iris.

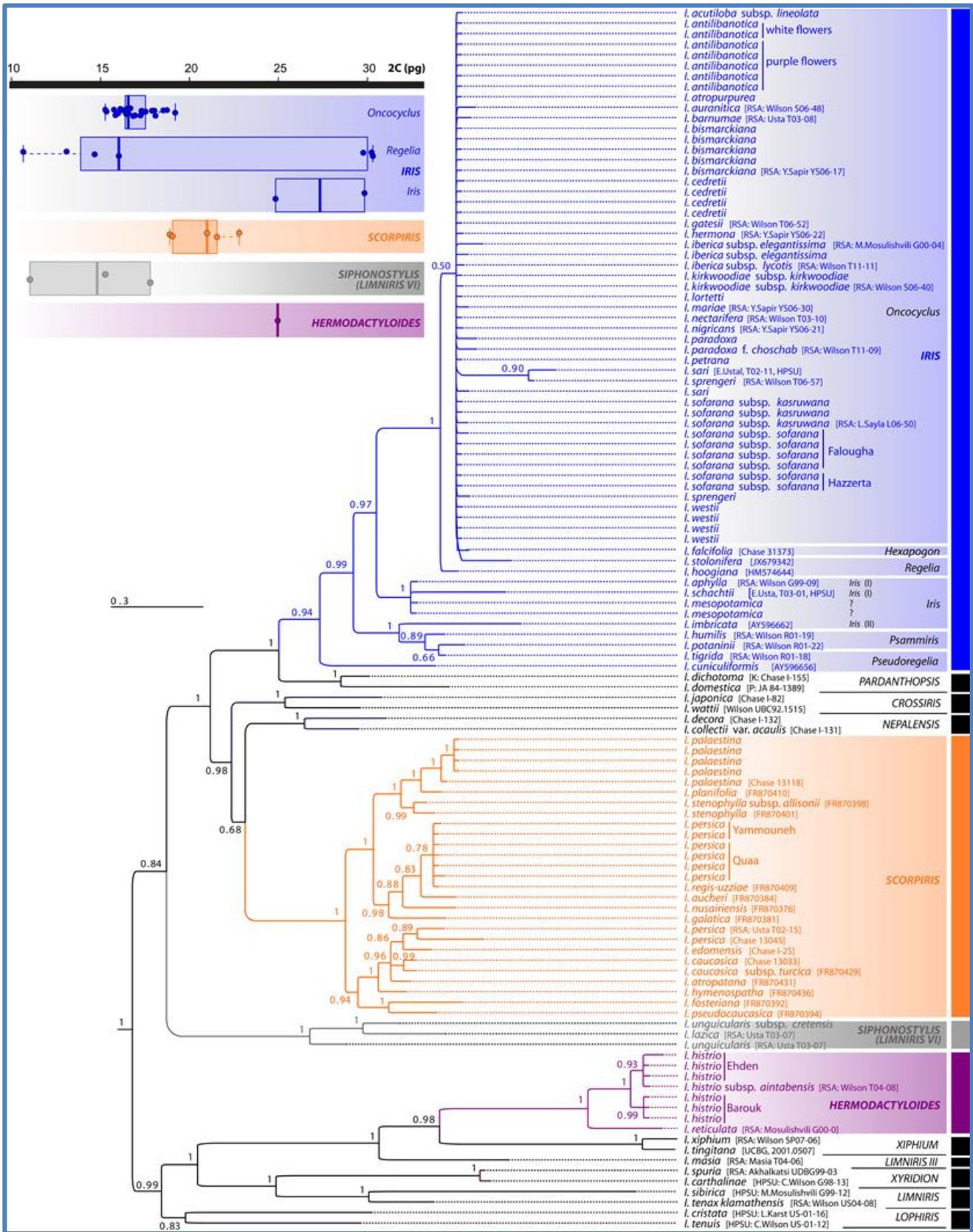


Figure 24: La phylogénie consensus de 83 séquences des taxa d'*Iris* obtenue par l'analyse bayésienne de l'ensemble de données combinées des *matK-trnK* et *trnL-trnF*. En haut à gauche : boxplots avec des valeurs individuelles pour les espèces, représentant la distribution des valeurs de la taille du génome à travers les sous-genres et les sections du genre *Iris*.

3- Nombre chromosomique et analyse du caryotype

Un nombre diploïde de chromosomes de $2n = 2x = 20$ avec un nombre chromosomique de base $x = 10$ a été observé dans les études des sept taxons *Oncocyclus*. Leurs caryotypes détaillés ont été établis pour la première fois dans cette étude. Les données morphométriques pour chaque caryotype sont présentées dans l'Annexe 5. Les caryotypes des taxons *Oncocyclus* étaient remarquablement similaires en taille et en symétrie. Les longueurs des chromosomes variaient de 1,8 à 6,7 μm . Pour les autres taxons non *Oncocyclus*, le nombre chromosomique était soit diploïde $2n = 2x = 24$ pour *I. persica*, soit tétraploïde $2n = 4x = 40$ pour *I. unguicularis* var. *cretensis* et $2n = 4x = 48$ pour *I. mesopotamica* avec des nombres chromosomiques de base de $x = 12$ ou de $x = 10$. L'indice d'asymétrie intrachromosomique (M_{CA}) des taxons *Oncocyclus* variait de 68,4 à 73,6%. Pour *I. persica*, *I. unguicularis* var. *cretensis* et *I. mesopotamica*, M_{CA} était de 40,4%, 27,13% et 39,9% respectivement. L'indice d'asymétrie interchromosomique (CV_{CL}) des dix taxons variait de 20,9% à 33%. Les données morphométriques sont représentées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Principales données sur les caryotypes des taxa d'*Iris*.

Taxon	2n (x)	Formule chromosomique (2n)	M_{CA}	CV_{CL}
<i>I. antilibanotica</i>	20 (2x)	4t+2st-t+14st	71	33
<i>I. bismarckiana</i>	20 (2x)	10t+10st	73,2	28,1
<i>I. cedreti</i>	20 (2x)	10t+10st	73,6	31,6
<i>I. lortetii</i>	20 (2x)	18st+2t	68,4	29,6
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Falougha)	20 (2x)	6t+14st	70,6	31,4
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Hazzerta)	20 (2x)	6t+14st	71,6	31,7
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	20 (2x)	4t+16st	68,6	29,3
<i>I. westii</i>	20 (2x)	6t+14st	72,7	30,1
<i>I. mesopotamica</i>	48 (4x)	12m+24st+10sm+2sm-st	39,9	20,9
<i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	40 (4x)	12m+24sm+4st	27,13	24,42
<i>I. persica</i>	24 (2x)	2n=4M-m+12m+6sm+2st	40,4	31,7

M_{CA} - Indice d'asymétrie intrachromosomique (Peruzzi & Eroglu 2013); CV_{CL} - Indice d'asymétrie interchromosomique (Paszko 2006).

Les caryotypes des taxons étudiés ont été établis pour la première fois en utilisant des techniques de mesures classiques des chromosomes sur plusieurs plaques métaphasiques par espèce ou par population. Nos résultats montrent qu'en dépit des particularités de la couleur de la fleur, le caryotype des espèces *Oncocyclus* est resté essentiellement inchangé. Les espèces ont un complément chromosomique extrêmement similaire, bimodal et asymétrique ($2n = 20$) avec quatre paires (ou cinq pour *I. lortetii*) de chromosomes de grande taille et six paires de chromosomes de petite taille. Les petits chromosomes peuvent être différenciés en deux paires satellifères, deux paires avec « bouton visible » comme bras courts, et deux autres paires avec des bras courts « minuscules ». Toutes les espèces de la section *Oncocyclus* étudiées ici se sont révélées diploïdes avec un nombre chromosomique de base $x = 10$ et des caryotypes ayant des caractéristiques très similaires. Ceci est en accord avec les résultats rapportés par Avishai & Zohary (1967) et Mitra (1956) pour une douzaine de taxons *Oncocyclus* analysés. Le nombre constant des chromosomes et les caractéristiques similaires du caryotype peuvent être considérés comme une caractéristique de l'ensemble de la section et un trait de diagnostic séparant la section *Oncocyclus* d'autres sections d'*Iris* comme la section *Regelia* morphologiquement similaire à l'*Oncocyclus* avec un nombre chromosomique $2n = 22$ pour les diploïdes, exemple *I. korolkowii* Regel., et tétraploïdes $2n = 44$ exemple *I. stolonifera* Maxim. et *I. hoogiana* Dykes (Mitra 1956).

En plus du nombre de chromosomes de base de $x = 10$ trouvé dans les sections *Oncocyclus* et *Limniris* du sous-genre *Iris*, $x = 12$ a été trouvé dans *I. mesopotamica* (section *Iris*) et *I. persica* (sous-genre *Scorpiris*). Le nombre chromosomique de base de $x = 8, 10, 11$ et 12 a été rapporté pour le sous-genre *Iris* et $x = 10, 11, 12$ et 13 pour le sous-genre *Scorpiris* (Koçyiğit *et al.* 2013). Lorsque l'on compare le nombre chromosomique de base avec des arbres phylogénétiques du genre *Iris* (Wilson 2004), on n'a pas trouvé une tendance explicite ou corrélation entre le nombre chromosomique de base et la phylogénie. Dans chaque sous-genre, les différents nombres chromosomiques de base existent. Ainsi, nous ne pouvons pas supposer que le plus petit nombre chromosomique de base ni le plus grand soient le nombre de chromosomes ancestral.

Il est à noter que le statut taxonomique d'*I. persica* au Liban est encore un sujet de débat. En fait, Hall & Seisums (2014) ont examiné certaines populations d'*I. persica* du Liban et de la Syrie

comme une nouvelle espèce appelée *Iris wallisiae* contredisant Mouterde (1966) qui mentionnait *I. persica* dans son traitement de la flore de la Syrie et le Liban et ont déclaré qu'il n'existe aucune preuve qu'*I. persica* a jamais été trouvée au Liban. En outre, selon les mêmes auteurs, tous les rapports concernant *I. persica* par Tohmé & Tohmé (2002, 2011) pour la vallée de la Bekaa se réfèrent à *I. wallisiae*. Un comptage chromosomique de $2n = 22$ a été fait par Hall et Seisums (2014) à partir de trois populations syriennes d'*I. wallisiae* alors qu'il était $2n = 20$ dans six populations syriennes de d'*I. persica*. Nos résultats sont en conflit avec les deux comptages chromosomiques parce que nous avons trouvé $2n = 24$ pour le supposé *I. persica*, que nous avons analysé. D'autres études, sur un plus grand nombre de populations dans cette zone géographique, sont nécessaires pour mieux comprendre la taxonomie et la phytogéographie de ces taxons.

Pour *I. mesopotamica* nous avons trouvé $2n = 4x = 48$, ce qui est en accord avec les rapports précédents par Simonet (1932, 1934). *Iris mesopotamica* est considérée comme un synonyme d'*I. germanica* (Arano & Saito 1980). *Iris germanica* a été trouvée tétraploïde dans les Balkans (Siljak-Yakovlev *et al.* 2005). Les deux taxons sont considérés comme des hybrides et on a constaté qu'ils poussent dans les zones cultivées ou sauvages comme échappés de la culture. *Iris mesopotamica* est multiplié par voie végétative et distribué localement du sud de la Turquie à travers Syrie jusqu'au Israël (Mathew 1989). Souvent cultivée dans les cimetières et les jardins, cette espèce provient probablement des côtes méditerranéennes asiatiques (Mouterde 1966).

Pour *I. unguicularis* var. *cretensis*, nous confirmons le précédent rapport de $2n = 4x = 40$ (Davis & Jury 1990). Cette variété se retrouve également en Grèce, en Crète et en Asie Mineure. Les formes typiques d'*I. unguicularis* sont très répandues dans la région de la Méditerranée orientale et de l'Afrique du Nord où elles sont très variées.

La polyploïdie était importante dans la diversification précoce de la famille des Iridaceae (Goldblatt & Takei 1997). Dans le genre *Iris*, où des changements dans le nombre chromosomique de base sont communs, le nombre de base ancestral, cependant, reste douteux (Goldblatt & Takei 1997). Les reconstructions phylogénétiques ne fournissent pas une résolution suffisante pour interpréter soit une dysploïdie ascendante ou descendante. Bien que peu d'études ont évalué le phénomène de la dysploïdie dans un cadre phylogénétique, une diminution du

nombre chromosomique n'est pas inhabituelle (Cerbah *et al.* 1998 ; Siljak-Yakovlev *et al.* 1996). La dysploïdie descendante a déjà été proposée par (Goldblatt & Takei 1997) pour plusieurs genres de la famille des Iridaceae.

En se basant sur l'étude des caryotypes, nous pouvons conclure que la section *Oncocyclus* est plus récente que les sections *Iris*, *Limniris* et *Scorpiris*. Le nombre constant de chromosomes ($2n = 20$) et l'extrême similitude des caryotypes parmi les espèces de la section *Oncocyclus* peuvent être liés à sa petite répartition géographique et indiquent que l'*Oncocyclus* serait une section récente qui est en cours d'évolution.

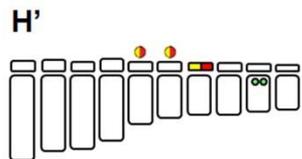
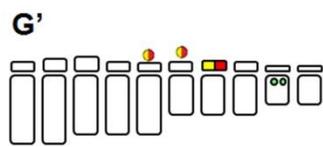
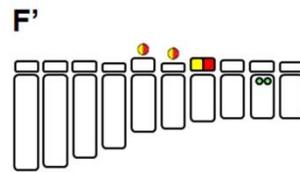
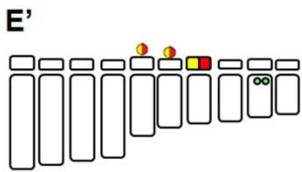
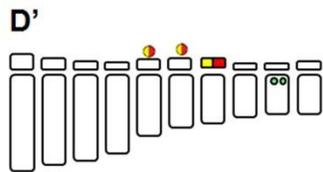
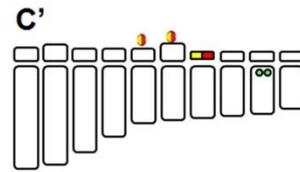
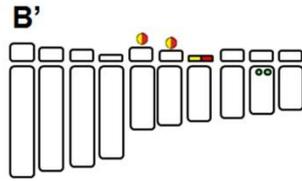
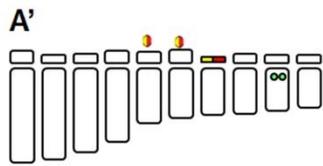
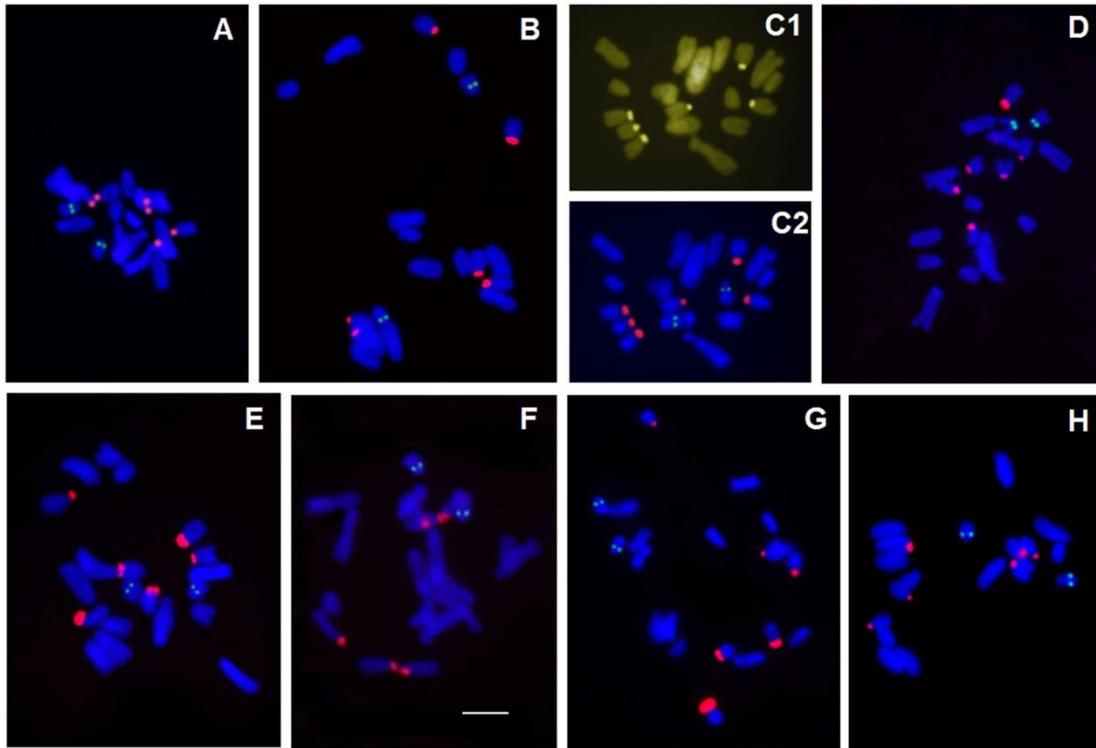
4- Cartographie de l'hétérochromatine et des gènes ribosomiques

La cartographie physique des deux familles de gènes d'ARNr 5S et 35S, et la distribution des régions d'ADN riches en GC (hétérochromatine) dans les chromosomes de dix taxons libanais ont été effectuées pour la première fois dans cette étude. Les résultats sont présentés dans le Tableau 9 et la Figure 25.

Tableau 9: La synthèse des résultats de l'approche cytogénétique moléculaire des taxa d'*Iris*.

Taxon	2n	Nombre et position des bandes CMA⁺	Nombre des signaux 35S	Nombre des signaux 5 S
<i>I. antilibanotica</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. bismarckiana</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. cedreti</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. lortetii</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. westii</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. mesopotamica</i>	48	4 (6, 11)*	4 (6, 11)*	2 (17)
<i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	40	4 (19, 20)*	4 (19, 20)*	2 (8)
<i>I. persica</i>	24	4 (11, 12)*	4 (11, 12)*	2 (6)

* Numéro de la paire de chromosome



CMA
 18-26S
 5S rDNA

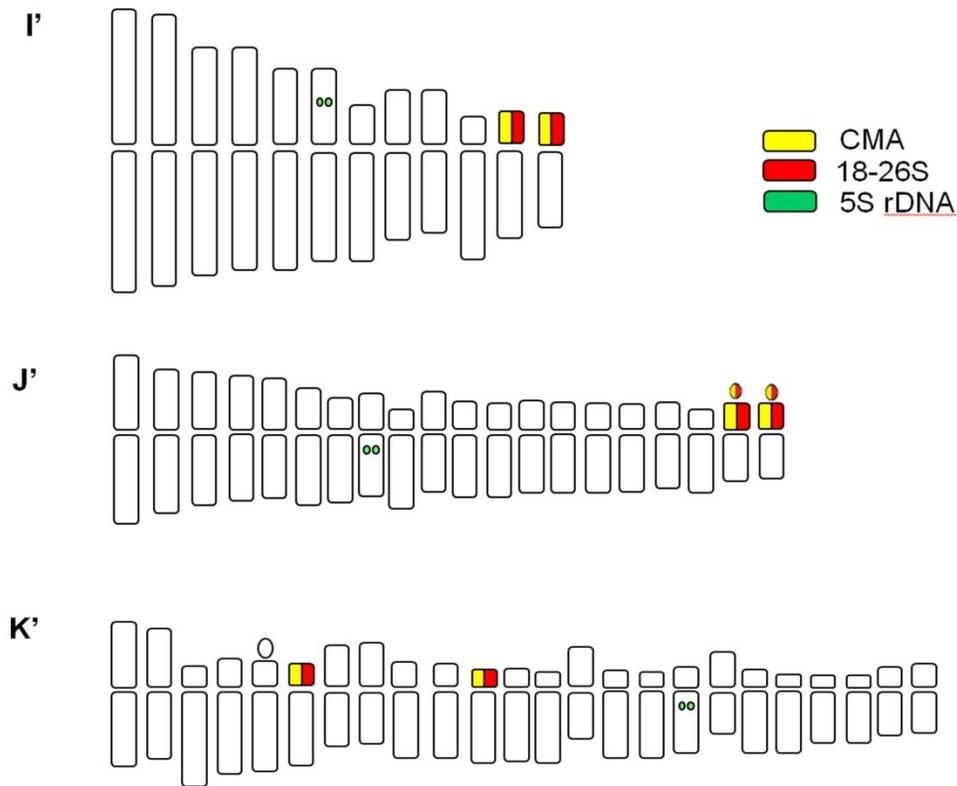
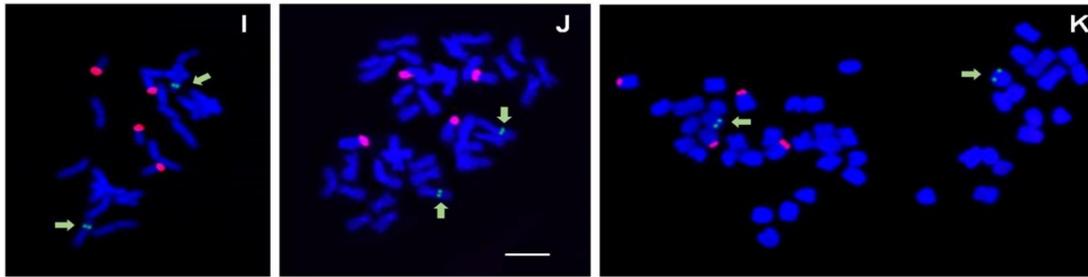


Figure 25: A-K: plaques métaphasiques des taxa d'*Iris* après FISH à double cible à l'aide de deux sondes d'ADNr 5S (signaux verts) et 35S (signaux rouges). C1 représente la coloration CMA (signaux jaunes). A' - K': idiogrammes avec emplacement de 5S (vert) et 35S (rouge) gènes d'ADNr. A': *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Falougha), B': *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Hazzerta) C': *I. sofarana* subsp. *kasruwana*, D': *I. cedreti*, E': *I. westii*, F': *I. bismarckiana*, G': *I. lortetii*, H': *I. antilibanotica*, I' : *I. persica*, J': *I. unguicularis* var. *cretensis*, K': *I. mesopotamica*. Barre d'échelle 10 μ m.

Le fluorochrome banding a révélé des régions d'hétérochromatine riches en GC (bandes CMA+) qui étaient toujours associées aux locus d'ADNr 35S. En conséquence, le nombre et la position des régions d'ADN riches en GC correspondent à celles du locus 35S (Tableau 9).

L'hétérochromatine et l'organisation d'ADNr ont été conservées et presque identiques pour tous les taxons *Oncocyclus* (Fig. 25 A-H). Les gènes 35S d'ARNr (signaux rouges) étaient situés dans les constriction secondaires (SC) et les satellites, qui correspondent aux régions organisatrices du nucléole (NORs) des paires chromosomiques satellifères 5 et 6 et sur le bras court de la paire de chromosome 7. Pour *I. persica* les gènes ribosomiques 35S étaient situés sur les bras courts des paires de chromosomes 11 et 12 (Fig. 25 I, I'), pour *I. unguicularis* var. *cretensis* sur les paires 19 et 20 (Fig. 25 J, J'), pour *I. mesopotamica* sur les paires 6 et 11 (Fig. 25 K, K'). Le seul locus 5S (signaux verts) a été localisé sur la position intercalaire paracentromérique de la paire chromosomique 9 dans tous les taxons *Oncocyclus* (Fig. 25 A-H), sur la paire 6 de *I. persica*, sur la paire 8 d'*I. unguicularis* var. *cretensis* et les paires 17 d'*I. mesopotamica* (Fig. 25 I-K).

Bien que ce genre d'études reste très rare pour le genre *Iris*, les localisations chromosomiques des loci 5S et 35S d'ADNr ont été préalablement déterminées pour 7 espèces du sous-genre *Xiphium* (The Plant List 2013) où le nombre de loci d'ADNr 35S a probablement augmenté au cours du processus de divergence (Martínez *et al.* 2010).

Dans cette étude, les deux familles de gènes d'ARNr sont situées sur des paires de chromosomes distincts. Ainsi, les gènes 5S sont d'arrangement de type S selon Garcia *et al.* (2012). Six signaux de 35S d'ADNr et 2 signaux d'ADNr 5S sont observés dans les iris *Oncocyclus* diploïdes tandis que 4 signaux de 35S et 2 signaux de 5S ont été révélés dans les tétraploïdes *I. unguicularis* var. *cretensis* et *I. mesopotamica*. Dans *Iris germanica* qui est actuellement considérée comme synonyme d'*I. mesopotamica*, Siljak-Yakovlev *et al.* (2005) ont trouvé 8 loci de 35S et 2 loci de 5S. Le nombre différent de signaux 35S d'ADNr entre ces deux espèces pose la question sur leur véritable synonymie. Les deux espèces sont tétraploïdes mais leur origine hybride présumée devrait être confirmée.

Nos résultats prouvent encore une fois ce qui a été rapporté dans les études précédentes: une perte de loci d'ADNr de 35S et peut-être 5S ; ces pertes peuvent être considérées comme une indication précoce du diploïdisation du génome polyploïde. Si cela devrait être appliqué à la polyploïdie d'*I. germanica* et *I. mesopotamica*, le premier pourrait être un autopolyploïde tandis que le deuxième pourrait être un hybride interspécifique. Bien entendu, l'origine polyploïde doit être traitée avec plus d'attention en incluant dans l'étude, les parents putatifs. À ce stade, nous ne

pouvons confirmer que la cartographie des gènes d'ARN ribosomique permet la distinction entre *I. germanica* des Balkans et *I. mesopotamica*.

Étonnamment, cette technique n'a pas réussi à montrer les différences entre les sept iris *Oncocyclus* étudiés. Cette constatation renforce leur récente histoire évolutive commune, comme suggéré précédemment (Saad 2006). Le croisement entre les espèces de la section *Oncocyclus* est signalé comme possible, et avec des hybrides fertiles (Avishai & Zohary 1980). Cependant au Liban, les différentes populations de taxons analysées dans cette étude sont très fragmentées et ne sont pas suffisamment proches pour permettre à leurs pollinisateurs à courte distance de vol de maintenir le flux de gènes entre eux. D'autre part, ces taxons se trouvent à différentes altitudes, les dates de floraison ne se chevauchent pas, contribuant ainsi à l'isolement génétique de chaque taxon (Figure 26). Les iris *Oncocyclus* sont des plantes myrmécophiles, ayant leurs graines dispersées par les fourmis, ce qui entrave également le flux de gènes. Toutes ces raisons vont conduire à la spéciation et la sélection des génotypes localement adaptés. Pour les questions de conservation, puisque les différents taxons semblent très proches, le renforcement de la population serait l'approche à retenir compte tenu des résultats de ce travail et ceci en utilisant les différentes ressources génétiques. Toutefois, il est conseillé de réaliser des expériences de fertilisation croisée contrôlées afin de confirmer leur compatibilité biologique. Ce type d'information est cruciale pour faire face à l'état de la liste rouge de l'UICN de ces taxa.

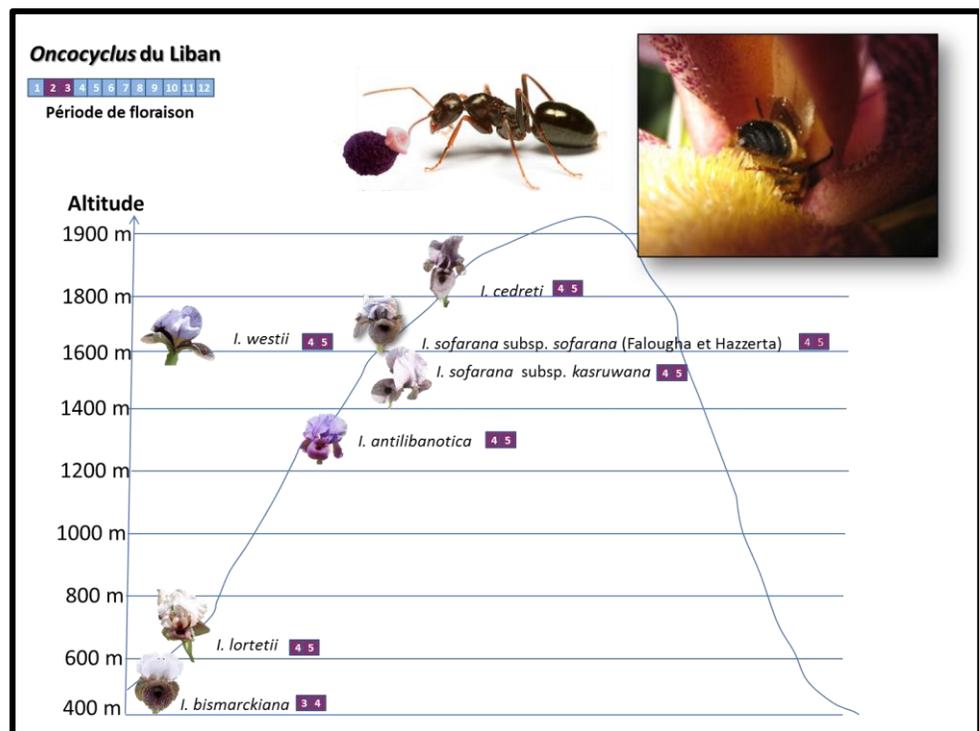


Figure 26 : La période de floraison des *Oncocyclus* Libanais.

5- Résultats de la coloration au nitrate d'argent

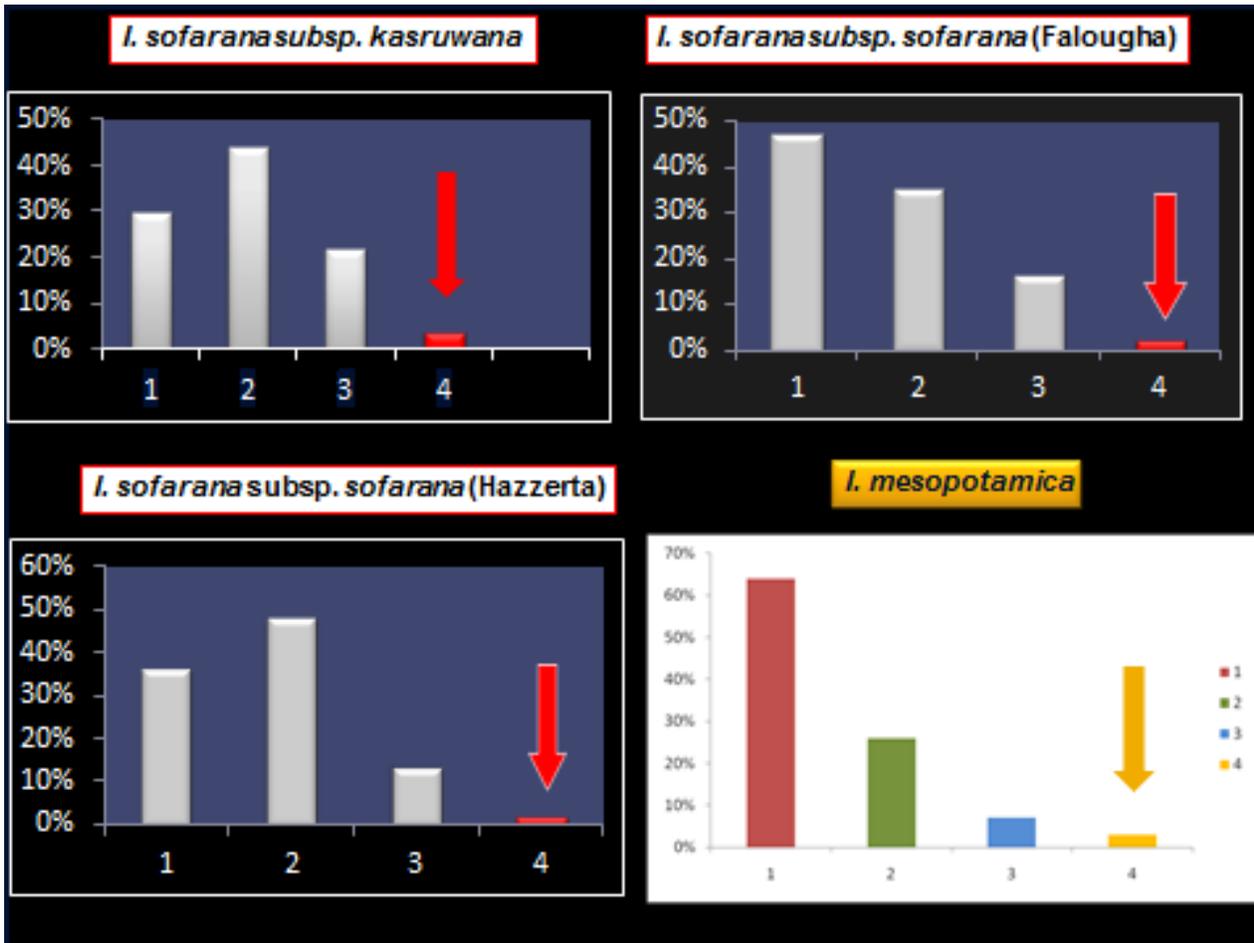


Figure 27 : Les résultats du nitrate d'argent des 2 espèces d'*Oncocyclus* endémiques du Liban, *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Falougha et Hazzerta) et *I. sofarana* subsp. *kasruwana* et *I. mesopotamica* montrant le nombre de nucléoles et son pourcentage (le nombre de nucléoles était mesuré dans 100 cellules de chaque espèce).



Figure 28 : Les nucléoles d'*I. sofarana* subsp. *kasruwana*

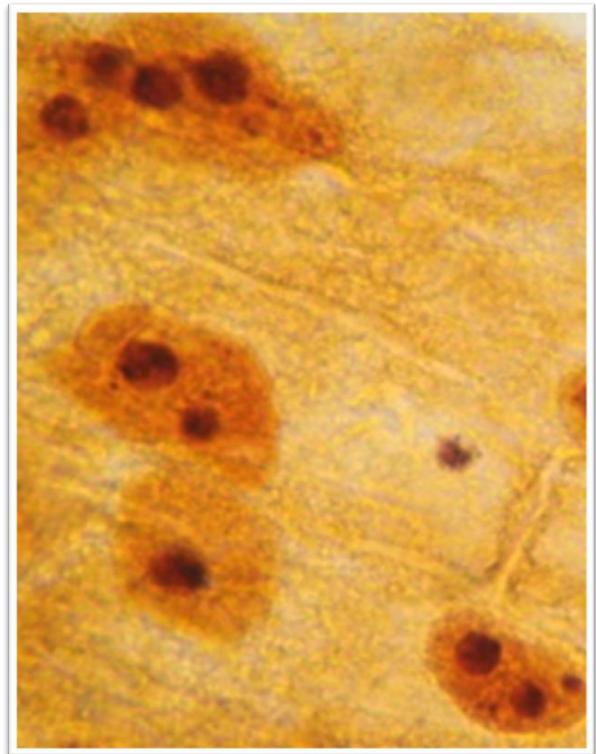
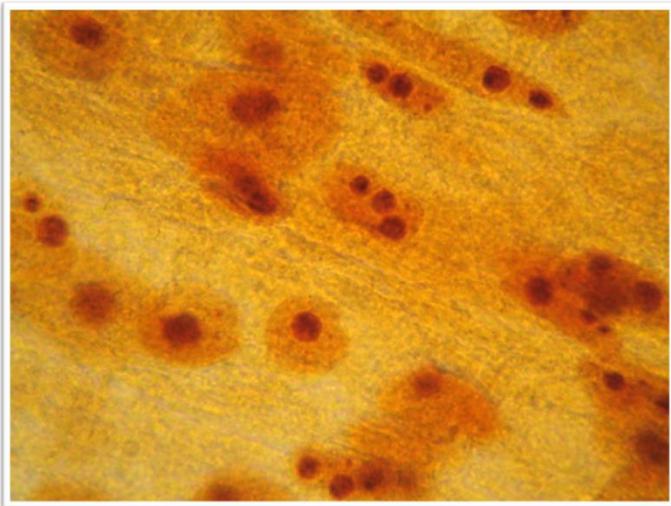


Figure 29 : Les nucléoles d'*I. mesopotamica*

La coloration au nitrate d'argent qui met en évidence les nucléoles permet d'évaluer l'activité des gènes ribosomiques 35S qui se trouvent dans les régions à organisateur nucléolaire (NORs). Les nucléoles souvent fusionnent et leur nombre varie d'un à un nombre maximale des sites de gènes ribosomiques 35S. Chez les espèces à petit génome, malgré le grand nombre des loci 35S, un seul nucléole est formé par fusion de nombreux autres nucléoles. C'est le cas chez les cultivars hexaploïdes d'*Ipomea batatas* (2C DNA = 3,26 pg) qui peuvent posséder jusqu'à 9 loci de gènes 35S rRNA (Srisuwan *et al.* 2006). Dans le cas de l'allopolyploïde *Brassica* un nucléole seulement a été présent (Hasterok & Maluszynska 2000).

Par contre, dans le grand génome de *Picea omorica* (2C DNA = 37 pg) 16 nucléoles ont été observé pour un nombre de 8 loci de gènes 35S rRNA (Siljak-Yakovlev *et al.* 2002) ce qui indiquait que tous les loci ont été actifs. Cependant, le pourcentage des cellules observées avec le maximum des nucléoles est toujours le plus faible.

Dans le cas des *Iris* les résultats obtenus dans ce travail montrent que chez les 2 taxons d'*Oncocyclus* endémiques du Liban, *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Falougha et Hazzerta) et *I. sofarana* subsp. *kasruwana*, seulement 4 sites sur 6 d'ADNr 35S sont actifs, tandis que chez *I. mesopotamica* tous les 4 sites sont actifs (Figs 27, 28 et 29).

5- Remarques finales

Ce travail est une contribution à la connaissance de ce grand genre qui a été, jusqu'à présent, rarement étudié dans ce domaine de recherche. Il fournit une première caryomorphologie et une caractérisation cytogénétique moléculaire de dix espèces d'*Iris* libanaises. Une importante variation inter-sections a été détectée parmi les taxons étudiés. Une différence dans le nombre chromosomique, les données morphométriques du caryotype, le nombre et la position des régions d'ADN riches en GC, la cartographie des loci 5S et 35S d'ADNr étaient évidents chez les trois espèces restantes qui appartiennent aux sections *Iris*, *Limniris* et *Scorpiris*. Cependant, l'absence de la variabilité et la forte similitude dans les caractéristiques du caryotype observées chez les taxons *Oncocyclus* suggèrent qu'il s'agit probablement d'un groupe récent et que leur spéciation est toujours en cours, comme indique d'ailleurs une phylogénie récente de certains *Oncocyclus* (Wilson *et al.* 2016). Des études moléculaires et cytologiques supplémentaires, y compris un échantillonnage plus large d'*Iris* *Oncocyclus* de la Méditerranée orientale, sont

actuellement en cours. Ces études devraient contribuer à la meilleure connaissance sur la diversification et la spéciation de cette section.

Un article intitulé « Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora » a été publié par Bou Dagher-Kharrat *et al.* (2013). Cette étude a contribué à l'enrichissement de la base de données de la valeur-C des taxons endémiques libanais. Ces données ont renforcé les études d'évaluation de la biodiversité, de la systématique et de l'évolution impliquant des processus de spéciation tels que la polyploïdisation. Cette étude présente les valeurs C pour 225 taxons appartenant à 55 familles et 141 genres dont le genre *Iris* au Liban. Les valeurs C sont nouvelles pour 193 taxons dont 126 plantes sont endémiques à la région de la Méditerranée orientale et les premières valeurs pour 50 genres (Annexe 8).

Concernant la conservation *in situ* ; depuis 2013, et toujours dans le cadre du projet intitulé « Determination of Important Areas for Plants and Creation of Micro-Reserves to Conserve Rare or Endemic Species in Lebanon. Grant 63257 », notre laboratoire libanais travaille pour protéger deux espèces d'*Iris* :

- *Iris sofarana* subsp. *kasruwana* à Ehmej : le site dans lequel cette plante pousse est en partie propriété de l'Etat et en partie des propriétés privées. Des arrangements ont été conclus avec les propriétaires privés qui ont donné libre droit à notre équipe de recherche de récolter les graines chaque année pour la conservation *ex situ* et pour transférer les rhizomes des Iris vers les terrains publics protégés quand l'usage des terres changera. Les terrains publics ont été déclarés en 2015 comme un site naturel protégé par le décret numéro 2878.
- *Iris bismarckiana* à Sarada : Le site sur lequel poussent les iris appartient aux communautés religieuses. Une désignation du site comme réserve naturelle est en cours.

Chapitre V : Les perspectives

Dans ce manuscrit, nous avons rapporté les résultats des études cytogénétiques et phylogénétiques des iris du Liban et des espèces de la section *Oncocyclus* du Levant, visant à clarifier les limites taxonomiques et les relations entre ses espèces (Abdel Samad *et al.* 2016, accepté, Annexe 9). Ces outils permettent aussi de mieux comprendre la structuration des populations et les relations entre ces dernières, ce qui peut grandement aider à la définition des actions de conservation entreprises pour ces espèces et à leur ordre de priorité.

La nécessité de conserver les iris *Oncocyclus* est maintenant bien mise en évidence dans plusieurs pays. En Jordanie, par exemple, l'iris noir *I. nigricans* est un emblème national, et les iris dits royaux sont devenus le symbole de la protection de la nature en Israël. Certains taxons d'*Iris* sont protégés en Turquie (*I. sprengeri*) et en Arménie (*I. paradoxa*) (Archibald 1999, Gazit-Ginsburg 1974, Shmida *et al.* 2002, Tan *et al.* 2003).

Comment pouvons-nous compléter cet agenda de conservation des iris *Oncocyclus*?

1. Dans la partie phylogénétique, nous étions confrontés à un problème d'amplification de la région ITS causé par un champignon endophyte qui se situe dans les tissus des iris.

Pour cela, les études phylogénétiques sur la section *Oncocyclus* sont à poursuivre en appliquant d'autres marqueurs moléculaires : *matK*, *trnK5'*, *trnK3'*, *petL-psbE*, *psbM-trnD*, *trnL-F*, *rpl20-clpP*, *ycf1* (partial), AT1G08750 (Wilson *et al.* 2016) qui peuvent nous aider à différencier les différents taxons de la section *Oncocyclus* et éviter le problème causé par le champignon endophyte.

Il sera aussi intéressant d'étudier le polymorphisme détecté par les rétrotransposons IRRE, TY3/gypsy-like (Kentner *et al.* 2003).

2. Protéger l'habitat dans lequel les espèces végétales vivent (l'approche *in situ*), reste la manière la plus importante et durable de conservation. Ainsi on conserve aussi la multitude des interactions qui existent entre les plantes et autres organismes, tels que les interactions avec les pollinisateurs ou les acteurs de dispersion, ce qui permet la continuation du processus d'évolution (Prance 1997).

A l'avenir, si des mises en défens des zones concernées ne sont pas possibles (terrains privés et prisés), des transplantations pourraient être envisagées. Dans ce cas, il serait indispensable de vérifier si l'entomofaune associée à la pollinisation des *Iris* est suffisamment représentée dans le nouvel habitat. Simultanément, des études concernant la dispersion des diaspores devraient être menées, puisque les organismes garantissant cette dispersion sont, eux aussi, essentiels à une dynamique équilibrée des populations.

3. Coopérer avec les municipalités au Liban où poussent des iris *Oncocyclus* pour inaugurer plus de sites protégés à Sofar, Sarada, Mays El Jabal, Bcharré, Khreibé comme le site naturel d'El-Dichar à Ehmej. Ce dernier a été inauguré sous le patronage du ministère de l'Environnement, et en coopération avec la municipalité de Ehmej et l'Association de développement de Ehmej, la Faculté des sciences de l'Université Saint-Joseph, sous les directives de Dr. Magda Bou Dagher Kharrat, chef du département des Sciences de la Vie et de la Terre, le dimanche 24 mai 2015, dans le cadre du projet de « Détermination des zones importantes pour les plantes et création de micro-réserves pour conserver les espèces rares ou endémiques du Liban », financé par le Critical Ecosystem Partnership Fund (CEPF).

La désignation du site El-Dichar en tant que site naturel est une initiative qui vise principalement à sauver faune et flore de l'endroit, parmi lesquelles se distingue *Iris sofarana* subsp. *kasruwana*, combinant à la fois rareté et endémisme du Liban.

4. Transférer des iris *Oncocyclus* qui se trouvent dans des terrains privés à d'autres sites protégés comme nous avons déjà fait le 14 mai 2011, avec un groupe d'étudiantes de l'Université Saint-Joseph sous la direction de Dr. Magda Bou Dagher-Kharrat, dans le cadre de l'opération 7ème jour de l'USJ en coopération avec la municipalité d'Ehmej; centaines d'individus d'*Iris sofarana* subsp. *kasruwana* ont été sauvés et transférés d'un

terrain où la municipalité voulait construire une route à un autre site public qui lui appartient, où les iris seront toujours protégés.

5. Sensibiliser les jeunes et le grand public à l'importance de la biodiversité et des plantes menacées du Liban, surtout les iris, par création des expositions éducatives (sorties scolaires et des concours scientifiques et photographiques) et des campagnes de communication (émissions télévisées, conférences...) visant à valoriser aux yeux des jeunes (les élèves dans les écoles officielles et privées), l'importance et la beauté de notre patrimoine naturel, surtout des plantes endémiques menacées comme les iris.

La sauvegarde de l'environnement et celle du patrimoine naturel libanais, de la flore libanaise surtout endémique, sont la responsabilité de tous, à tous les niveaux. Agissons en humains responsables afin de redresser les torts avenus et redonner à notre pays une partie de sa splendeur des siècles passés !

Références:

1. Abi Saleh, B., Nasser, N., Hanna, R., Safi, N., Safi, S., & Tohme, H. (1996). Lebanon Country Study on Biological Diversity. Terrestrial Flora. Republic of Lebanon, Ministry of Agriculture (MoA) and United Nations Development Programme. Lebanon, 3.
2. Albert, M., A. Escudero and J. Iriondo (2001). "Female reproductive success of narrow endemic *Erodium paularense* in contrasting microhabitats." *Ecology* 82(6): 1734-1747.
3. Al-Gabbiesh, A., D.S. Hassawi, and F.U. Afifi. (2006). In vitro propagation of endangered *Iris* species. *J. Biol. Sci.* 6(6): p. 1035-1040.
4. Al-Khasawneh, A.A., et al. (2010). Assessment of Genetic Variation in Black Iris (*Iris nigricans* Dinsm.) Using RAPD Markers. *Jordan Journal of Agricultural Sciences.* 3(3).
5. Allahverdioglu R.S., V.I.O., Ex situ conservation of endangered geophytes of the Hirkan National Park (Azerbaijan) in the Central Botanical Garden (Azerbaijan) European Botanic Gardens in a Changing World: Insights into EUROGARD VI.
6. Álvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29(3), 417-434.
7. Arafeh, R. M. H., Y. Sapir, A. Shmida, N. Iraki, O. Fragman and H. P. Comes (2002). "Patterns of genetic and phenotypic variation in *Iris haynei* and *I. atrofusca* (*Iris* sect. *Oncocyclus* = the royal irises) along an ecogeographical gradient in Israel and the West Bank." *Molecular Ecology* 11(1): 39-53.
8. Arano, H. and H. Saito (1980). "Cytological studies in family Umbelliferae, 5: Karyotypes of seven species in subtribe Seselinae." *Kromosomo* (Japan).
9. Archibald, J. (1999). "Silken Sad Uncertain Queens." *Bulletin of the Alpine Garden Society* 67: 245-264.
10. Arnheim, N. (1983). Concerted evolution of multigene families. In: Nei M, Koehn RK (eds) *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland MA pp 38–61.
11. Avishai, M. (1977). *Species relationships and cytogenetic affinities in section Oncocyclus of the genus Iris*. Jerusalem, Hebrew University.

12. Avishai, M. and D. Zohary (1977). "Chromosomes in the *Oncocyclus* Irises." *Botanical Gazette* 138(4): 502-511. Univ. Chicago Press.
13. Avishai, M. and D. Zohary (1980). "Genetic Affinities among the *Oncocyclus* irises." *Botanical Gazette* 141(1): 107-115.
14. Ayensu, E. S. (1981). *Medicinal plants of the West Indies [French West Indies]*, Algonac, Michigan, USA: Reference Publications.
15. Badaeva, E., O. Dedkova, G. Gay, V. Pukhalskyi, A. Zelenin, S. Bernard and M. Bernard (2007). "Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution." *Genome* 50(10): 907-926.
16. Bae, K.-H., et al. (2012). Callus induction and plant regeneration of *Iris dichotoma* Pall. in endangered species. *Journal of Plant Biotechnology* 39(3): 182-188.
17. Bae, K.-H., et al. (2013). Plant regeneration from callus of *Iris odaesanensis* YN Lee native to Korea via organogenesis. *Journal of Plant Biotechnology* 40(3): 163-168.
18. Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell and M. J. Donoghue (1995). "The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny." *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 247-277.
19. Ball Jr, R. M. and J. C. Avise (1992). "Mitochondrial DNA phylogeographic differentiation among avian populations and the evolutionary significance of subspecies." *The Auk* 109: 626-636.
20. Baskin, C. C. and E. Quarterman (1969). "Germination requirements of seeds of *Astragalus tennesseensis*." *Bulletin of the Torrey Botanical Club*: 315-321.
21. Baskin, J. and C. Baskin (1997). "Methods of breaking seed dormancy in the endangered species *Iliamna corei* (Sherff) sherff (Malvaceae), with special attention to heating." *Natural Areas Journal* 17(4): 313-323.
22. Baskin, J. M. and C. M. Baskin (1979). "Studies on the autecology and population biology of the weedy monocarpic perennial, *Pastinaca sativa*." *The Journal of Ecology* 67 No.2: 601-610.
23. Beaulieu, J. M., A. T. Moles, I. J. Leitch, M. D. Bennett, J. B. Dickie and C. A. Knight (2007). "Correlated evolution of genome size and seed mass." *New Phytologist* 173(2): 422-437.

24. Beaulieu, J. M., I. J. Leitch, S. Patel, A. Pendharkar and C. A. Knight (2008). "Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms." *New Phytologist* 179(4): 975-986.
25. Beaulieu, J. M., S. A. Smith and I. J. Leitch (2010). "On the tempo of genome size evolution in angiosperms." *Journal of Botany* doi:10.1155/2010/989152.
26. Bennett, M. and I. Leitch (2011). "Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow." *Annals of Botany* 107(3): 467-590.
27. Bennett, M. D., P. Bhandol and I. J. Leitch (2000). "Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses—807 new estimates." *Annals of Botany* 86(4): 859-909.
28. Bennett, S., I. Leitch and M. Bennett (1995). "Chromosome identification and mapping in the grass *Zingeria bebersteiniana* (2n= 4) using fluorochromes." *Chromosome research* 3(2): 101-108.
29. Blondel, J. (2010). *The Mediterranean region: biological diversity in space and time*. Oxford University Press.
30. Dagher-Kharrat, M. B., Mariette, S., Lefèvre, F., Fady, B., Grenier-de March, G., Plomion, C., & Savouré, A. (2007). Geographical diversity and genetic relationships among *Cedrus* species estimated by AFLP. *Tree Genetics & Genomes* 3(3) : 275-285.
31. Bou Dagher-Kharrat, M. (2013 - 2016). "Determination of Important Areas for Plants and Creation of Micro-Reserves to Conserve Rare or Endemic Species in Lebanon." from <http://www.cepf.net/blog/Pages/Conserving-the-floral-biodiversity-of-Lebanon.aspx>.
32. Bou Dagher-Kharrat, M. *et al.* (2016). *Iris sofarana* Foster. IUCN, Red List Assessment.
33. Bou Dagher-Kharrat, M. *et al.* (2013). Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 147(4): 1228-1237.
34. Boyce, M. S. (1992). "Population viability analysis." *Annual Review of Ecology and Systematics* 23: 481-506.
35. British Iris Society. Species Group (Ed.). (1997). *A guide to species irises: their identification and cultivation*. Cambridge University Press.
36. Bublyk, O.M., *et al.* (2013). Efficiency of different PCR-based marker systems for assessment of *Iris pumila* genetic diversity. *Biologia* 68(4): 613-620.

37. Cartes, J. E., & Carrassón, M. (2004). Influence of trophic variables on the depth-range distributions and zonation rates of deep-sea megafauna: the case of the Western Mediterranean assemblages. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 51(2) : 263-279.
38. Castañeda-Álvarez, N. P., H. Vincent, S. Kell, R. Eastwood and N. Maxted (2011). "Ecogeographic surveys." In Guarino L, Ramanatha Rao V, Goldberg E (editors). *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*. 2011 update. Bioversity International, Rome.
39. Catalán, P., E. A. Kellogg and R. G. Olmstead (1997). "Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast ndhf gene sequences." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8(2): 150-166.
40. Caughley, G. (1994). "Directions in conservation biology." *Journal of Animal Ecology* 63: 215-244.
41. Cerbah, M., T. Souza-Chies, M. Jubier, B. Lejeune and S. Siljak-Yakovlev (1998). "Molecular phylogeny of the genus *Hypochaeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution." *Molecular Biology and Evolution* 15(3): 345-354.
42. Charlesworth, B., P. Sniegowski and W. Stephan (1994). "The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes." *Nature* 371: 215–220.
43. Chaudhary, S. A. (1972). "Three new taxa of *Iris* subgenus *Oncocyclus* from Lebanon and Syria." *Bot. Notiser* 125: 497-500.
44. Chaudhary, S. A. (1974). "Taxonomy of *Oncocyclus* Irises from Lebanon and Syria." *ASI Yearbook*: 65-68.
45. Chester, M., A. R. Leitch, P. S. Soltis and D. E. Soltis (2010). "Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation)." *Genes* 1(2): 166-192.
46. Chung, M.Y., et al. (2015). Clonal and genetic structure of *Iris odaesanensis* and *Iris rossii* (Iridaceae): insights of the Baekdudaegan Mountains as a glacial refugium for boreal and temperate plants. *Plant Systematics and Evolution*. 301(5): p. 1397-1409.
47. Cigić, P., et al. (2004). The distribution of endemic species of the genus *Iris* L. (Iridaceae) in Croatia in XI OPTIMA Meeting.

48. Clampitt, C. A. (1987). "Reproductive biology of *Aster curtus* (Asteraceae), a Pacific Northwest endemic." *American Journal of Botany* 74(6): 941-946.
49. Clark, D. L., C. A. Ingersoll and K. K. Finley (1997). "Regeneration of *Erigeron decumbens* var. *decumbens* (Asteraceae), the Willamette Daisy." *Conservation and management of native plants and fungi*, 41-47.
50. Corien, O., & Avishai, M. (2001). The Irises Still Exist: The Conservation Status of Species *Iris* Section *Oncocyclus* in Israel, A Century after their description. *Annali Di Botanica* 1: 145.
51. Crowder, C. A. (1978). "The ecology and reproduction of *Sophora leachiana* Peck (Fabaceae)." M.S. thesis, Oregon State University, Corvallis, OR.
52. Davis, A. P. and S. L. Jury (1990). "A taxonomic review of *Iris* L. series *Unguiculares* (Diels) Lawrence." *Botanical Journal of the Linnean Society* 103(3): 281-300.
53. Davis, P. (1946). "Oncocyclus Irises in the Levant." *The Journal of the Royal Horticultural Society* 121: 93-97.
54. De Munk, W. and J. Schipper. (1993). "Iris-bulbous and rhizomatous." *The Physiology of Flower Bulbs*. A. De Hertogh and M. Le Nard (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands: 349-379.
55. Delić, A., J. Razlog-Grlica, and I.D. Grlica. (2001). Siberian Iris (*Iris sibirica* L.): endangered and rare plant species in Croatia. *Priroda*. 91(1): p. 24-25.
56. Deniz, İ.G., C. Aykurt, and M.A. Başaran. (2015). Taxonomic and Ecologic Properties of the Endangered *Iris pamphylica* (Iridaceae) Endemic to SW Anatolia. *Journal of Applied Biological Sciences* 9(2): 01-06.
57. Derneği, D. (2010). Ecosystem profile: Mediterranean basin biodiversity hotspot. CEPF—Critical Ecosystem Partnership Fund.
58. Deyrup, M. and E. Menges. (1997). "Pollination ecology of the rare scrub mint *Dicerandra frutescens* (Lamiaceae)." *Florida Scientist* 60(3): 143-157.
59. Dinsmore, J. E. (1934). "Plantae Postianae et Dinsmoreanae, Fasc. 2." American University Press, Beirut.
60. Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols* 2(9) : 2233-2244.

61. Dorman, M., et al. (2009). Factors affecting dormancy of *Oncocycclus iris* seeds. *Israel Journal of Plant Sciences* 57(4): 329-333.
62. Doyle, J., & Doyle, J. L. (1987). Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochemical Bulletin* 19(11) : 11-15.
63. Douaihy, B., et al. (2013). Eriophyoid mite of the genus *Trisetacus* reported on *Juniperus excelsa* in Lebanon. *American Journal of Plant Sciences*. 4(2A): p. 395.
64. Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* 7(1) : 1.
65. Drury, W. H. (1974). "Rare species." *Biological Conservation* 6(3): 162-169.
66. Drury, W. H. (1980). "Rare species of plants." *Rhodora* 82(829): 3-48.
67. Dudash, M. and C. B. Fenster (2000). "Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations." In: Young AG, Clarke GM, editors. *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge: Cambridge University Press; 35-54.
68. Dulloo, M., N. Maxted, L. Guarino, D. Florens, H. Newbury and B. F. Lloyd. (1999). "Ecogeographic survey of the genus *Coffea* in the Mascarene Islands." *Botanical Journal of the Linnean Society* 131(3): 263-284.
69. Duncan, D. H., A. B. Nicotra, J. T. Wood and S. A. Cunningham (2004). "Plant isolation reduces outcross pollen receipt in a partially self-compatible herb." *Journal of Ecology* 92(6): 977-985.
70. Dykes, W. R. (1913). *The genus Iris*. Cambridge, England The University Press.
71. El-Haber, M. T., & El-Haber, R. M. (1993). Seven established Lebanese wildflowers not described among the native flora. *Lebanese Science Bulletin (Lebanon)*.
72. Feliner, G.N. (2014). Patterns and processes in plant phylogeography in the Mediterranean Basin. A review. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 16(5): 265-278.
73. Ferguson, M., B. Ford-Lloyd, L. Robertson, N. Maxted and H. Newbury (1998). "Mapping the geographical distribution of genetic variation in the genus *Lens* for the enhanced conservation of plant genetic diversity." *Molecular Ecology* 7(12): 1743-1755.
74. Feulgen, R. and H. Rossenbeck (1924). "Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die-darauf beruhende elektive

- Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten." *Hoppe-Seyler s Zeitschrift für Physiologische Chemie* 135(5-6): 203-248.
75. Fiedler, P. L., B. Knapp and N. Fredricks. (1998). Rare plant demography: lessons from the Mariposa lilies (*Calochortus*: Liliaceae). *Conservation Biology*, Springer: 28-48.
 76. Fischer, M. and D. Matthies. (1998). "Effects of population size on performance in the rare plant *Gentianella germanica*." *Journal of Ecology* 86(2): 195-204.
 77. Florance, E. R. (1997). "Structure, dormancy, and germination of seeds from *Frasera albicaulis* and *F. umpquaensis* (Gentianaceae)." *Conservation and management of native plants and fungi*. Proceedings of the Oregon Conference on the Conservation and Management of Native Vascular Plants, Bryophytes, and Fungi: 62-65.
 78. Francis, D., M. S. Davies and P. W. Barlow (2008). "A strong nucleotypic effect on the cell cycle regardless of ploidy level." *Annals of Botany* 101(6): 747-757.
 79. Fraser, D. J. and L. Bernatchez. (2001). "Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units." *Molecular ecology* 10(12): 2741-2752.
 80. Furuya, H. (1999). Method of the seedling production of rare native plants with in vitro culture, 1: *Iris rossii* Baker. *Bulletin of the Hiroshima Prefectural Agriculture Research Center (Japan)*.
 81. Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma and E. Firoozabady. (1983). "Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues." *Science* 220(4601): 1049-1051.
 82. Garcia, S., T. Garnatje and A. Kovařík. (2012). "Plant rDNA database: ribosomal DNA loci information goes online." *Chromosoma* 121(4): 389-394.
 83. Gärdenfors, U., Hilton-Taylor, C., Mace, G. M., & Rodríguez, J. P. (2001). The application of IUCN Red List criteria at regional levels. *Conservation Biology* 15(5) : 1206-1212.
 84. Gardes, M. and T. D. Bruns (1993). "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts." *Molecular Ecology* 2(2): 113-118.
 85. Gavrilenko, B. D. (1975). Kavkaz kak krupneishii tsentr formoobrazovaniya irisov podseksii *Oncocyclus*. (The Caucasus as the largest centre of form generation of irises from the subsection *Oncocyclus*). *Bot. Zhurn.* 60(7): 951-956.

86. Gazit-Ginsburg, Z. (1974). "The Oncocyclus irises in their connection with the phytogeographical territories of Israel." *Aril Society International Yearbook*: 76-81.
87. Gernandt, D. S., A. Liston and D. Piñero (2001). "Variation in the nrDNA ITS of *Pinus* subsection *Cembroides*: implications for molecular systematic studies of pine species complexes." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21(3): 449-467.
88. Gielly, L., & Taberlet, P. (1994). The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11(5) : 769-777.
89. Gisler, S. D. and R. J. Meinke (1997). "Reproductive attrition by predispersal seed predation in *Sidalcea nelsoniana* (Malvaceae): implication for the recovery of a threatened species." *Conservation and management of native plants and fungi* 56: 61.
90. Goldblatt, P. and M. Takei (1997). "Chromosome cytology of Iridaceae-Patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change." *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 285-304.
91. Goldblatt, P., V. Walbot and E. A. Zimmer (1984). "Estimation of genome size (C-value) in Iridaceae by cytophotometry." *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: 176-180.
92. Grindeland, J. M., N. Sletvold and R. A. Ims (2005). "Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*." *Functional Ecology* 19(3): 383-390.
93. Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5) : 696-704.
94. Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, pp. 95-98).
95. Hall, T. and A. Seisums (2014). "793. IRIS WALLISIAE." *Curtis's Botanical Magazine* 31(3): 238-248.
96. Halse, R. and R. Mishaga (1988). "Seed germination in *Sidalcea nelsoniana* (Malvaceae)." *Phytologia (USA)*. 64:179–184.
97. Hannan, G.L. and M.W. Orick. (2000). Isozyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (Iridaceae). *American Journal of Botany* 87(3): 293-301.

98. Harper, K. (1979). "Some reproductive and life history characteristics of rare plants and implications of management." *Great Basin Naturalist Memoirs* 3: 129-137.
99. Hart, C.R. (1990). A New Station in Door County, Wisconsin, for the Rare *Iris lacustris* Nutt. (Dwarf Lake Iris). *Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts, and Letters (USA)*.
100. Hasterok, R. and J. Maluszynska. (2000). Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid Brassica species. *Genome* 43(3): 574-579.
101. Heller, F. O. (1973). "DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie1." *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86(5-9): 437-441.
102. Hewitt, G.M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological journal of the Linnean Society* 68(1-2): 87-112.
103. Hodgson, J., M. Sharafi, A. Jalili, S. Díaz, G. Montserrat-Martí, C. Palmer, B. Cerabolini, S. Pierce, B. Hamzehee and Y. Asri (2010). "Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog?" *Annals of Botany* 105(4): 573-584.
104. Hoffmann, A. A. and L. H. Rieseberg (2008). "Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation?" *Annual review of ecology, evolution, and systematics* 39: 21-42.
105. Hofrichter R., 2001;Das Mittelmeer, Fauna, Flora Ökologie; Band I - Allgemeiner Teil; Spektrum Verlag; Heidelberg - FRG
106. Holobiuc, I. and R. Blindu. (2006). In vitro culture introduction for ex situ conservation of some rare plant species. *Rom. J. Biol.–Plant Biol.* 51, 52: 13-23.
107. Hughes, J., S. J. Longhorn, A. Papadopoulou, K. Theodorides, A. de Riva, M. Mejia-Chang, P. G. Foster and A. P. Vogler (2006). "Dense taxonomic EST sampling and its applications for molecular systematics of the Coleoptera (beetles)." *Molecular biology and evolution* 23(2): 268-278.
108. Jacobs, J. (1993). "New hope for the Peters Mountain mallow." *Endangered species technical bulletin (USA)*. 18(3):13-14.
109. Janzen, D. H. (1993, May). Taxonomy: universal and essential infrastructure for development and management of tropical wildland biodiversity. In *Proceedings of the*

- Norway/UNEP expert conference on biodiversity (pp. 100-113). pp. 100-113. Trondheim, Norway: NINA.
110. Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein (1985). "Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA." *Nature* 314(6006): 67-73.
 111. Jevremović, S., et al. (2009). Cryopreservation of *Iris pumila* shoot tips by vitrification. in I International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species 908.
 112. Jevremović, S., et al. (2009). Plant regeneration of Southern Adriatic iris by somatic embryogenesis. *Arch. Biol. Sci.* 61: 413-418.
 113. Johnson, D. H. and T. A. O'Neil (2001). *Wildlife-habitat relationships in Oregon and Washington*, Oregon State University Press.
 114. Johnson, L. A., & Soltis, D. E. (1995). Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using matK sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 149-175.
 115. Jurka, J., V. V. Kapitonov, A. Pavlicek, P. Klonowski, O. Kohany and J. Walichiewicz (2005). "Rebase Update, a database of eukaryotic repetitive elements." *Cytogenetic and Genome Research* 110(1-4): 462-467.
 116. Kamenetsky, R. and H. Okubo (2012). *Ornamental geophytes: from basic science to sustainable production*, CRC Press.
 117. Kandemir, N. (2006). An investigation on the autecological endemic *Iris taochia* Woronow Ex Grossh. (Iridaceae) distributed in the North East Anatolia Region. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9: 2753-2760.
 118. Kandemir, N., A. Çelik, and A. Sürücü. (2011). Ecological response of some *Iris* L. taxa (Iridaceae) in Turkey. *Bangladesh Journal of Botany* 40(2): 177-184.
 119. Karron, J. D. (1987). "The pollination ecology of co-occurring geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae)." *Biological Conservation* 39(3): 179-193.
 120. Karron, J. D. (1989). Breeding systems and levels of inbreeding depression in geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 76 : 331-340.

121. Kearns, C. A., D. W. Inouye and N. M. Waser (1998). "Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions." *Annual review of ecology and systematics* 29: 83-112.
122. Kemler, M. (2015). "Education: Botanists still need to tell plants apart." *Nature* 521(7550): 32-32.
123. Kentner, E. K., M. L. Arnold and S. R. Wessler (2003). "Characterization of High-Copy-Number Retrotransposons from the Large Genomes of the Louisiana Iris Species and Their Use as Molecular Markers." *Genetics* 164(2): 685-697.
124. Kereša, S., A. Mihovilović, and M. Ćurković-Perica. (2009). In vitro regeneration of the Croatian endemic species *Iris adriatica* Trinajstić ex Mitić. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51(2): 7-12.
125. Khouzami, M., M. Bassil, L. Fortunat and A. Hayek (1996). "Etude de la diversité biologique du Liban. Liste des espèces basée sur les rapports de l'étude de la diversité biologique du Liban." Ministère de l'Agriculture et Programme des Nations Unies pour l'Environnement, Liban.
126. Koçyiğit M., E. K., Özhatay F.N., Kaya E. (2013). *Iris* L. Subgen. *Iris* Ve Subgen. *Scorpiris* Tabanında Kültür Bitkileri Üzerindeki Karyolojik Çalışmaların Önemi. V. SÜS Bitkileri Kongresi. Yalova, Türkiye.
127. Köhlein, F. (1987). *Iris*. Portland, Oregon, Timber Press.
128. Kostrakiewicz, K. (2000). The analysis of spatial structure of *Iris sibirica* (Iridaceae) population on the station in Stanisławice near Bochnia (southern Poland). *Fragmenta Floristica et Geobotanica, Series Polonica* 7: 209-214.
129. Kostrakiewicz, K. (2007). The effect of dominant species on numbers and age structure of *Iris sibirica* L. population on blue moor-grass meadow in southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 76(2).
130. Kostrakiewicz, K. and A. Wróblewska. (2008). Low genetic variation in subpopulations of an endangered clonal plant *Iris sibirica* in southern Poland. In *Annales Botanici Fennici*. BioOne. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board 45(3) : 186-194.
131. Kostrakiewicz-Gierałt, K. (2013). The influence of neighbouring species on ecological variation of the selected subpopulations of *Iris sibirica* L. *Biodiversity Research and Conservation* 32(1): 45-52.

132. Krijgsman, W., Hilgen, F. J., Raffi, I., Sierro, F. J., & Wilson, D. S. (1999). Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* 400(6745): 652-655.
133. Kruckeberg, A. R. and D. Rabinowitz (1985). "Biological aspects of endemism in higher plants." *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 447-479.
134. Kubešová, M., L. Moravcova, J. Suda, V. Jarošík and P. Pyšek (2010). "Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora." *Preslia* 82(1): 81-96.
135. Kunakh, V. (2013). A study of the effect of habitat fragmentation on the population status of *Iris pumila* L. in Ukraine. *Dry Grasslands of Europe: Grazing and Ecosystem Services*, p. 252.
136. Lande, R. (1988). "Genetics and demography in biological conservation." *Science (Washington)* 241(4872): 1455-1460.
137. Lande, R. (1998). "Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation." *Researches on Population Ecology* 40(3): 259-269.
138. Larson, B. M. and S. C. Barrett (1998). "Reproductive biology of island and mainland populations of *Primula mistassinica* (Primulaceae) on Lake Huron shorelines." *Canadian Journal of Botany* 76(11): 1819-1827.
139. Lavergne, S., et al. (2004). The biology and ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *Oikos* 107(3): 505-518.
140. Lavergne, S., et al. (2010). Biodiversity and climate change: integrating evolutionary and ecological responses of species and communities. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41: 321-350.
141. Lawrence, G. H. M. (1953). A reclassification of the genus *Iris*. *Gentes Herb*, 8, 346-71.
142. Leitch, I. J. and A. R. Leitch (2013). Genome size diversity and evolution in land plants. *Plant Genome Diversity Volume 2*, Springer: 307-322.
143. Leitch, I. J., J. M. Beaulieu, M. W. Chase, A. R. Leitch and M. F. Fay (2010). "Genome size dynamics and evolution in monocots." *Journal of Botany* 2010: 18 pages.
144. Leitch, I., D. Soltis, P. Soltis and M. Bennett (2005). "Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta)." *Annals of Botany* 95(1): 207-217.

145. Leitch, I., I. Kahandawala, J. Suda, L. Hanson, M. J. Ingrouille, M. Chase and M. Fay (2009). "Genome size diversity in orchids: consequences and evolution." *Annals of botany* 104(3): 469–481.
146. Levin, D. A., B. G. Palestis, R. N. Jones and R. Trivers (2005). "Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms." *Evolution* 59(5): 962-969.
147. Mace, G. M. (2004). "The role of taxonomy in species conservation." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359(1444): 711-719.
148. Macior, L. W. (1978). "Pollination ecology of vernal angiosperms." *Oikos* 30(3): 452-460.
149. Maddock, A., & Du Plessis, M. A. (1999). Can species data only be appropriately used to conserve biodiversity? *Biodiversity & Conservation* 8(5): 603-615.
150. Magri, D., Fineschi, S., Bellarosa, R., Buonamici, A., Sebastiani, F., Schirone, B., and Vendramin, G. G. (2007). The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology* 16(24) : 5259-5266.
151. Makarevitch, I., K. Golovnina, S. Scherbik and A. Blinov (2003). "Phylogenetic Relationships of the Siberian Iris Species Inferred from Noncoding Chloroplast DNA Sequences." *International Journal of Plant Sciences* 164(2): 229-237.
152. Margaret A. T, J. and G. Adil (2002). "Iris stenophylla Hausskn. & Siehe ex Baker from Turkey and its cytology." *Botanical Journal of the Linnean Society* 140(2): 115-127.
153. Marinescu, M., A. Teodorescu, and N. Şuţan. (2013). Preliminary results on the in vitro propagation by leaf explants and axillary buds of *Iris aphylla* L. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 17(1): p. 279-282.
154. Marinescu, V.M. and V. Alexiu, *Iris aphylla* L. ssp. *Hungarica* Critically Endangered Taxon. In Europa. Editorial Board: p. 96.
155. Marrero-Gomez, M. V., A. Bañares-Baudet and E. Carqué-Alamo (2003). "Plant resource conservation planning in protected natural areas: an example from the Canary Islands, Spain." *Biological Conservation* 113(3): 399-410.
156. Martínez J., P. V., M. Luceño, and A. Cuadrado (2010). "Evolution of *Iris* subgenus *Xiphium* based on chromosome numbers, FISH of nrDNA (5S, 45S) and trnL-trnF sequence analysis." *Plant Systematics and Evolution* 289: 223-235.

157. Massey, J. and P. D. Whitson (1980). "Species biology, the key to plant preservation." *Rhodora* 82(829): 97-103.
158. Mathew, B. (1989). *The Iris*. London, Batsford.
159. Maxted, N. (1995). An ecogeographical study of *Vicia* subgenus *Vicia*, Rome, IT: IPGRI.
160. Mayr, E. (1982). *The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance*. Harvard University Press.
161. Médail, F. and K. Diadema. (2006). Biodiversité végétale méditerranéenne et anthropisation: approches macro et micro-régionales. In *Annales de géographie*. Armand Colin 5: 618-640.
162. Médail, F. and K. Diadema. (2009). "Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin." *Journal of Biogeography* 36(7): 1333-1345.
163. Médail, F. and P. Quézel. (1997). Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84(1): 112-127.
164. Menges, E. S. (1992). Stochastic modeling of extinction in plant populations. *Conservation biology*, Springer 10: 253-275.
165. Menges, E. S. (1995). "Factors limiting fecundity and germination in small populations of *Silene regia* (Caryophyllaceae), a rare hummingbird-pollinated prairie forb." *American Midland Naturalist* 133(2): 242-255.
166. Menges, E. S., D. M. Waller and S. C. Gawler (1986). "Seed set and seed predation in *Pedicularis furbishiae*, a rare endemic of the St. John River, Maine." *American Journal of Botany*: 1168-1177.
167. Meulenkaamp, J.E. and W. Sissingh. (2003). Tertiary palaeogeography and tectonostratigraphic evolution of the Northern and Southern Peri-Tethys platforms and the intermediate domains of the African–Eurasian convergent plate boundary zone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 196(1): 209-228.
168. Miller, A. L. and R. P. Duncan (2003). "Extrinsic and intrinsic controls on the distribution of the critically endangered cress, *Ischnocarpus exilis* (Brassicaceae)." *Biological Conservation* 110(1): 153-160.

169. Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010, November). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Gateway Computing Environments Workshop (GCE) IEEE: 1-8.
170. Mitra, J. (1956). "Karyotype Analysis of Bearded Iris." *Botanical Gazette* 117(4): 265-293.
171. Mittermeier, R.A., et al. (2005). Wilderness conservation in a biodiversity hotspot. *International Journal of Wilderness* 11(3): 42-46.
172. Molina, W. F. (2007). "Chromosomal changes and stasis in marine fish groups." *Fish cytogenetics*: 69-110.
173. Molvray, M., Kores, P. J., & Chase, M. W. (2000). Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters. *Monocots: systematics and evolution*. Collingwood, Australia: CSIRO, 441-448.
174. Monty, A., L. Saad and G. g. Mahy (2006). "Bimodal pollination system in rare endemic *Oncocyclus* irises (Iridaceae) of Lebanon." *Canadian Journal of Botany* 84(8): 1327-1338.
175. Morley, R. (1982). "A palaeoecological interpretation of a 10,000 year pollen record from Danau Padang, Central Sumatra, Indonesia." *Journal of Biogeography*: 151-190.
176. Mousavi, S. A., Li, L., Wei, G., Räsänen, L., & Lindström, K. (2016). Evolution and taxonomy of native mesorhizobia nodulating medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *Systematic and Applied Microbiology* 39(4) : 260-265.
177. Mouterde, P. (1966-1983). *Nouvelle flore du Liban et de la Syrie*. Beyrouth (Liban), Imprimerie catholique.
178. Myers, N., et al. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403(6772): 853-858.
179. Nadkarni, A. (1976). *KM Nadkarni's Indian Materia Medica*. Bombay Popular Prakashana, Vol. 2, Bombay, India.
180. Nasircilar, A.G. and I.G. Deniz. (2014). An alternative plant propagation and conservation process for *Iris pampyphlica* an endemic and endangered geophyte. in *Book of proceedings: Fifth International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2014"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, October 23-26, 2014. University of East Sarajevo, Faculty of Agriculture.

181. Naves, Y. R., G. Mazuyer and E. Sagarin (1947). "Natural perfume materials."
182. Neto, C. C. M., M. B. Cioffi, L. A. C. Bertollo and W. F. Molina (2011). "Extensive chromosomal homologies and evidence of karyotypic stasis in Atlantic grunts of the genus *Haemulon* (Perciformes)." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 401(1): 75-79.
183. Nordbakken, J. F., K. Rydgren and R. Økland (2004). "Demography and population dynamics of *Drosera anglica* and *D. rotundifolia*." *Journal of Ecology* 92(1): 110-121.
184. Nunney, L. and K. A. Campbell (1993). "Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics." *Trends in Ecology & Evolution* 8(7): 234-239.
185. O'Brien, S. J. and E. Mayr (1991). "Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies." *Science (Washington)* 251(4998): 1187-1188.
186. Ohri, D. (2005). "Climate and growth form: the consequences for genome size in plants." *Plant Biology* 7(05): 449-458.
187. Olivieri, I. and R. Vitalis (2001). "La biologie des extinctions." *Revue médecine/sciences* 17 : 63-69.
188. Oostermeijer, J., S. Luijten and J. Den Nijs (2003). "Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation." *Biological conservation* 113(3): 389-398.
189. Oran, S.A. and A.H. Al-Gabbiesh. (2014). Conservation of *Iris bismarckiana* Regel (Iridaceae) Using Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis. *Journal of Agricultural Science and Technology*. A. 4(7A).
190. Östergren, G. and W. K. Heneen (1962). "A squash technique for chromosome morphological studies." *Hereditas* 48(1-2): 332-341.
191. Pacifici, M., Foden, W.B., Visconti, P., Watson, J.E., Butchart, S.H., Kovacs, K.M., Scheffers, B.R., Hole, D.G., Martin, T.G., Akçakaya, H.R. and Corlett, R.T., (2015). Assessing species vulnerability to climate change. *Nature Climate Change* 5(3):215-224.
192. Park, Y.-W., et al. (2006). Karyotype analysis of three Korean native *Iris* species. *Horticulture Environment and Biotechnology*. 47(1): p. 51-54.
193. Paszko, B. (2006). "A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices." *Plant Systematics and Evolution* 258(1-2): 39-48.

194. Pavlik, B. M., D. L. Nickrent and A. M. Howald (1993). "The recovery of an endangered plant. I. Creating a new population of *Amsinckia grandiflora*." *Conservation Biology* 7(3): 510-526.
195. Pavlik, B. M., N. Ferguson and M. Nelson (1993). "Assessing limitations on the growth of endangered plant populations, II. Seed production and seed bank dynamics of *Erysimum capitatum* ssp. *angustatum* and *Oenothera deltooides* ssp. *howellii*." *Biological conservation* 65(3): 267-278.
196. Penn, O., Privman, E., Ashkenazy, H., Landan, G., Graur, D., & Pupko, T. (2010). GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic acids research* 38(suppl 2): W23-W28.
197. Peruzzi, L. and H. Eroglu (2013). "Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure?" *Comparative cytogenetics* 7(1): 1.
198. Petit, R. J., El Mousadik, A., & Pons, O. (1998). Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12(4) : 844-855.
199. Petit, R.J., Aguinagalde, I., de Beaulieu, J.L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M. and Mohanty, A. (2003). Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300(5625): 1563-1565.
200. Pinkel, D., T. Straume and J. Gray (1986). "Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(9): 2934-2938.
201. Planisek, S. L. (1983). "The breeding system, fecundity and dispersal of *Iris lacustris*." *Mich. Bot.* 22(3): 93-102.
202. Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution* 25(7) : 1253-1256.
203. Post, G. (1933). *Flora of Syria, Palestine and Sinai*. Beirut, American University Press.
204. Prance, G. (1997). "The conservation of botanic diversity." *Plant Genetic Conservation-The in situ Approach*. Chapman and Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras 3.
205. Pullin A. S. (2002). *Conservation Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, 345 pp.

206. Ráb, P., J. Bohlen, M. Rábová, M. Flajšhans and L. Kalous (2006). "Cytogenetics as a tool box in fish conservation: the present situation in Europe." *Fish cytogenetics*. Science Publishers, Enfield: 215-241.
207. Rabinowitz D. S. (1981). Seven forms of rarity, pp. 205–217. In: *The Biological aspects of rare plant conservation*. (H. Synge editor) Wiley, Chichester, United Kingdom.
208. Raven, P.H., et al. (2013). *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Vol. 3: Island Press.
209. Regato, P. (2001). *The Mediterranean Forests, a New Conservation Strategy*. WWF-MedPO Ed, Rome.
210. Rix, M. (1997). Section *Oncocyclus*. In: *A guide to Species Irises*. London, Cambridge Press.
211. Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12) : 1572-1574.
212. Ryder, O. A. (1986). "Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies." *Trends in Ecology & Evolution* 1(1): 9-10.
213. Saad, L. (2006). *Etude écogéographique et biologie de la conservation des Iris Oncocycles endémiques du Liban*. Thèse de doctorat, Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux.
214. Saad, L. and G. Mahy (2009). "Molecular and morphological variation of rare endemic oncocyclus irises (Iridaceae) of Lebanon." *Botanical Journal of the Linnean Society* 159(1): 123-135.
215. Saad, L. and S. Khuri (2003). "Hanging in there by a fall-the *Oncocyclus* Irises of Lebanon." *British Iris Society*. 3p.
216. Saad, L., S. N. Talhouk and G. Mahy (2009). "Decline of endemic *Oncocyclus* irises (Iridaceae) of Lebanon: survey and conservation needs." *Oryx* 43(01): 91-96.
217. Saarela, J. M., H. S. Rai, J. A. Doyle, P. K. Endress, S. Mathews, A. D. Marchant, B. G. Briggs and S. W. Graham (2007). "Hydatellaceae identified as a new branch near the base of the angiosperm phylogenetic tree." *Nature* 446(7133): 312-315.
218. Sang, T., D. J. Crawford and T. F. Stuessy (1995). "Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear

- ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(15): 6813-6817.
219. Sapir, Y. and A. V. I. Shmida (2002). "Species concepts and ecogeographical divergence of *Oncocyclus irises*." *Israel Journal of Plant Sciences* 50(sup1): 119-127.
220. Sapir, Y. and R. Mazzucco. (2012). Post-zygotic reproductive isolation among populations of *Iris atropurpurea*: the effect of spatial distance among crosses and the role of inbreeding and outbreeding depression in determining niche width. *Evolutionary Ecology Research* 14(4): 425-445.
221. Sapir, Y., A. Shmida and G. Ne'eman (2005). "Pollination of *Oncocyclus irises* (Iris: Iridaceae) by Night-Sheltering Male Bees." *Plant Biology* 7: 417-424.
222. Sapir, Y., Shmida, A., and Fragman, O. (2003). "Constructing Red Numbers for endangered plant species: Israeli flora as a test case." *Journal for Nature Conservation* 11 91-107.
223. Sarukhan, J., M. Martinez-Ramos and D. Pinero (1984). "Analysis of demographic variability at the individual level and its population consequences." *Perspectives on plant population ecology*/edited by Rodolfo Dirzo and Jose Sarukhan.
224. Schemske, D. W., B. C. Husband, M. H. Ruckelshaus, C. Goodwillie, I. M. Parker and J. G. Bishop (1994). "Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants." *Ecology* 75(3): 584-606.
225. Schinz, H., L. Ruzicka, C. Seidel and C. Tavel (1947). "Produits à odeur de violette. Synthèse de la d, l- α -irone." *Helvetica Chimica Acta* 30(6): 1810-1814.
226. Schwarzscher, T. (2003). "DNA, chromosomes, and in situ hybridization." *Genome* 46(6): 953-962.
227. Schweizer, D. (1976). "Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI." *Chromosoma* 58(4): 307-324.
228. Segal, B., Y. Sapir, and Y. Carmel. (2006). Fragmentation and pollination crisis in the self-incompatible *Iris bismarckiana* (Iridaceae), with implications for conservation. *Israel Journal of Ecology & Evolution* 52(2): 111-122.
229. Shibli, R.A. and M. Ajlouni. (2000). Somatic embryogenesis in the endemic black iris. *Plant cell, tissue and organ culture* 61(1): 15-21.

230. Shmida, A., O. Fragman, R. Nathan, Z. Shamir and Y. Sapir (2002). "The Red Plants of Israel: a proposal of updated and revised list of plant species protected by the law." *Ecologia mediterranea* 28: 55-64.
231. Siljak-Yakovlev, S., Bogunić, F., Muratović, E., Šolić, M.E., Pavlović, D. & Medjedović, S. (2005). Genome organization of some Iris species assessed by molecular cytogenetics. XVII International Botanical Congress. Vienne: 384.
232. Siljak-Yakovlev, S., M. Cerbah, J. Coulaud, V. Stoian, S. C. Brown, V. Zoldos, S. Jelenic and D. Papes (2002). "Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*." *Theor Appl Genet* 104(2-3): 505-512.
233. Siljak-Yakovlev, S., S. Benmalek, M. Cerbah, T. C. DelaPeña, N. Bounaga, S. C. Brown and A. Sarr (1996). "Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm." *Sexual Plant Reproduction* 9(3): 127-132.
234. Simberloff, D. (1998). "Small and declining populations." *Conservation science and action*, ed. W.J. Sutherland: 116-134.
235. Simonet, M. (1932). "Recherches cytologiques et génétiques sur les Iris." *Bull. Biol. France Belg.* 78: 696-707.
236. Simonet, M. (1934). "Nouvelles recherches cytologiques et génétiques chez les iris." *Ann. sci. Nat, Bot. Annales des sciences naturelles Botanique* 25.
237. Simonich, M.T. and M.D. Morgan. (1994). Allozymic uniformity in *Iris lacustris* (dwarf lake iris) in Wisconsin. *Canadian Journal of Botany* 72(11): 1720-1722.
238. Soulé, M. E. (1986). "Conservation biology and the " real world." *Conservation biology. The science of scarcity and diversity*: 1-12.
239. Srisuwan, S., D. Sihachakr, and S. Siljak-Yakovlev. (2006). The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science* 171(3): 424-433.
240. Swift, H. (1950). "The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei." *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 36(11): 643.
241. Taberlet, P., L. Fumagalli, A. G. Wust-Saucy and J. F. Cosson (1998). "Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe." *Molecular Ecology* 7(4): 453-464.

242. Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet (1991). "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA." *Plant Molecular Biology* 17(5): 1105-1109.
243. Talhouk, S., R. Zurayk and S. Khuri (2001). "Conservation of the coniferous forests of Lebanon: past, present and future prospects." *Oryx* 35(3): 206-215.
244. Tan, A., H. Duman, F. N. Ýnal and A. Karagöz (2003). "Ecosystem conservation and management for threatened species projects: description of target species and their habitats." TACN (Turkish Association for the Conservation of Nature).
245. Taylor, J. J. (1976). A reclassification of *Iris* species bearing arillate seeds. *Proceedings Biol. Soc. Washington* 89, 35:411-420.
246. The Plant List. (2013). "Version 1.1." Retrieved 2/2/2016.
247. Tohmé, G. and H. Tohmé (2002). *A thousand and one flowers of Lebanon*, Lebanese University.
248. Tohmé, G. and H. Tohmé (2004). "Recherches sur le statut actuel des plantes endémiques du Liban." *Archaeology & history in Lebanon* (19): 64-69.
249. Tohmé, G. and H. Tohmé (2011). "Nouvelles recherches sur la flore endémique et naturalisée du Liban." *Lebanese Science Journal* 12(2): 133-141.
250. Tohmé, G. and H. Tohmé (201). *Illustrated flora of Lebanon*, National Council for Scientific Research.
251. Tohmé, G., & H. Tohmé (1981). *Extinct and disappearing animals in Lebanon*. Biology International.
252. Trias-Blasi, A. and M. Vorontsova (2015). "Botany: plant identification is key to conservation." *Nature* 521(7551): 161
253. Tzedakis, P. et al. (2002). Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. *Science* 297 (5589) : 2044-2047.
254. Uzun, S. et al. (2014). Efficient in vitro plant regeneration from immature embryos of endemic *Iris sari* and *I. schachtii*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 38 (3): 348-353.
255. Van Kley, J. and D. Wujek. (1993). *Habitat and ecology of Iris lacustris (the dwarf lake iris)*. Michigan botanist (USA).

256. Velterop, O. (2000). "Effects of fragmentation on pollen and gene flow in insect-pollinated plant populations." Groningen: s.n., 156p.
257. Vereecken, N. J., A. Dorchin and A. C. Dafni (2015). "Reply to Lavi & Sapir (2015): floral colour and pollinator-mediated selection in *Oncocyclus irises* (Iridaceae)." *New Phytologist* 207 (4): 948-949.
258. Vereecken, N. J., A. Dorchin, A. Dafni, S. Hötling, S. Schulz and S. Watts (2013). "A pollinators' eye view of a shelter mimicry system." *Annals of Botany* 111 (6): 1155-1165.
259. Violeta, M.M., A. Teodorescu, and Ş.N. Anca. (2003). Preliminary results on the in vitro propagation by leaf explants and axillary buds of *Iris aphylla* L. *In vitro* 2 (24): 40-48.
260. Vogel, J. C., Rumsey, F. J., Schneller, J. J., Barrett, J. A., & Gibby, M. (1999). Where are the glacial refugia in Europe? Evidence from pteridophytes. *Biological Journal of the Linnean Society* 66 (1) : 23-37.
261. Volis, S., et al. (2015). *Iris atrofusca* genetic and phenotypic variation, the role of habitat-specific selection in this variation structuring, and conservation implications using quasi in situ guidelines. *Israel Journal of Plant Sciences*, p. 1-8.
262. Volis, S., M. Blecher, and Y. Sapir. (2010). Application of complex conservation strategy to *Iris atrofusca* of the Northern Negev, Israel. *Biodiversity and conservation*. 19 (11): p. 3157-3169.
263. Walter, K. S. and H. J. Gillett (1998). 1997 IUCN Red List of threatened plants, IUCN.
264. Watts, S., Y. Sapir, B. Segal and A. Dafni (2013). "The endangered *Iris atropurpurea* (Iridaceae) in Israel: honey-bees, night-sheltering male bees and female solitary bees as pollinators." *Annals of Botany* 111(3): 395-407.
265. Wesselingh, R. A. and M. L. Arnold (2000). "Pollinator behaviour and the evolution of Louisiana iris hybrid zones." *Journal of Evolutionary Biology* 13 (2): 171-180.
266. West, W. A. (1963). New *Oncocyclus* Irises, *ASI Yearbook* 60-61.
267. West, W. A. (1967). "*Iris antilibanotica*." *ASI Yearbook*: 64-66.
268. White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18 (1): 315-322.
269. Wilson, C. A. (2004). "Phylogeny of *Iris* based on chloroplast *matK* gene and *trnK* intron sequence data." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33(2): 402-412.

270. Wilson, C. A., Padiernos, J. & Sapir Y. (2016). "The royal irises (*Iris* subg. *Iris* sect. *Oncocyclus*): Plastid and low-copy nuclear data contribute to an understanding of their phylogenetic relationships." *Taxon*: 12 pp.
271. Wilson, E. O. (2002). *The future of life*, Vintage.
272. Wilson, E. O. (2004). "Taxonomy as a fundamental discipline." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 359(1444): 739-739.
273. Wroblewska, A. and E. Brzosko. (2006). The genetic structure of the steppe plant *Iris aphylla* L. at the northern limit of its geographical range. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152 (2): 245-255.
274. Wroblewska, A., et al. (2003). High levels of genetic diversity in populations of *Iris aphylla* L. (Iridaceae), an endangered species in Poland. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142 (1): 65-72.
275. Wróblewska, A., Brzosko, E., Chudzińska, E., Bordács, S., and Ivanovych Prokopiv, A. (2010). Cytotype distribution and colonization history of the steppe plant *Iris aphylla*. *Annales Botanici Fennici*. *BioOne* 47 (1): 23-33.
276. Wu, Q. G. and D. F. Cutler (1985). "Taxonomic, evolutionary and ecological implications of the leaf anatomy of rhizomatous *Iris* species." *Botanical Journal of the Linnean Society* 90 (4): 253-303.
277. Young, N. D. (1996). "An analysis of the causes of genetic isolation in two Pacific Coast iris hybrid zones." *Canadian Journal of Botany* 74: 2006-2013.
278. Zimmer, E., S. Martin, S. Beverley, Y. Kan and A. C. Wilson (1980). "Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (4): 2158-2162.
279. Zohary, M., *Geobotanical foundations of the Middle East*. 1973.

Annexe 1 : Solutions utilisées

Préparations des plaques de chromosomes métaphasiques, Nitrate d'argent, tampons:

- Colchicine à 0,05%:

Eau distillée	100 ml
Colchicine	50 mg

- Ethanol acétique 3 :1:

	40 ml
Ethanol	30 ml
Acide acétique glacial	10 ml

- Ethanol à 70%:

	100 ml
Ethanol	70 ml
Eau distillée	30 ml

- Acide acétique glacial à 45%:

	10 ml
Acide acétique glacial	4,5 ml
Eau distillée	5,5 ml

- Nitrate d'argent à 50% :

AgNO ₃	5 g
-------------------	-----

Eau distillée	10 ml
---------------	-------

- Tampon citrate 0,1M pH 4,6:

Tri-sodium citrate	882 mg
Acide citrique	420 mg
Eau	50 ml
(dilution au 1/10 ^e au moment de l'utilisation)	

- Solution enzymatique R:

Tampon citrate 5mM pH 4,6	10 ml
Hémicellulase	0,4 g
Pectolyase Y23	0,1 g
Cellulase R10	0,4 g

Tampons, CMA:

Solution A	100 ml d'H ₂ O
Acide citrique	2,10 g
Solution B	100 ml d'H ₂ O
NA ₂ HPO ₄	5,361 g
Tampon Mac Ilvaine pH de 7	100 ml d'H ₂ O distillée (compléter)
Solution A	3,53 ml
Solution B	16,47 ml

Tampon MacIlvaine pH de 7 avec MgSO ₄	100 ml Tampon Mac Ilvaine pH de 7
MgSO ₄ (PM 246,47 g) à 0,005 M	0,123 g
Tampon MacIlvaine pH de 5,5	100 ml d'H ₂ O distillée (compléter)
Solution A	8,85 ml
Solution B	11,5 ml
Chromomycine A3 à 0,2 mg/ml	50 ml
Chromomycine A3 SIGMA	10 mg (flacon entier)
Tampon Mac Ilvaine pH de 7 avec MgSO ₄	50 ml

- Fluorochrome DAPI 2µg/ml dans MacIlvaine pH=7

Tampons, FISH:

- 20X SSC (Stérilisation à autoclave: 110 °C, 30 min.)

A diluer 5, 10 et 20 fois avec de l'eau ultra pure stérilisée pour obtenir les solutions 4X, 2X et 0,1X SSC

	2000 ml
NaCl	350,64 g
Trissodium citrate	176,46 g
Eau ultra pure	Qsp 2000 ml

- 4X SSC Tween (Stérilisation à l'autoclave: 110 C, 30 min.)

	1000 ml
Tween	2 ml
20X SSC	200 ml
Eau ultra pure	800 ml

- 4X SSC

	1000 ml
20X SSC	200 ml
Eau ultra pure	800 ml

- 2X SSC

	1000 ml
20X SSC	100 ml
Eau ultra pure	900 ml

- 0,1X SSC

	260 ml
2X SSC	13 ml
Eau ultra pure	247 ml

- Formamide 20%

	200 ml
0,1X SSC	160 ml
Formamide	40 ml

- RNase A (Stock à 20 mg.ml⁻¹)

	1 ml
RNase à 100 mg/ml (Qiagen)	200 µl
2X SSC	800 µl

A diluer 200 X dans du 2X SSC au moment de l'utilisation

- Pepsine (Stock à 500 mg.^{ml}⁻¹)

	1 ml
Pepsine	500 mg
0,01 M HCl	1 ml

- Solution BSA (Bovine serum albumin) (Stériliser sur filter millipore 0,22 µm)

	2 ml
BSA	100 mg
4X SSC Tween	2 ml

Solutions pour la cytométrie en flux:

TNP	200 ml
CPW-A (x100)	2 ml
CPW-B (x100)	2 ml
Mannitol	18,2 ml
PEG	500 ml
Triton X-100	1 ml
pH	6,5-7,0

- Le tampon d'extraction

Produit	Volume (mL)	Masse (g)	Concentration	Entreprise
NaCl (5M)	28		1.4 M	MERCK 106404
CTAB		2	0.02	SIGMA, H 5882
EDTA (0,5M)	4		20 mM	SIGMA, 35H0356
Tris HCl (1M, pH=8)	10		100 mM	BIOPROBE, TRIS 03
PVP soluble (40000)		2	0.02	SIGMA, 7443
		100		

**Annexe 2 : Le protocole et les produits utilisés pour la préparation de la sonde
de l'hybridation *in situ***

Solutions	Remarques	Concentration finale	1 lame
Formamide	Améliore la dénaturation.	50%	25µl
Dextran sulfate	Forme un réseau autour de la sonde.	50% W/V	10µl
20% SDS	Détergent.	0,1% W/V	0,25µl
Salmon sperm	Bloque les sites pour éviter les fixations aspécifiques.	250µL/mg	1,5µl
20×SSC	Solution saline où les chromosomes se sentent bien.		5µl
H2O pure	Le volume ajouté dépend du volume de sonde ajouté.		Qsp 6,75µl
ADN 18S	Les sondes sont préparées par PCR. Bien prélevé dans le fond du tube pour ne pas contaminer les sondes avec l'huile utilisée pour la PCR. Essuyer le cône.	20 à 30 ng/lame	1,5 µl
ADN 5S			1,5 µl
Volume final			50µl

Annexe 3: Tépales scannés des iris *Oncocyclus* du Liban

Iris sofarana

Foster 1889



Forma *westii*

(Dinsm.) n.

comb. — *Iris*

westii Dinsm.



<p>Forma <i>kasruwana</i> (Dinsm.) n. comb. — <i>Iris</i> <i>kasruwana</i> Dinsmore.</p>	
<p><i>Iris cedreti</i> Dinsm. in sched.</p>	
<p><i>Iris</i> <i>bismarckiana</i> Regel — /. <i>saari</i> Schott, v. <i>nazarena</i> Foster, /. <i>nazarena</i> (Foster) Dinsmore, /. <i>hermona</i> Dinsmore</p>	

Iris lortetii

Barbey



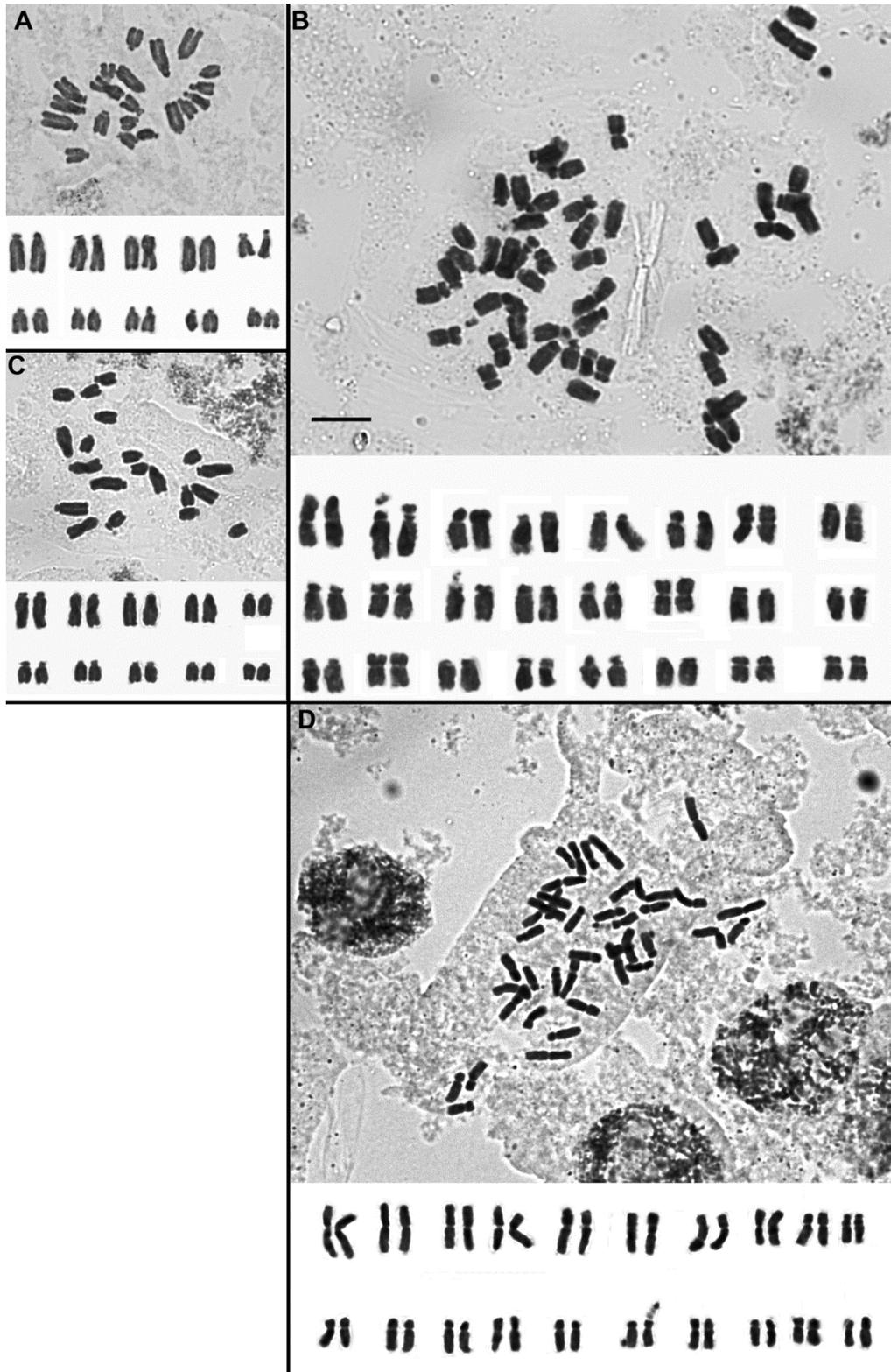
Iris

antilibanotica

Dinsm.



Annexe 4: Les plaques métaphasiques et les caryotypes de 4 espèces d'*Iris* :
 A : *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Hazzerta), B : *I. mesopotamica*, C : *I. sofarana*
 subsp. *sofarana* (Falougha), D : *I. unguicularis* var. *cretensis*.



Annexe 5 : Les données morphométriques pour chaque caryotype.

Morphometric data concerning the karyotype of *Iris* taxa **l** -long arm; **s** -short arm; **TL** -Total chromosome length; **TKL** = total haploid length of the chromosome complement; **r** -ratio long/short arms; **Ci%** -Centromeric index = $100 \times s/TL$; **AsI%** - Index expressed by the ratio of the sum of the lengths of the long arms of individual chromosomes to the TKL; **Ct** -Chromosome type (according to Levan & *al.*, 1964); **M_{CA}** -Mean Centromeric Asymmetry = $A \times 100$ [$A = \text{Mean (long arm-short arm)/(long arm+short arm)}$]; **CV_{CL}** -Coefficient of Variation of Chromosome Length = $A2 \times 100$ [$A2 = \text{standard deviation of chromosome length/mean chromosome length (Romero Zarco 1986)}$]; **TF%** index is expressed by the ratio of the sum of the lengths of the short arms of individual chromosomes to the TKL; **Syi%** -Value indicates the ratio of the mean length of the short arms against the mean length of the long arms in a chromosome set; **m** -metacentric; **sm** -submetacentric; **sat** -satellite **SD** -Standard Deviation. All the values are in μm .

hr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.6	5	5.6	8.3	10.7	85.28	t	70.6	31.4	14.7	17
2	0.5	4.8	5.3	9.6	9.4		t				
3	0.5	4.3	4.8	8.6	10.4		t				
4	0.5	3.8	4.3	7.6	11.6		st				
5	0.6	2.8	3.4	4.7	17.6		st-sat				
6	0.7	2.5	3.2	3.6	21.9		st-sat				
7	0.6	2.3	2.9	3.8	20.7		st				
8	0.5	2.3	2.8	4.6	17.9		st				
9	0.5	2.1	2.6	4.2	19.2		st				
10	0.5	2	2.5	4.0	20.0		st				
Total	5.5	32	37.4								
Average	0.5	3.2	3.7								
SD	0.1	1.2	1.2								

I. sofarana subsp. sofarana (Falougha)

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	MCA%	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.9	5.8	6.7	6.3	13.7	85.7	st	71.6	31.7	14.1	16.6
2	0.7	5.5	6.2	7.9	11.3		t				
3	0.6	5.3	5.8	8.9	10.1		t				
4	0.4	4.9	5.2	13.6	6.9		t				
5	0.7	3.3	4.0	4.8	17.3		st-sat				
6	0.6	3.1	3.7	5.5	15.4		st-sat				
7	0.8	2.9	3.7	3.6	21.7		st				
8	0.6	2.7	3.3	4.4	18.6		st				
9	0.6	2.5	3.1	4.5	18.3		st				
10	0.5	2.3	2.8	4.3	18.9		st				
Total	6.3	38.2	44.5	63.7							
Average	0.6	3.8	4.5								
SD			1.4								

I. sofarana subsp. sofarana (Hazzerta)

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	MCA%	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.7	5.4	6.1	7.6	11.6	84.3	t	68.6	29.3	15.7	18.5
2	0.6	5.1	5.7	8.9	10.1		t				
3	0.7	4.5	5.2	6.1	14.1		st				
4	0.6	3.7	4.3	5.7	14.9		st				
5	0.6	3.0	3.6	4.7	17.6		st-sat				
6	0.9	2.8	3.7	3.1	24.1		st-sat				
7	0.6	2.7	3.3	4.4	18.4		st				
8	0.6	2.6	3.1	4.4	18.4		st				
9	0.5	2.5	3.0	4.8	17.1		st				
10	0.5	2.2	2.7	4.3	18.8		st				
Total	6.4	34.4	40.9								
Average	0.6	3.4	4.1								
SD			1.2								

I. sofarana subsp. *kasruwana*

Chr. p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.8	5.1	5.9	6.4	13.5	86.8	st	73.6	31.6	13.19	15.20
2	0.6	4.7	5.3	7.6	11.6		t				
3	0.4	4.5	4.9	10.9	8.4		t				
4	0.4	4.1	4.5	11.5	8.0		t				
5	0.5	3.2	3.7	6.2	14.0		st-sat				
6	0.6	2.7	3.3	4.7	17.7		st-sat				
7	0.6	2.6	3.1	4.5	18.0		st				
8	0.5	2.3	2.8	4.3	18.9		st				
9	0.3	2.2	2.5	7.2	12.2		t				
10	0.4	2.1	2.4	5.3	15.8		t				
Total	5.1	33.4	38.5								
Average	0.5	3.3	3.8								
SD			1.2								

I. cedreti

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/T L	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.7	5.0	5.7	6.7	12.9	86.3	st	72.7	30.1	13.7	15.7
2	0.5	4.7	5.2	9.8	9.3		t				
3	0.5	4.5	5.0	8.8	10.2		t				
4	0.5	4.4	4.8	9.1	9.9		t				
5	0.7	3.2	3.9	4.8	17.4		st-sat				
6	0.5	2.8	3.3	5.8	14.8		st-sat				
7	0.7	2.6	3.3	3.6	21.6		st				
8	0.4	2.5	2.9	5.9	14.4		st				
9	0.4	2.2	2.6	4.9	17.1		st				
10	0.4	2.1	2.5	4.9	16.9		st				
Total	5.4	33.8	39.2								
Average	0.5	3.4	3.9								
SD			1.2								

I. westii

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/T L	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.5	5.0	5.5	9.8	9.3	86.6	t	73.2	28.1	13.3	15.5
2	0.5	4.8	5.3	9.4	9.6		t				
3	0.5	4.4	4.9	8.5	10.5		t				
4	0.4	3.8	4.2	10.0	9.1		t				
5	0.6	2.9	3.6	4.6	17.9		st-sat				
6	0.4	2.8	3.2	7.3	12.0		t-sat				
7	0.6	2.4	3.1	3.8	20.8		st				
8	0.6	2.3	2.9	4	20.0		st				
9	0.5	2.3	2.8	4.5	18.2		st				
10	0.4	2.3	2.8	5.1	16.3		st				
Total	5.1	33.1	38.3								
Average	0.5	3.3	3.8								
SD			1.1								

I. bismarckiana

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.6	3.6	4.2	6	14.3	84.2	st	68.4	29.6	15.7	16.7
2	0.5	3.6	4.1	5.6	12.2		st				
3	0.8	3.1	3.8	4	20.0		st				
4	0.5	3.1	3.6	6	14.3		st				
5	0.4	3.1	3.5	8	11.1		t-sat				
6	0.5	2.1	2.6	4	20.0		st-sat				
7	0.5	2.1	2.6	4	20.0		st				
8	0.5	2.1	2.6	4	20.0		st				
9	0.3	1.5	1.8	6	14.3		st				
10	0.3	1.5	1.8	6	14.3		st				
Total	4.9	25.6	30.5								
Average	0.3	1.5	3								
SD			0.9								

I. lortetii

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.56	4.44	5	8	11	86	t	71	33	14.3	16.7
2	0.60	3.93	5	7	13		st-t				
3	0.47	3.85	4	8	11		t				
4	0.64	3.42	4	5	16		st				
5	0.51	2.56	3	5	17		st-sat				
6	0.51	2.22	3	4	19		st-sat				
7	0.43	2.05	2	5	17		st				
8	0.38	2.05	2	5	16		st				
9	0.34	1.88	2	6	15		st				
10	0.30	1.79	2	6	14		st				
Total	5	28	33								
Average	0	3	3								
SD			1								

I. antilbanotica

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci=100s/T L	AsI%	Ct	M_{CA}%	CV_{CL}%	TF%	Syi%
1	5.1	5.3	10.5	1	49	60.4	m	40.4	31.7	39.6	65.7
2	4.9	5.1	10.1	1	49		m				
3	3.7	4.7	8.4	1.3	43.9		m				
4	3.7	4.5	8.2	1.2	45		m				
5	2.9	4.5	7.4	1.6	38.9		m				
6	2.9	4.1	7.0	1.4	41.2		m				
7	2.1	3.3	5.3	1.6	38.5		m				
8	2.1	3.1	5.1	1.5	40		m				
9	1.4	4.1	5.5	2.9	25		sm				
10	1	4.1	5.1	4	20		st				
11	1.2	3.3	4.5	2.7	27.3		sm				
12	1.2	2.9	4.1	2.3	30		sm				
Total	32.2	49	81.2								
Average	2.7	4.1	6.8								
SD			2.1								

I. persica

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	2.8	3.38	6.20	1.20	45.5	63.57	m	27.13	24.42	36.3	57.2
2	2.3	2.95	5.26	1.28	43.9		m				
3	2.1	2.65	4.79	1.24	44.6		m				
4	2.1	2.52	4.57	1.23	44.9		m				
5	2.0	2.39	4.36	1.22	45.1		m				
6	1.5	2.65	4.19	1.72	36.7		sm				
7	1.4	2.35	3.72	1.72	36.8		sm				
8	1.5	2.22	3.68	1.53	39.5		m				
9	1.2	2.56	3.76	2.14	31.8		sm				
10	0.8	2.82	3.59	3.67	21.4		st				
11	1.0	2.35	3.38	2.29	30.4		sm				
12	1.0	2.35	3.38	2.29	30.4		sm				
13	1.1	2.22	3.33	2.00	33.3		sm				
14	0.9	2.14	3.08	2.27	30.6		sm				
15	1.0	2.18	3.21	2.13	32.0		sm				
16	0.7	2.18	2.88	3.09	24.4		st				
17	1.0	2.18	3.21	2.13	32.0		sm				
18	1.0	2.05	3.08	2.00	33.3		sm				
19	1.0	1.79	2.82	1.75	36.4		sm				
20	0.8	1.67	2.44	2.17	31.6		sm				
Total	27.29	47.61	74.89								
Average	1.36	2.38	3.74								
SD			0.91								

I. unguicularis var. *cretensis*

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	2.7	3.0	5.6	1.1	47.3	69.9	m	39.9	20.9	30.1	43
2	2.4	2.7	5.0	1.1	46.9		m				
3	1.6	2.2	3.8	1.3	43.2		m				
4	1.7	2.1	3.8	1.2	45.9		m				
5	1.6	1.8	3.4	1.2	46.3		m				
6	1.4	1.6	3.1	1.1	46.7		m				
7	0.8	3.8	4.6	4.6	17.8		st				
8	1.1	3.3	4.4	2.9	25.6		sm				
9	1.0	3.2	4.2	3.1	24.4		st				
10	0.9	3.0	3.8	3.4	22.7		st				
11	0.7	2.9	3.6	4.0	20.0		st				
12	0.6	2.9	3.5	4.7	17.6		st				
13	0.8	2.8	3.6	3.4	22.9		st				
14	1.0	2.7	3.7	2.6	27.8		sm				
15	0.9	2.7	3.6	2.9	25.7		sm				
16	0.7	2.7	3.4	3.7	21.2		st				
17	0.7	2.7	3.4	3.7	21.2		st				
18	0.7	2.5	3.2	3.4	22.6		st				
19	0.8	2.5	3.3	3.0	25.0		sm-st				
20	0.5	2.5	3.0	4.8	17.2		st				
21	0.9	2.1	3.0	2.2	31.0		st				
22	0.5	2.1	2.6	4.0	20.0		st				
23	0.8	1.7	2.6	2.1	32.0		sm				
24	0.9	1.6	2.6	1.8	36.0		sm				
Total	26.1	60.6	86.7								
Average	1.1	2.5	3.6								
SD			0.8								

I. mesopotamica

Annexe 6 : Les fiches d'information sur des produits utilisés

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:

Chloroform - anhydrous, ≥99%, contains 0.5-1.0% ethanol as stabilizer

Product Number: 288306
CAS Number: 67-66-3
MDL: MFCD00000826
Formula: CHCl₃
Formula Weight: 119.38 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	Colorless
Appearance (Form)	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure
Purity (GC)	≥ 99.0 %
Excluding Stabilizer	
Ethanol as Stabilizer	0.5 - 1.0 % (V)
Residue on Evaporation	≤ 0.0003 %
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.001 %
Note	-----

For 100 mL unit size, water content may exceed above specification; not to exceed 0.005%

Specification: PRD.2.ZQ5.10000025862



ISO 9001 CERTIFIED
 ISO 13485 CERTIFIED

AMRESCO LLC

28600 Fountain Parkway
 Solon, Ohio USA 44139
 440/349-1199 FAX: 440/349-1182
 www.amresco-inc.com
 Email: info@amresco-inc.com

CERTIFICATE OF QUALITY / CERTIFICATE OF ANALYSIS

Isoamyl Alcohol

Code: 0944

Chemical Formula:	C5H11OH	Manufacture Date:	(batch specific)
Molecular Weight:	88.15	Expiration/Reassay Date:	(batch specific)
CAS #:	123-51-3		
Appearance:		Storage:	
Clear liquid		Grade:	ULTRA PURE GRADE

Additional Information

TEST	SPECIFICATION	DISPOSITION
Color (APHA)	<= 20	PASS
Moisture (KF)	<= 1.0 %	PASS
Purity	>= 99.0 %	PASS

Spec Set: 0944UP

Analysis may have been rounded to significant digits in specification limits.
 Product meets analytical specifications of the grades listed.

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

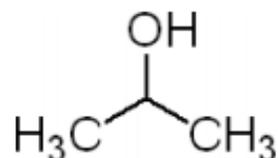
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
2-Propanol - ACS reagent, ≥99.5%

Product Number: **437522**
CAS Number: 67-63-0
MDL: MFCD00011674
Formula: C₃H₈O
Formula Weight: 60.1 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	Colorless
Appearance (Form)	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure
Color Test	≤ 10 APHA
Purity (GC)	≥ 99.50 %
Acetone	≤ 0.002 %
Carbonyl compounds as Propionaldehyde	≤ 0.002 %
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.2 %
Residue on Evaporation	≤ 0.001 %
Solubility	Pass
Titrateable Acid or Base	≤ 0.0001 meq
Meets ACS Requirements 10th Edition	Current ACS Specification
Recommended Retest Period 2 years	-----

Specification: PRD.0.ZQ5.10000021096

**Annexe 7: Evaluation élaborée par la liste rouge de l'IUCN sur le status de l'*Iris sofarana*
Foster au Liban**

Annexe 8: Article: Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora.

M. Bou dagher-Kharrat, N. Abdel-Samad, B. Douaihy, M. Bourge, A. Fridlender, S. Siljak-Yakovlev & S. C. Brown.

Plant Biosystems, 2013

**Annexe 9: Article: Unlocking the karyological and cytogenetic diversity of *Iris* from Lebanon:
Oncocyclus section shows a distinctive profile and relative stasis during its continental
radiation**

Sort title: FISH of rRNA genes in four *Iris* subgenera

**Authors: Nour Abdel Samad, Magda Bou Dagher-Kharrat, Oriane Hidalgo, Rana El Zein, Bouchra Douaihy,
Sonja Siljak-Yakovlev**

PLOS ONE

2016

Titre : Caractérisation Génétique du Genre *Iris* évoluant dans la Méditerranée Orientale.

Mots clés : *Iris*, *Oncocylus*, région Est-Méditerranéenne, relations phylogénétiques, status taxonomique.

Résumé : Le genre *Iris* appartient à la famille des Iridacées, il comprend plus de 280 espèces distribuées à travers l'hémisphère Nord. La section *Oncocylus* (Siems.) Baker de ce genre est confinée au Sud-ouest de l'Asie et comprend plus de 65 espèces au statut taxonomique souvent discuté.

Le genre *Iris* présente un taux d'endémisme relativement élevé par rapport à d'autres groupes taxonomiques de son aire de répartition géographique et plusieurs de ses taxons présentent une valeur patrimoniale. Cependant, la cueillette excessive ainsi que la destruction de leurs habitats naturels menace un grand nombre de ces espèces.

Le présent travail de thèse porte sur un groupe de taxons des iris de la section *Oncocylus* ayant évolué à l'est de la région méditerranéenne. L'objectif principal de ce travail est d'affirmer le statut taxonomique des espèces et de clarifier les relations phylogénétiques qui les relient, une étape nécessaire au développement de stratégies de conservation appropriées pour ce groupe.

L'approche scientifique est basée sur de nombreux outils moléculaires et génétiques tels que : l'analyse de la taille du génome, l'étude du caryotype, l'organisation du génome basée sur la localisation des gènes ribosomiques et l'étude de la structuration de la diversité génétique et la phylogénie basée sur des marqueurs moléculaires chloroplastiques. Ainsi, les régions *trnL-F* et *matK* de tous les iris du Liban et 26 taxa d'*Oncocylus* de la région Est-Méditerranéenne ont été séquencées pour élucider les relations phylogénétiques. Les deux techniques Feulgen et FISH ont été appliquées sur plusieurs espèces *Oncocylus* du Liban pour comparer leurs caryotypes et déterminer le nombre et la localisation des gènes ribosomiques sur leurs chromosomes.

Les études ont été accompagnées par des travaux de terrain afin de suivre l'évolution de la dynamique des taxons endémiques du Liban en vue de leur préservation.

Title: Genetic Characterization of *Iris* Genus evolving in the East Mediterranean Region.

Keywords: East Mediterranean region, *Iris*, *Oncocylus*, phylogenetic relationships, taxonomic status.

Abstract: The genus *Iris* belongs to the Iridaceae family which includes over 280 species distributed throughout the Northern Hemisphere. The *Oncocylus* section (Siems.) Baker of this genus is confined to the Southwest Asia and includes more than 65 species which their taxonomic status is often discussed.

The genus *Iris* has a relatively high rate of endemism compared to other taxonomic groups of its geographic range and several of its taxa have a heritage value. However, overharvesting and the destruction of their natural habitats threaten many of these species.

This thesis focuses on a group of taxa of the iris section *Oncocylus* evolving in the east Mediterranean region, The main objective of this work is to affirm the taxonomic status of the species and to clarify the phylogenetic relationships that connect them, a necessary step in the development of appropriate conservation strategies for this group.

The scientific approach is based on many molecular and genetic tools such as the analysis of genome size, the study of the karyotype, genome organization based on the location of ribosomal genes and the study of the structure genetic diversity and phylogeny based on chloroplast molecular markers. Thus, the *trnL-F* and *matK* regions of all Lebanese irises and 26 taxa of *Oncocylus* of the East Mediterranean region were sequenced to elucidate phylogenetic relationships. Both techniques Feulgen and FISH were applied to several *Oncocylus* species of Lebanon to compare their karyotype and determine the number and the location of ribosomal genes on their chromosomes.

Studies were accompanied by field work to monitor the dynamics of Lebanon's endemic taxa for their preservation.

Remerciements

**Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.**

Marcel Proust

**La recherche n'avancerait-elle pas plus vite, si au lieu de recruter des
chercheurs, on engageait des trouveurs ?**

- Le chat -

Au risque d'employer une métaphore un peu hasardeuse, une thèse m'apparaît comme un écosystème en soi, dont la dynamique d'idées change au cours du temps, influencées par de nombreuses perturbations, parfois négatives quand elles sont trop intenses, mais aussi formatrices car même la plus faible des perturbations stimule la régénération d'idées. Elle est aussi très diversifiée en problématiques de recherche, en études, ce qui la rend forte face aux menaces. Dès que j'ai commencé à coloniser mon sujet, j'ai apporté de plus en plus d'énergie, la thèse est devenue de plus en plus stable jusqu'à atteindre un équilibre, comme un iris qui raidit ses pétales contre les brises matinales et défie les rayons brûlants du soleil. Néanmoins, la thèse n'est pas uniquement le travail personnel du doctorant ; elle bénéficie des interactions établies avec les encadreurs, les collègues, les proches et les diverses rencontres imprévues... Ainsi je me dois et j'ai le plaisir de remercier :

Monsieur le Vice-recteur aux affaires académiques de l'Université Saint-Joseph, **Pr. Toufic Rizk**,
Monsieur le Doyen, **Pr. Richard Maroun** pour leur soutien et leur encouragement.

En restant dans les murs de la Faculté des Sciences, je voudrais remercier les nombreuses personnes qui, tous les jours, m'ont offert leur bonjour accompagné de leur sourire. En particulier, je désire remercier ma sœur et mon amie **Marianne Beainy** et **Dr. Mireille Kallassy**.

Dr. Teresa Garnatje et **Dr. Gianluigi Bachetta** ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et je les en remercie, de même que pour leur participation au Jury. Ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce manuscrit, et je leur en suis très reconnaissante.

Dr. Sophie Nadot, vous m'avez fait l'honneur de participer au Jury de soutenance; je vous en remercie profondément.

Dr. Sonja Siljak-Yakovlev, ma directrice de thèse, mon idole, ma mère de substitution. Merci, Chef, de m'avoir accompagné sur ce chemin, rempli d'embûches, de m'avoir guidée et enseignée les réflexes du bon chercheur. Vous m'avez appris à me poser les bonnes questions et à y répondre avec le maximum de rigueur. Merci encore de m'avoir montré l'exemple dans la préparation et la rédaction de mes papiers et travaux. Votre écoute, votre générosité, votre patience, votre optimisme et votre extraordinaire force de travail font de vous un exemple ... dont j'espère encore pouvoir longtemps profiter !

Pr. Magda Bou Dagher-Kharrat, merci de m'avoir permis de mener ma barque vers un nouvel horizon, la recherche ! Vos paroles : Une thèse, c'est un travail de longue haleine, un défi que l'on se donne à soi-même.

En signe de reconnaissance. Je me demande parfois comment vous rendre, en partie du moins, le trésor de sollicitude que vous avez manifesté à mon égard, toutes ces petites ou grandes attentions qui m'ont facilité la vie et l'ont agrémentée. Vous me répondrez peut-être que cette générosité porte en elle-même sa récompense, mais je tiens tout de même à exprimer ma gratitude...

Merci **Dr. Oriane Hidalgo**, la chercheuse brillante dont les grandes capacités ont éclairé tant d'étudiants et de collègues. Merci à la "fantastiqueuse" spécialiste de phylogénie extrêmement douée pour tous ses logiciels et outils.

Pr. Georges Tohmé et **Pr. Henriette Tohmé** :

Merci d'être ce que vous êtes, incomparables ! Malgré vos honneurs et vos succès, vous demeurez des chercheurs infatigables et généreux, généreux dans tous les sens du terme. Vous utilisez vos succès pour le mettre au service de votre discipline, la biologie, mais surtout vous engagez toutes vos recherches avec l'idée force de garantir l'avenir de la flore libanaise.

Dr. Edouard Makhoul, amoureux des fleurs sauvages du Liban, je tiens à vous remercier d'avoir bien voulu nous aider et enrichir nos connaissances.

Odile Robin, l'experte en biologie moléculaire et la cytogénétique, tes solides compétences, tes multiples encouragements répétés : Nour ne t'inquiète pas, tu vas t'en sortir comme une chef ! Ton sourire éclaircit le labo, ton énergie et ta bonne humeur sont hyper communicatives, la chaleur humaine est la plus agréable des chaleurs. Tu es toujours capable ! Tu donnes sans rien attendre en retour, tu penses toujours aux autres.

Au « résident permanent » de nos iris, qui nous a fait une visite sans invitation, **M. Champignon endophyte** qui nous a rappelé le fameux proverbe : A quelque chose malheur est bon !

Un grand merci à **Elie Saliba** qui a partagé avec moi la phase « moléculaire » de cette thèse. L'ADN le « roi » de cette phase est un matériau capricieux et rebelle. Mais pas pour le roi de la PCR, Elie, qui a

essayé plusieurs fois et finit pas réussir ! «C'est en essayant continuellement qu'on finit par réussir, en d'autres termes, plus ça rate, plus on a de chances que ça marche » (Devise Shadok).

Plus que précieuse, leur aide fut déterminante :

- **Dr. Layla Saad**, votre thèse de doctorat et vos articles étaient d'une importance capitale et m'ont donné une excellente base pour mes recherches.

- **M. Frédéric Dépalle**, l'amoureux et le spécialiste des iris, vous m'avez fait les plus beaux cadeaux : les feuilles précieuses des iris *Oncocyclus*.

- **M. Nasser Chreif** et **M. Raghed Al Hassan** pour votre aide apportée à la préparation des visites de terrain.

- **Dr. Spencer Brown**, le roi de la cytométrie en flux, je n'oublierai jamais vos histoires magnifiques de l'Australie et des Aborigènes, qui ont fait des longues heures de travail, des moments agréables et éducatifs.

- **Dr. Joan Vallès**, pour vos remarques judicieuses, pour votre chaleur, humanisme, délicatesse, vous avez été de bon conseil et cela toujours avec calme et sourire.

- Mon amie **Dr. Rana El Zein** pour tes conseils et critiques pertinents lors de la rédaction de cette thèse m'ont été d'une aide précieuse.

Je souhaite ensuite intégrer dans ces remerciements, **le Ministère de l'Education et de l'Enseignement Supérieur du Liban** qui m'a encouragée à poursuivre mon chemin et **mes collègues et mes élèves dans les deux écoles officielles secondaires de Baakline et Niha**, qui m'ont toujours épaulée, en particulier lors des périodes difficiles.

Mes remerciements vont aussi à **mes parents** qui m'ont toujours accompagnée tout en posant ces questions fameuses et récurrentes : Tout va bien ? Tu avances ? Votre aide a fait de vous des experts en biologie moléculaire et de la flore libanaise... et m'a permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Je n'oublierai jamais ces phrases quand je cherchais l'aide et le réconfort : Nous sommes prêts ! Ne t'inquiète pas ! Vous m'avez appris le respect des gens et de la nature, l'amour du Liban et de ses paysages, l'attachement au territoire et ses trésors. Vous êtes mes stars !

Quand la Lumière s'établit en nous et nous apporte l'illumination et la connaissance, c'est la Joie indescriptible, rayonnante...

La joie est toujours associée à la lumière : là où est la lumière est la joie.

Merci ma sœur, mon amie, ma moitié.

Nous, **Farah** et Nour, Joie et Lumière, continuerons le chemin ensemble...

"Le souvenir, c'est la présence invisible." Victor Hugo.

Une pensée pour toi qui ne m'a jamais quitté, qui m'accompagne dans mon chemin de lumière... Ta présence silencieuse soutient mes pas, encourage mon espérance, reste à mes côtés et pose ses mains sur mon visage quand je t'appelais à mon aide, je sais que tu es très fier de ta sœur !

Raghid, la vie sans toi est comme un iris qui a affronté un orage et a perdu ses couleurs mais il pousse chaque printemps en espérant un jour, après les larmes, les emprunter d'un arc en ciel.

Ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail doctoral : **mes deux familles Abdel Samad et Achkar.**

A mes cher(ère)s ami(e)s : Notre amitié m'est apparue aussi belle et aussi vivifiante qu'un printemps tout neuf. Quand j'ai eu besoin d'une main secourable, de paroles de réconfort ou d'une oreille attentive, vous avez été toujours présent(e)s.

Au Liban... Le Liban de Gebran khalil Gebran qui est :

... une vérité simple et nue; comme elle se mire dans le bassin d'une fontaine, elle ne voit que son visage serein et épanoui.

...un gazouillement de merles, frissonnement de chênes et de peupliers. Il est écho de flûtes dans les grottes et les cavernes.

...fait de collines qui s'élèvent avec prestance et magnificence vers le ciel azuré.

...fait de vallées silencieuses et mystérieuses dont les versants recueillent le son des carillons et le frisson des ruisseaux.

Je termine ces remerciements par saluer, le personnage central de ce propos, dixit le magnifique « **Iris L.** » qui a colonisé avec plaisir mon champs neuronal pendant plusieurs années :

Place à nos fleurs embrasées,
Dont les teintes irisées

Nous ont - honneur précieux ! -
Valu le nom symbolique
Qu'avait, dans l'Olympe antique,
La messagère des Dieux !

Ils paraissent tout étonnés
Un matin d'avril d'être nés.

Ces fleurs honteuses d'être nues
Ont les frayeurs des ingénues.

Le vol léger d'un gai pinson
Leur fait passer un lent frisson.

Contre les brises matinales
Elles raidissent leurs pétales.

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification du genre <i>Iris</i> (British Iris Society 1997)	28
Tableau 2 : Les <i>Iris</i> du Liban	37
Tableau 3 : La classification IUCN (International Union for the Conservation of Nature, 1997) des <i>Oncocyclus</i> . E : En Danger ; Ex : Extinct ; I : Infréquent ; R : Rare ; V : Vulnérable.....	38
Tableau 4: Les différents types d'espèces classées selon leur étendue géographique, leur spécificité d'habitat et leur taille de populations. Modifié de Pullin, 2002, d'après Rabinowitz. En grisé, le seul moyen pour une espèce d'être commune.	44
Tableau 5 : Liste des iris menacés dans le monde, leurs origines, leurs statuts et les études réalisées sur ces iris.	57
Tableau 6 : L'origine du matériel végétal.....	68
Tableau 7 : Résultats de la taille du génome. Le nombre chromosomique, le nombre de loci ADNr 35S et les données écologiques sont indiqués selon la disponibilité de ces données.....	86
Tableau 8 : Principales données sur les caryotypes des taxa d' <i>Iris</i>	98
Tableau 9: La synthèse des résultats de l'approche cytogénétique moléculaire des taxa d' <i>Iris</i>	101

Listes des figures

Figure 1: L’histoire tectonique du bassin méditerranéen (Magri <i>et al.</i> 2007).....	18
Figure 2: Points-chauds (<i>hotspots</i>) régionaux de biodiversité végétale de la région méditerranéenne (d’après Médail & Quézel 1997, complété).....	21
Figure 3: Le relief du Liban (République Libanaise, Conseil du Développement et de la Reconstruction) et sa topographie (source Jaradi R.).....	23
Figure 4: Carte des précipitations (isohyètes) du Liban (Plassard 1972).....	24
Figure 5 : <i>Iris persica</i> (section <i>Scorpiris</i>).....	29
Figure 6 : Un groupe d’ <i>Iris sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> (section <i>Oncocyclus</i>).....	29
Figure 7 : Le village de Yammouneh, où pousse l’ <i>Iris persica</i>	29
Figure 8 : Le village d’Ehmej, où pousse l’ <i>Iris sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	29
Figure 9 : La barbe de l’ <i>Iris antilibanotica</i>	31
Figure 10 : Morphologie de la fleur d’un <i>Iris lortetii</i>	31
Figure 11 : Le fruit et la graine d’ <i>Iris sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	32
Figure 12 : La distribution géographique du genre <i>Iris</i> (Kohlein 1987) et de la section <i>Oncocyclus</i> (Killens, British Iris Society 1997).	33
Figure 13: Photos des <i>Iris Oncocyclus</i> du Liban	39
Figure 14 : Etablissement du statut de conservation d’un taxon et étapes vers leur conservation (modifié d’après Schemske <i>et al.</i> 1994 & Marrero-Gomez <i>et al.</i> 2003).	65
Figure 15 : Des racines poussant sur un rhizome d’ <i>Iris bismarckiana</i>	80
Figure 16: Un histogramme sur les valeurs 2C des 63 populations différentes des espèces d’ <i>Iris</i>	88
Figure 17: Phylogénie des espèces <i>Oncocyclus</i> (Wilson <i>et al.</i> 2016) tracée sur la carte géographique et montrant la reconstruction de la taille du génome ancestrale (à gauche) avec des images illustrant la diversité du phénotype floral parmi des iris <i>Oncocyclus</i> (à droite). A. <i>I. antilibanotica</i> . B. <i>I. atropurpurea</i> (crédit: Mat Knight & Zachi Evenor). C. <i>I. cedreti</i> . D. <i>I. mariae</i> (crédit: Hedva Sanderovitz). E. <i>I. paradoxa</i> (crédit: CT Johansson). F. <i>I. sari</i> (crédit: Zeynel Cebeci). G. <i>I. sprengeri</i> (crédit: Kohran 1923). H. <i>I. westii</i>	89
Figure 18: Histogrammes obtenus par cytométrie en flux. A. à partir de l’analyse d’ <i>I. korolkovii</i> (16,03 pg / 2C, pic 2) en utilisant <i>Pisum sativum</i> (9,09 pg / 2C, pic 1) en tant qu’étalon. B. à partir du co-traitement d’ <i>I. acutiloba</i> subsp. <i>lineolata</i> (16,73 pg / 2C, pic 1) et <i>I. sprengeri</i> (19,20 pg / 2C, pic 2).....	90
Figure 19: La région ITS et les deux amorces universelles ITS-4 et ITS-5 utilisées.....	91
Figure 20: Les gels électrophorétiques montrant les produits PCR de 66 échantillons.	92
Figure 21: 1. Les séquences des espèces d’ <i>Iris</i> publiées sur NCBI; 2. Les séquences des espèces de champignons endophytes publiées sur NCBI; 3. Nos séquences des espèces d’ <i>Iris</i>	93
Figure 22: La nouvelle amorce utilisée ITS-N1.....	94
Figure 23: Un gel électrophorétique montrant les produits PCR de quelques échantillons.....	94
Figure 24: La phylogénie consensus de 83 séquences des taxa d’ <i>Iris</i> obtenue par l’analyse bayésienne de l’ensemble de données combinées des <i>matK-trnK</i> et <i>trnL-trnF</i> . En haut à gauche : boxplots avec des valeurs variables individuelles pour les espèces, représentant la distribution des valeurs de la taille du génome à travers les sous-genres et les sections du genre <i>Iris</i>	97
Figure 25: A-K: plaques métaphasiques des taxa d’ <i>Iris</i> après FISH à double cible à l’aide de deux sondes d’ADNr 5S (signaux verts) et 35S (signaux rouges). C1 représente la coloration CMA (signaux jaunes). A'- K ': idiogrammes avec emplacement de 5S (vert) et 35S (rouge) gènes d’ARNr. A': <i>I. sofarana</i> subsp.	

<i>sofarana</i> (Falougha), B': <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Hazzerta) C': <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> , D': <i>I. cedreti</i> , E': <i>I. westii</i> , F': <i>I. bismarckiana</i> , G': <i>I. lortetii</i> , H': <i>I. antilibanotica</i> , I' : <i>I. persica</i> , J': <i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i> , K': <i>I. mesopotamica</i> . Barre d'échelle 10 µm.	103
Figure 26 : La période de floraison des <i>Oncocyclus</i> Libanais.	105
Figure 27 : Les résultats du nitrate d'argent des 2 espèces d' <i>Oncocyclus</i> endémiques du Liban, <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Falougha et Hazzerta) et <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> et <i>I. mesopotamica</i> montrant le nombre de nucléoles et son pourcentage (le nombre de nucléoles était mesuré dans 100 cellules de chaque espèce).	106
Figure 28 : Les nucléoles d' <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	107
Figure 29 : Les nucléoles d' <i>I. mesopotamica</i>	107

Liste des abréviations

%	Pourcentage
°C	Degree Celsius
3H, 35S, 125I, 32P	Iodine-125, Phosphore 32, Sulfure 35, Tritium
ACP	Amplification en chaîne par polymérase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNcp	Acide Désoxyribonucléique chloroplastique
ADNr	Acide Désoxyribonucléique Ribosomal
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AgNO ₃	Nitrate d'argent
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i>
ARN	Acide Désoxyribonucléique
ARNr	Acide Désoxyribonucléique Ribosomique
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome: chromosome artificiel bactérien</i>
CDR/ECODIT-IAURIF	Council for Development and Reconstruction/Environment Consultancy Firm-Institut d'aménagement et d'Urbanisme de la Région Ile-de-France
CMA ₃	Chromomycine A3
CV _{CL}	Indice d'asymétrie interchromosomal
CY3	Cyanine 3
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Nucleoside triphosphates containing deoxyribose (deoxyadenosine triphosphate, deoxycytidine triphosphate, deoxyguanosine triphosphate (dGTP), deoxythymidine triphosphate)
Eco RI	<i>Restriction endonuclease enzyme isolated from species E. coli</i>
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization
<i>I.</i>	Genre <i>Iris</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
JC	Jesus Christ
MA	Million d'années
matk	Maturase Kinase
M _{CA}	Indice d'asymétrie intrachromosomal
mg	milligram
min.	minute
mL	milliliter
mM	millimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NOR	<i>Nucleolus Organizer Region</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction : réaction en chaîne par polymérase</i>
pg	Picogramme
pH	Power of Hydrogen
PNUD	Programme des Nations Unies pour le développement
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA : amplification aléatoire d'ADN polymorphe
RBGK	Royal Botanic Gardens, Kew
SC	Species concept
SD	Ecart-type
Spp.	Species
SSC	Standard Saline Citrate
SSCT	Standard Saline Citrate Tween
Subsp.	Subspecies
TBE	Tris, Borate, EDTA
TE-RNase	Tris EDTA Ribonucléase A
<i>trnL</i>	Cloroplast tRNA gene
<i>trnL-F</i>	Cloroplast Noncoding intergenic spacer region
valeur 2C	La quantité d'ADN dans un noyau diploïde
WWF	World Wide Fund for Nature
μ/n/p	micro = 10 ⁻⁶ / nano=10 ⁻⁹ /pico=10 ⁻¹²

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des tableaux.....	7
Listes des figures.....	8
Liste des abbréviations.....	10
Chapitre I : Introduction.....	14
Chapitre II : Généralités.....	17
I- Biodiversité et endémisme dans la région méditerranéenne	17
I-1 Géographie, climat et histoire	18
I-2 Richesse floristique : origines et distribution	20
II. Le Liban et sa flore	22
III. Le genre <i>Iris</i>	27
III.1- Description botanique et classification :.....	27
III.2- Distribution géographique :	28
IV. Section <i>Oncocyclus</i>	30
IV.1- Description botanique :.....	30
IV.2- Distribution géographique	32
IV.3- Taxonomie :.....	34
IV.4- Habitat, climat, saisonnalité et croissance	35
IV.5- Le genre <i>Iris</i> au Liban	36
IV.6- Les <i>iris Oncocyclus</i> du Liban.....	37
IV.7- Les menaces :	40
V. La génétique au service de la conservation.....	42
V.1- Conservation des espèces.....	42
VI. Les iris menacés dans le monde :.....	57
VI.1- La conservation <i>ex situ</i> :.....	61
VI.2- La conservation <i>in situ</i> :	62
VI.3- Conservation des iris au Liban :	64
VII. Objectif de la thèse :	66
Chapitre III: Matériel et Méthodes.....	68
III.1- Matériel végétal	68
III.2- Méthodes	72

III.2.1- Mesure de la taille du génome par cytométrie en flux :.....	72
III.2.2- Amplification de la région ITS et des deux régions chloroplastiques <i>matK</i> et <i>trnL-F</i> :.....	72
III.2.3- Cytogénétique :.....	80
Chapitre IV : Résultats et Discussion	86
1- Taille du génome	86
2- Reconstruction phylogénétique moléculaire.....	91
3- Nombre chromosomique et analyse du caryotype.....	98
4- Cartographie de l'hétérochromatine et des gènes ribosomiques.....	101
5- Résultats de la coloration au nitrate d'argent	106
5- Remarques finales.....	108
Chapitre V : Les perspectives	110
Références:.....	113
Annexe 1 : Solutions utilisées.....	136
Annexe 2 : Le protocole et les produits utilisés pour la préparation de la sonde de l'hybridation <i>in situ</i>	142
Annexe 3: Tépaies scannés des iris <i>Oncocyclus</i> du Liban.....	143
Annexe 4: Les plaques métaphasiques et les caryotypes de 4 espèces d' <i>Iris</i> : A : <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Hazzerta), B : <i>I. mesopotamica</i> , C : <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Falougha), D : <i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	146
Annexe 5 : Les données morphométriques pour chaque caryotype.....	147
Annexe 6 : Les fiches d'information sur des produits utilisés	155
Annexe 7: Evaluation élaborée par la liste rouge de l'IUCN sur le status de l' <i>Iris sofarana</i> Foster au Liban	158
Annexe 8: Article: Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora.....	159
Annexe 9: Article: Unlocking the karyological and cytogenetic diversity of <i>Iris</i> from Lebanon: <i>Oncocyclus</i> section shows a distinctive profile and relative stasis during its continental radiation	160

A plant's name is the key to its literature. Van Steenis (1957)

One of the greatest assets of a sound classification is its predictive value. Mayr (1969)

Chapitre I : Introduction

Notre planète est en pleine crise d'extinction de la biodiversité. Dans la dernière édition de la Liste Rouge Mondiale (version 2015.4), sur les 79837 espèces étudiées, 23250 sont classées menacées d'extinction (IUCN 2016). Les impacts humains du développement, la déforestation, la pollution et les changements climatiques sont en train de détruire les habitats des faunes et des flores dans le monde entier.

Le déclin des espèces commence par des extinctions locales c.à.d elles disparaissent de quelques portions de leurs habitats. A ce stade, leur absence peut affecter les communautés écologiques, mais elles ne seront pas inscrites par l'IUCN ou toute autre autorité jusqu'à ce que l'espèce dans son ensemble devienne menacée.

La connaissance du statut taxonomique des taxons est un prérequis à toute action de conservation des espèces. Donc les plantes doivent être largement acceptées et reconnues par des noms scientifiques qui reflètent leurs positions dans la hiérarchie de la classification.

La préservation de la biodiversité végétale dépend de la taxonomie, parce que les mesures adéquates pour sa conservation ne peuvent être appliquées qu'avec une connaissance approfondie des espèces et de leur écologie.

La flore du bassin Méditerranéen constitue un mélange riche d'espèces à feuilles persistantes et à feuilles caduques adaptées à toute la gamme des climats de la Méditerranée et à l'environnement physique.

Malgré des milliers d'années d'occupation humaine, d'exploitation des terres et de modification continue de la structure de la végétation naturelle et de la composition en plantes, la flore méditerranéenne est toujours l'une des plus riches au monde (Regato 2001).

Le nombre d'espèces endémiques à la Méditerranée est aussi très élevé : 13000 plantes endémiques (la moitié de la flore) poussent dans la région, ce qui en fait la deuxième région la plus riche en plantes à fleurs endémiques dans le monde, derrière les Andes tropicales.

Un des problèmes principaux de la conservation des plantes en Méditerranée est que beaucoup de plantes endémiques ne le sont que sur des habitats petits et isolés et sont considérées comme menacées. La récolte irrationnelle et l'exportation de plantes aromatiques et de bulbes pour des usages cosmétiques, médicaux et ornementaux ont sérieusement endommagé la flore endémique de la Méditerranée (Regato 2001). Environ 5000 espèces de plantes méditerranéennes (17% de la

flore totale), appartenant à 87 familles dans 18 pays, sont classées comme menacées, rares ou vulnérables par l'Union mondiale pour la nature (UICN) et sont inscrites sur la liste rouge des plantes en voie de disparition.

L'Étude de la biodiversité du Liban, mise en œuvre par le Ministère de l'Agriculture a été réalisée en 1996 (Abi Saleh *et al.* 1996) grâce à l'appui financier du Fond Mondial pour l'Environnement (Global Environmental Facility ou GEF), à l'assistance technique du programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) et à l'appui administratif du Programme des Nations Unies pour le Développement (PNUD).

Malgré les affinités que présente la végétation libanaise avec celle du pourtour méditerranéen, sa diversité tient de la rencontre de plusieurs éléments floristico-géographiques sur le territoire libanais. Selon l'étude citée ci-dessus, on compte aujourd'hui 92 espèces endémiques au Liban. Certaines sont abondantes mais d'autres (38) sont rares et menacées de disparition.

L'étude de la biodiversité du Liban s'est basée principalement sur l'ouvrage magistral de Paul Mouterde intitulé « Nouvelle flore du Liban et de la Syrie » (Mouterde 1966), dont la dernière édition est parue à titre posthume en 1983. Cet ouvrage est considéré comme une référence de base pour la connaissance de la flore du Liban et de la Syrie. Or, il y a quarante ans la plaine de la Bekaa, par exemple, était peu cultivée et l'usage des herbicides était quasi-absent. La flore dans la région a donc irrévocablement changé depuis. Par conséquent, une multitude de plantes abondantes à l'époque sont aujourd'hui au bord de l'extinction, tandis que d'autres à répartition jadis limitée se trouvent actuellement sur la liste des espèces envahissantes. Malgré les études faites sur la flore libanaise (Abi Saleh *et al.* 1996, El-Haber & El-Haber 1993, Mouterde 1966, Tohmé & Tohmé 1981), l'actualisation des connaissances sur l'état de la flore au Liban demeure une véritable nécessité.

L'existence d'une douzaine d'espèces d'***Iris* au Liban** dont 4 endémiques strictes, toutes menacées d'extinction, justifie le choix de ce groupe pour prendre urgemment des mesures pour leur conservation.

Cependant, les différents taxons appartenant à ce genre restent difficiles à identifier en se basant uniquement sur les caractères morphologiques. L'identification génétique de ces taxons et l'affinement de leur statut taxinomique devrait permettre l'adoption de meilleures stratégies de conservation.

L'élucidation des rapports phylogénétiques des différents taxons appartenant à ce genre est

essentielle pour comprendre l'histoire évolutive des événements qui sont à la base de l'origine et de la diversification de ce genre.

En conservation, on accorde beaucoup d'importance à la documentation sur la répartition et surtout sur la variabilité génétique à différents niveaux hiérarchiques au sein des espèces (au sein des individus, au sein des populations, parmi les populations et parmi les régions). Une diversité génétique élevée est un gage de survie et de pérennité pour les espèces. Elles seraient théoriquement plus aptes à s'adapter face à des changements environnementaux plus ou moins importants (réchauffement climatique, tolérance à la pollution, ...). Les tests des marqueurs génétiques comprennent une variété de techniques pour analyser ces relations génétiques et le niveau de diversité.

Ce travail de thèse est constitué de cinq chapitres, répartis comme suit :

Le **chapitre I**, présente le contexte général et national de l'étude : la biodiversité et l'endémisme dans la région méditerranéenne, le Liban et sa flore.

Le **chapitre II**, porte sur le genre *Iris* en général, les iris du Liban en particulier et la section *Oncocyclus* dans le monde et au Liban, la génétique au service de la conservation et l'objectif de la thèse.

Le **chapitre III**, présente le matériel végétal et les méthodes utilisées : la cytométrie en flux, les deux techniques FISH et Feulgen et la phylogénie basée sur des marqueurs moléculaires et chloroplastiques.

Le **chapitre IV**, développe les résultats et les discute.

Le **chapitre V**, expose les perspectives de ce travail de thèse. A la lumière de toutes les données obtenues dans le cadre de ce travail, des perspectives dressent le bilan des différents résultats et soulignent l'importance d'une conservation évolutive et biogéographique du genre *Iris*.

Chapitre II : Généralités

I- Biodiversité et endémisme dans la région méditerranéenne

Le bassin méditerranéen abrite une grande diversité d'habitats et d'espèces. Myers *et al.* 2000 a désigné la région comme un point chaud (*hotspot*) de la biodiversité, en raison de sa riche biodiversité végétale et son statut menacé. Ce *hotspot* est une des plus grandes zones de plantes endémiques sur Terre et comprend plusieurs épices de la diversité végétale. Ces facteurs combinés font du bassin méditerranéen le troisième le plus riche *hotspot* dans le monde en termes de biodiversité végétale (Mittermeier *et al.* 2004).

Deux circonstances principales ont contribué à la grande biodiversité et les paysages spectaculaires du *hotspot* : (i) son emplacement à l'intersection de deux continents majeurs, l'Eurasie et l'Afrique et (ii) et la grande diversité topographique et différences d'altitude se situant entre le niveau de la mer et de 4165 mètres à l'ouest (Maroc) et 3756 mètres à l'est (Turquie). Son climat est unique, caractérisé par des hivers frais et humides et des étés chauds et secs. Néanmoins, les précipitations se situent entre 100 millimètres et 3 000 millimètres, ce qui entraîne une haute diversité de végétation dans la région. Les raisons évoquées ci-dessus, collectivement, ont abouti à la diversité et un endémisme végétal exceptionnellement élevé.

Environ 13 000 espèces végétales sont endémiques au *hotspot* ; pourtant, beaucoup d'autres sont découvertes chaque année (Plantlife International 2010, rapport non publié). Les « points-chauds » de biodiversité se caractérisent à la fois par des niveaux exceptionnels de richesse spécifique et d'endémisme et par des niveaux critiques de pertes d'habitats (d'au moins 70%). D'où la nécessité d'intensifier les efforts de recherche et de conservation qui doivent s'articuler actuellement autour des espèces les plus menacées.

Mais l'évaluation de la biodiversité végétale méditerranéenne semble difficile car la correspondance directe entre les frontières biogéographiques et les frontières politiques d'un état n'existent pas. Les niveaux taxonomiques adoptés varient aussi fortement selon que les taxonomistes optent pour une approche limitative ou globale. De plus, certaines évaluations effectuées ne considèrent que l'espèce, alors que d'autres prennent compte des espèces et sous-

espèces, les variétés et les formes douteuses, ce qui rend ardu l'établissement de bilans comparatifs (Médail & Quézel 1997).

I-1 Géographie, climat et histoire

La formation du bassin méditerranéen a débuté avec la convergence des plaques continentales il y a 120 Ma rapprochant l'Afrique de l'Europe. Ce qui a créé les montagnes périméditerranéennes entourant la Méditerranée (Figure 1). Les continents ont atteint l'apparence actuelle durant le Miocène-Pliocène, avec l'orogénèse des Alpes et le changement du niveau de la mer (Meulenkamp & Sissingh 2003).

La crise de salinité du Messinien qui s'est traduite par l'assèchement de la Méditerranée a créé un ensemble de conditions environnementales favorables à certains taxons et défavorables pour d'autres. Dans ce contexte, les îles méditerranéennes auraient joué le rôle de passage dans un environnement défavorable permettant la migration de certains taxons d'une rive à l'autre de la Méditerranée. Cet assèchement s'est brutalement achevé il y a 5,33 Ma (Krijggsman *et al.* 1999), quand la jonction entre l'océan Atlantique et la Méditerranée a été restituée, phénomène connu sous le nom de « Zanclean flood ».

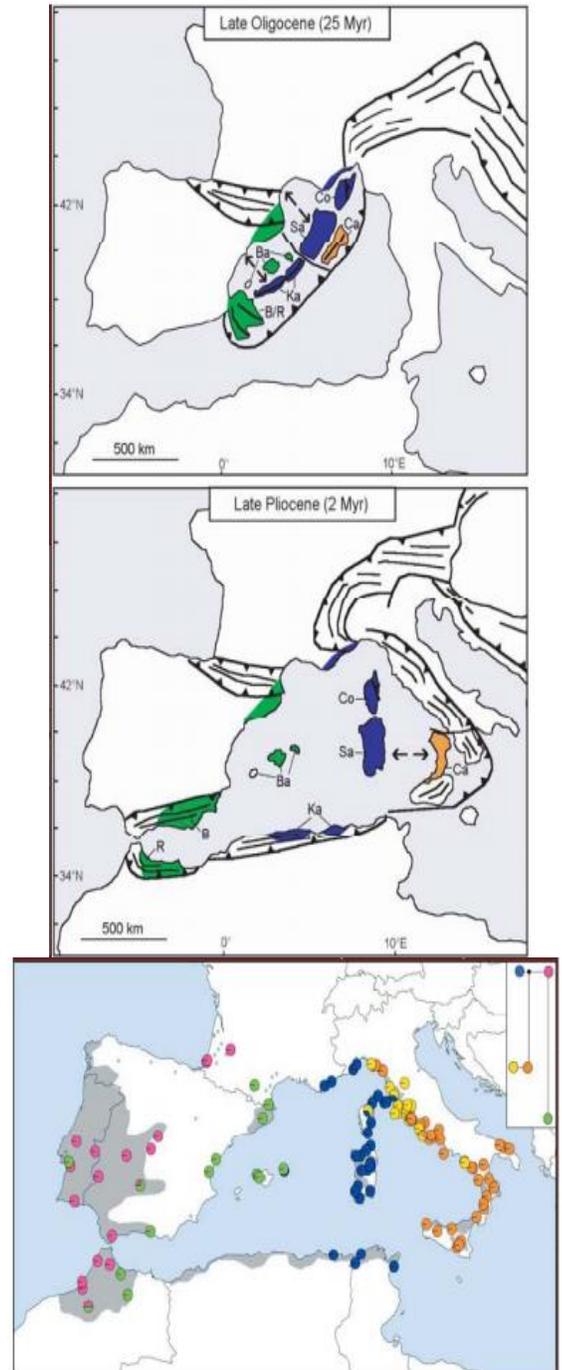


Figure 1: L'histoire tectonique du bassin méditerranéen (Magri *et al.* 2007)

Le bassin méditerranéen couvre 2,085,292 kilomètres carrés. Il s'étend sur 34 pays et territoires de Madère aux Açores à l'ouest jusqu'au nord de l'Irak à l'Est. Il comprend le Nord de l'Italie et de l'extrême sud du Maroc. La majorité de la Péninsule Ibérique et toutes les montagnes de l'Atlas au Maroc sont incluses dans ce *hotspot*. Dans le Sud de la Méditerranée, seules les parties étroites (<200 kilomètres carrés) côtières de l'Algérie, la Tunisie, la Lybie et l'Égypte appartiennent au bassin. Les régions du Moyen-Orient couvrent une grande partie des montagnes du Liban, d'Israël et de la Syrie et s'étendent de loin à l'intérieur que dans le nord Ira. Près de 30% de la Turquie fait partie de ce point chaud. Le *hotspot* s'étend aussi vers les pays des Balkans, couvrant les lacs karstiques et les rivières s'étendant à partir du niveau de la mer jusqu'à 1800 mètres au Mont Dinara.

La gamme altitudinale est énorme avec les montagnes de l'Atlas culminant à plus de 4000 mètres et la mer Morte descendant 420 mètres en dessous du niveau de la mer, le point le plus bas sur Terre. Les deux plus hauts sommets sont les montagnes du Haut Atlas (4165 mètres) au Maroc et Taurus (3756 mètres) en Turquie.

La partie marine du bassin méditerranéen comprend 2,500,000 kilomètres carrés, qui s'étend de 5,5°O à 36°E le long de 4000 kilomètres, et de 30 à 46°N. Le nom de la mer se réfère à *Mediterraneum*, qui signifie « mer au milieu des terres ». Les connexions uniques avec les mers et les océans qui l'entourent sont à travers l'étroit Déroit de Gibraltar (14 km de large et 320 mètres de profondeur) sur l'océan Atlantique, et par le Canal de Dardanelles (encore plus étroite et à seulement 70 mètres de profondeur), sur la mer Noire, ainsi que par l'artificiel canal de Suez avec la mer Rouge depuis 1869 (Hofrichter 2001). Le déroit de Sicile divise la mer en deux bassins principaux - le bassin de la Méditerranée occidentale (avec une plus grande influence de l'Atlantique) et de la Méditerranée orientale - qui restent dans une certaine mesure déconnectés (Cartes & Carrassón 2004).

Le bassin méditerranéen a donné lieu à quelques-unes des plus grandes civilisations de la planète. Les populations humaines denses ont été dispersées à travers le *hotspot* depuis plusieurs millénaires. Bien que le *hotspot* couvre une vaste zone, une grande partie de la végétation dans le bassin a été fortement modifiée par l'habitation humaine. Le bassin de la Méditerranée a le plus

faible pourcentage de végétation restante d'un *hotspot* (environ 5 pour cent). De nombreuses forêts ont été converties à l'agriculture.

Il serait illogique de se concentrer uniquement sur les habitats vierges car il y avait une coévolution significative à travers le *hotspot* avec des habitats semi-transformés contenant de nombreuses espèces rares et taxons menacés. La population actuelle du bassin est plus de 300 millions et elle est en augmentation. Les populations du nord et de l'est du bassin méditerranéen sont relativement stables mais le nombre augmente rapidement en Afrique du Nord, avec environ 160 millions aujourd'hui et probablement 206 millions d'ici 2025 (Derneği 2010).

Malheureusement, moins de 5% de la superficie totale du *hotspot* est sous une certaine forme de protection. Le faible niveau de protection, le niveau extrêmement bas de l'habitat naturel restant, la menace élevée et l'endémisme exceptionnellement élevé rendent le *hotspot* du bassin méditerranéen parmi les "plus chauds" de tous les points chauds de la biodiversité.

I-2 Richesse floristique : origines et distribution

La biodiversité méditerranéenne unique est rassemblée particulièrement dans les zones refuges où des espèces végétales ont pu persister durant les périodes glaciaires-interglaciaires du Pléistocène (Feliner 2014, Médail & Diadema 2006, Médail & Diadema 2009) (Figure 2). Les topographies très hétérogènes de la région méditerranéenne ont permis à beaucoup d'espèces de trouver un habitat convenable lors de changements climatiques (Hewitt 1999, Vogel *et al.* 1999). L'organisation et l'originalité de la biodiversité méditerranéenne actuelle existent grâce aux zones refuges (Petit *et al.* 2003, Tzedakis *et al.* 2002).

Dix zones principales sont des centres de diversité végétale (Médail & Quézel 1997). Elles comprennent environ 44% des endémiques du bassin. Ce sont le Haut et le Moyen Atlas en Afrique du Nord, le Rif Bétique au sud de l'Espagne et deux bandes côtières du Maroc et de l'Algérie, les Alpes Maritimes et Liguriennes à la frontière entre la France et l'Italie, les îles tyrrhéniennes, le sud et le centre de la Grèce, le sud de la Turquie et Chypre, Israël et le Liban, la Cyrénaïque en Libye et les îles de la Macaronésie.

La richesse en espèces du bassin Méditerranéen est souvent attribuée à l'histoire géographique et géologique complexe de cette région du monde. Des barrières géographiques se sont installées puis effacées en réponse aux changements du niveau des eaux et aux variations climatiques, notamment

celles liées aux diverses glaciations du Pléistocène. De telles barrières et changements climatiques drastiques ont été avancés pour expliquer des taux de spéciation et d'endémisme élevés (Médail & Diadema 2009). La flore méditerranéenne est donc le résultat de différenciations locales à partir d'espèces ancestrales, de multiples migrations de végétaux et processus d'hybridation ou d'introgession, répétées au fil du temps.

Selon Blondel *et al.* (2010), les quatre principaux facteurs qui influent sur les populations, les espèces, les habitats et les paysages hétérogènes de la Méditerranée sont biogéographiques, géologiques, historiques et humains.

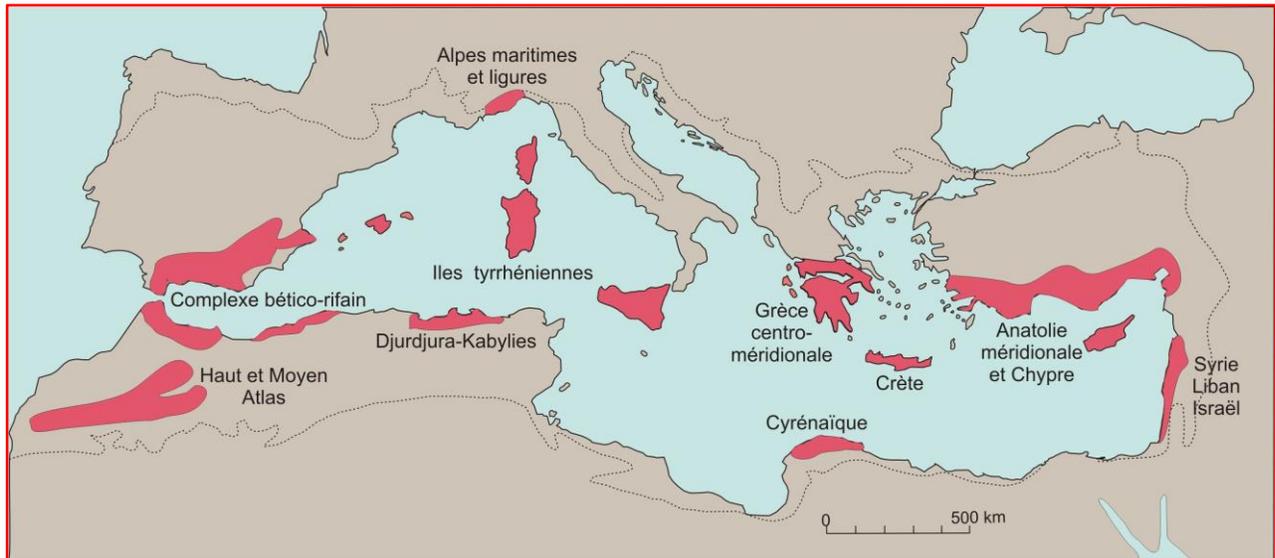


Figure 2: Points-chauds (*hotspots*) régionaux de biodiversité végétale de la région méditerranéenne (d'après Médail & Quézel 1997, complété)

II. Le Liban et sa flore

Le Liban se trouve à l'extrémité orientale du bassin méditerranéen. Il fait partie de la région qui occupe la jonction entre l'Europe, l'Asie et l'Afrique, avec une longueur d'environ 220 km, une largeur de 40 à 70 km et une superficie de 10452 km². La richesse biologique du Liban est intimement liée à la géomorphologie, à différentes influences climatiques régionales et aux microclimats. La géomorphologie couplée à une grande variabilité de sol, pluviométrie et température, a engendré une diversité et une richesse floristique élevées. La présence de hautes montagnes comme le Mont-Liban présente des zones subalpine et alpine est en grande partie responsable du nombre élevé d'espèces endémiques de l'ensemble Liban-Syrie qui, de plus, est localisé à la limite sud de la sphère d'influence euro-sibérienne (Zohary 1973).

Sur le plan de la topographie : (Figure 3).

La région 1 : La zone côtière inclut le littoral et le plateau continental, les plaines côtières et les contreforts du Mont-Liban jusqu'à des altitudes de 250 mètres. Le littoral libanais est d'environ 250 km de longueur (CDR/ECODIT-IAURIF 1997).

La région 2 : La chaîne occidentale ou chaîne du Liban mesure 170 km de long. Elle s'étend tout au long de la côte du Nord-Est au Sud-Ouest délimitant une plaine côtière dont la largeur varie suivant la plus ou moins grande proximité de cette chaîne du littoral. Le Mont-Liban atteint son maximum à 3088 mètres à Kornet es-Saouda dans le nord.

La région 3 : La plaine de la Békaa, est une dépression de terre qui sépare les chaînes du Mont Liban et de l'Anti-Liban. Elle correspond à un couloir fertile 8-12 km de largeur et d'environ 120 km du Nord au Sud. La plaine de Békaa est drainée par le fleuve Aassi au Nord et par le fleuve Litani au Sud.

La région 4 : La chaîne orientale de l'Anti-Liban, elle a comme la chaîne du Mont-Liban, une longueur de 170 km, mais, elle est en général moins élevée que celle-ci. Son sommet le plus important est le Mont Hermon ou Jabal Ach-Chaikh qui a une altitude de 2814 m.

La région 5 : Le Sud-Liban est un plateau élevé qui s'étend sur une courte distance dans les terres des rives occidentales du sud du Liban aux contreforts du Mont Hermon dans l'est. De nombreux cours d'eau saisonniers coulent d'Est en Ouest et se déversent dans la mer Méditerranée traversent cette région.

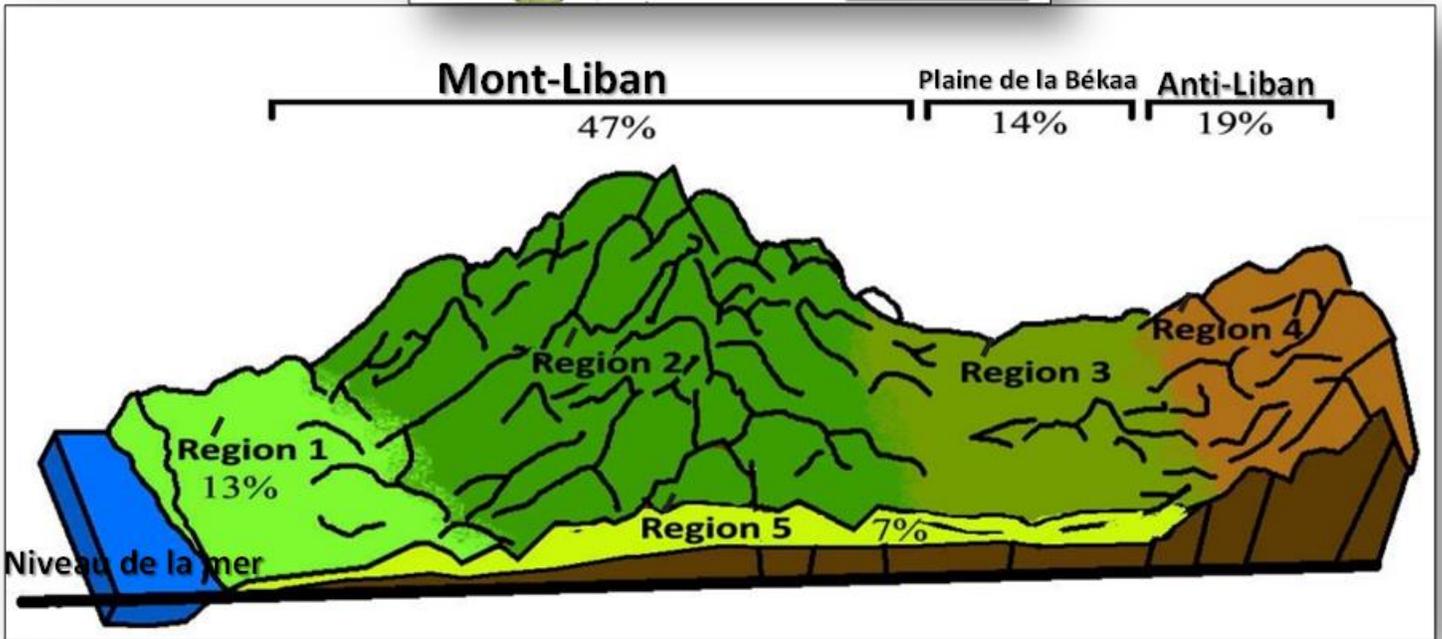
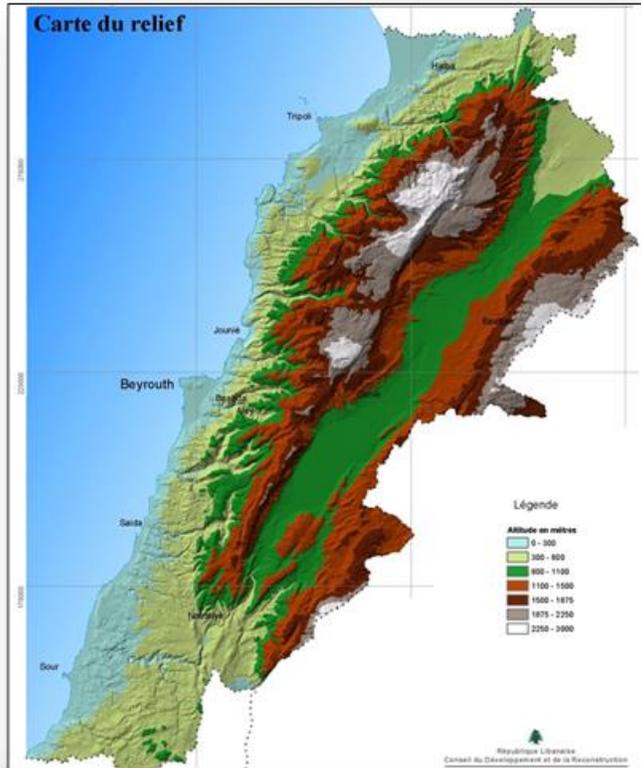


Figure 3: Le relief du Liban (République Libanaise, Conseil du Développement et de la Reconstruction) et sa topographie (source Jaradi R.)

En ce qui concerne le climat, c.à.d. particulièrement la température et la pluviosité, le Liban possède une transition progressive des conditions méditerranéennes aux conditions méditerranéennes continentales et sub-désertiques de l'ouest à l'est avec une pluviométrie moyenne annuelle allant de plus de 1400 mm / an à moins de 200 mm / an (Figure 4). Il est caractérisé par un climat de type méditerranéen avec des étés chauds et secs et des hivers plus courts, pluvieux mais à température modérée par les influences marines, alors que le printemps et l'automne marquent toutefois la transition entre les deux saisons principales. Cependant en raison de l'existence des deux chaînes de montagnes en particulier de la chaîne occidentale, et de la disposition de celles-ci par rapport aux vents dominants, le Liban présente de nombreuses variantes du climat méditerranéen: Le climat méditerranéen humide tout au long de la côte, le climat méditerranéen humide de type montagnard sur les pentes et les sommets, le climat méditerranéen continental est celui de la Békaa et enfin le climat de steppe qui règne sur le nord de la Békaa.

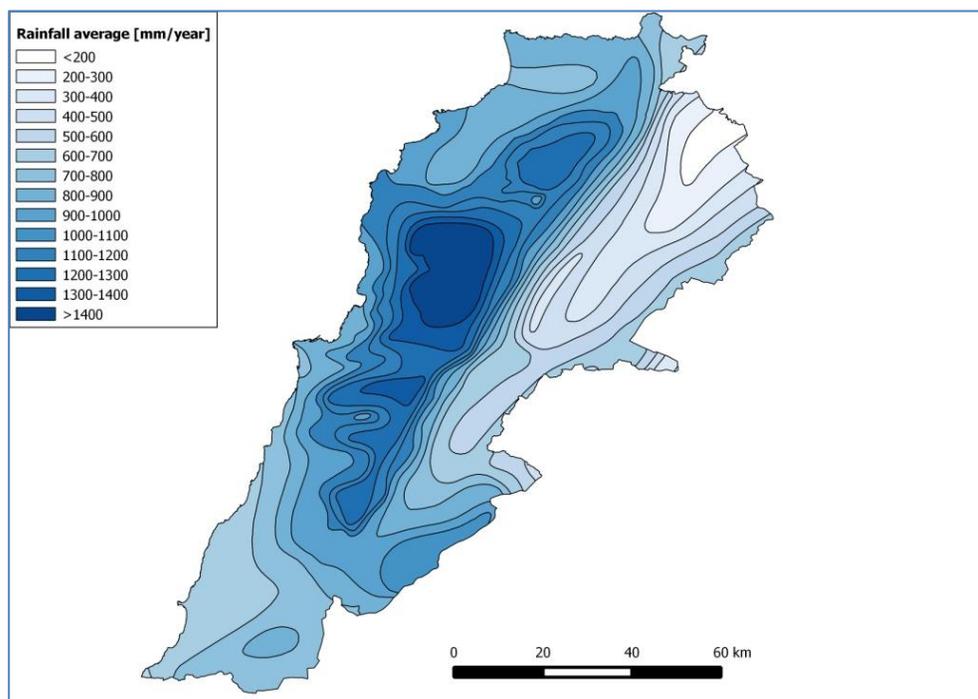


Figure 4: Carte des précipitations (isohyètes) du Liban (Plassard 1972)

L'effet d'isolement caractérisant les hauts sommets des deux chaînes de montagnes (Qamoua, Quornet es Sauda, Ehden, Sanin et le mont Hermon) se prononce sur la zone alpine et constitue un réservoir pour les espèces endémiques (Bou Dagher Kharrat *et al.* 2013). En conséquence, plus de cent espèces spécifiques du Mont Hermon et de la chaîne de l'Anti-Liban ont été comptés (Médail & Quézel 1997). Quelle est l'origine de cet endémisme ?

Les chaînes du Mont-Liban et de l'Anti-Liban sont situées à la limite sud de la sphère d'influence de la zone biogéographique euro-sibérienne (Zohary 1973). Au cours de la période Quaternaire, le refroidissement progressif et la sécheresse du climat ont causé l'extinction de nombreuses espèces. Les plantes méditerranéennes ont persisté pendant cette période dans les refuges glaciaires isolés qui sont reconnus pour être les sources pour une re-colonisation future. De nos jours, de nombreux auteurs stipulent que les montagnes au Liban ont agi comme un refuge et des stations relictuelles pour de nombreuses espèces pendant les périodes de glaciation du Quaternaire (Bou Dagher-Kharrat *et al.* 2007, Douaihy *et al.* 2011, Médail & Diadema 2009, Petit *et al.* 2002, Taberlet *et al.* 1998).

Cet endémisme significatif est expliqué par la situation de la région sur les frontières de diverses influences biogéographiques, par la diversité géomorphologique et topographique et l'effet de l'isolement des grandes chaînes de montagnes qui abritent une grande variété de niches écologiques sur de courtes distances.

Le Liban occupe 0,007% de la surface terrestre du monde, mais abrite 1,11% des espèces végétales (Tohmé & Tohmé 2007). Il abrite environ 2600 espèces de plantes terrestres. 8,5% d'entre elles sont endémiques (endémique du Liban, de la Syrie et de la Palestine) et 3,5% sont strictement endémiques du Liban. Par rapport à sa taille, le Liban possède l'une des plus fortes densités de diversité florale dans le bassin méditerranéen, qui à son tour est l'une des régions les plus biologiquement diverses dans le monde (Médail & Quézel 1997). De même, la végétation du Liban a un rapport espèces/surface exceptionnellement élevé de 0,25 espèces par km², comparativement à un ratio de 0,0081 par km² pour l'Afrique du Sud, 0,0044 pour le Brésil, 0,0021 pour l'Egypte, 0,022 pour la Jordanie, 0,015 pour l'Espagne, 0,017 pour la Syrie et 0,011 pour la Turquie. La diversité de la faune du Liban est également élevée par rapport à la superficie du pays en comparaison avec les pays voisins (0,028 espèces / km² pour le Liban ; 0,019 pour la Syrie, et 0,017 pour la Libye, et 0,46 pour la Jordanie).

Quarante neuf pour cent du nombre total d'espèces végétales qui vivent au Liban (1279 espèces) sont spécifiques aux pays du Moyen-Orient (Tohmé & Tohmé 2014). D'autres taxons sont cosmopolites et se trouvent en Europe, Afrique du Nord, le bassin méditerranéen et en Asie centrale, etc. Selon Tohmé & Tohmé (2014), 804 plantes sont endémiques à la région méditerranéenne, 108 sont strictement endémiques au Liban, 154 sont endémiques au Liban et en Syrie, 104 sont endémiques au Liban, en Syrie et en Turquie, 59 sont endémiques au Liban, en Syrie et en Palestine, 29 sont endémiques au Liban et en Turquie et 21 sont endémiques au Liban et à la Palestine. La plupart de ces plantes endémiques occupent les sommets du Mont-Liban. Ils appartiennent à 25 familles différentes: Apiaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cistaceae, Crassulaceae, Cyperaceae, Dipsacaceae, Ericaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Iridaceae, Liliaceae, Lamiaceae, Linaceae, Malvaceae, Orobanchaceae, Papaveraceae, Primulaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Violaceae. Plus de 40% de la flore endémique du Liban est estimé comme rare et / ou menacée (Khouzami *et al.* 1996). Une nouvelle évaluation en se concentrant sur les espèces endémiques selon les critères de l'UICN est en cours. Cela devrait contribuer à la définition des priorités afin de conserver cette riche flore.

Le Liban est intégré principalement dans la région méditerranéenne, mais des portions du territoire présentent une affinité irano-touranienne (*Citrus*, *Haplophyllum*, *Artemisia*, *Astragalus*, ...) ou saharo-Sindienne (*Capparis*, ...), et parfois dans le Nord, certaines enclaves de flore mésophile avec affinité mi-européenne (*Fagus*, *Tilia*, *Sorbus*, *Acer*, ...). Il y a aussi des phytochories plus complexes où les espèces, appelées "de liaison" sont distribuées dans deux régions biogéographiques.

Selon le travail d'Abi Saleh (1978), les montagnes méditerranéennes du Liban dans leurs aspects vers la mer peuvent être différenciées selon l'altitude dans les zones Thermo-Méditerranéenne, Eu-méditerranéenne, Supra-Méditerranéenne, Montagneux Méditerranéenne et Oro-Méditerranéenne. L'ensemble pré-steppe méditerranéen est également représenté de 1000 m sur les pentes du Mont-Liban et du nord de l'Anti-Liban.

III. Le genre *Iris*

Les iris ont de belles fleurs qui ont fasciné les botanistes, les horticulteurs et les amateurs depuis les temps anciens. L'admiration portée à ce genre est très ancienne, de nombreux documents anciens ont fait référence aux iris (L'Égypte ancienne, la Perse, la Bible et les livres sur les plantes médicinales écrits par Dioscoride au 6^{ème} siècle).

Les iris ont une immense importance médicinale, dans le traitement du cancer (antiproliférative des cellules cancéreuses), l'inflammation et les infections bactériennes et virales (Nadkarni 1967). Les rhizomes des espèces d'*Iris* sont aussi utilisés dans l'assaisonnement, et dans la fabrication des dentifrices et de certains parfums (Naves *et al.* 1947, Schinz *et al.* 1947).

Plus de 300 espèces d'*Iris* sont connues ; sans prendre en compte toutes les sous-espèces, les variétés, les hybrides naturels et les cultivars (De Munk & Schipper 1993).

III.1- Description botanique et classification :

Le genre *Iris* L. comprend environ 280 espèces réparties dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord avec quatre espèces en Afrique du Nord. Les *Iris* sont des plantes monocotylédones géophytes, dont les fleurs sont à symétrie tertiaire, avec trois tépales externes (les labelles) plus ou moins dilatés, et trois tépales internes (les étendards) généralement dressés. Les *Iris* ont généralement des feuilles volubiles basales unifaciales et un périanthe coloré fusionné distalement à la base d'un tube avec trois sépales horizontaux et trois pétales dressés. Le gynécée contribue également à la fleur de l'iris colorée avec des branches du style qui sont fusionnés à la base et un pétaloïde distalement allant au-delà du petit stigmate transverse comme une crête bifide. Les étamines sont insérées à la base des labelles. Le style présente des branches dilatées, pétaloïdes et bifides (Mouterde 1966).

La classification des taxons du genre *Iris* est une tâche difficile à cause du nombre et de la diversité des espèces, du grand nombre de formes ou de diversité morphologique et des hybrides naturels.

La classification retenue ici est la plus récente (Tableau 1), elle correspond à la classification de la *British Iris Society* (1997) et compte 6 sous-genres et 8 sections.

La classification subgénérique actuelle par Mathew (1989) est en grande partie basée sur le travail de Dykes (1913), Lawrence (1953) et Taylor (1976) et met l'accent sur des caractères tels que la barbe des sépales et / ou crêtes, élaïosomes de graines (cf. paragraphe IV- Section *Oncocyclus*), et le type de l'organe de stockage souterrain.

Tableau 1: Classification du genre *Iris* (British Iris Society 1997)

Genre	Sous-genre	Section
<i>Iris</i> L.	<i>Iris</i> L.	<i>Iris</i> L.
		<i>Psammiris</i> (Spach) J. Taylor
		<i>Oncocyclus</i> (Siemssen) Baker
		<i>Regelia</i> Lynch
		<i>Hexapogon</i> (Bunge) Baker
		<i>Pseudoregelia</i> Dykes
	<i>Limniris</i> Tausch	<i>Limniris</i> Tausch
		<i>Lophiris</i> (Tausch) Tausch
	<i>Nepalensis</i> (Dykes)	
	<i>Xiphium</i> (Miller) Spach	
	<i>Scorpiris</i> Spach	
	<i>Hermodactyloides</i> Spach	

Les arils sont les espèces barbues des terres semi-arides du Moyen-Orient et de l'Asie centrale, ils comprennent les sections *Oncocyclus* et *Regelia*. Les « Arils » sont nommés ainsi car les graines ont un «élaïosome» : un appendice blanc ou crème à l'une des deux extrémités (cf. paragraphe IV- Section *Oncocyclus*).

III.2- Distribution géographique :

D'un point de vue géographique, le genre *Iris* se retrouve à travers les zones tempérées et tropicales de l'hémisphère Nord. Les iris « sans barbe » (apogons) sont les plus répandus (Figure 5) alors que les iris barbues (eupogons) (Figure 6) sont localisés sur une zone plus limitée (du sud de l'Europe à l'Asie du Sud-Ouest, jusqu'au Cachemire à l'est et jusqu'à la péninsule arabique au Sud) (De Munk & Schipper 1993, Köhlein 1987).

Presque toutes les espèces se trouvent dans les zones tempérées et tropicales de l'hémisphère Nord, dans des régions sèches, semi-désertiques, ou dans les zones montagneuses rocheuses les plus froides (Figures 7 et 8), (Kamenetsky 2012) et dans d'autres habitats comme les pentes herbeuses, les prairies, les tourbières et les berges.



Figure 5 : *Iris persica* (section *Scorpiris*)



Figure 6 : Un groupe d'*Iris sofarana* subsp. *kasruwana* (section *Oncocyclus*)



Figure 7 : Le village de Yammouneh, où pousse l'*Iris persica*.



Figure 8 : Le village d'Ehmej, où pousse l'*Iris sofarana* subsp. *kasruwana*

On s'est intéressé à étudier la section *Oncocyclus* car c'est une section assez diversifiée comprenant un grand nombre de taxons endémiques stricts, répandus sur un petit territoire, dans des habitats difficiles d'accès dans le Sud-Ouest de l'Asie. Ving neuf espèces appartenant à la section *Oncocyclus* sont menacées d'extinction (Walter & Gillet 1998). Rassembler des données sur cette section de nature génétique, taxonomique et phylogénétiques ne peut être qu'appréciable pour la suavegarde de ces espèces qui représente en même temps un très bon modèle pour étudier l'évolution de ses espèces.

IV. Section *Oncocyclus*

IV.1- Description botanique :

Oncocyclus est un mot grec, avec « *onco* » la masse, et « *cyclus* » le cercle, cette nomenclature fait référence à l'unique tache sombre sur les labelles des fleurs des iris *Oncocyclus*. D'un point de vue botanique, les espèces *Oncocyclus* étant caractérisées par une tige simple et uniflore. Les fleurs sont grandes et portent sur chaque labelle une barbe de poils (trichomes), ainsi une tache «onco» sombre signal à l'entrée du tunnel de la pollinisation et un élaïosome sur les semences appelé « élaïosome » (Avishai 1977, Avishai & Zohary 1980, Dykes 1913, Rix 1997) (Figure 9). Les labelles et les étendards contiennent à la fois des pigments jaunes et pourpres, le jaune prévalant surtout dans les barbes mais pouvant parfois dominer toute la fleur (Mathew 1989, Saad & Khuri 2003). La plupart des *Oncocycles* ont des fleurs pourpres uniformément colorées, ou présentant un réseau de veines et de points sur un fond plus pâle. Les étendards sont très développés, de même teinte ou plus clairs que les labelles (Mouterde 1966). Les tépales externes ont un onglet peu rétréci, couvert de poils ou de pubescence occupant généralement toute sa largeur. Les tépales internes sont toujours larges, très développés, tantôt de même teinte, tantôt de teinte plus claire que les tépales externes (Figure 10 et Annexe 3). Le fruit est une capsule allongée. Les graines présentent un élaïosome blanchâtre, souvent aussi large que la graine elle-même, qui joue probablement un rôle dans la dispersion des diaspores par les fourmis (Figure 11). Ces iris se caractérisent aussi par un rhizome épais, compact et généralement court, ainsi que par une croissance clonale assez lente (Köhlein 1987, Mathew 1989, Mouterde 1966).



Figure 9 : La barbe de l'*Iris antilibanotica*

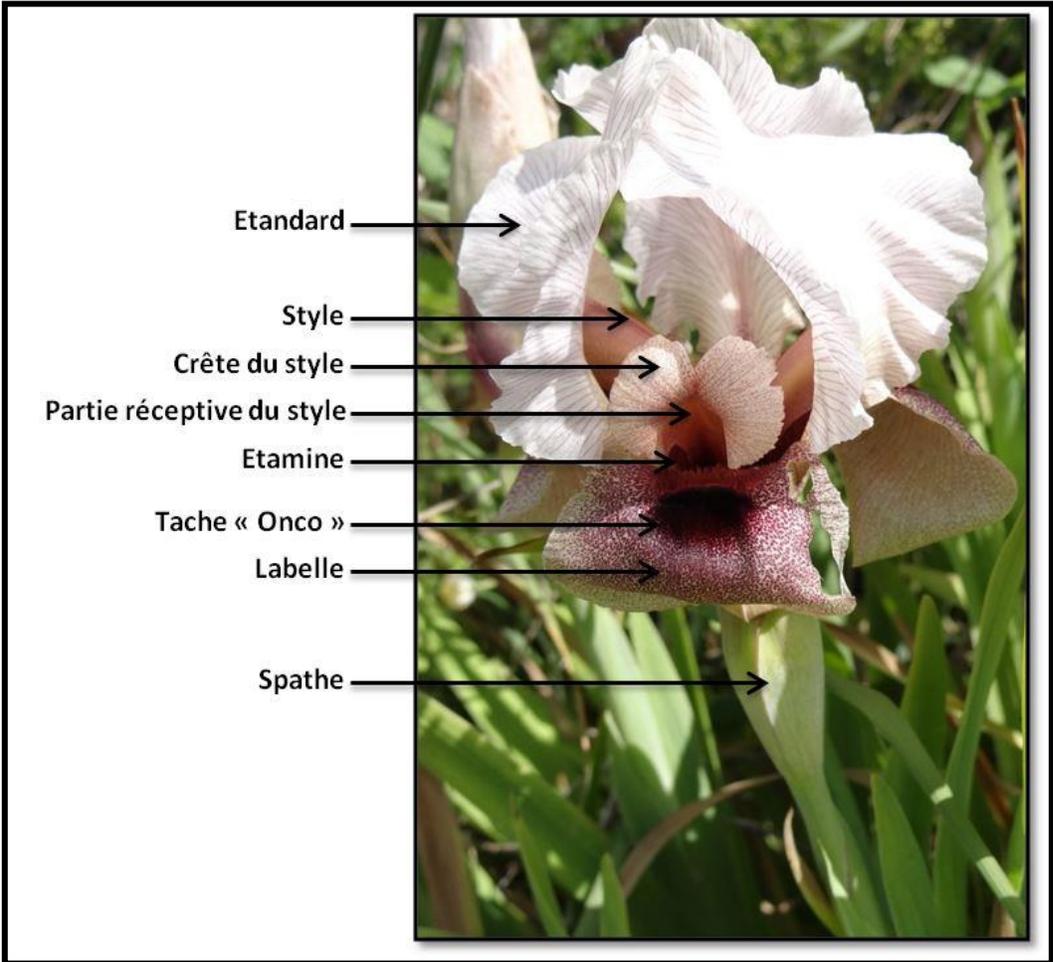


Figure 10 : Morphologie de la fleur d'un *Iris lortetii*

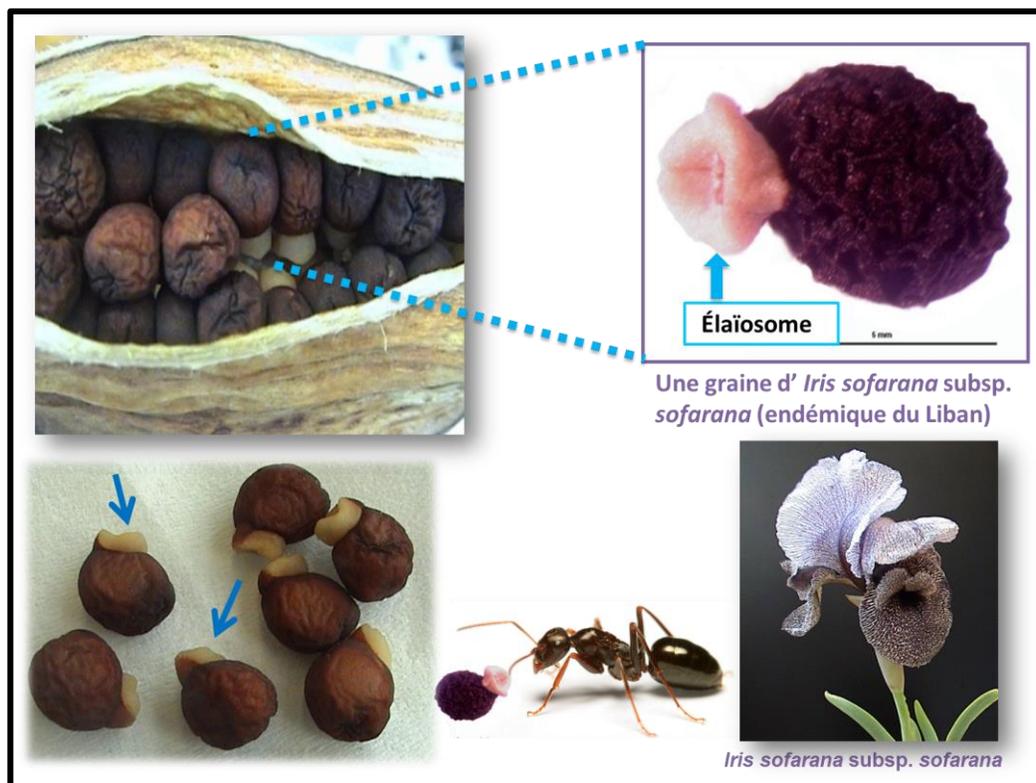


Figure 11 : Le fruit et la graine d'*Iris sofarana* subsp. *sofarana*

IV.2- Distribution géographique

Les iris *Oncocyclus* caractérisés par de grandes fleurs voyantes sont originaires du Moyen-Orient et de la Transcaucasie (Figure 12). La majorité des espèces de ce groupe sont endémiques strictes, qui poussent en petites populations ou sont dispersées localement à travers des collines rocheuses, des steppes et des déserts, du Nord de la région de Caucase vers le Sud jusqu'à l'Iran, à l'Ouest, jusqu'au l'Est de la Turquie, et au Sud, jusqu'au Sud de la Turquie (Wilson *et al.* 2016).

Sept des agrégats (*Susiana*, *Iberica*, *Acutiloba*, *Paradoxa*, *Lorteti*, *Maculata*, *Haynei*) ont été décrits dans la section *Oncocyclus* sur la base de la morphologie florale, la couleur de la fleur et

la micromorphologie des poils à l'entrée du tube ou tunnel de pollinisation et nommés selon la première espèce découverte de chaque agrégat (Avishai & Zohary 1980).

La section *Oncocyclus* (Siemss.) Baker appartient au sous-genre *Iris*.

Elle fait partie du groupe des *eupogons* ou «*Iris* barbus». Ces derniers ont une distribution beaucoup plus restreinte que les *Iris* « sans barbe » (*apogons*), qui se retrouvent dans la quasi-totalité de l'hémisphère Nord (Köhlein 1987) (Figure 12).

Les *Oncocycles* les plus anciens semblent venir des régions du sud-ouest de la mer Caspienne, les espèces du Levant étant des types plus récents (Davis 1946). Une carte de répartition des iris de la section *Oncocyclus* est présentée dans la figure 12.

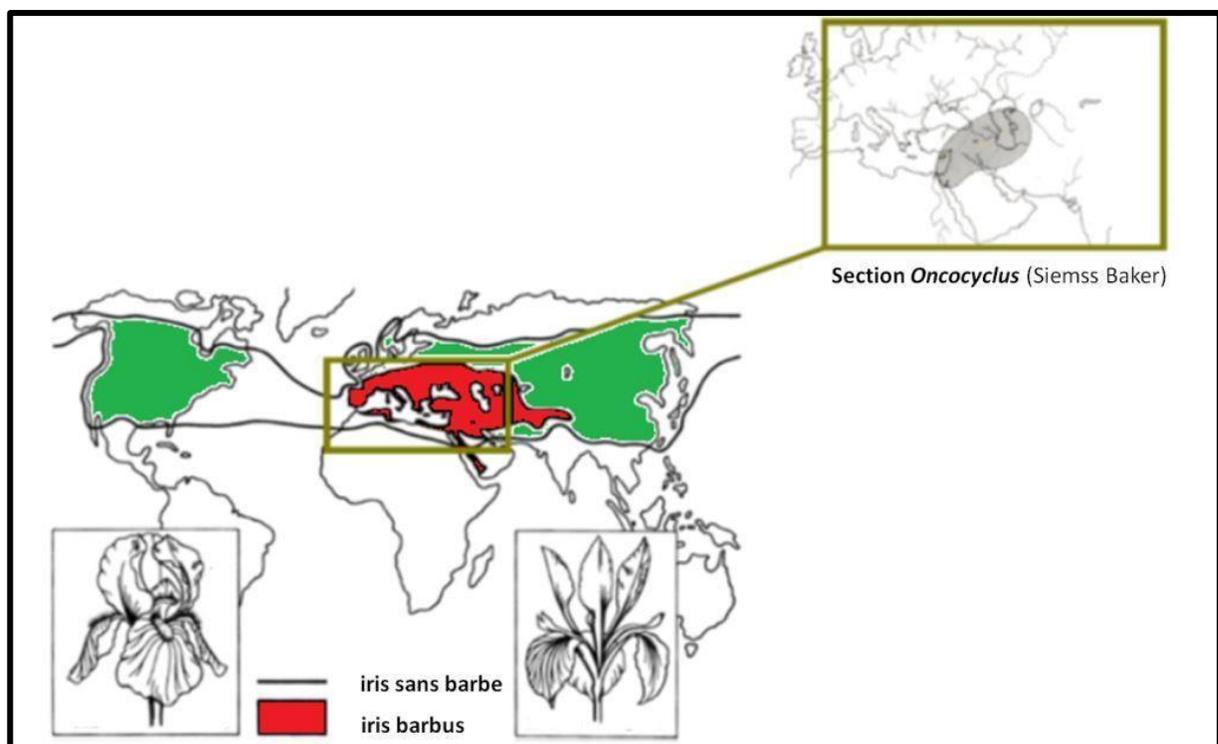


Figure 12 : La distribution géographique du genre *Iris* (Köhlein 1987) et de la section *Oncocyclus* (Killens, British Iris Society 1997).

IV.3- Taxonomie :

Les formes des iris très diversifiées d'une région à une autre, proviennent vraisemblablement d'une parenté commune peu ancienne. Elles ne sont séparées les unes des autres que par des caractères mineurs de taille, de forme des feuilles, de couleur, ce qui, logiquement, permettrait de les rattacher toutes à une seule espèce collective, soit *Iris susiana* L. (Saad & Khuri 2003), le représentant du groupe dans l'horticulture dès les siècles passés, soit *Iris sari* Schott, une des premières formes spontanées décrites.

En réalisant un herbier, les fleurs perdent leurs caractéristiques de couleur dès le début du séchage. Il arrive aussi que les noms donnés par des botanistes du siècle passé soient devenus obsolètes. Le spécialiste qui les étudiait avait en vue un iris mis en culture quelque part en Europe, de provenance orientale mal précisée. Ces cultures une fois déperies, seule la description parfois trop succincte en garde le souvenir, ce qui fait que la conservation en herbier d'un spécimen-type est elle-même décevante. Les technologies modernes nous offrent de nouvelles solutions, comme la photocopie, qui nous permet de conserver intacte la silhouette des échantillons et le scan qui apporte la couleur des fleurs. L'indication capitale, irremplaçable, est celle des sites. Ce qui les définit est en effet la zone où chacune d'entre elles, depuis la potentielle dislocation de l'espèce primitive, a pris ses caractéristiques actuelles.

Au niveau de la nomenclature et de la systématique, la section *Oncocyclus* est sans doute la plus compliquée du genre *Iris* (Köhlein 1987). Les travaux d'Avishai & Zohary (1980) montrent d'ailleurs que les différentes espèces de cette section, dont le nombre de chromosomes est constant ($2n = 20$), ne sont isolées que par des barrières géographiques, écologiques et saisonnières d'une part, et par les préférences des pollinisateurs d'autres part. Ils ont en effet montré que les croisements, entre la plupart des espèces reconnues dans cette section, donnent lieu à des hybrides viables et fertiles.

Il semble en fait qu'il existe un grand nombre de formes locales, plus ou moins isolées des autres, auquel on a souvent donné des noms spécifiques (*Iris sofarana* f. *franjieh*, *Iris sofarana* f. *westii*...). De même, des hybrides naturels ont souvent été considérés, à tort, comme des espèces (Saad & Khuri 2003) (comme *I. schelkownikowii* Fomin., *I. grossheimii* Woron. ...). C'est sans doute la raison pour laquelle les révisions taxonomiques de ce groupe ne font que réduire le nombre d'espèces.

Sur les 60 espèces décrites par Avishai en 1977, Mathew n'en cite plus que 41 en 1989, et Rix (1997) réduit ce nombre à 32 en en considérant 9 comme des hybrides naturels. Notons que la plupart des auteurs reconnaissent des « agrégats d'espèces » au sein de la section, sans un véritable statut taxonomique (Avishai & Zohary 1980, Köhlein 1887, Rix 1997, Sapir *et al.* 2003).

IV.4- Habitat, climat, saisonnalité et croissance

Seules des généralités peuvent être évoquées concernant l'écologie de cette section, vu sa diversité et le peu d'études qui en ont été faites (Köhlein 1987, Saad & Khuri 2003).

Les données écologiques associées à des spécimens d'herbier sont limitées, avec seulement 4-8% y compris les données concernant l'altitude, l'habitat et / ou le type de sol, ce qui est typique pour les spécimens d'herbier (Dulloo *et al.* 1999). Il n'existe pas d'exigences spécifiques de l'habitat, à l'exception d'un bon drainage du sol, traduit par la présence des iris sur des pentes rocailleuses avec une exposition sud. Les iris colonisent différents types de sols et aucune différence de sol n'a été trouvée entre les zones hébergeant l'iris par rapport aux zones où ils étaient absents (Saad 2006). Cependant, il existe des exemples d'adaptation des *Oncocyclus* à des types de sol spécifiques, tels que l'*Iris basaltica* (West 1963), qui pousse sur le basalte. Une telle spécificité n'est pas repérée dans la section *Oncocyclus* au Liban, où ils semblent se développer seulement à haute altitude, mais aussi dans les zones adjacentes en Jordanie et en Israël, certaines espèces poussent jusqu'au niveau de la mer comme *I. atropurpurea* et *I. jordana* qui se retrouve même dans des régions sous le niveau de la mer (près du Le lac de Tibériade, mer de Galilée) (Rix 1997).

Dans les habitats / biotopes où on les trouve, les iris sont présents parmi des « formations herbacées ouvertes » et de « steppes ouvertes avec plantes éparses » (Avishai 1977, Avishai & Zohary 1980). Ces formations végétales se trouvent dans les zones semi-arides, et dans les aires de transition avec le désert. Des *Oncocycles* se retrouvent aussi sur les arêtes montagnardes, notamment au Liban, ainsi que sur les hauteurs du Golan (Saad & Khuri 2003, Sapir *et al.* 2003).

Dans leur aire d'origine, les Oncocycles sont soumis à un climat méditerranéen sec. Ils subissent donc des étés chauds et secs, des hivers relativement froids et secs, et des printemps parfois humides (Köhlein 1987, Rix 1997).

Beaucoup d'espèces passent l'hiver sous un manteau de neige, et sont alors dans un état de dormance plus ou moins profond. Les espèces les plus méridionales ne sont pas recouvertes de neige, mais l'air froid et sec ralentit fortement leur croissance jusqu'au début du printemps. Donc, même au sud d'Israël, la floraison n'a pas lieu avant mars ou avril. Dans les montagnes ou plus au nord, la floraison a lieu de mai à juin, après la fonte des neiges (Saad 2003). En été, les Oncocycles entrent dans une longue période de dormance. La croissance racinaire, et parfois un début de croissance foliaire, commencent en automne avec les premières pluies, quand le sol est encore suffisamment chaud. Cette croissance sera ralentie par les basses températures hivernales, et sera très réduite jusqu'au printemps suivant (Mathew 1989).

IV.5- Le genre *Iris* au Liban

Le nombre exact des taxons d'*Iris* indigènes au Liban est difficile à définir, car la taxonomie des *Iris* dans la région souffre d'un manque de données, des études phylogénétiques et une ambiguïté taxonomique. Selon Mouterde (1966), 14 espèces d'*Iris* sont indigènes du Liban. Cependant, ce travail a besoin d'une mise à jour (Tableau 2), d'où l'importance de notre étude génétique qui aide à lever l'ambiguïté qui règne sur la taxonomie des iris libanais.

Tableau 2 : Les *Iris* du Liban

Sous-genre	Section	Taxon	Distribution
<i>Iris</i>	<i>Oncocyclus</i> (Siemssen) Baker	<i>Iris antilibanotica</i> Dinsm.	Liban, Syrie
		<i>Iris bismarckiana</i> Damman & Sprenger	Liban, Syrie, Israël
		<i>Iris cedreti</i> Dinsm.	Liban
		<i>Iris sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> Foster	Liban
		<i>Iris sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> Dinsm.	Liban
		<i>Iris lortetii</i> Barbey ex Boiss.	Liban
	<i>Iris</i> (Lawrence) Mathew	<i>Iris westii</i> Dinsm.	Liban
		<i>Iris mesopotamica</i> Dykes	Région Méditerranéenne
	<i>Iris albicans</i> Lange.	Cosmopolite	
<i>Hermodactyloides</i>	<i>Hermodactyloides</i> Spach	<i>Iris histrio</i> Reichenb.	Région Méditerranéenne
<i>Scorpiris</i>	<i>Scorpiris</i> Spach	<i>Iris palaestina</i> Baker	Liban, Israël
		<i>Iris persica</i> L.	Liban, Syrie
<i>Limniris</i>	<i>Limniris</i> Series <i>Laevigatae</i> (Diels) Lawrence	<i>Iris pseudacorus</i> L.	Cosmopolite
	<i>Limniris</i> Series <i>Unguicularis</i> (Diels) Lawrence	<i>Iris unguicularis</i> Poiret <i>cretensis</i> Dinsm.	Région Méditerranéenne

IV.6- Les iris *Oncocyclus* du Liban

Les iris *Oncocyclus* du Liban comprennent sept taxons, dont quatre strictement endémiques (Figure 13 et Tableau 2). On trouve ces derniers sur le Mont-Liban, à des altitudes élevées de 1300 m à 2000 m. Ces iris ont des distributions distinctes et limitées, sans connexion (Mouterde 1966, Köhlein 1987, Mathew 1989, Rix 1997, Saad & Khuri 2003).

Selon les auteurs, le statut taxonomique de ces taxons varie : si le statut d'espèce d'*I. cedreti* n'a jamais été contesté et que ses diverses descriptions concordent, il n'en est pas de même pour *I. westii* et *I. sofarana* subsp. *kasruwana*, qui oscillent entre le statut d'espèce et de sous-espèce d'*I. sofarana* (Saad & Khuri 2003).

Quoiqu'il en soit, la dernière classification IUCN (1997) (Walter & Gillet 1998) des *Oncocyclus* endémiques du Liban qui date de 1997 montre à quel point il est urgent de protéger ces iris (Tableau 3). Dans le cadre de la présente étude, les deux espèces *I. antilibanotica* et *I. westii* reportées comme éteintes (ex) ont été retrouvées. Il est à noter que dans le cadre d'un projet financé par le Critical Ecosystem Partnership Fund, notre laboratoire mène actuellement les investigations nécessaires pour mettre à jour le statut de conservation IUCN des ces iris. Le statut d'*Iris sofarana* est déjà publié (Bou Dagher *et al.* 2016) (Annexe 7).

Les Oncocycles libanais sont menacés, à plus ou moins court terme, par l'urbanisation grandissante de certaines zones du Mont-Liban, par l'herbivorie, l'utilisation pour l'agriculture de terres autrefois « incultes » et la cueillette, etc.

Les populations originales, autrefois très denses, ont été considérablement réduites au cours des cent dernières années à cause des différentes menaces citées ci-dessus et parce qu'il n'y a aucune loi au Liban qui protège ces espèces.

La connaissance de la biologie, la biogéographie et la taxonomie des espèces endémiques avance progressivement (Mousavi *et al.* 2016, Pacifici *et al.* 2015). De plus, l'écologie de la pollinisation de ces taxons est largement connue (Monty *et al.* 2006), ce qui pourrait favoriser l'élaboration d'une stratégie de conservation optimale. La connaissance du système de pollinisation, et des espèces animales associées, peut fournir des informations cruciales sur les facteurs limitant la reproduction, ainsi que les variations génétiques, tant spatiales que temporelles (Kearns *et al.* 1998, Larson & Barrett 1998, Velterop 2000, Wesselingh & Arnold 2000).

Tableau 3 : La classification IUCN (International Union for the Conservation of Nature, 1997) des *Oncocyclus*. E : En Danger ; Ex : Extinct ; I : Infréquent ; R : Rare ; V : Vulnérable.

Noms	Pays	Status IUCN 1997
<i>Iris antilibanotica</i> Dinsm.	Syrie	Ex
<i>Iris cedreti</i> Dinsm.	Liban	E
<i>Iris lortetti</i> Barbey	Israël- Liban	E-I
<i>Iris sofarana</i> Foster	Liban	E
<i>Iris westii</i> Dinsm.	Liban (Mashghara-Jezzine)	Ex

Figure 13: Photos des *Iris Oncocyclus* du Liban



Iris antilibanotica
blanc



Iris antilibanotica
mauve



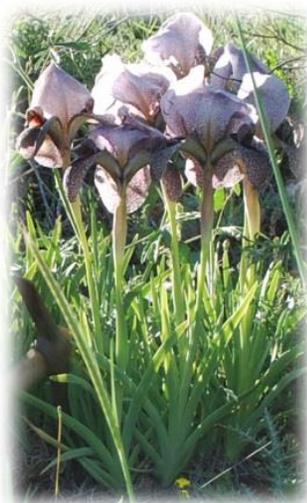
Iris bismarckiana



Iris lortetii



Iris cedreti



Iris sofarana subsp.
sofarana (Hazzerta)



Iris sofarana subsp.
sofarana
(Falougha)



Iris sofarana subsp.
Kasruwana (Ehmej)



Iris sofarana subsp.
kasruwana
(Hammana)



Iris westii

IV.7- Les menaces :

La cueillette de la fleur et la collection de plantes entières sont probablement les premières causes de la pression humaine sur les populations sauvages des *Oncocyclus*. La première mention de la culture des *Oncocyclus* date du 4^{ème} siècle avant JC quand le Pharaon égyptien Tutmosis III a introduit ces plantes après son expédition en Asie (Archibald 1999). Au début du Vingtième Siècle, les rhizomes ont été fortement prélevés en Turquie et au Moyen-Orient pour être vendus en Europe de l'Ouest (Archibald 1999).

Actuellement, on assiste à une prise de conscience de la nécessité de préserver les iris *Oncocyclus* dans plusieurs pays. En Jordanie, par exemple, l'iris noir (*Iris nigricans*) est l'emblème national du pays et les iris dits « Royaux » sont devenus le symbole de la protection de la nature en Israël. Certains taxons d'iris sont protégés en Turquie (*I. sprengeri*) et en Arménie (*I. paradoxa*) (Archibald 1999, Gazit-Ginsburg 1974, Shmida *et al.* 2002, Tan *et al.* 2003).

Les herbiers fournissent souvent des informations précieuses sur la répartition historique des espèces d'*Iris* au Liban. Ainsi, ces herbiers comprennent 58% des informations historiques et sont représentatifs de 66% des populations existantes des iris *Oncocyclus*. Cependant, la localisation des populations est mieux documentée dans la littérature que dans les herbiers. Le travail sur le terrain réalisé par Saad *et al.* (2009) indique un déclin des populations des iris *Oncocyclus*, avec deux populations apparemment disparues et deux qui peuvent avoir disparu sur les 12 historiquement rapportées, et ils n'ont pas pu localiser des nouvelles populations.

Au Liban, la principale menace pour les populations d'*Iris* est la perte d'habitat due à l'expansion des stations des sports d'hiver et les infrastructures telles que les nouveaux bâtiments et les réseaux routiers. L'activité humaine conduit ainsi à la fragmentation de l'habitat convenable. En conséquence, les populations d'iris *Oncocyclus* libanais sont fragmentées et représentent les vestiges de populations historiques plus grandes ou étendues. Les conséquences de la fragmentation sont la réduction du nombre des individus d'une population et du flux génétique entre les populations (Dudash & Fenster 2000) et l'efficacité de la pollinisation (Duncan *et al.* 2004). La petite taille des populations résiduelles les rend plus enclins à une

stochasticité démographique, environnementale et génétique (Fischer & Matthies 1998, Lande 1998, Oostermeijer *et al.* 2003). Le pâturage par les chèvres et les moutons domestiques est une autre menace pour les iris *Oncochilus* lorsque les gousses sont vertes et charnues (Saad *et al.* 2009) bien que Arafah *et al.* (2002) ont rapporté un pâturage sur toutes les parties de la plante.

V. La génétique au service de la conservation

V.1- Conservation des espèces

La réaction des scientifiques face à la crise d'extinction des espèces s'est manifestée vers la fin des années 1960 sous la forme d'une discipline hybride : la biologie de la conservation. Son but est d'associer science et gestion pour le maintien de la diversité du vivant sur la planète (Soulé 1986). C'est donc une discipline de crise fondée sur les principes de l'écologie, mais aussi de l'anthropologie, de l'économie, de la sociologie, etc. Cette discipline a obtenu graduellement le corpus théorique et prédictif d'une discipline scientifique propre mais elle se définit aussi comme une science de l'action. Elle est basée principalement sur l'analyse des processus de maintien de la biodiversité, à différents niveaux spatio-temporels et a comme but de présenter des éléments concrets pour la gestion conservatoire et durable des espèces et des milieux.

La conservation peut être considérée à différents niveaux (population, méta-population, communauté, écosystème et du paysage), mais le but commun est l'espèce. La population est un groupe d'individus de la même espèce et la métapopulation est l'ensemble des populations qui sont liées par des phénomènes de migration. Les études sur les communautés portent sur un ensemble d'espèces. La préservation d'un écosystème, consiste à protéger sa richesse mais aussi à maintenir les relations fonctionnelles entre ces espèces. Le paysage est l'ensemble de communautés d'espèces. Il est une zone de plusieurs kilomètres carrés, et se distingue par une combinaison caractéristique des écosystèmes interactifs.

V.1.1- L'espèce et la population : des concepts théoriques et pragmatiques

Plusieurs définitions sur le concept d'espèce ont été fournies (concept biologique, concept évolutionniste, concept phylogénétique). Nous adoptons comme définition celle de l'espèce biologique de Mayr (1982). L'espèce biologique est une communauté d'êtres vivants réellement ou potentiellement interféconds et produisant des descendants eux-mêmes interféconds. Ainsi, les différentes espèces sont isolées reproductivement et présentent une destinée évolutive indépendante qui est propre à chacune. Dans certains groupes de plantes (Fougères, Orchidées) où les phénomènes d'hybridation sont courants, cette définition n'est pas toujours adéquate.

La plupart des travaux de conservation sont focalisées sur l'espèce car c'est une unité de mesure de la biodiversité plus pratique que l'écosystème ou les gènes. De plus, l'IUCN

(Union Internationale pour la Conservation de la Nature et Ressources naturelles) et de nombreux pays utilisent l'espèce comme base de leur législation. En pratique, l'espèce reste l'outil privilégié de la conservation à travers le monde car c'est une unité légale, généralement facile à identifier et plus évocatrice pour le public.

Etudier une espèce exige de joindre les différents ensembles de sa population et dans ce contexte, la notion de population est aussi un outil réaliste pour les gestionnaires. La population peut être définie comme un groupe d'individus de même espèce présentant une ségrégation spatiale, génétique et démographique avec d'autres groupes. La ségrégation spatiale est la disjonction géographique des deux populations. Sur le plan génétique, les individus d'une population ont des caractéristiques génétiques communs qui ne sont pas partagées par les individus d'une autre population. Sur le plan démographique, les individus d'une population partageant des caractéristiques démographiques communes qui diffèrent des autres caractéristiques démographiques des populations. Il peut toutefois exister des flux d'individus ou de gènes entre populations qui peuvent avoir un rôle fondamental en terme de conservation. La migration peut permettre de sauver certaines populations en déclin.

La population représente donc un objet d'étude primordial en biologie de la conservation. Les plus petites populations présentent plus de risques d'extinction que les grandes, car le hasard intervient au niveau génétique, démographique et environnemental (Caughley 1994). La notion de taille, minimum de population viable (MVP : minimum viable population) a constitué l'un des premiers indicateurs de la viabilité d'une population (Boyce 1992, Nunnery & Campbell 1993, Soulé 1986). Tout en focalisant la conservation sur l'espèce et la population, il est souvent essentiel de s'intéresser aussi à des échelles supérieures à celles de la population ou de la métapopulation. Dans les notions d'espèce clef de voûte, d'espèce emblématique et d'espèce parapluie (Simberloff 1998), la conservation d'une unique espèce est justifiable d'autant plus qu'elle favorise la conservation d'autres espèces, à l'échelle d'un type d'habitat, d'une communauté ou d'un écosystème. L'espèce parapluie est une espèce dont la restauration de l'habitat peut contribuer automatiquement à la conservation d'autres espèces. Toutefois, une des critiques à ce type d'approche est que les mesures de conservation prises dans le cadre de la conservation d'une unique espèce, qu'elle soit emblématique, clef de voûte ou parapluie pourront être néfastes à d'autres espèces.

V.1.2- Les cibles de la conservation

Rareté et menaces

Un reproche plus général à la conservation d'une unique espèce est l'amalgame qui peut exister entre la rareté d'une espèce et son caractère menacé. L'étude de la rareté a pour but de comprendre ce qui réduit l'abondance et la distribution d'une espèce rare. C'est pourquoi, des espèces taxonomiquement proches mais à distributions différentes peuvent être comparées pour déterminer des caractéristiques biologiques à la rareté (Lavergne *et al.* 2004). Néanmoins, les cibles prioritaires de la conservation sont les espèces en déclin et menacées, qu'elles soient rares ou communes. Le nombre important d'espèces rares et le manque de connaissances sur ces espèces mènent généralement à les considérer comme menacées. Toutefois, une espèce rare n'est pas forcément menacée. Il existe différents types de rareté liées aux propriétés essentielles des espèces et qui peuvent être classés en se basant sur trois critères : l'étendue géographique, la spécificité de l'habitat et la taille des populations (Rabinowitz 1981, Pullin 2002, Tableau 4).

Tableau 4: Les différents types d'espèces classées selon leur étendue géographique, leur spécificité d'habitat et leur taille de populations. Modifié de Pullin, 2002, d'après Rabinowitz. En grisé, le seul moyen pour une espèce d'être commune.

Etendue géographique	Espèce à grande aire de répartition		Espèce à petite aire de répartition	
	Habitat peu spécifique	Habitat très spécifique	Habitat peu spécifique	Habitat très spécifique
Spécificité de l'habitat				
Taille des populations élevées	Localement abondante avec une grande aire de répartition et dans plusieurs habitats	Localement abondante avec une grande aire de répartition dans un habitat spécifique	Localement abondante dans plusieurs habitats avec une aire de répartition réduite	Localement abondante dans un habitat spécifique avec une aire de répartition réduite

Taille des populations faibles	Localement réduite avec une grande aire de répartition et dans plusieurs habitats	Localement réduite avec une grande aire de répartition dans un habitat spécifique	Localement réduite dans plusieurs habitats avec une aire de répartition réduite	Localement réduite dans un habitat spécifique avec une aire de répartition réduite
--------------------------------	---	---	---	--

L'endémisme est une des manifestations de la rareté. C'est un caractère propre à une unité systématique dont l'aire de répartition est bien délimitée et réduite dans le monde (dernière colonne du Tableau 4).

Il faut distinguer entre la rareté liée aux propriétés intrinsèques d'une espèce et aux changements environnementaux naturels, d'une rareté liée et/ou causée par les activités humaines. Certaines espèces sont naturellement rares et subsistent ainsi sur de très longues périodes. Dans les cas où la rareté est accrue par les activités humaines, les menaces qui pèsent sur une espèce peuvent être facilement identifiées sur le terrain et l'établissement rapide des mesures de conservation devient possible. C'est le cas d'un déclin des populations causé par un pâturage, des incendies, l'assèchement d'une zone humide, ou encore à un aménagement touristique proche des populations. Dans ces cas, il est souvent facile de remédier au déclin des populations en minimisant les menaces ou en restaurant l'habitat. Néanmoins, si l'arrêt des nuisances ou la réhabilitation de l'habitat ne mènent pas à restaurer des populations viables, des études plus avancées deviennent indispensables. Donc pour pouvoir remédier au déclin des populations, il faut tout d'abord identifier ses mécanismes. Du point de vue de la conservation, c'est la nature et le degré de menaces qui ont causé la rareté qui font d'une espèce rare une cible pour la conservation (critères IUCN). Un des défis importants de la biologie de la conservation est de promouvoir l'évaluation des menaces qui pèsent sur une espèce et d'utiliser les connaissances scientifiques pour l'application pratique de la conservation.

V.1.3- Les moyens de la conservation

a- Identification

La taxonomie est la science qui a pour objectif de décrire les organismes vivants et de les regrouper en taxons pour les identifier puis les nommer. La taxonomie complète la systématique qui est la science qui organise le classement des taxons et leurs relations. De plus, les taxonomistes ont également participé à la connaissance de l'histoire naturelle des espèces, ce qui aide les études de biologistes et autres spécialistes de l'environnement. La taxonomie contribue aussi à la reconnaissance et la caractérisation de la biodiversité, et la conservation des espèces (Janzen 1993, Mace 2004). Il existait jusqu'à 2002 environ 6000 taxonomistes dans le monde, et cette science reste l'une des moins reconnues et des plus sous-financées malgré son importance (Wilson 2002).

L'identification de nouvelles espèces végétales est toujours aussi pertinente aujourd'hui que la découverte de nouveaux gènes et de nouvelles fonctions des gènes, et est cruciale pour les efforts de conservation dans les pays en développement. Des nombres énormes d'espèces végétales attendent toujours une description formelle. Les compétences nécessaires pour répondre à ce défi et leur capacité à attirer des financements ne devraient pas être rejetées. La communauté botanique est en passe de combler rapidement les lacunes entre le travail de l'herbier et la métagénomique, malgré la diminution des fonds (Kemler 2015). Un bon endroit pour commencer la relance de l'intérêt pour une éducation botanique, et donc renforcer cette communauté, serait d'inclure des espèces végétales impressionnantes dans des programmes télévisés sur la nature, plutôt que sur la mégafaune charismatique (Trias-Blasi & Vorontsova 2015).

b- Etude écologique

Etude écogéographique

Une étude écogéographique est le processus de collecte des données écogéographiques. Elle est définie comme «une collecte d'informations écologiques, géographiques, taxonomiques et génétiques et processus de synthèse, où les résultats sont prédictifs et peuvent être utilisés pour aider à la formulation des priorités de conservation et de collection » (Castañeda-Álvarez *et al.* 2011, Maxted 1995). Elle est généralement basée sur la collecte d'informations à partir des spécimens d'herbier, les obtentions des banques de gènes, des bases de données, de la littérature, et toutes les autres sources de données possibles et, si possible, doivent être complétées par la collecte de nouvelles données si le taxon est mal connu. Elle constitue une étape clé pour le développement de stratégies pour la conservation des ressources phytogénétiques. Un petit nombre d'études écogéographiques ont été menées au Liban et elles ont ciblé surtout certaines espèces cultivées (Ferguson *et al.* 1998, Maxted 1995, Talhouk *et al.* 2001).

Analyse démographique

La première étape de l'élaboration de programmes de restauration ou renforcement d'espèces menacées exige des connaissances sur la démographie (Miller & Duncan 2003, Pavlik *et al.* 1993). En plus de la description et l'explication du comportement populationnel des plantes, les études démographiques doivent constituer une double avenue pour étudier les phénomènes à deux niveaux d'organisation: au niveau individuel (ou sous-populationnel) et au niveau de la communauté (ou supra-populationnel). Les études démographiques à long terme peuvent être utilisées pour repérer et interpréter la variabilité au niveau individuel concernant ces composantes de la forme darwinienne individuelle telles que la survie différentielle, la croissance et la fécondité (Sarukhán *et al.* 1984). L'étude démographique est une des approches les plus indispensables pour l'évaluation de la viabilité des populations chez les plantes menacées (Lande 1988, Schemske *et al.* 1994). Des études démographiques détaillées peuvent montrer des stades critiques du cycle de vie et permettre des prédictions sur l'avenir du développement des populations (Menges 1992). Ces connaissances sont essentielles aux efforts de conservation des plantes rares et menacées (Fiedler *et al.* 1998, Nordbakken *et al.* 2004). Néanmoins, ces analyses sont longues, en particulier chez les espèces vivaces et sont généralement difficiles à mener face à des menaces à court terme.

Caractérisation des habitats

L'habitat est une zone avec la combinaison de ressources nécessaires (par exemple, la nourriture, la couverture, l'eau) et les conditions environnementales (la température, les précipitations, la présence ou l'absence de prédateurs et des concurrents) qui favorise l'occupation par des individus d'une espèce donnée (ou d'une population) et permet à ces individus de survivre et de se reproduire (Johnson & O'Neil 2001). Il comprend l'interaction entre les sols, l'hydrologie, la végétation et le climat. Un habitat fournit les fonctions et processus écologiques nécessaires pour préserver les communautés biologiques qui y vivent pour la totalité ou une partie de leur cycle de vie. La description de l'habitat d'une espèce menacée est très importante pour l'étude des populations à un niveau plus fin. En fait, l'hétérogénéité des microhabitats agit sur le succès reproducteur d'une espèce en affectant la taille des individus, la compétition, les pollinisateurs, la phénologie, la taille de la population et/ou la structure génétique (Albert *et al.* 2001).

c- Reproduction et dispersion

La connaissance de la reproduction est essentielle à notre compréhension des causes de la rareté et de la conservation des taxons de végétaux rares (Ayensu 1981, Drury 1974, 1980; Harper 1979, Kruckeberg & Rabinowitz 1985). Les plantes herbacées vivaces qui ne se reproduisent pas végétativement dépendent des graines pour introduire de nouveaux individus dans les populations. Les fleurs doivent donc être pollinisées pour former les fruits, les ovules doivent être fécondés, soutenues avec des nutriments, et d'échapper à la prédation pour former des graines viables. Les graines doivent être dispersées à des substrats convenables pour la croissance, où elles doivent germer. Tout lien faible ou rupture de cette chaîne d'événements limite la capacité de la plante de se reproduire et, si constant sur l'espace et le temps, peut contribuer à la rareté d'une espèce et à entraver sa conservation. La connaissance du mode de reproduction, des pollinisateurs et des vecteurs de dispersion est nécessaire pour développer une méthode de gestion efficace. L'analyse de la dispersion peut également contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans la rareté et la vulnérabilité d'une espèce (Olivieri & Vitalis 2001). L'analyse du succès reproducteur est essentielle pour prédire l'avenir des espèces végétales en déclin. L'étude de la biologie de la reproduction des plantes rares s'avère donc très importante pour leur conservation (Kruckeberg & Rabinowitz

1985). Beaucoup de chercheurs ont étudié les composantes simples ou combinées de l'écologie de la reproduction des plantes rares, telles que la fréquence de la floraison et la reproduction végétative (Morely 1982), la pollinisation (Deyrup & Menges 1997, Karron 1987, Macior 1978), le système de reproduction (Planisek 1983, Karron 1989), la prédation des graines (Gisler & Meinke 1997), la germination des graines (Baskin & Baskin 1979 ;1997, Baskin & Quarterman 1969, Clark *et al.* 1997, Florance 1997, Halse 1988, Jacobs 1993), le système d'élevage et la germination (Clampitt 1987, Menges 1995), et la production de semences et la prédation (Menges *et al.* 1986). Cependant, peu d'études de plantes rares décrivent les limites de la reproduction, à tous les stades à partir de la production de fleurs, par la dispersion de semences susceptibles de germer (Massey & Whitson 1980, mais voir Crowder 1978, Pavlik *et al.* 1993).

d- Génétique moléculaire au service de la conservation

Les programmes pour les espèces en danger dans le monde (par exemple, l'IUCN) identifient et protègent des espèces, sous-espèces et des populations menacées et en voie de disparition. Bien que ces désignations peuvent être controversées dans une perspective évolutive, elles peuvent «favoriser ou empêcher» le rétablissement des espèces ou des groupes spécifiques vu que les ressources attribuées à leur rétablissement sont souvent prioritaires en fonction de leur statut taxonomique (voir Ball & Avise 1992, O'Brien & Mayr 1991, Ryder 1986). Inversement, la reconnaissance qu'une espèce, sous-espèce, ou une population ne se distingue pas des taxons étroitement liés non menacés, permettra l'utilisation des ressources pour des besoins plus critiques.

Les études morphologiques ne sont pas suffisantes pour expliquer les relations systématiques entre les espèces. Il est devenu indispensable d'utiliser des marqueurs moléculaires pour résoudre les problèmes taxonomiques et évolutifs. Le progrès dans les domaines de la biologie moléculaire et de la technologie génétique, surtout les technologies de séquençage d'ADN, est devenu très utile pour une détermination rapide et précise des relations phylogénétiques (Catalán *et al.* 1997, Saarela *et al.* 2007).

Récemment, les espaceurs transcrits internes (ITS) du 18S ribosomique 26S-5.8S-cistron sont devenus la région cible la plus utilisée dans le génome nucléaire pour les études sur l'évolution des groupes de plantes diverses (Baldwin *et al.* 1995, Álvarez & Wendel 2003, Hughes *et al.* 2006). Les quatre principales raisons de cette utilisation généralisée selon (Baldwin *et al.* 1995) sont :

La disponibilité de plusieurs ensembles d'amorces de PCR universelles qui fonctionnent avec une grande diversité de groupes taxonomiques (Gardes & Bruns 1993, White *et al.* 1990),

La structure multicopie facilite l'amplification de la PCR même des spécimens d'herbier,

La taille modérée de l'ITS (< 700 pb) permet généralement l'amplification et le séquençage sans amorces internes même si elles sont remarquablement longues exceptions dans plusieurs groupes de gymnospermes (Gernandt *et al.* 2001).

A cause de leurs niveaux de variation, les ITS fournissent souvent des marqueurs moléculaires assez convenables pour les études évolutives au niveau de l'espèce. Il s'agit surtout des sujets tels que l'origine de taxons polyploïdes, l'hybridation, l'introgession et, surtout, l'inférence phylogénétique (divergence de séquence jusqu'à 40% dans les comparaisons paires entre les taxons congénères signalés dans les premières études (Zimmer *et al.* 1980).

Il existe aussi d'autres avantages des séquences ITS qui sont leur héritage biparental par rapport à l'héritage uniparental de l'ADN des organites, et l'uniformité intragénomique assumée à cause de la homogénéisation active des copies de répétition au sein et entre loci qui se produisent dans ces régions multicopies, dite évolution concertée (Arnheim 1983, Zimmer *et al.* 1980). D'autre part, chez les hybrides et les introgressants dans lesquels l'évolution concertée n'a pas des copies homogénéisées, les ITS peuvent contribuer à l'identification des progéniteurs ou lignages impliqués (Sang *et al.* 1995).

L'intron *trnL* (UAA) et l'espaceur intergénique entre l'exon *trnL* (UAA) 3' et le gène *trnF* (GAA) semblent être bien adaptés pour déduire la phylogénie entre les taxons étroitement liés: (i) ADNcp double brin peut être facilement amplifié pour une large gamme taxonomique des espèces végétales, et (ii) la taille de ces régions non codantes est assez petite pour nous permettre d'obtenir toute la séquence en utilisant seules les amorces d'amplification. Avec l'utilisation de ces régions, il est maintenant possible d'étendre l'utilisation de l'ADNcp et essayer de résoudre les relations phylogénétiques au niveau intragénérique si nécessaire en liaison avec d'autres régions de la molécule, par exemple, une région codante comme *matK* (Gielly & Taberlet 1994).

Un grand nombre d'études sur la conservation ont montré comment les outils moléculaires peuvent être utilisés pour traiter les problèmes spécifiques de conservation. Les études qui ont utilisé plusieurs techniques moléculaires pour aborder les questions liées ont fourni une évaluation plus précise que celles qui ont utilisé une seule technique. Les techniques moléculaires fournissent également un aperçu du rôle des individus dans une population, les relations entre les populations et les différences entre les espèces. La plus grande compréhension des informations moléculaires se produit, cependant, quand elles sont utilisées en conjonction avec des données écologiques, démographiques, comportementaux, et les données physiologiques collectées sur le terrain.

e- La cytogénétique

La cytogénétique est un outil important dans l'évaluation de la biodiversité. La caractérisation de la biodiversité est essentielle pour la conservation, et à ce titre la cytogénétique peut apporter des informations précieuses sur le nombre chromosomique, sur le caryotype, le niveau de ploïdie ou sur la taille du génome. Chester *et al.* (2010) ont déjà prévu que les méthodes cytogénétiques utilisées dans l'amélioration des plantes et dans l'étude de la biodiversité seront nécessaires dans un avenir proche.

Les espèces peuvent être identifiées au moyen de caractères diagnostiques à différents niveaux de l'organisme / organisation du génome (Ráb *et al.* 2006). La variation génétique est une caractéristique fondamentale de la plupart des biotes. Récemment, des progrès dans les technologies génétiques ont permis des enquêtes profondes de la variation génétique entre des groupes vivants distincts ou même des groupes éteints. Ces méthodes ont permis l'exploration de diverses questions liées à la biodiversité et sa conservation. Parmi ces approches, des études cytogénétiques ont révélé être un outil utile dans plusieurs cas, en identifiant les caractéristiques chromosomiques du génome d'une espèce. En effet, dans certaines situations, des changements dans le nombre et la structure de chromosomes ont été corrélés avec un certain nombre de nouvelles caractéristiques morphologiques et environnementaux conduisant à la divergence et l'adaptation (Hoffmann & Rieseberg 2008). Par rapport à divers autres marqueurs génétiques, la cytogénétique peut révéler un ensemble de caractères, qui ne sont pas accessibles par d'autres méthodes et ainsi explorer un autre niveau de composante génétique de la biodiversité.

Pendant de nombreuses années, les méthodes classiques de caryotypage ont été utilisées pour déterminer le nombre de chromosomes et leur morphologie ainsi que la présence de systèmes de chromosomes sexuels différenciés morphologiquement chez de nombreuses espèces animales et végétales. Cette approche a contribué de manière significative à la connaissance actuelle de la diversité et / ou la stabilité chromosomique parmi beaucoup de taxons distincts. L'avènement des techniques de banding chromosomiques (c-à-d C-, G-, R-, Q- et H-banding et colorations aux AgNOR₃, DAPI et CMA₃) utilisées pour la différenciation des régions spécifiques le long des chromosomes, a pu démontrer de nombreux changements importants au niveau du caryotype des espèces étudiées. L'utilisation combinée récente des études cytogénétiques, génétiques et moléculaires raffinées nous a aidés à comprendre le lien entre

l'organisation génomique et la biologie fonctionnelle, l'adaptation des espèces et la survie de l'espèce, et ainsi a commencé une nouvelle ère de la génomique et de la phylogénomique évolutives. Des avancées majeures dans la cytogénétique ont été soulevées dans les deux dernières décennies, avec l'application de détection *in situ* de séquences d'ADN sur les chromosomes, parties de chromosomes ou de l'ADN génomique tout entier. Les techniques des hybridations *in situ* les plus anciennes, réalisées dans les années 1960, utilisaient des sondes radioactives marquées avec des radio-isotopes (par exemple, ³H, ³⁵S, ¹²⁵I et ³²P). Depuis le début des années 1980, les sondes ont commencé à être marquées avec des molécules non radioactives. Bien que plusieurs méthodes basées sur des réactions enzymatiques en utilisant la phosphatase alcaline, la bêta-galactosidase ou la peroxydase de raifort étaient disponibles, la méthode la plus couramment utilisée dans les années suivantes a été basée sur l'utilisation d'éléments fluorescents; par conséquent, la technique a été nommée Fluorescence *In Situ* Hybridation ou FISH (Pinkel *et al.* 1986).

Une des applications les plus importantes de la technique FISH a été son utilisation dans la cartographie physique de séquences d'ADN sur les chromosomes. Son développement a conduit à l'avancement des études chromosomiques, non seulement pour les analyses de cartographie et génomiques physiques, mais aussi comme un outil pour les études évolutives et phylogénétiques. Avec la technique de FISH, il est possible de cartographier l'emplacement des séquences d'ADN sur les chromosomes des espèces proches pour montrer non seulement leur conservation probable mais aussi leur diversification lors des processus évolutifs. Ainsi, l'avènement de FISH a permis le passage de la «cytogénétique classique» (noir et blanc) à la "cytogénétique moléculaire" (couleur) et la combinaison avec les données génomiques récemment à l'ère phylogénomique, ce qui a permis l'intégration de l'information moléculaire de séquences d'ADN avec son emplacement physique le long des chromosomes et des génomes (Schwarzacher 2003).

La caractérisation simple du caryotype chez certaines espèces peut être suffisante pour identifier les variantes intra et inter-cytotype et de caractériser les espèces. Cependant, dans la plupart des cas, juste les descriptions de caryotype semblent être concluantes lorsqu'elles ne sont pas couplées avec d'autres méthodes capables de générer des marqueurs chromosomiques plus précises pour la cytotaxonomie ou les applications phylogénétiques. En partie, cela découle de l'incapacité à discerner ni les mécanismes impliqués dans l'évolution du caryotype de certains groupes (homologies par rapport aux convergences) ni la

genèse de nouvelles structures chromosomiques. Dans certains groupes, le caryotype et les aspects cytogénétiques associées à la structure chromosomique, identifiés par des techniques cytogénétiques conventionnelles, montrent un grand nombre d'espèces partageant le même motif caryotypique, ce qui limite leur utilisation à des inférences taxonomiques et phylogénétiques (Molina 2007, Neto *et al.* 2011). En revanche, l'organisation moléculaire et la cartographie cytogénétique de nombreux gènes pourraient être un ensemble de données significatives pour la caractérisation des segments particuliers de biotes, fournissant des informations très importantes pour la phylogénomique. De manière remarquable, une fraction substantielle de tout génome eucaryote est constituée de séquences d'ADN répétitives, notamment satellites, minisatellites et microsatellites et éléments transposables (Jurka *et al.* 2005). Ces séquences d'ADN répétitives sont censées résulter de nombreux mécanismes, à partir de l'amplification de séquence directe par recombinaison inégale des régions d'ADN homologues à l'écoulement inverse de l'information génétique en utilisant une molécule d'ARN intermédiaire. En raison de la hypervariabilité de répétitions en tandem, ces segments génomiques sont très polymorphes et considérés comme de bons marqueurs moléculaires pour le génotypage des individus et des populations (Jeffreys *et al.* 1985). Aujourd'hui, de nombreuses études ont été menées en utilisant des séquences d'ADN répétitives en tandem comme sondes pour la cartographie cytogénétique de FISH dans les organismes vivants distincts; ces séquences comprennent des répétitions de séquences simples, de l'ADN satellite, clones BAC, et les gènes d'ARNr. En général, ces sondes fournissent des signaux très visibles en raison de leur répétition abondante et de la distribution dans le génome, et ils pourraient même générer un caryotype FISH unique pour chaque espèce (par exemple, Badaeva *et al.* 2007), permettant une vision évolutive et phylogénétique des espèces apparentées. Contrairement aux gènes fonctionnels, des séquences d'ADN répétitives sont considérées comme ayant évolué dans des conditions différentes, échappé aux pressions sélectives qui agissent sur les segments non répétitives (Charlesworth *et al.* 1994). En ce sens, ils constituent de bons marqueurs chromosomiques pour détecter des événements récents de différenciation. En résumé, le développement et l'amélioration des analyses cytogénétiques ont considérablement élargi les méthodes d'études chromosomiques et ont joué un rôle important dans la caractérisation précise de la structure des génomes. La disponibilité actuelle d'un nombre toujours croissant de génomes eucaryotes entièrement séquencés a ouvert de nouvelles "avenues" pour faire avancer la cytogénétique. Couplée avec l'application de la bioinformatique, l'intégration de l'analyse des chromosomes et des données

génomiques représente des outils prometteurs pour l'avenir de la cytogénétique. Cependant, l'information classique concernant le nombre et la morphologie de chromosomes et les données de marquage n'est pas obsolète et devrait donc toujours être utile pour élucider les aspects fondamentaux et appliqués de la cytotaxonomie et de l'évolution du caryotype.

f- Cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été initialement développée pour des applications médicales, mais plus tard, elle est devenue utile dans différents domaines pour des applications telles que le comptage des cellules, le tri et la détection par biomarqueur. Bien que le premier document sur l'analyse des noyaux de plantes en utilisant la cytométrie en flux a été publié en 1973 (Heller 1973) la percée dans l'analyse de l'ADN de plantes par la cytométrie en flux est venue à la fin des années 1980, lorsque les chercheurs ont commencé à appliquer cette technologie de façon persistante sur les plantes. Fondamentalement, les botanistes utilisent la cytométrie en flux pour mesurer la teneur en ADN dans les noyaux de plantes.

La valeur C de l'ADN nucléaire et la taille du génome sont des caractères importants de la biodiversité avec une signification biologique fondamentale et de nombreuses utilisations (Bennett & Leitch 1995, Bennett *et al.* 2000). La valeur C de l'ADN d'un organisme est la quantité d'ADN nucléaire dans son noyau gamétique non répliqué (Swift 1950), quel que soit le niveau de ploïdie du taxon. La première valeur C estimée pour quelques plantes a été faite dans les années 1950 en utilisant des méthodes d'extraction chimique fastidieuses. Le développement ultérieur d'autres techniques, y compris la microdensitométrie de Feulgen, la cytométrie en flux et la cytométrie de l'image de l'ADN, ont permis une estimation de l'ADN à la fois plus facile et plus rapide, de sorte que les données de la valeur C soient désormais disponibles pour plus de 8500 espèces de plantes. Les informations sur les valeurs C sont utilisées dans un large éventail de domaines biologiques (par exemple, voir Bennett *et al.* 2000 et Bennett & Leitch 2011). L'intérêt pour ces données, à en juger par le nombre de nouvelles estimations publiées, est resté élevé au cours des dernières années (Bennett & Leitch 2011). En effet, de plus en plus les données sont utilisées pour les analyses comparatives à grande échelle (par exemple, y compris les études de la relation entre la taille du génome et chromosomes B (Levin *et al.* 2005), la durée du cycle cellulaire (Francis *et al.* 2008), la taille et la masse des semences (Beaulieu *et al.* 2007), la forme de la croissance des plantes et de la distribution (Ohri 2005), la taille des cellules de la feuille et la densité stomatique (Beaulieu *et al.* 2008, Hodgson *et al.* 2010), les modèles d'envahissement

(Kubešová *et al.* 2010, Lavergne *et al.* 2010) et les modes de l'évolution de la taille du génome (Beaulieu *et al.* 2010, Leitch *et al.* 2005; 2009; 2010, Leitch & Leitch 2013).

Avec la capacité de la cytométrie de flux pour analyser un grand nombre d'individus à l'intérieur et entre les populations, les données de taille du génome sont maintenant de plus en plus utilisées pour aider à résoudre les problèmes taxonomiques. Celles-ci ont inclus des exemples où la taille du génome a été utilisée pour fournir de nouveaux éclairages sur les relations des espèces ainsi que pour la reconnaissance de nouvelles entités taxonomiques, en soutenant les existantes ou en les rejetant. La taille du génome a également été utilisée comme un guide fiable dans la séparation d'espèces étroitement liées et leurs hybrides. En effet, la taille du génome a été montrée pour être plus robuste et moins subjective que les caractères morphologiques qui variaient plus ou moins continuellement entre les espèces et leurs hybrides (Bennett & Leitch 2011).

La taille du génome, son niveau de ploïdie, ainsi que son organisation sont des indicateurs de spéciation et de la dynamique de l'évolution de l'espèce. Ce type de données permet également d'aborder certaines questions concernant la réponse du génome aux stress environnementaux. La mesure de la taille du génome (valeur-C) est d'une importance fondamentale pour l'étude de la biodiversité (Bennett *et al.* 2000). Le nombre chromosomique et les réarrangements chromosomiques sont utilisés pour étudier les phénomènes de spéciation et l'évolution au sein des groupes d'espèces voisines. Ces données sont considérées comme indicatrices de la biodiversité. Nous avons également exploré la répartition de la diversité génétique dans ce groupe et les mécanismes qui l'engendrent afin de bien cerner l'intérêt et les cibles pertinentes d'un éventuel effort de conservation.

VI. Les iris menacés dans le monde :

Dans le cadre de ce travail, nous avons réalisé une compilation des iris menacés dans le monde en précisant leurs origines, leurs statuts ainsi que les études réalisées sur ces iris (Tableau 5).

Tableau 5 : Liste des iris menacés dans le monde, leurs origines, leurs statuts et les études réalisées sur ces iris.

Nom de l'iris	Pays	Statut	Etudes réalisées	Référence
<i>I. pumila</i>	Croatie	endémique et menacée	régénération par embryogenèse somatique	Radojević <i>et al.</i> 1987
<i>I. lacustris</i>	Grands Lacs- Etats Unis	menacée	Nouveaux sites	Hart 1990
<i>I. lacustris</i>	Grands Lacs- Etats Unis	menacée	Habitat et écologie	Van Kley & Wujek 1993
<i>I. lacustris</i>	Grands Lacs- Etats Unis	menacée	Allozymes	Simonich & Morgan 1994
<i>I. rossii</i>	Japon	rare	Méthode de production de plants avec la culture <i>in vitro</i>	Furuya 1999
<i>I. lacustris</i>	Grands Lacs- Etats Unis	menacée	diversité des isozymes	Hannan & Orick 2000
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	analyse de structure spatiale	Kostrakiewicz 2000
<i>I. nigricans</i>	Jordanie	endémique et menacée	régénération par embryogenèse somatique	Shibli & Ajlouni 2000
<i>I. sibirica</i>	Croatie	rare et menacée	Nouveaux sites	Delić <i>et al.</i> 2001
<i>I. haynei</i> , <i>I. atrofusca</i>	Israël	Oncocycles rares et endémiques	variation génétique (RAPD) et phénotypique	Arafeh <i>et al.</i> 2002
<i>I. sp.</i>	Sibérie	menacées	relations phylogénétiques (ADN chloroplastique)	Makarevitch <i>et al.</i> 2003
<i>I. aphylla</i>	Pologne	en voie de disparition	diversité génétique par RAPD	Wróblewska <i>et al.</i> 2003
<i>I. croatica</i> , <i>I. illyrica</i> , <i>I. adriatica</i>	Croatie	rare, vulnérable, menacée	Collecte de données	Cigić <i>et al.</i> 2004
<i>Oncocyclus</i>	Israël	Oncocycles rares et	pollinisation	Sapir <i>et al.</i> 2005

		endémiques		
<i>I. petrana</i> , <i>I. atrofusca</i> , <i>I. vartanii</i>	Jordanie	menacée	propagation in-vitro	Al-Gabbiesh <i>et al.</i> 2006
<i>I. taochia</i>	Pakistan	rare et endémique	propriétés autoécologiques	Kandemir 2006
<i>I. cedreti</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	Liban	Oncocycles rares et endémiques	système de pollinisation bimodale	Monty <i>et al.</i> 2006
<i>I. odaesanensis</i> , <i>I. koreana</i> , <i>I. dichotomata</i>	Corée	menacées et endémiques	analyse du caryotype	Park <i>et al.</i> 2006
<i>I. cedreti</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> and <i>I. westii</i>	Liban	Oncocycles rares et endémiques	variation démographique spatio-temporelle et de la stratégie de reproduction	Saad <i>et al.</i> 2006
<i>I. bismarckiana</i>	Israël	rare et menacée	fragmentation et pollinisation	Segal <i>et al.</i> 2006
<i>I. aphylla</i>	Pologne	en voie de disparition	diversité génétique par RAPD	Wróblewska & Brzosko 2006
<i>I. halophila</i>	Roumanie	rare	culture in-vitro	Holobiuc & Blindu 2006-2007
<i>I. nigricans</i>	Jordanie	endémique et menacée	variation génétique par RAPD	Al-Khasawneh <i>et al.</i> 2010
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	variation génétique (Allozyme)	Kostrakiewicz & Wróblewska 2007
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	structure des populations dans des conditions d'habitat différentes	Kostrakiewicz 2008
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	variation génétique (Allozyme)	Kostrakiewicz & Wróblewska 2008
<i>I. cedreti</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> and <i>I. westii</i>	Liban	Oncocycles rares et endémiques	étude écogéographique-collecte de données	Saad <i>et al.</i> 2006, 2009
<i>Oncocyclus</i>	Israël	Oncocycles rares et endémiques	dormance des graines	Dorman <i>et al.</i> 2009
<i>I. pseudopallida</i>	Péninsule des Balkans	endémique	régénération par embryogenèse somatique	Jevremović <i>et al.</i> 2009
<i>I. adriatica</i>	Croatie	endémique quasi menacée	propagation in-vitro	Kereša <i>et al.</i> 2009
<i>I. cedreti</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> , <i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> and <i>I. westii</i>	Liban	Oncocycles rares et endémiques	étude de la variation morphologique et moléculaire par RAPD	Saad <i>et al.</i> 2009

<i>I. atrofusca</i>	Nord du Néguev en Israël	parmi les espèces les plus menacées d' <i>I. Oncocyclus</i> en Israël	approche complexe ex situ - in situ	Volis <i>et al.</i> 2009
<i>I. atrofusca</i>	Israël	parmi les espèces les plus menacées d'iris <i>Oncocyclus</i> en Israël	approche complexe ex situ - in situ	Volis <i>et al.</i> 2010
<i>Iris atrofusca</i>	Israël	parmi les espèces les plus menacées d' <i>I. Oncocyclus</i> en Israël	Translocation	Volis <i>et al.</i> 2010
<i>I. aphylla</i>	Pologne	rare et menacée	distribution de cytotype et l'histoire de la colonisation	Wróblewska <i>et al.</i> 2010
<i>I. pumila</i>	Serbie	endémique et menacée	fidélité clonale régénérée après conservation par vitrification	Jevremović <i>et al.</i> 2011
<i>I. aucheri</i> , subsp. <i>aintabensis</i> , subsp. <i>histrion</i> , <i>I. pamphylica</i> , <i>I. bakeriana</i>	Turquie	distribution restreinte	écologie	Kandemir <i>et al.</i> 2011
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	effet des espèces dominantes sur le nombre et la structure d'âge	Kostrakiewicz 2011
<i>I. stenophylla</i> subsp. <i>allisonii</i>	Turquie	endémique et menacée	micropropagation in vitro	Nasircilar <i>et al.</i> 2011
<i>I. dichotoma</i>	Corée	menacée	induction du cal et régénération à partir de la feuille, du rhizome, et des cals racinaires dérivés de l'explant	Kee-Hwa <i>et al.</i> 2012
<i>I. atropurpurea</i>	Israël	endémique et menacée	reproduction	Sapir & Mazzucco 2012
<i>I. odaesanensis</i>	Corée	rare	régénération de plantes à partir de cals via organogenèse	Bae <i>et al.</i> 2013
<i>I. pumila</i>	Ukraine	menacée	diversité génétique (ISSR, IRAP, REMAP, RGAP et LP-PCR)	Bublyk <i>et al.</i> 2013
<i>I. sibirica</i>	Pologne	rare et menacée	variation écologique	Kostrakiewicz-Gierałt 2013
<i>I. pumila</i>	Ukraine	menacée	effet de la fragmentation de l'habitat	Kunakh 2013
<i>I. aphylla</i>	Roumanie	rare et menacée	propagation <i>in vitro</i> par des explants de feuilles et de bourgeons axillaires	Marinescu & Teodorescu 2013

<i>I. aphylla</i>	Roumanie	rare et menacée	propagation <i>in vitro</i> par des explants de feuilles et de bourgeons axillaires	Violeta <i>et al.</i> 2013
<i>I. atropurpurea</i>	Israël	endémique et menacée	pollinisation	Watts <i>et al.</i> 2012
<i>I. pamphylica</i>	Turquie	endémique et menacée	propagation in-vitro	Nasircilar & Deniz 2014
<i>I. bismarckiana</i>	Jordanie	très rare	régénération par embryogenèse somatique	Oran & Al-Gabbiesh 2014
<i>I. sari, I. schachtii</i>	Turquie	endémiques	régénération <i>in vitro</i> à partir d'embryons immatures	Uzun <i>et al.</i> 2014
<i>I. aphylla, I. camilla, I. carthaliniae, I. graminea, I. elegantissima, I. grossheimii, I. hungarica, I. iberica, I. imbricate, I. lycotis, I. musulmanica, I. prilipkoana, I. pseudacorus, I. timofejewii</i>	Géorgie	rares et endémiques	conservation <i>in situ</i>	Nadiradze & Eradze 2014
<i>I. odaesanensis, I. rossii</i>	Corée	rare	Structure clonale et génétique	Chung <i>et al.</i> 2015
<i>I. pamphylica</i>	Turquie	endémique et menacée	propriétés taxonomiques et écologiques	Deniz <i>et al.</i> 2015
<i>I. atrofusca</i>	Israël	parmi les espèces les plus menacées d' <i>Iris Oncocyclus</i> en Israël	AFLP and phénotypique	Volis <i>et al.</i> 2015
<i>I. helena</i>	Azerbaïdjan	en voie de disparition	conservation <i>ex situ</i>	Allahverdioglu & Velioglu
<i>I. aphylla</i> subsp. <i>hungarica</i>	Roumanie	en danger critique	collecte de données	Marinescu & Alexiu

A partir de cette compilation, nous avons remarqué que la plupart de ces iris menacés dans le monde sont endémiques et rares. La plupart des 57 études réalisées entre 1987 et 2015 ont été menées en Pologne (9), Israël (9), Turquie (5), Roumanie (4).

Vingt cinq types d'études ont été utilisés sur les iris menacés dans le monde entre 1987 et 2015 dont la micropropagation in-vitro (15% des études réalisées), la diversité génétique par RAPD (10%), les allozymes (7%), la fragmentation de l'habitat (7%), la pollinisation (7%), la régénération par embryogenèse somatique (7%), les études écogéographiques (5%), les conservations *ex situ - in situ* (3%).

Donc nous pouvons remarquer d'après tout ce qui est mentionné au-dessus que les iris menacés sont très peu étudiés. Nous avons choisi de mettre l'accent sur ce point pour dire qu'il est essentiel de mener des études sur toutes les espèces menacées d'*Iris*, pour pouvoir achever le but final : La protection.

VI.1- La conservation *ex situ* :

Les pressions environnementales telles que l'agriculture, l'érosion, surpâturage des prairies, et l'urbanisation sont la cause d'une perte significative des espèces végétales et de leurs habitats. Donc, une attention particulière devrait être accordée à protéger et à préserver la flore endémique qui se trouve normalement dans des zones limitées (Fay 1992, Sarasan *et al.* 2006). Plusieurs méthodes *ex situ* sont utilisées pour la conservation des espèces sauvages comme : La culture dans les jardins botaniques, la création des banques de semences, la cryoconservation (graines, pollen ou de tissus congelés dans l'azote liquide), le stockage des tissus, la culture *in vitro* des tissus (Raven 2013).

La conservation des espèces endémiques par culture de tissus végétaux *in vitro* a attiré l'attention des chercheurs (Corral *et al.* 2011, Mallon *et al.* 2010, Piovan *et al.* 2010). *In vitro*, les techniques font la production rapide et fiable d'une grande quantité d'individus d'une petite quantité de matériel végétal, et sont donc préférés comme un moyen efficace pour la conservation des plantes endémiques et des populations sauvages (Corral *et al.* 2011).

L'utilisation de la méthode de culture cellulaire et tissulaire est devenue populaire dans la reproduction des iris car elle augmente considérablement les facteurs de multiplication des plantes et améliore la qualité de plantation précieuse. En outre, la régénération par la culture de tissu est de plus en plus utilisée pour la conservation des espèces rares et endémiques, qui

représentent une composante importante de la génétique des plantes et la gestion des ressources (Pense 2013).

La multiplication *in vitro* des espèces d'*Iris* est possible et a été rapportée pour *I. ensata* (Boltenkov *et al.* 2007, Yabuya *et al.* 1991), *I. germanica* (Shimizu *et al.* 1997, Wang *et al.* 1999a ; 1999b), *I. nigricans* (Shibli & Ajlouni 2000), *I. pumila* (Jevremovic & Radojevic 2002), *I. ensata*, *I. setosa*, *I. sanguinea* (Boltenkov & Zarebno 2005), *I. hollandica* (Fidalgo *et al.* 2005), *I. atrofusca*, *I. petrana*, *I. vartanii* (Al-Gabbiesh *et al.* 2006), *I. adriatica* (Keresa *et al.* 2009), *I. sari* and *I. schachtii* (Uzun 2014).

VI.2- La conservation *in situ* :

L'objectif principal et à long terme de la conservation *in situ* des espèces cibles est de protéger, de gérer et de surveiller les populations sélectionnées dans leurs habitats naturels afin que les processus évolutifs naturels peuvent être maintenus, permettant ainsi une nouvelle variation à générer dans le pool de gènes qui permettra aux espèces de s'adapter à l'évolution des conditions environnementales. La conservation *in situ* couvre un large éventail d'activités allant de la préparation et la mise en œuvre des plans de rétablissement d'espèces uniques détaillées dans le cas des espèces qui sont en danger critique, grâce à la vigilance et de surveillance pour les espèces qui sont rares, non menacées ou seulement vulnérables, à diverses formes et degrés d'intervention de gestion qui affectent soit les populations d'espèces concernées ou les habitats / zones dans lesquelles ils se produisent, ou les deux. La conservation *in situ* des espèces est généralement opposée à la conservation *ex situ*, mais existe différents types de situations intermédiaires qui font une transition entre les deux. Il est temps de traiter la conservation des espèces *in situ* dans la Méditerranée comme un problème grave qui exige une stratégie éclairée, cohérente et chiffrée.

Dans la pratique, la conservation des espèces *in situ* dépend de façon critique sur l'identification des habitats dans lesquels ils se produisent et protéger à la fois l'habitat et les espèces par le biais de divers types de gestion et / ou de surveillance. Dans le cas des espèces menacées, leur conservation *in situ* exige également que les menaces qui pèsent sur eux soient enlevées ou au moins contenues.

Ainsi, bien que la conservation *in situ* soit essentiellement un processus de conservation d'espèces, elle implique aussi nécessairement la protection de l'habitat.

La conservation *in situ* des espèces cibles couvre un certain nombre d'activités interdépendantes, y compris :

- La préparation et la mise en œuvre des plans de conservation ou de gestion d'espèces uniques détaillées.
- Dans le cas de ces espèces qui sont en danger critique, la préparation et la mise en œuvre des plans de rétablissement détaillés qui peut impliquer le renforcement des populations ou plus extrêmes cas réintroduction (translocation) des populations.
- Les plans de gestion multi-espèces et de récupération.
- Surveillance de l'état des habitats.
- La protection de l'habitat.
- Le suivi des résultats des interventions de gestion pour les espèces qui sont rares, menacées et vulnérables.
- La conservation génétique dans le cas des espèces d'importance économique (Heywood 2014).

Tous ces éléments sont dépendants de l'obtention des informations sur la taxonomie, la diversité génétique, la distribution, l'écologie, la démographie, la variation, l'ethnobotanique et l'état de conservation des populations des espèces cibles, souvent appelée surveillance éco-géographique (Guarino *et al.* 2005, Hunter & Heywood 2011: chapitre 6).

Dans la pratique, divers types de situations intermédiaires existent entre conservation *in situ* et *ex situ*, tel que :

Quasi *in situ*

Les termes « complexe *ex situ-in situ* ... de conservation » et de « quasi- *in situ* conservation » ont été introduites par Volis *et al.* (2009) et Volis & Blecher (2010a, b) pour décrire leur approche comme un pont entre la conservation *ex situ* et *in situ* de sorte que les collections *ex situ* sont maintenues dans un environnement naturel ou semi-naturel tout en préservant la diversité génétique à la fois neutre et adaptative. Il a été appliqué aux populations d'*Iris atrofusca* (section *Oncocyclus*) dans le nord du Néguev, en Israël.

VI.3- Conservation des iris au Liban :

Les études déjà menées sur les iris Oncocycles au Liban ont permis de développer des connaissances sur divers aspects de l'écologie, la biologie, la taxonomie, la génétique des iris Oncocycles endémiques du Liban en vue de promouvoir le développement de stratégies de conservation (Saad 2006).

L'établissement du statut de conservation des iris Oncocycles au Liban et les étapes vers leur conservation (modifié d'après Marrero-Gomez *et al.* 2003 & Schemske *et al.* 1994) sont montrées dans la Figure 14. Parmi ces étapes, les études génétiques s'avèrent très importantes pour la conservation des espèces menacées et notamment les iris. La caractérisation génétique précise des ressources disponibles (populations, individus, etc.) est cruciale dans le développement de tout programme de conservation, afin de déterminer quelles populations sont prioritaires pour la conservation (Petit *et al.* 1998) et d'identifier les populations qui ont besoin être propagées *ex situ* (Mistretta 1994). Notre travail sur les divers outils génétiques et de biologie moléculaire afin de préciser le statut taxonomique des espèces d'iris menacés au Liban et pour élucider leurs relations phylogénétiques tels que : l'analyse de la taille du génome, l'étude du caryotype, l'organisation du génome basée sur la localisation des gènes ribosomiques et l'étude de la structuration de la diversité génétique et la phylogénie basée sur des marqueurs moléculaires nucléaires et chloroplastiques constitue une base de données importante pour leur conservation.

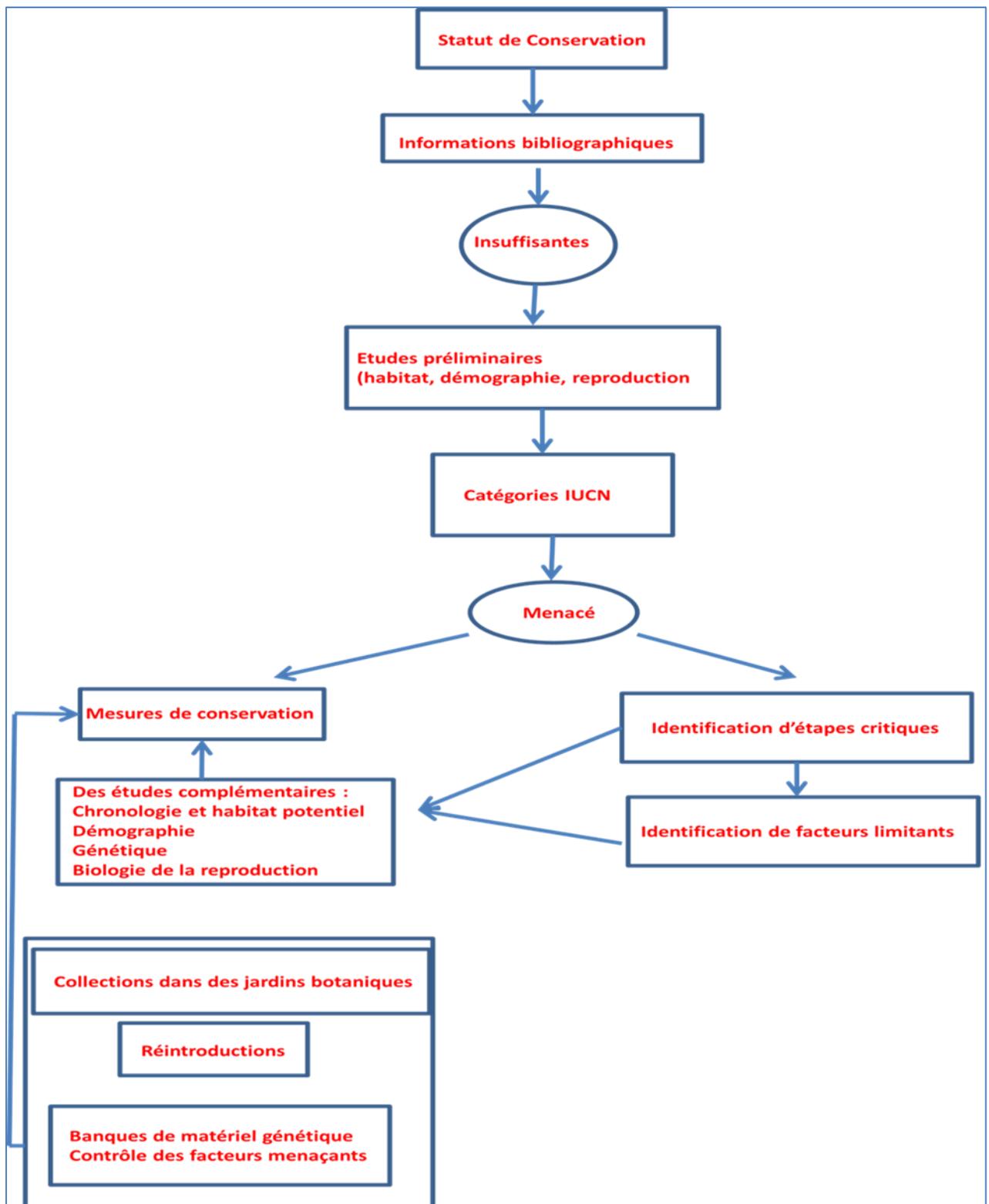


Figure 14 : Etablissement du statut de conservation d'un taxon et étapes vers leur conservation (modifié d'après Marrero-Gomez *et al.* 2003 & Schemske *et al.* 1994).

VII. Objectif de la thèse :

La présente étude porte sur le complexe d'espèces d'*Iris* évoluant dans les pays de la Méditerranée Orientale: Liban, Syrie, Jordanie, Palestine/Israël, Arménie, Turquie et Iran.

Le taux d'endémisme au sein de ce genre est relativement élevé. Malheureusement, la cueillette excessive ainsi que la destruction de leurs habitats menacent un grand nombre de ces espèces. Ce qui les rend une cible pour les stratégies de conservation nationales et régionales.

L'objet principal de notre étude est un groupe de taxons des iris de la section *Oncocyclus*. Cette section présente à elle seule 55% de toutes les espèces menacées du genre *Iris* (Walter & Gillet 1998), ce qui les classe en tête de liste des espèces à protéger. Une évaluation approfondie de la distribution, de la viabilité de la population et de sa diversité génétique est cependant essentielle afin de développer des stratégies de conservation appropriées pour protéger ces plantes emblématiques ayant très souvent une valeur patrimoniale prononcée.

Les *Oncocyclus* endémiques du Liban sont actuellement formés par un complexe de quatre taxons étroitement apparentés et représentés par des populations distinctes dans les hautes altitudes (1200 jusqu'à 1900 m) de la chaîne montagneuse du Mont-Liban. Il s'agit notamment d'*I. sofarana* Foster subsp. *sofarana*, *I. sofarana* subsp. *kasruwana* Dinsmore, *I. cedreti* Dinsmore ex Chaudhary et *I. westii*. Ces espèces appartiennent toutes à la *Sofarana* agrégat comme défini par Avishai et Zohary (1980) en se basant essentiellement sur des caractères morphologiques.

La variation morphologique (couleur des tépales, nombre de feuilles, taille de l'individu...) entre ces taxons entraîne souvent une grande confusion pour les distinguer en utilisant des clés d'identification proposées par différents auteurs (Chaudhary 1972, 1974, Dinsmore 1934, Kohlein, 1987, Mathew 1989, Mouterde 1966, Post 1933, Rix 1997). En fait, la délimitation des espèces de ce groupe a été fondée sur quelques spécimens d'herbier, sans tenir compte de la variation naturelle des populations.

Des études éparses ont été menées (Avishai & Zohary 1977, Goldblatt *et al.* 1984) pour démystifier le statut taxonomique de ce groupe. Saad et ses collaborateurs (2003), à titre d'exemple, se sont intéressés à l'étude d'*Iris sofarana* du Liban. Toutefois, une confusion persiste quant à l'identité de taxons proches tels qu'*I. sofarana* subsp. *sofarana* et

I. sofarana subsp. *kasruwana* et même *Iris cedreti* (Tohmé & Tohmé 2004). D'autres taxons existant dans le sud du Liban : *I. bismarckiana* Damman & Sprenger et *I. lortetii* Barbey ex Boiss. sont proches morphologiquement mais plus éloignés géographiquement des *Oncocyclus* endémiques méritent également d'être étudiés afin d'élucider leur statut taxonomique précis.

Divers outils génétiques et de biologie moléculaire ont été employés dans ce travail afin de préciser le statut taxonomique de ces espèces et pour élucider leurs relations phylogénétiques tels que: l'analyse de la taille du génome, l'étude du caryotype, l'organisation du génome basée sur la localisation des gènes ribosomiques et l'étude de la structuration de la diversité génétique et la phylogénie basée sur des marqueurs moléculaires nucléaires et chloroplastiques (Abdel Samad *et al.* 2016, accepté, Annexe 9).

Notre étude est une des premières contributions scientifiques pour la conservation des ressources génétiques des iris endémiques du Liban et de la méditerranée orientale, une étape essentielle pour la définition, l'implémentation et la gestion d'aires protégées.

Chapitre III: Matériel et Méthodes

III.1- Matériel végétal

Dans la présente étude, toutes les espèces d'*Iris* au Liban (13 espèces et une sous-espèce) sont collectées ; l'ADN et les feuilles vertes de 26 *Oncocylus* de la Syrie, Jordanie, Palestine/Israël, Arménie, Turquie, Iran, ont été fournis par M. László Csiba de Kew, « Royal Botanic Gardens» et par M. Frédéric Dépalle de sa collection personnelle. La provenance du matériel, l'origine des populations étudiées sont répertoriées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : L'origine du matériel végétal

Sous-genre	Section/Sous-genre	Espèces	Origine	Collecté par
<i>Iris</i>	<i>Oncocyclus</i>	<i>I. acutiloba</i>	Azerbaïdjan, Jeyrankechmaz	Dépalle F.
		<i>I. acutiloba</i> subsp. <i>lineolata</i>	Arménie (RBGK 2012-1109)	Kew
		<i>I. antilibanotica</i>	Liban, Kheibeh-Baalbeck	Abdel Samad N.
		<i>I. assadiana</i>	Syrie, Sadad	Dépalle F.
		<i>I. atropurpurea</i>	Israël, Palmahim (RBGK 1998-2808)	Kew
		<i>I. bismarckiana</i>	Liban, Sarada	Abdel Samad N.
		<i>I. bismarckiana</i>	Jordanie, Ajloun	Dépalle F.
		<i>I. camillae</i>	Azerbaïdjan, Tovuz	Dépalle F.
		<i>I. cedreti</i>	Liban, Bcharré	Abdel Samad N.
		<i>I. cedreti</i>	Liban, les cèdres	Dépalle F.
		<i>I. damascena</i>	Syrie, Damas	Dépalle F.
		<i>I. haynei</i> var. <i>jordana</i>	Jordanie, Umm Qais	Dépalle F.
		<i>I. iberica</i> subsp. <i>elegantissima</i>	Turquie, Erzurum, entre Kirekli Pass et Tortum, 80km avant Erzurum (RBGK 1999-4347)	Kew
		<i>I. kirkwoodi</i>	Syrie, St Simeon	Dépalle F.
		<i>I. kirkwoodii</i> subsp. <i>kirkwoodii</i>	Turquie, Antakya Prov., Nurdaglari (RBGK 1994-2407)	Kew
		<i>I. lortetii</i>	Liban, Mays el Jabal	Abdel Samad N.
<i>I. lortetii</i> 2	Israël, Ayelet-Hashahar	Dépalle F.		

	<i>I. lineolata</i>	Arménie, Gandja	Dépalle F.
	<i>I. mariae</i>	Israël, sede boker	Dépalle F.
	<i>I. paradoxa</i> f. <i>mirabilis</i>	Iran, Ayerandibi	Dépalle F.
	<i>I. meda</i>	Iran, Baqloujeh Sardar	Dépalle F.
	<i>I. nigricans</i>	Palestine, Bani Naim	Dr .Khalid Sawalha
	<i>I. paradoxa</i>	Arménie, Akhkhlu, Dilijan (Dilizhan) – Idzhevan (Idjevan) (RBGK 1977-4470)	Kew
	<i>I. petrana</i>	Jordanie, Shawbak	Dépalle F.
	<i>I. petrana</i>	Inconnue (RBGK 1990-3180)	Kew
	<i>I. samariae</i>	Israël, Majdal	Dépalle F.
	<i>I. sari</i>	Inconnue (RBGK 2011-1955)	Kew
	<i>I. schelkownikowii</i>	Azerbaïdjan, Mingachevir	DépalleF.
	<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	Liban, Chabrouh	Bou Dagher-Kharrat M.
	<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana2</i>	Liban, Ehmej	Abdel Samad N.
	<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	Liban, Dahr El-Baydar	Abdel Samad N.
	<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana2</i>	Liban, Hazzerta	Abdel Samad N.
	<i>I. sprengeri</i>	Turquie, Nigde, S d'Aksaray, base de Hasan Laginr Taspinar (RBGK 2011-1958)	Kew
	<i>I. westii</i>	Liban, Tawmet Jezzine	Abdel Samad N.
	<i>I. yeruchamensis</i>	Israël, Yerocham	Dépalle F.
	<i>I. yebrudii</i> subsp. <i>yebrudii</i>	Syrie, Yebrud	Dépalle F.
Regelia	<i>I. afghanica</i>	Afghanistan	Dépalle F.

	<i>Iris</i>	<i>I. albicans</i>	Liban, Aley	Abdel Samad N.
		<i>I. mesopotamica</i>	Liban, Mrouje	Bou Dagher-Kharrat M.
<i>Limniris</i>	<i>Limniris</i>	<i>I. longipetala</i>	Iran, Jazvanaq	Dépalle F.
		<i>I. pseudacorus</i>	Liban, Kfarzabad	Bou Dagher-Kharrat M.
		<i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	Liban, Baadarane	Abdel Samad N.
<i>Scorpiris</i>	<i>Scorpiris</i>	<i>I. palaestina</i>	Liban, Joun	Abdel Samad N.
		<i>I. persica</i>	Turquie C9 Siirt; Eruh-Sirnak arasi, Segirik Karakolu civari (RBGK 2014-1875)	Kew
		<i>I. regis-uzziae</i>	Israël (RBGK 1987-2212)	Kew
		<i>I. tauri</i>	Liban, Quaa	Abdel Samad N.
<i>Hermodactyloides</i>	<i>Hermodactyloides</i>	<i>I. histrio</i>	Liban, Barouk	Abdel Samad N.

III.2- Méthodes

III.2.1- Mesure de la taille du génome par cytométrie en flux :

La taille du génome a été mesurée en utilisant la méthode de cytométrie en flux décrite par Doležel *et al.* (2007). Afin de mesurer la quantité d'ADN des iris du Liban à l'aide d'un cytomètre en flux, entre 1 à 5 individus par population de chaque espèce ont été analysés pour obtenir la quantité d'ADN moyenne. Au moins 5000 à 10000 noyaux ont été analysés pour chaque échantillon. Au moment de l'analyse, des étalons internes avec la quantité d'ADN connue, ont été rajoutés à l'échantillon (*Triticum aestivum* 'Chinese Spring' : 2C = 6x = 30,9 pg; 43,7% GC). La quantité d'ADN (2C) connue de ces étalons est utilisée pour la quantification de l'ADN de l'échantillon. La technique consiste à couper les feuilles de l'échantillon et de l'étalon à l'aide d'une lame rasoir dans une boîte de Pétri, avec 600 µl de tampon Galbraith (Galbraith *et al.* 1983) pour l'extraction des noyaux. Les noyaux en suspension ont été ensuite filtrés à travers une maille de nylon (taille de pores 48 µm), afin d'éliminer les fragments et les grands débris tissulaires. Les noyaux sont ensuite colorés avec de l'iodure de propidium à 50 µg/ml. La quantité d'ADN (2C) est calculée en utilisant la liaison linéaire entre les signaux fluorescents provenant des noyaux colorés de l'échantillon inconnu et l'étalon interne connu selon la formule suivante :

$$2C_{\text{échantillon Iris}} = \frac{\text{Intensité fluorescente}_{\text{échantillon}}}{\text{Intensité}_{\text{étalon interne}}} * 2C_{\text{étalon (connue)}}$$

III.2.2- Amplification de la région ITS et des deux régions chloroplastiques *matK* et *trnL-F*:

Broyage:

Tout le matériel (pilons, mortiers, spatule) est autoclavé. Les morceaux de jeunes feuilles vertes sont coupés et déposés dans un mortier pré-refroidi 3 fois avec de l'azote liquide. Un volume d'azote liquide est ajouté, le mélange est broyé avec le pilon pendant au moins 2 minutes. Un

volume d'azote liquide est ajouté si c'est nécessaire. A l'aide d'une spatule, la poudre (blanche/verte) est rassemblée avant qu'elle ne sèche et transférée dans un tube ou deux si la quantité est suffisante. Les tubes sont déplacés directement dans l'azote liquide et gardés à -80°C jusqu'au jour de l'extraction de leur ADN. Le matériel est nettoyé 3 fois avec de l'éthanol absolu entre deux broyages consécutifs.

Extraction de l'ADN :

Dans chaque tube, 1 ml du mix du tampon d'extraction déjà préparé, est ajouté. Le tube est transféré directement dans le bain-marie, incubé au bain-marie à 60°C pendant 45 minutes et vortexé chaque 5 minutes. Les échantillons sont sortis du bain-marie. 1 ml/tube de 3*(24/1 chloroforme (SIGMA-ALDRICH-2883306)-isoamylalcool (AMRESCO-0944) est ajouté. Le tube est bien agité à la main jusqu'à l'obtention d'un liquide verdâtre puis centrifuger à 13000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant est prélevé et transvasé dans la deuxième série de tubes (attention à ne pas perturber l'interface). 1 ml de chloroforme-isoamylalcool est rajouté à chaque tube, ce dernier est centrifugé à 13000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant est plus clair et plus propre. Le surnageant est transféré dans la 3^{ème} série de tubes en notant le volume. Un volume égal d'isopropanol (SIGMA-ALDRICH- 437522) est ajouté à chaque tube. L'ADN se précipite et apparaît en retournant le tube plusieurs fois à la main. Les tubes sont centrifugés à 8000 tr/min pendant 15-20 min, l'ADN se précipite. Le surnageant est éliminé. 1 ml/tube d'éthanol 75% froid (1^{er} lavage) est ajouté au culot. Le tube est agité pour décoller le culot puis centrifugé à 8000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant est éliminé à nouveau et le culot est gardé. 1 mL d'éthanol 100% froid (2^{ème} lavage) est ajouté à chaque tube. Les tubes sont centrifugés pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot est séché à l'air libre pendant 30 min.

Le culot d'ADN est resuspendu dans 100-150 µl de la solution TE-RNase froide (selon la taille du culot). Les échantillons d'ADN sont incubés au bain-marie à 37°C pendant la nuit.

Amplification par PCR:

Un mix commun d'un volume de 50 µl par tube est préparé et mis dans la glace. Un témoin est aussi préparé en substituant l'ADN par H₂O : aucune amplification ne doit alors être détectée pour ce témoin, ce qui permet de vérifier que les préparations ne contiennent pas de contaminants. Les tubes sont alors placés dans un thermocycleur (Perkin Elmer, GeneAmp® PCR System 9700).

Amplification de la région ITS-1, 5.8S et ITS2 par PCR

Mix commun	1 tube
Eau stérile	35,8
5x Phire Reaction Buffer	10
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**à 10 mM (100 µM final)	1
ITS-4 (20 µM) (Emofinis MWA Operon H13342)	0,25
ITS-5 (20 µM) (Emofinis MWA Operon H13341)	0,25
Phire Hot Start II DNA Polymerase (F122-S)	1
Volume final	48,3µl



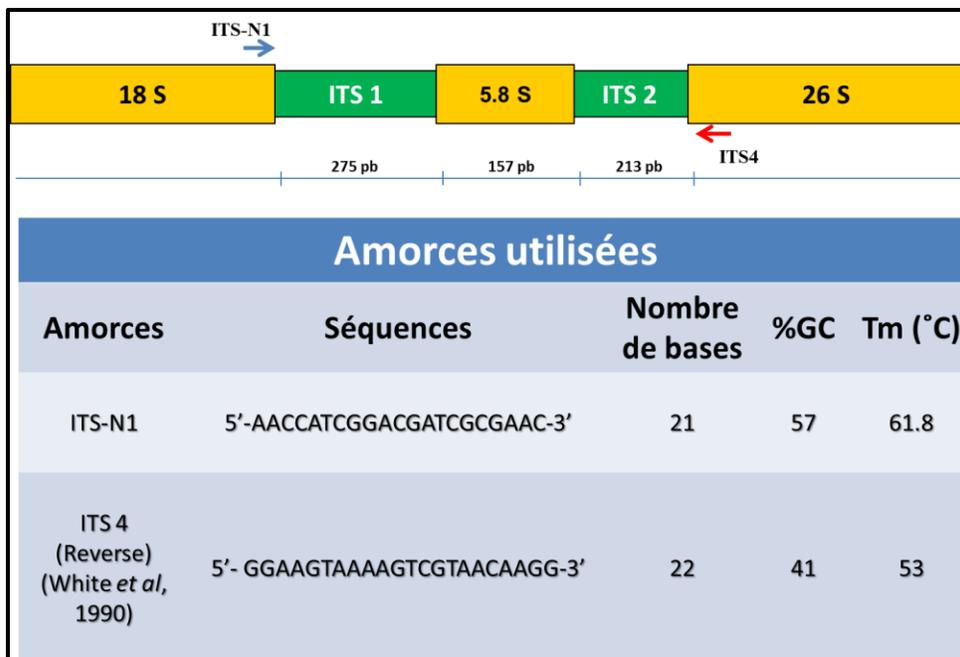
Amorces	Séquences	Tm
ITS 5 (Forward) (White <i>et al</i> , 1990)	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC	69
ITS 4 (Reverse) (White <i>et al</i> , 1990)	5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	53

L'ADN est dénaturé à 98°C pendant 30 sec. Puis 35 cycles successifs formés de ces 3 mêmes étapes sont réalisés: une dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 5 sec., puis une hybridation des amorces sur les ADN matrice simple brin à 58°C pendant 5 sec. suivie par une élongation des brins d'ADN à 72°C pendant 15 sec. Une étape terminale est faite à 72°C pendant 1 min. ce qui permet de compléter la synthèse des molécules en cours d'élongation. La PCR est terminée par

une étape finale à 4°C jusqu'à l'infini, le moment où on récupère les échantillons. Les échantillons sont prélevés et gardés à -20°C jusqu'au moment d'utilisation.

Amplification de la région ITS par le couple d'amorces ITS-N1/ITS4

Mix commun	1 tube
Eau stérile	35,8
5x Phire Reaction Buffer	10
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**à 10 mM (100 µM final)	1
ITS-4 (100 µM) (Emofinis MWA Operon H13342)	0,1
ITS-N1 (100 µM) (Emofinis MWA Operon H13341)	0,1
Phire Hot Start II DNA Polymerase (F122-S)	1
Volume final en µl	48



L'ADN est dénaturé à 98°C pendant 30 sec. Ensuite 35 cycles successifs formés de ces 3 mêmes étapes sont réalisés: Une dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 5 sec., puis une hybridation des

amorces sur les ADN matrice simple brin à 57°C pendant 5 sec. Suivie par une élongation des brins d'ADN à 72°C pendant 15 sec. Une étape terminale est faite à 72°C pendant 1 min. ce qui permet de compléter la synthèse des molécules en cours d'élongation. La PCR est terminée par une étape finale à 4°C jusqu'à l'infini, le moment où on récupère les échantillons. Les échantillons sont prélevés et gardés à -20°C jusqu'au moment d'utilisation.

Amplification de la région *matK* et *trn* chloroplastique par PCR

1 ^{er} Mix	1 tube
Eau stérile	35,8
5x Phire Reaction Buffer	10
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**à 10 mM (100 µM final)	1
MatK19F (100 µM) (Emofinis MWA Operon)	0,1
trnK-2R (100 µM) (Emofinis MWA Operon)	0,1
Phire Hot Start II DNA Polymerase (F122-S)	1
Volume final en µl	48

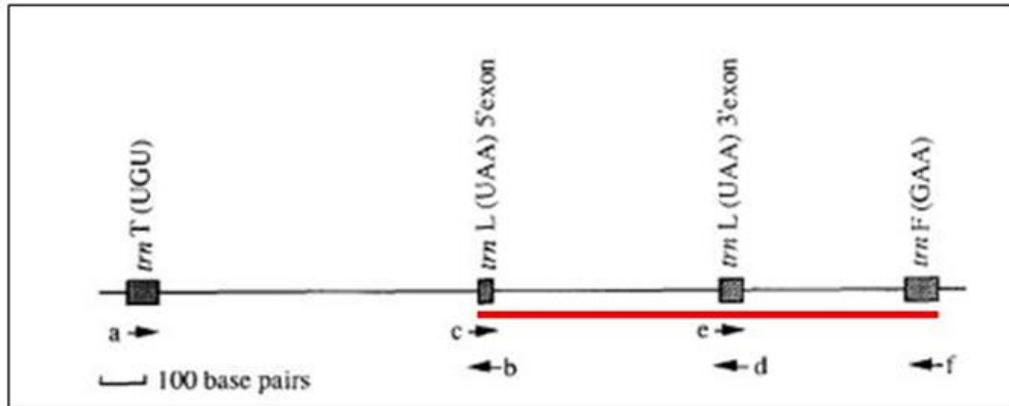
MatK19F : 5'-CGTTCTGACCATATTGCACTATG-3' **Tm= 58,9°C**

(Molvray *et al.* 2000)

trnK-2R : 5'-AACTAGTCGGATGGAGTAG-3' **Tm= 54,5°C**

(Johnson & Soltis 1995)

2 ^{ème} Mix	1 tube
Eau stérile	35,8
5x Phire Reaction Buffer	10
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**à 10 mM (100 µM final)	1
trn-C (100 µM) (Emofinis MWA Operon)	0,1
trn-f (100 µM) (Emofinis MWA Operon)	0,1
Phire Hot Start II DNA Polymerase (F122-S)	1
Volume final en µl	48



trn-C 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'

Tm= 59,4°C

trn-F 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'

Tm=55,3°C

(Taberlet 1991)

L'ADN est dénaturé à 98°C pendant 30 sec. Ensuite 35 cycles successifs formés de ces 3 mêmes étapes sont réalisés: Une dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 30 sec., puis une hybridation des amorces sur les ADN matrice simple brin à 53°C pendant 5 sec. Suivie par une élongation des brins d'ADN à 72°C pendant 15 sec. Une étape terminale est faite à 72°C pendant 20 sec. ce qui permet de compléter la synthèse des molécules en cours d'élongation. La PCR est terminée par une étape finale à 4°C jusqu'à l'infini, le moment où on récupère les échantillons. Les échantillons sont prélevés et gardés à -20°C jusqu'au moment d'utilisation.

Purification des produits d'amplification PCR :

Une quantité suffisante de TBE 1 X (à peu près 500 ml) et un gel d'agarose de 1% ou 2% sont préparés. 1 ou 2g d'agarose en poudre sont dissous dans 100 ml de TBE 1x dans une bouteille de verre. La bouteille est chauffée pendant 2 minutes à la micro-onde pour faire fondre l'agarose complètement. Après elle est laissée pour refroidir jusqu'à 60°C puis 10 µl de bromure d'éthidium (SIGMA E1510) est ajouté. Le plateau de l'électrophorèse est ajusté à l'horizontale, le gel est coulé jusqu'à une épaisseur de 1 cm. Le peigne est mis en faisant attention à ne pas faire de bulles. La solution est laissée pour se solidifier pendant 30 à 45 min. à température

ambiante, puis le peigne est enlevé et le gel est placé dans la cuve à électrophorèse remplie de TBE. Récupérer les échantillons de -20°C. Garder les dans la glace. Les échantillons sont préparés, homogénéisés par un petit coup de doigt puis centrifugés au cas où il y a des bulles d'air. Le contenu des tubes est versé dans les puits correspondants. L'appareil est mis sous tension (135 V) pendant 37 min. L'examen du gel est réalisé sous rayon U.V. suivi d'une acquisition photographique par la caméra.

Reconstruction phylogénétique moléculaire

L'ADN a été isolé de 50-170 mg de feuilles fraîches ou congelées en utilisant une méthode de bromure de cetyltriméthylammonium modifié (CTAB) (Doyle & Doyle 1987). La qualité et la quantité d'ADN ont été vérifiées par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'éthidium (0,5 mg / mL) dans 1xTBE. La région ITS a été amplifiée tout d'abord par les deux amorces ITS-4 et ITS-5, après alignement des séquences, on s'est rendu compte que la région ITS d'un champignon endophyte a été amplifiée au lieu de l'ITS de nos iris. Donc on a eu recours à la fabrication d'une amorce ITS-N1 plus spécifique de l'ITS des iris que celle des champignons endophytes. Les régions plastides *trnL-trnF* et *matK / trnK* ont été amplifiées en utilisant les amorces *trnL-C*, *trnL-F* (Taberlet *et al.* 1991), *MatK19F* (Molvray *et al.* 2000) et *trnK-2R* (Johnson & Soltis 1994). Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume de 50 µl contenant 10 µl de 5x tampon de réaction Phire, 10 mM dNTP, 100 pM d'amorces, 20-50 ng de matrice d'ADN génomique, et 1 ul Phire Hot Start DNA Polymerase II (F122-S). Le programme de PCR avait une étape de séparation des brins initiaux à 98°C pendant 30 sec. suivie par 35 cycles de dénaturation à 98°C pendant 5 sec., un anelage à 57°C pendant 5 sec., et une élongation à 72°C pendant 15 sec., l'étape finale à 72°C pendant 1 min. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur agarose dans un gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'éthidium (0,5 mg / mL) dans 1xTBE. Les produits purifiés PCR ont été séquencés par Eurofins MWG, France en utilisant la méthode de Sanger sur la plate-forme ABI 3730XL.

L'ensemble des données, y compris de nouvelles séquences tout à fait avec des séquences recueillies auprès de GenBank a été aligné en utilisant les paramètres par défaut sur Guidance serveur web (Penn *et al.* 2010) et manuellement ajustés avec le logiciel BioEdit (Hall 1999). Il comprend la région *matK / trnK* pour 117 adhésions (représentant 1842 caractères) et la région *trnL-trnF* pour 94 accessions (1028 caractères). *Dietes robinsoniana* a été incluse dans l'analyse

comme une espèce exogroupe. Une inférence bayésienne (BI) a été réalisée à l'aide MrBayes la version 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) sur le serveur CIPRES (Miller *et al.* 2010) avec des cloisons par région (*trnL-trnF*, *matK-trnK*) et quand c'est applicable par la position de codon. Le meilleur modèle de substitutions nucléotidiques sélectionnées avec jModelTest v.0.1.1 (Posada 2008, Guindon & Gascuel 2003) en utilisant les informations critère Akaike (AIC) a été GTR + I + G pour toutes les partitions de la région. Pour chaque analyse, quatre chaînes de Markov ont été exécutés simultanément pour 30×10^6 générations, et ceux-ci ont été échantillonnés toutes les 700 générations. Les analyses ont été vérifiées pour la convergence dans Tracer v.1.6 (Rambaut & Drummond 2007). Les données des 5000 à 10000 premières générations ont été rejetées comme étant la période de burn-in dans chaque analyse, et les échantillons groupés restants ont été utilisés pour construire les règles de la majorité des arbres de consensus 50% et de calculer la probabilité a posteriori (PP) de noeuds.

Analyses statistiques

Les analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées en utilisant la fonction `prcomp` dans le package `stats` de R v.3.2.2 (R, équipe de base, 2016) sur les données transformées en log et normalisées. Les résultats ont été visualisés avec la fonction `ggbiplot`.

(<https://github.com/vqv/ggbiplot>).

III.2.3- Cytogénétique :

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé les racines poussant sur les rhizomes des iris collectés du Liban. Les rhizomes sont emballés dans des papiers humides et mis à 4°C. Une semaine après, les racines poussent (Figure 15).



Figure 15 : Des racines poussant sur un rhizome d'*Iris bismarckiana*

Les apex racinaires sont détachés des racines à l'aide d'un scalpel avant de subir :

-Un pré-traitement : des racines de 0,5 cm prélevées en milieu de journée, sont par la suite trempées dans de la colchicine à 0,05% (agent mitoclasique) pendant 4h 30 min. à température ambiante; ainsi les divisions mitotiques sont bloquées au stade métaphasique.

-Une fixation : Les tissus racinaires subissent une fixation au moins 24h à 4°C dans une solution d'éthanol acétique (3:1, v/v) pour bloquer les divisions cellulaires permettant ainsi la conservation de l'intégrité structurale des chromosomes.

-Un stockage : Les racines ainsi traitées sont conservées dans de l'éthanol 70% à 4°C, aussi longtemps que voulu, et sont prêtes à subir l'hydrolyse.

-Une hydrolyse : Afin d'effectuer un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelle, et pour la perméabilisation des membranes cellulaires avant les colorations, une hydrolyse de cellules est nécessaire.

Selon la coloration réalisée, deux types d'hydrolyse sont effectués :

- **Pour la coloration de Feulgen ou au nitrate d'argent** : le ramollissement des tissus est effectué avec l'acide chlorhydrique 1N pendant 12 min. à 60°C.
- **Pour l'hybridation *in situ*** : Les racines sont incubées dans du tampon citrate pendant 15 min. (acide citrique + citrate de sodium) pour réhydratation, après décongélation des solutions enzymatiques, les racines y sont ramollies à 37°C pendant 20 min. ou plus. La durée de l'hydrolyse dépend de l'âge et la dureté des racines. Les tissus racinaires ainsi ramollis sont ensuite déposés sur la lame et rincés légèrement à l'aide d'une solution d'acide acétique à 45% fraîchement préparée. L'écrasement s'effectue ensuite dans 1 à 2 gouttes de cette même solution d'acide acétique à l'aide d'un bâtonnet métallique. Afin d'assurer un bon étalement des chromosomes, une pression homogène est exercée sur la lamelle à l'aide du pouce. Ainsi, les lames sont prêtes à être observées au microscope en contraste de phase. Après avoir vérifié la qualité de l'étalement par observation au microscope photonique, les plaques métaphasiques sont repérées et marquées à l'aide d'une lame quadrillée (lame chercheuse). Les lames sont déposées dans congélateur à -80°C pendant la nuit (ou au moins quelques heures), puis la lamelle est décollée à l'aide d'un coup sec de la lame de scalpel. La préparation est rapidement rincée à l'éthanol absolu et séchée verticalement pendant 1 à 2 jours avant la coloration.

1- Coloration de Feulgen :

Après rinçage de 10 min. à l'eau distillée, les méristèmes sont hydrolysés dans de l'HCl 1N pendant 12 min. à 60°C. L'hydrolyse a pour but de ramollir les tissus et de libérer les groupements aldéhydes de l'ADN. La coloration est réalisée selon la technique de Feulgen et Rossenbeck (1924). Les groupements aldéhydes libérés incubés en présence du réactif de Schiff

pendant 30 min. à l'obscurité, donnent une coloration rouge aux chromosomes. L'écrasement est effectué selon la méthode d'Östergreen (1962). Les apex colorés sont sectionnés et déposés sur une lame dans une goutte de carmin acétique. La préparation est recouverte d'une lamelle et écrasée doucement en tapotant à l'aide d'une baguette de bois. Le comptage chromosomique est fait au microscope photonique.

2- Coloration des nucléoles au nitrate d'argent :

Sur la préparation qui a séché pendant plus de 24h, on dépose une grosse goutte d'une solution de nitrate d'argent à 50%. On couvre la préparation avec une lamelle en plastique opaque et on laisse l'imprégnation s'effectuer dans une chambre humide à 60°C pendant 24h. Après 24h on observe si la coloration est de bonne qualité. La préparation est ensuite rincée à l'eau distillée avant d'effectuer un montage dans l'Euparal ou dans l'huile à immersion. L'observation et le comptage des nucléoles sont effectués au microscope photonique.

3- Marquage des bases GC par la chromomycine A₃ :

Le matériel est prétraité, fixé et préparé comme pour l'hybridation *in situ*. La coloration à la chromomycine est effectuée selon Schweizer (1976) avec de légères modifications. Pour réhydrater la préparation, on dépose sur la lame plusieurs gouttes du tampon MacIlvaine pH7+MgSO₄ qu'on laisse incuber pendant 15 min.

On se débarrasse du tampon en secouant la lame. On dépose une grosse goutte de chromomycine A₃ 0,02g/100 mL pendant 90 min. à l'obscurité.

On rince rapidement avec le tampon MacIlvaine pH7 avant d'effectuer une contre coloration des chromosomes par du vert de méthyle à 0.1% pendant 7 min. à l'obscurité. On rince ensuite avec tu tampon MacIlvaine pH 5,5. On égoutte la lame (ne pas laisser sécher complètement). Le montage est ensuite effectué dans une goutte de Citifluor ou dans le cas échéant dans une goutte de glycérol : tampon MacIlvaine pH=7 + MgCl₂ (1 : 1).

L'observation se fait au microscope à épifluorescence Zeiss Axiophot avec le filtre approprié : 07 (excitation 457 nm, émission 530 nm).

4- Technique d'hybridation in situ :

Pour localiser les sites d'ARNr chez les espèces d'*Iris*, nous avons hybridé *in situ* deux types de sondes : la sonde d'ADN ribosomique 18S-5.8S-26S (35S) d'*Arabidopsis thaliana*, représentant un fragment de 4 kb Eco RI, et de l'ADN ribosomique 5S de blé, représentant un fragment de 410 pb BamHI. Les sondes 5S et 35S ont été marquées respectivement avec les fluorochromes Digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics) par la technique de Réaction Polymérisation en Chaîne (PCR), et CY3 (Amersham) par Nick-Translation en suivant les instructions du fabricant du kit Amersham.

Avant de commencer l'application de la technique, les lames contenant les préparations chromosomiques sont lavées avec de l'éthanol à 100%, et laissées sécher à température ambiante. Ensuite 200µl d'RNase (10mg/ml diluée au 1/100^{ème}) sont déposés sur chaque lame. Les lames sont recouvertes de lamelles en plastique en évitant la formation des bulles d'air, et mises dans une chambre humide (boite tapissée de Kleenex imbibés de 2×SSC) pendant 1h à 37°C.

Après, les lamelles sont enlevées et les lames sont rincées avec du 2×SSC dans un portoir sous agitation lente pendant 5 min. et à température ambiante. 50 à 70 µl de la pepsine (1mg/mL dans HCl 1N) est déposé par lame, les lames sont recouvertes d'une lamelle plastique et mises dans une chambre humide (boite tapissée de kleenex imbibées de 2×SSC) pendant 30 min. à 37°C.

Ensuite les lames sont lavées dans un portoir avec du 2×SSC sous agitation lente pendant 5 min. à température ambiante, ce lavage est répété 3 fois. Pendant le premier lavage de 5 min, les lamelles sont laissées se décoller seules sur les lames puis retirées à l'aide d'une paire de pince.

Les lames sont déshydratées dans une série d'éthanol dans un portoir sous agitation lente à température ambiante :

- Ethanol à 70% pendant 3 min.
- Ethanol à 90% pendant 3 min.
- Ethanol à 100% pendant 3 min.

Les lames sont placées sur un portoir et laisser sécher pendant une 1h30. Le mélange contenant la sonde est préparé et dénaturé pendant 10 min. à 65°C puis mis immédiatement dans la glace au moins 15 min. 50 µl du mélange contenant la sonde sont déposés sur les lames puis recouvertes avec une lame en plastique. Les lames sont placées (4 par 4) dans une boîte en plastique dont le fond est lavé à l'alcool à 95%. Pour éviter l'entrée de l'humidité, il est possible de scotcher l'ouverture. La boîte est mise dans un bain-marie à 72°C pendant 10 min. (pour la dénaturation des chromosomes sur les lames) puis transférée dans un bain marie à 55°C pendant 5 min. Les lames sont retirées doucement et mises sur un portoir dans la boîte tapissée de Kleenex imbibée de 2×SSC préalablement chauffée à 37°C, température d'hybridation et laissées incuber toute la nuit à 37°C. Les lavages de stringence sont destinés à débarrasser les lames de l'ADN sonde non hybridé spécifiquement. Ils sont réalisés à 42°C avec agitation douce. Une température plus élevée augmente la spécificité d'hybridation, mais diminue l'intensité du signal fluorescent. Mettre dans un bain-marie à 42°C et à faible vitesse d'agitation les tampons à chauffer : 600ml de 2×SSC, 20% formamide, 0,1 ×SSC,

100ml 4×SSCT. Mettre ensuite les lames successivement dans :

- 2×SSC à température ambiante sous agitation pendant 3 min.
- 2×SSC à 42°C pendant 3 ×5 min.
- 20% formamide à 42°C pendant 2×5 min.
- 0,1 ×SSC à 42°C pendant 1 ×5 min.
- 2 ×SSC à 42°C pendant 2× 5 min.
- 4× SSCT à 42°C pendant 5min.
- 4 ×SSCT à température ambiante sous agitation pendant 5 min.

Après le dernier lavage, les lames sont drainées sur un mouchoir et laissées se sécher quelques instants à température ambiante. Les lames sont traitées avec un tampon de détection (tampon préparé extemporanément) : 5% BSA : 0,1g de BSA dans 2 ml 4×SSCT. 100µl de tampon de détection sont déposés sur chaque lame. Les lames sont recouvertes par une lamelle en plastique et laissées 5 min. à température ambiante. L'Anti-Digoxigenin-Fluorescein est sorti et placé dans la glace, la solution d'incubation est incubée en ajoutant 6µl anti-dig dans 444µl de tampon de détection (concentration finale : 20g/ml). 50µl sont déposés par lame, les lames sont recouvertes d'une lamelle en plastique et incubées à 37°C pendant une heure dans une chambre humide (Kleenex avec 2×SSC). Les lavages sont à réaliser 3 fois, à chaque fois pendant 5 min. dans

4×SSCT à température ambiante sous agitation douce. La lamelle en plastique s'élimine toute seule lors du premier lavage, la retirer à l'aide d'une paire de pince. Les lames sont séchées sur un portoir sans les assécher en les protégeant de la lumière. La contre-coloration destinée à colorer entièrement les chromosomes, est effectuée à la température ambiante et à l'obscurité, en utilisant le DAPI ou l'IP dans le milieu de montage VECTASHIED. Les lames sont observées le lendemain. En attendant, elles sont laissées au frigo à l'abri de la lumière. Les observations sont effectuées sur un microscope à épifluorescence Zeiss Axiophot équipé d'un coulisseau portant les filtres d'excitation et d'émission adaptés aux fluorochromes utilisés : 01 DAPI (longueur d'onde d'excitation de 365 nm et d'émission de 480 nm), 09 (FITC) pour dig-oxygénine (excitation 490 nm, émission 525 nm), 15 pour CY3 (excitation 540 nm, émission 580 nm).

Les signaux d'hybridation sont analysés en utilisant une caméra CCD de haute sensibilité (Prinston) couplée à un logiciel d'acquisition et de traitement d'images (MetaVue).

Chapitre IV : Résultats et Discussion

1- Taille du génome

Nous avons fourni des données sur la taille du génome pour les 63 populations d'*Iris* des sous-genres *Hermodactyloides*, *Iris*, *Limniris* et *Scorpiris*, dont 26 espèces de la section *Oncocyclus* (Tableau 7). Dans l'ensemble, les valeurs C variaient de 2,84 fois, allant de 10,66 pg/2C pour *I. bloudowii* Bunge ex Ledeb à 30,31 pg /2C pour *I. hoogiana* Dykes, tous deux appartenant à la section *Regelia* Lynch du sous-genre *Iris*. Parmi la section *Oncocyclus*, les valeurs 2C ne varient que de 1,27 fois, allant de 15,13 pg/2C pour *I. camillae* Grossh. à 19,24 pg/2C pour *I. bismarckiana*. Un histogramme sur les valeurs 2C des 63 populations différentes des espèces d'*Iris* est présenté dans la Figure 16. Des histogrammes de cytométrie en flux présentés dans la Figure 18 sont obtenus à partir de l'analyse d'*I. korolkovii* en utilisant *Pisum sativum* comme étalon et à partir du co-traitement d'*I. acutiloba* subsp. *lineolata* et *I. sprengeri*.

Tableau 7 : Résultats de la taille du génome. Le nombre chromosomique, le nombre de loci ADNr 35S et les données écologiques sont indiqués selon la disponibilité de ces données.

<i>Iris</i> (sous-genre, section, espèce)	2C (SD) en pg	Et ¹	T ²	2n ³	PS ⁴	Origine, altitude (m)
Sous-genre <i>Hermodactyloides</i>						
<i>I. histrio</i>	24,96 (0,51)	3	2	20	3	Liban, Barouk, 1100 m
Sous-genre <i>Iris</i>						
Section <i>Oncocyclus</i>						
<i>I. acutiloba</i> subsp. <i>lineolata</i>	16,73 (0,10)	1	1	20	1	Arménie (RBGK 2012-1109), 1000 m
<i>I. acutiloba</i> subsp. <i>lineolata</i>	15,94	2	2	20	1	Leg. Frédéric Dépalle
<i>I. acutiloba</i>	16,72 (0,17)	2	2	20	1	
<i>I. antilibanotica</i>	16,83 (0,54)	3	2	20*	1	Liban, Khreibeh, 1337 m
<i>I. antilibanotica</i>	17,05 (0,54)	3	2	20*	1	Liban, Khreibeh, 1337 m
<i>I. assadiana</i>	17,44 (0,56)	3	2	20	1	Syrie
<i>I. assadiana</i>	17,61 (0,55)	2	2	20	1	Leg. Frédéric Dépalle
<i>I. atropurpurea</i>	18,53 (0,14)	1	1	20	1	Israël (RBGK 1998-2808)
<i>I. barnumiae</i> x <i>I. paradoxa</i> <i>choschab</i>	f.17,31 (0,05)	1	1	20	1	(Leg. Ray Drew, RBGK)
<i>I. bismarckiana</i>	18,24 (0,59)	3	2	20*	1	Liban, Sarada, 435 m
<i>I. bismarckiana</i>	19,24 (0,54)	2	2	20	1	Jordanie
<i>I. camillae</i>	15,13 (0,49)	3	2	20	1	Azerbaïdjan
<i>I. camillae</i>	16,40 (0,55)	2	2	20	1	
<i>I. cedreti</i>	16,83 (0,5)	3	2	20*	1	Liban, Bcharre, 1900 m
<i>I. damascena</i>	16,44 (0,04)	3	2	20	1	Syrie
<i>I. haynei</i> var. <i>jordana</i>	16,20 (0,52)	3	2	20	1	Jordanie
<i>I. iberica</i> subsp. <i>elegantissima</i>	17,89 (0,18)	1	1	20	1	Turquie (RBGK 1999-4347), 2200 m
<i>I. iberica</i> subsp. <i>iberica</i>	17,25 (0,05)	1	1	20	1	Inconnue (RBGK 2002-2632)
<i>I. kirkwoodii</i> subsp. <i>kirkwoodii</i>	17,83 (0,06)	1	1	20	1	Turquie (RBGK 1994-2407)
<i>I. kirkwoodii</i>	17,50	2	2	20	1	Syrie [1]

<i>I. kirkwoodii</i>	17,25 (0,15)	2	2	20	1	Syrie [2]
<i>I. lortetii</i>	16,53 (0,19)	3	2	20*	1	Liban, Mays el Jabal, 640 m
<i>I. lortetii</i>	16,38 (0,29)	2&3	2	20	1	Israël
<i>I. mariae</i>	15,34 (0,5)	3	2	20	1	Israël
<i>I. meda</i>	15,21 (0,49)	3	2	20	1	Iran [1]
<i>I. meda</i>	15,33 (0,28)	2	2	20	1	Iran [2]
<i>I. mirabilis</i>	15,69 (0,10)	2	2	20	2	Iran
<i>I. nigricans</i>	16,68	3	2	20	1	Palestine, Bani Naim
<i>I. paradoxa</i>	17,32 (0,08)	1	1	20	2	Arménie (RBGK 1977-4470)
<i>I. petrana</i>	18,17 (0,11)	1	1	20	1	Inconnue (RBGK 1990-3180)
<i>I. petrana</i>	18,01 (0,48)	2	2	20	1	Jordanie
<i>I. samariae</i>	16,56 (0,04)	3	2	20	1	Israël
<i>I. sari</i>	18,03 (0,11)	1	1	20	1	Inconnue (RBGK 2011-1955)
<i>I. schelkovnikowii</i>	16,11 (0,04)	2	2	-	1	Leg. Frédéric Dépalle
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	16,36 (0,53)	3	2	20	1	Liban, Chabrouh, 1900 m
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	16,68 (0,53)	3	2	20*	1	Liban, Ehmej, 1217 m
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	16,90 (0,49)	3	2	20*	1	Liban, Hazzerta, 1530 m
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	16,22 (0,37)	3	2	20*	1	Liban, Dahr El-Baydar, 1640 m
<i>I. sprengeri</i>	19,20 (0,16)	1	1	20	1	Turquie (RBGK 2011-1958), 1000 m
<i>I. westii</i>	16,00 (0,75)	3	2	20*	1	Liban, Tawmet Jezzine, 1300 m
<i>I. yeruchamensis</i>	16,54 (0,05)	3	2	-	1	Israël
<i>I. yebrudii</i> subsp. <i>yebrudii</i>	16,20 (0,11)	3	2	20	1	Syrie [1]
<i>I. yebrudii</i>	16,58 (0,17)	2	2	20	1	Syrie [2]
<i>I. sp.</i>	16,00 (0,05)	2	2	-	1	Iran
<i>I. sp.</i>	15,70 (0,08)	2	2	-	1	Azerbaïdjan
Section Regelia						
<i>I. afghanica</i>	14,67 (0,47)	3	2	22	3	Afghanistan
<i>I. bloudovii</i>	10,66 (0,13)	1	1	16, 26	3	Sibérie (RBGK 2004-2257)
<i>I. hoogiana</i>	30,31 (0,13)	1	1	44	3	Tadjikistan (RBGK 2010-2098)
<i>I. korolkovii</i>	16,03 (0,03)	4	1	22- 33- 44	3	Inconnue (RBGK 2010-2101)
<i>I. lineata</i>	29,77 (0,04)	1	1	44	3	Tadjikistan (RBGK 1993-3285)
<i>I. scariosa</i>	13,09 (0,18)	1	1	24	3	Kazakhstan (RBGK 2014-643)
<i>I. stolonifera</i>	30,24 (0,11)	1	1	44	3	Pamir (RBGK 1984-91)
Section Iris						
<i>I. albicans</i>	24,84 (0,65)	3	2	44-48	3	Liban, Aley, 880 m
<i>I. mesopotamica</i>	29,84 (0,79)	2	2	48	3	Liban, Mrouje, 1200 m
Sous-genre Linniris						
<i>I. longipetala</i>	15,84 (0,19)	2	2	86-88	1	Leg. Frédéric Dépalle
<i>I. pseudacorus</i>	11,03 (0,36)	3	2	34	3	Liban, Kfarzabad, 980 m
<i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	17,80 (0,28)	3	2	40*	3	Liban, Baadarane, 1200 m
Sous-genre Scorpiris						
<i>I. palaestina</i>	21,55 (0,52)	3	2	24	3	Liban, Joun, 460 m
<i>I. persica</i>	20,99 (0,05)	1	1	20-24	3	Turquie (RBGK 2014-1875), 1200 m
<i>I. persica</i>	18,89 (0,32)	3	2	24*	3	Liban, Quaa, 700 m
<i>I. persica</i>	19,05	3	2	20-24	3	Liban, Yammouneh
<i>I. regis-uzzaiae</i>	22,80 (0,03)	1	1	20	3	Israël (RBGK 1987-2212), 500 m

¹Etalon: (1) *Allium cepa* 2C=34,89 pg (Doležel *et al.* 1998), (2) *Artemisia arborescens* 2C=11,43 pg (Garcia *et al.* 2006), (3) *Triticum aestivum* 2C=30,90 pg (Marie & Brown 1993), (4) *Pisum sativum* 'Ctirad' 2C=9,09 pg (Doležel *et al.* 1998).

²Tampon: (1) GPB (Loureiro *et al.* 2007) avec 3% de PVP-40 et 8% de triton ajouté, (2) Tampon de Galbraith (Galbraith *et al.* 1983).

³Nombre chromosomique: l'astérisque indique les données déterminées par Abdel Samad *et al.* 2016 (Soumis) sur les mêmes individus mesurés pour la taille du génome; d'autres données sont mentionnées par « Chromosome counts database » (Rice *et al.* 2015).

⁴Stratégie de Pollination: (1) un abri mimique, (2) la tromperie sexuelle, (3) une autre stratégie de pollinisation (de Vereecken *et al.* 2012).

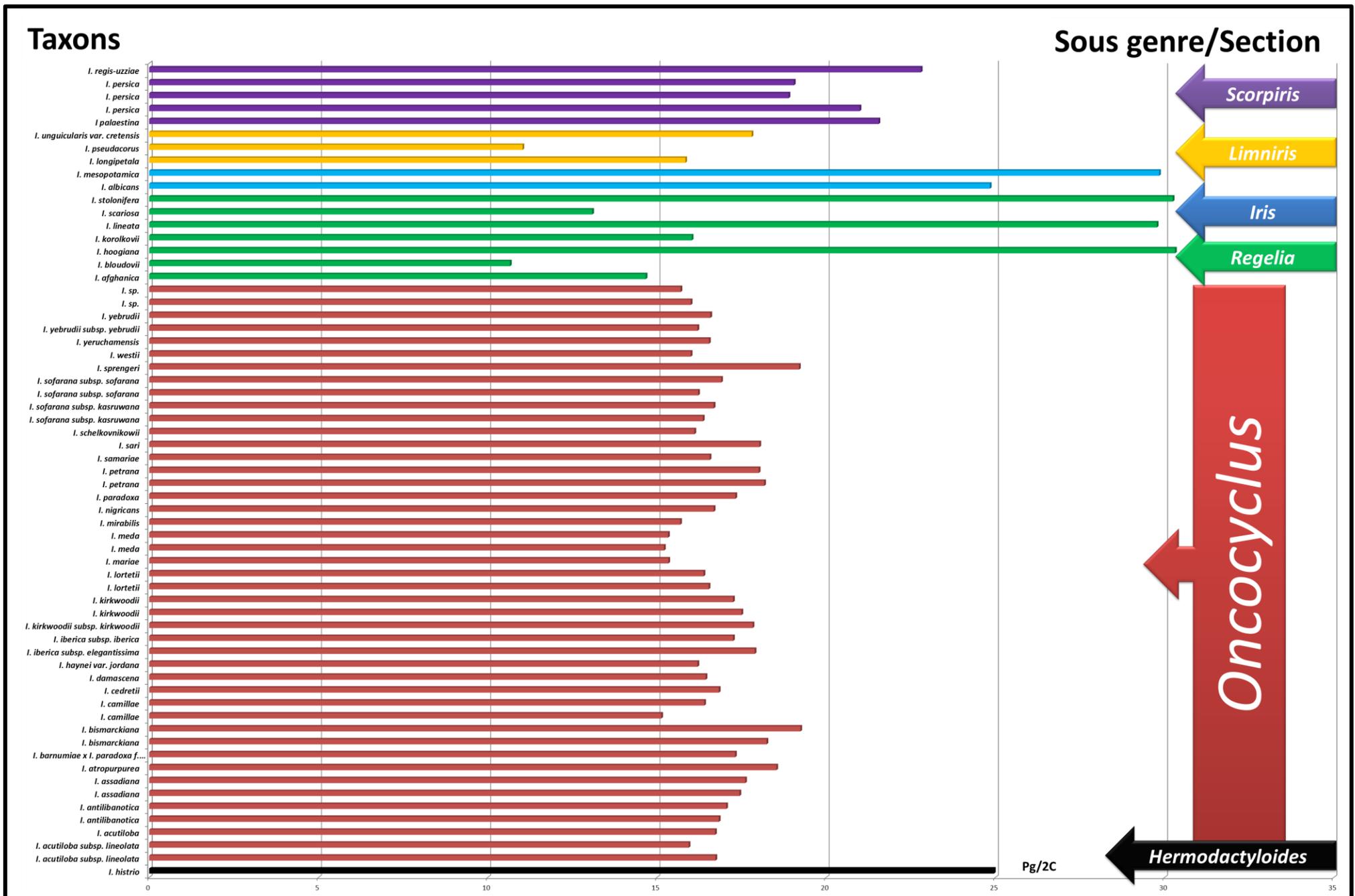


Figure 16: Un histogramme sur les valeurs 2C des 63 populations différentes des espèces d'*Iris*.

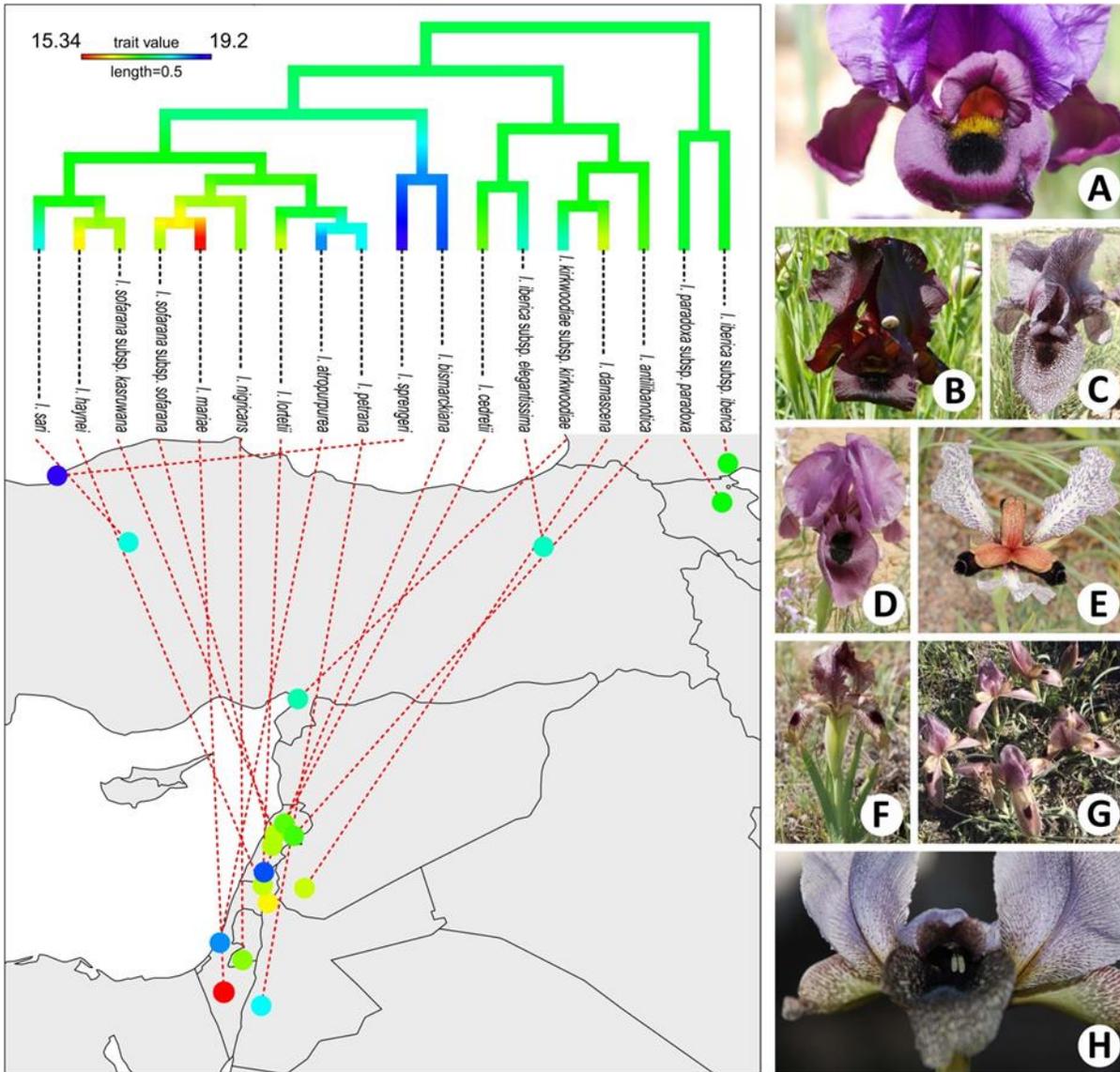


Figure 17: Phylogénie des espèces *Oncocyclus* (Wilson *et al.* 2016) tracée sur la carte géographique et montrant la reconstruction de la taille du génome ancestrale (à gauche) avec des images illustrant la diversité du phénotype floral parmi des iris *Oncocyclus* (à droite). A. *I. antilibanotica*. B. *I. atropurpurea* (crédit: Mat Knight & Zachy Evenor). C. *I. cedreti*. D. *I. mariae* (crédit: Hedva Sanderovitz). E. *I. paradoxa* (crédit: CT Johansson). F. *I. sari* (crédit: Zeynel Cebeci). G. *I. sprengeri* (crédit: Kohran 1923). H. *I. westii*.

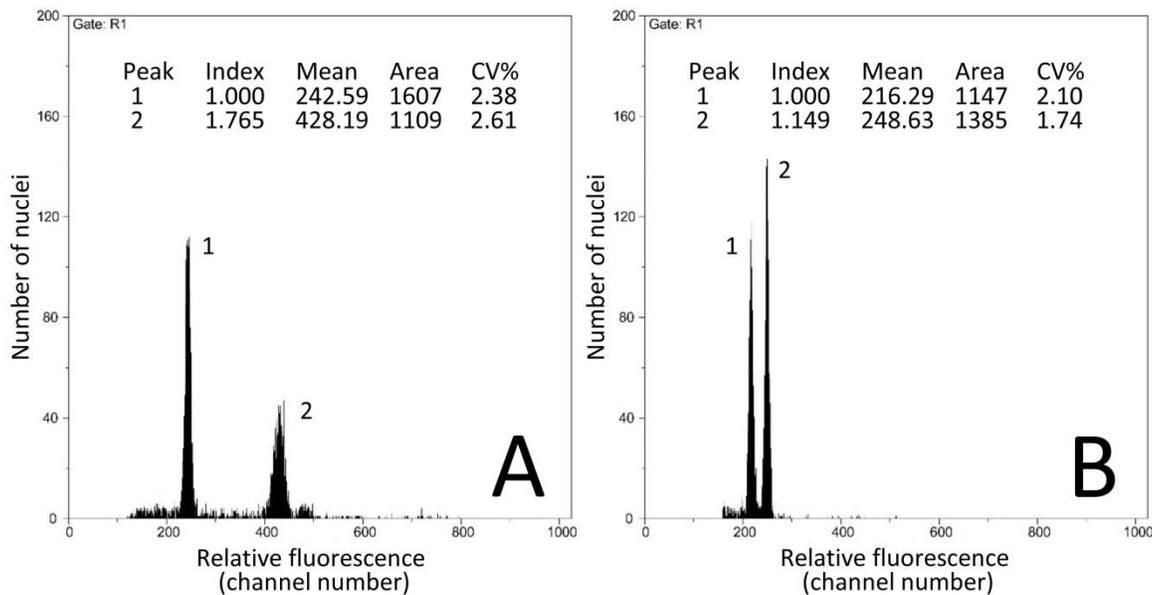


Figure 18: Histogrammes obtenus par cytométrie en flux. A. à partir de l'analyse d'*I. korolkovii* (16,03 pg / 2C, pic 2) en utilisant *Pisum sativum* (9,09 pg / 2C, pic 1) en tant qu'étalon. B. à partir du co-traitement d'*I. acutiloba* subsp. *lineolata* (16,73 pg / 2C, pic 1) et *I. sprengeri* (19,20 pg / 2C, pic 2).

La Figure 16 représente un histogramme sur les valeurs 2C des 63 populations différentes des espèces d'*Iris*. Nous remarquons que la taille du génome est un facteur de différence qui sépare différents sous-genres et sections : sous-genre *Hermodactyloides*, sous-genre *Limniris*, sous-genre *Scorpiris*, section *Oncocyclus*, section *Regelia*, section *Iris*. Pour la section *Oncocyclus*, la valeur la plus fréquente est de 16 pg/2C. Pour la section *Regelia*, les espèces tétraploïdes comme *I. hoogiana* (30,31 pg/2C) ont à peu près la même valeur 2C égale à 30 pg/2C, les espèces diploïdes comme *I. afghanica* (14,67 pg/2C) présentent des valeurs différentes. Les valeurs des espèces mesurées du sous-genre *Scorpiris* sont très proches entre 21 et 22 pg/2C, tandis que celles du sous-genre *Limniris* sont différentes (entre 11 et 17 pg/2C) et de la section *Iris* aussi (entre 25 et 30 pg/2C). Concernant *I. persica*, on remarque une grande différence dans la valeur 2C, entre la population Turque (21 pg/2C pour un échantillon) et celle du Liban (19 pg/2C pour 6 échantillons).

La phylogénie des espèces *Oncocyclus* (Wilson *et al.* 2016) tracée sur la carte géographique et montrant la reconstruction de la taille du génome ancestrale (Figure 17), prouve encore une fois ce qui a été suggéré par plusieurs auteurs (Davis 1946, Gavrilenko 1975, Wilson *et al.* 2016) concernant la région ancestrale des *Oncocyclus*. La Caucasic (Géorgie, Arménie et Azerbaïdjan) est la région ancestrale et le centre de diversification de la section *Oncocyclus*. Les *Oncocyclus* les plus anciens semblent venir des régions du sud-ouest de la mer Caspienne, les espèces du Levant étant des plus récentes (Davis 1946). Mais le sens de variation de la taille du génome pour les espèces du Levant reste inconnu, car elles présentent la plus petite et la plus grande valeur 2C.

Pour la section *Oncocyclus*, la valeur de la taille du génome la plus fréquente est au alentour de 16 pg/2C. Quelques valeurs s'écartent de cette moyenne mais n'en sont pas très loin comme 19 pg/2C pour *I. bismarckiana*. Cette similitude des valeurs 2C parmi les espèces de la section *Oncocyclus* peut être liée à sa répartition géographique restreinte et montre que l'*Oncocyclus* est une section récente qui est en cours d'évolution.

2- Reconstruction phylogénétique moléculaire

Au début de notre étude moléculaire sur les iris, nous avons commencé par l'amplification de la région ITS, en utilisant deux amorces universelles ITS-4 et ITS-5, la taille attendue était de 600 bp (Figure 19). Mais nous avons eu des problèmes de séquençage, 8 de 66 échantillons seulement ont pu être séquencés (Figure 20).

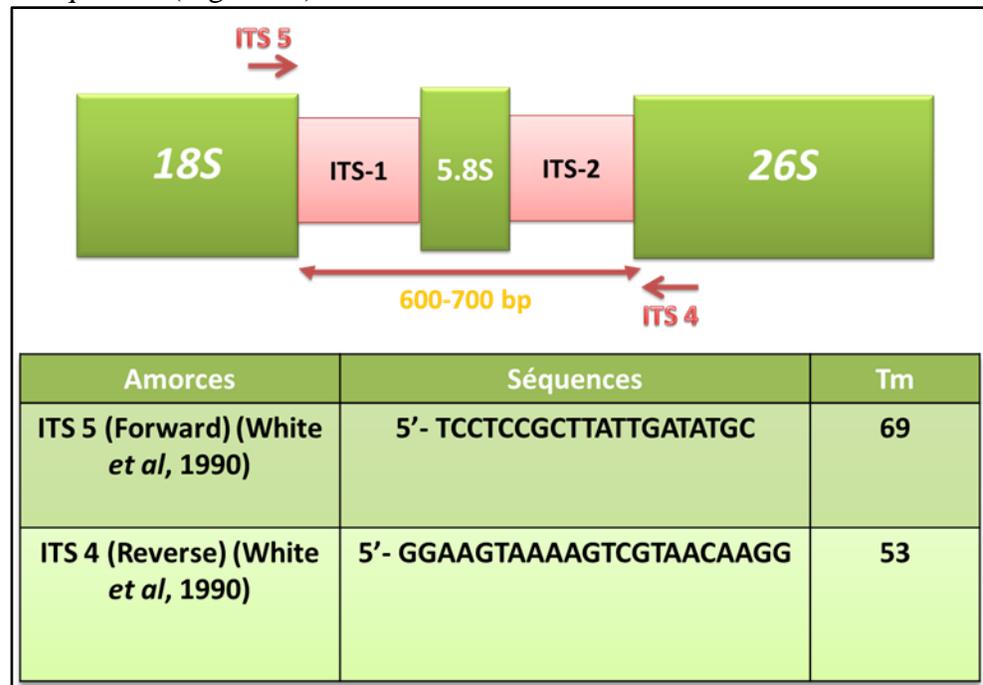


Figure 19: La région ITS et les deux amorces universelles ITS-4 et ITS-5 utilisées.

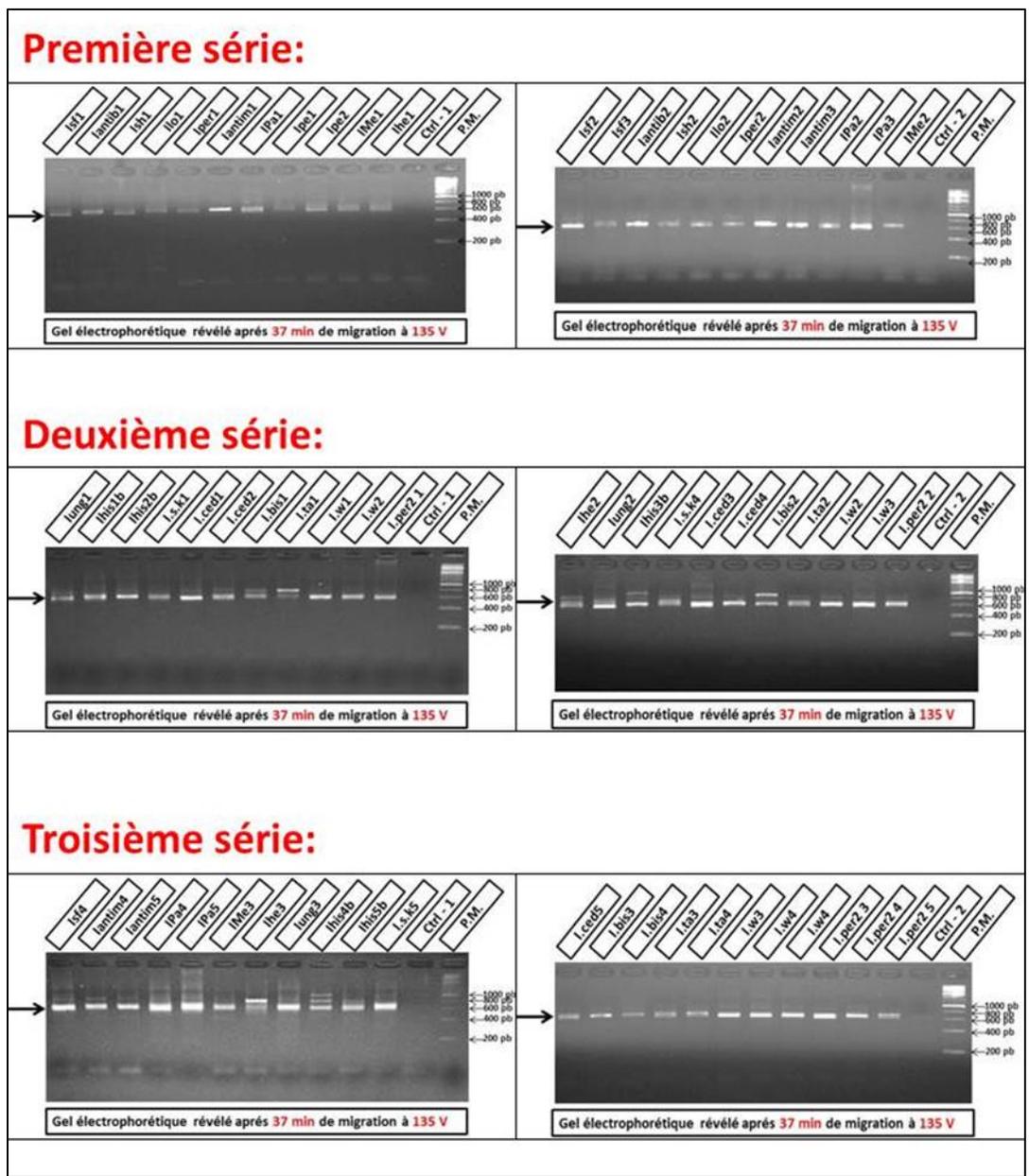


Figure 20: Les gels électrophorétiques montrant les produits PCR de 66 échantillons.

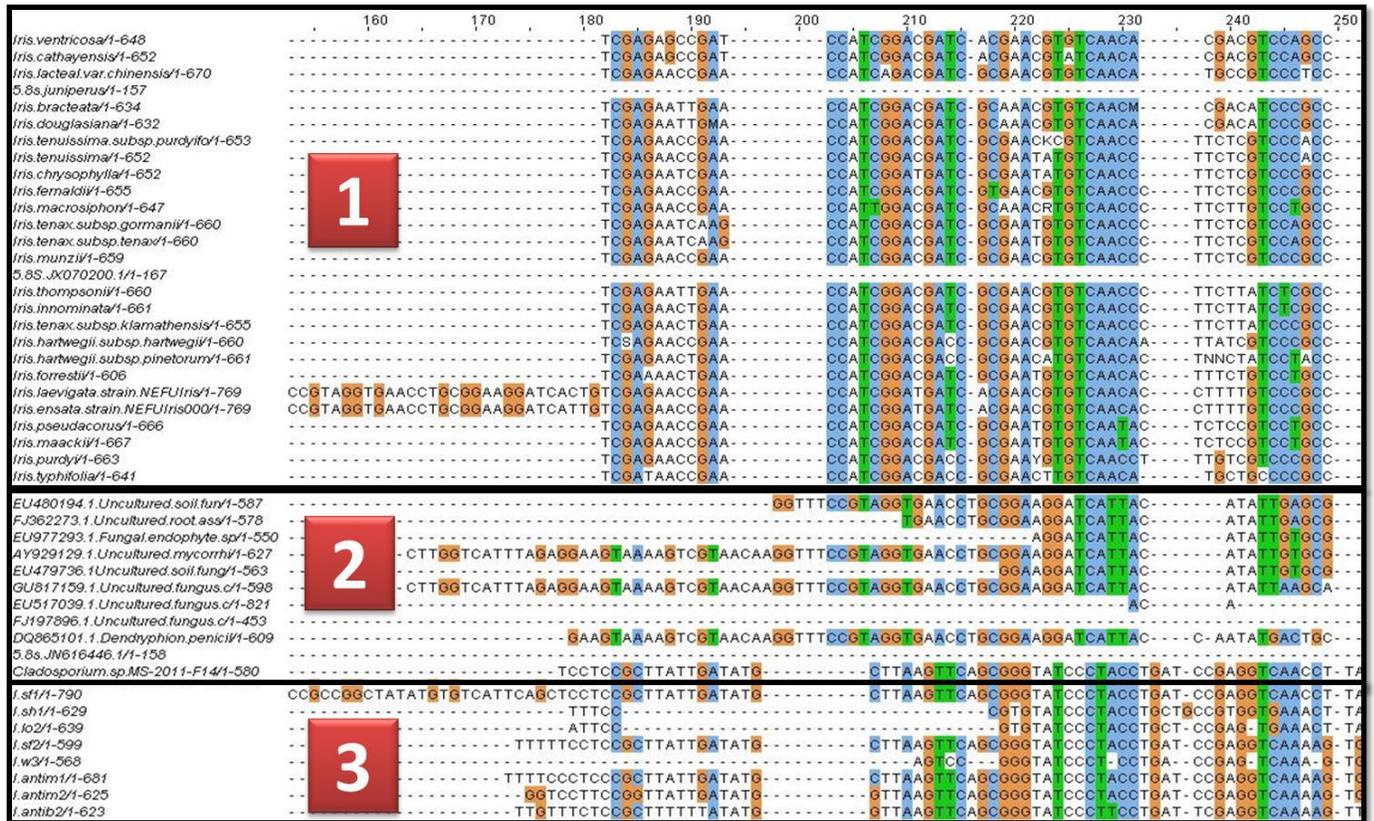


Figure 21: 1. Les séquences des espèces d'*Iris* publiées sur NCBI; 2. Les séquences des espèces de champignons endophytes publiées sur NCBI; 3. Nos séquences des espèces d'*Iris*.

En alignant les 8 séquences sur NCBI, nous avons remarqué la forte ressemblance entre nos séquences et les séquences d'un champignon endophyte (*Cladosporium sp.*, *Dendriphion sp.*) et non pas les séquences des iris déjà publiées (Figure 21), donc les ITS du champignon endophyte qui est présent dans les cellules des iris ont été amplifiés au lieu des ITS des iris, car les amorces universelles ont été développées à partir des champignons endophytes. Ainsi, leur haute spécificité pour ces organismes est compréhensible (White *et al.* 1990). La seule solution était de fabriquer une autre amorce spécifique de la région ITS des iris et non pas celle du champignon. La nouvelle amorce fabriquée était nommée ITS-N1 (Figure 22), nous l'avons utilisée cette fois-ci avec l'amorce ITS-4 déjà utilisée. Les résultats étaient positifs (Figure 23) et les produits PCR étaient tous séquencés mais non pas été utilisés dans la construction phylogénétique, car il y avait plusieurs séquences superposées, et cela nécessite la réalisation systématique du clonage pour les isoler. Cela peut être dû à des champignons endophytes mais aussi à la présence de plusieurs copies ITS d'*Iris*, en particulier s'il y a hybridation et introgression entre espèces.

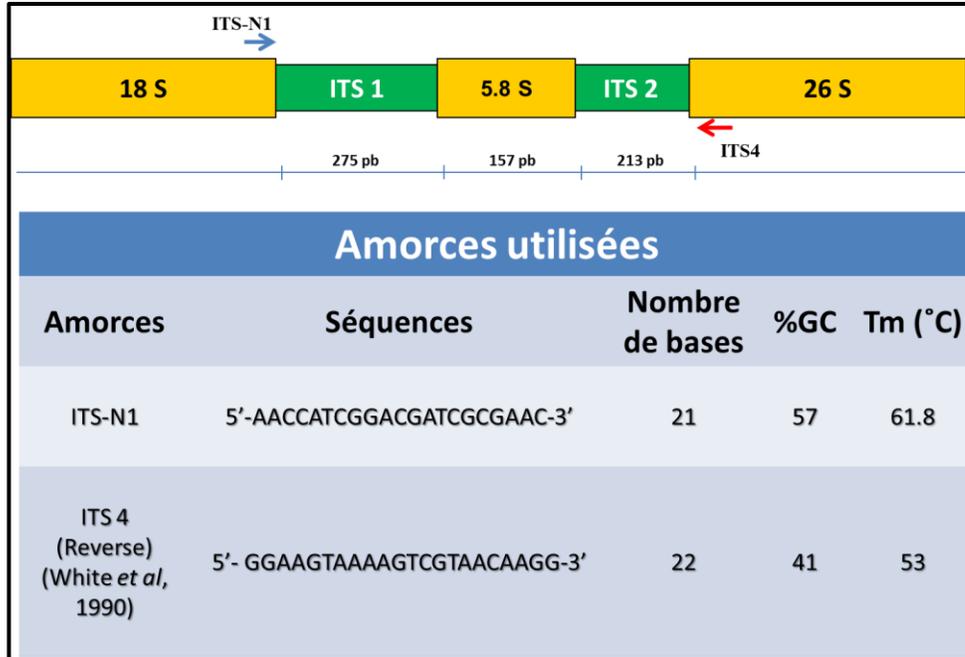


Figure 22: La nouvelle amorce utilisée ITS-N1.

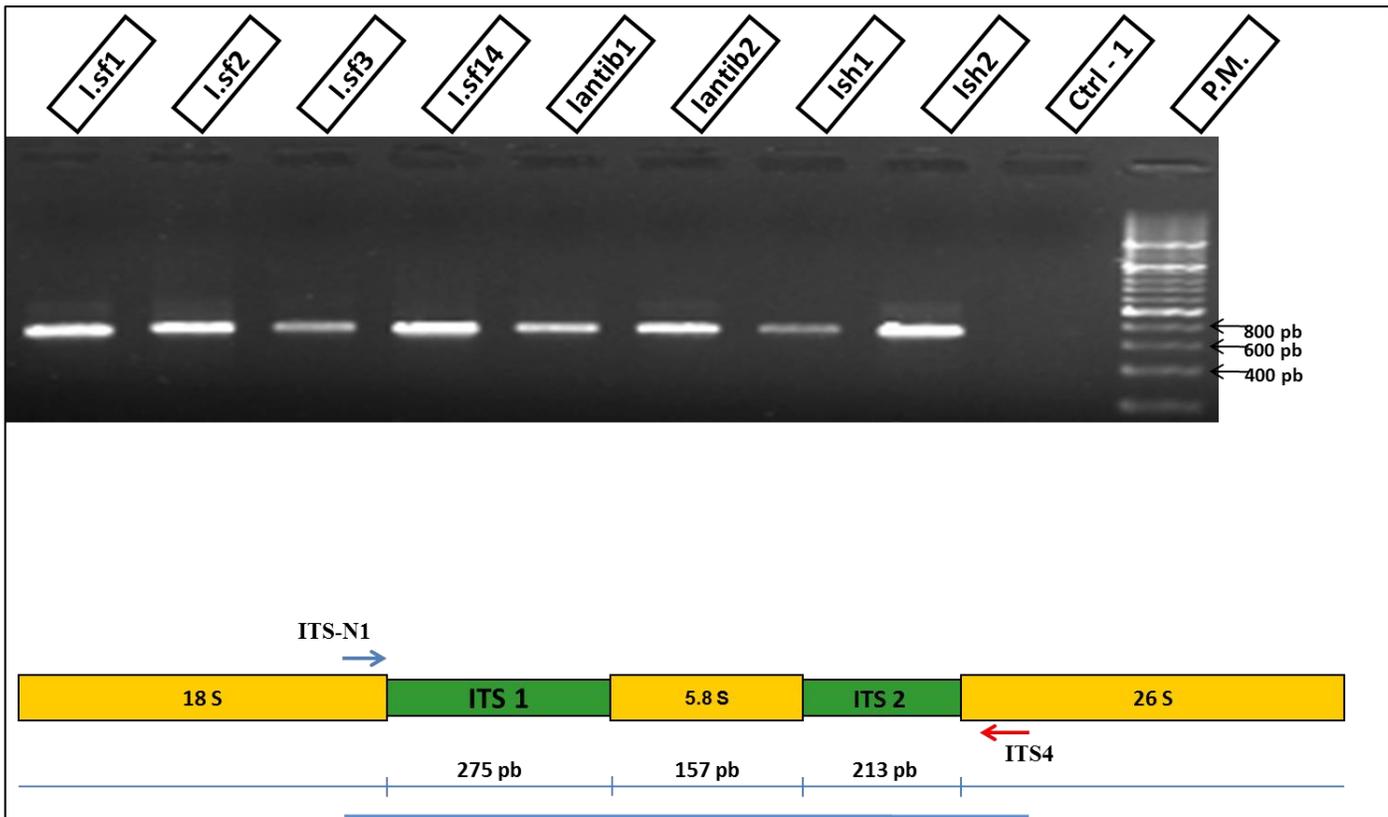


Figure 23: Un gel électrophorétique montrant les produits PCR de quelques échantillons.

L'arbre consensus obtenu par l'analyse bayésienne des marqueurs chloroplastiques est présenté Figure 24. La topologie de cette inférence est largement congruente avec les phylogénies moléculaires récemment publiées dans le genre *Iris* (Ikinci *et al.* 2011, Martinez 2010, Mavrodiev *et al.* 2014, Wilson 2004, 2009, 2011). Nos résultats montrent que les iris du Liban se distribuent entre quatre sous-genres : *Hermodactyloides*, *Iris*, *Scorpiris* et *Siphonostylis*, ces derniers présentant tous une valeur de probabilité postérieure significative (PP > 0.95) attestant de leur monophylie, à l'exception du sous-genre *Iris*, dont le support n'est pas significatif (PP = 0.94). Dans le sous-genre *Hermodactyloides*, les différentes accessions d'*I. histrio* forment un groupe monophylétique (PP = 1), frère d'*I. reticulata*. Dans le sous-genre *Siphonostylis*, *I. unguicularis* subsp. *cretensis* provenant d'une population libanaise apparaît plus proche de *I. lazica* (PP = 1) que de l'autre *I. unguicularis* analysé (Wilson, 2009). Au sein du sous-genre *Scorpiris*, les individus d'*I. persica* des populations libanaises de Yammouneh et Quaa rejoignent *I. regis-uzziae*, *I. aucheri* et *I. nusairiensis* (PP = 0.98), et non pas les deux autres individus de *I. persica* analysés (Ikinci *et al.* 2011 ; Wilson 2011), qui apparaissent dans un autre clade. Enfin, dans le sous-genre *Iris*, *I. mesopotamica* se regroupe avec *I. aphylla* et *I. schachtii* dans la section *Iris* (PP = 1), alors que les *Iris* des sections *Oncocyclus*, *Hexapogon* et *Regelia* forment une polytomie (PP = 1). Ces résultats mettent en évidence des problèmes de circonscription pour certaines espèces (ex. *I. unguicularis* et *I. persica*) qui mériteraient une étude plus approfondie. Mais surtout, ils illustrent l'incapacité des marqueurs moléculaires utilisés à résoudre les relations phylogéniques dans les sections *Oncocyclus* et affines, du fait de la radiation évolutive qui a conduit à une diversification très rapide et une faible divergence moléculaire. Malgré l'utilisation de six marqueurs chloroplastiques et d'un marqueur nucléaire, la plus récente phylogénie de la section *Oncocyclus* présente des supports relativement faibles, et de plus, aucune des cinq espèces représentées par deux entités subspécifiques ou plus apparaît monophylétique (Wilson, Padiernos et Sapir 2016). Il faudrait certainement multiplier les marqueurs par du séquençage de nouvelle génération pour pouvoir espérer résoudre les relations phylogénétiques dans un groupe tel que les iris *Oncocycles*.

Toutes les espèces *Oncocyclus* sont capables de produire des descendance vitales croisées, ainsi, selon le SC (Species Concept, concept d'espèce) biologique, ils sont une seule espèce biologique. Les caractères morphologiques quantitatifs sont continus entre les populations et sont

aussi en corrélation avec les conditions environnementales, la prévention de délimitation des espèces selon un SC écologique et phénétique (Sapir & Shmida 2002).

Bien qu'une conclusion systématique des conclusions ci-dessus puisse suggérer la fusion de la plupart des espèces *Oncocyclus* du Levant sud dans un ou quelques taxons, une approche pratique exigerait le contraire. La biologie de la conservation des plantes est principalement basée sur le niveau de l'espèce (Gärdenfors *et al.* 2001, Maddock & du Plessis 1999, Myers *et al.* 2000), mais chez les iris *Oncocyclus*, ne conservant que quelques morpho-espèces ne serait pas suffisant pour préserver la diversité globale (Corien & Avishai 2001). Il est également important de conserver la diversité morphologique et écologique actuelles des iris.

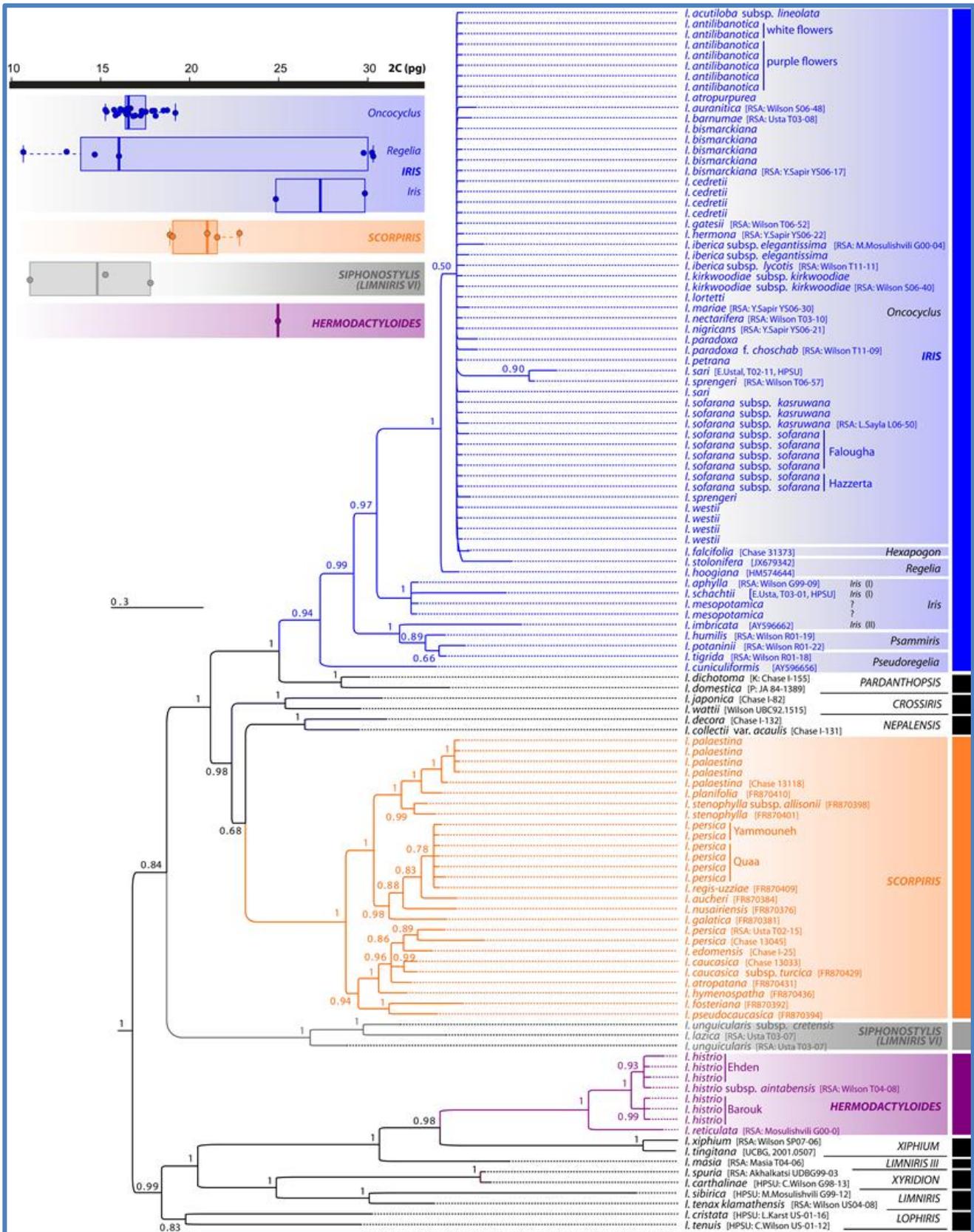


Figure 24: La phylogénie consensus de 83 séquences des taxa d'*Iris* obtenue par l'analyse bayésienne de l'ensemble de données combinées des *matK-trnK* et *trnL-trnF*. En haut à gauche : boxplots avec des valeurs variables individuelles pour les espèces, représentant la distribution des valeurs de la taille du génome à travers les sous-genres et les sections du genre *Iris*.

3- Nombre chromosomique et analyse du caryotype

Un nombre diploïde de chromosomes de $2n = 2x = 20$ avec un nombre chromosomique de base $x = 10$ a été observé dans les études des sept taxons *Oncocyclus*. Leurs caryotypes détaillés ont été établis pour la première fois dans cette étude. Les données morphométriques pour chaque caryotype sont présentées dans l'Annexe 5. Les caryotypes des taxons *Oncocyclus* étaient remarquablement similaires en taille et en symétrie. Les longueurs des chromosomes variaient de 1,8 à 6,7 μm . Pour les autres taxons non *Oncocyclus*, le nombre chromosomique était soit diploïde $2n = 2x = 24$ pour *I. persica*, soit tétraploïde $2n = 4x = 40$ pour *I. unguicularis* var. *cretensis* et $2n = 4x = 48$ pour *I. mesopotamica* avec des nombres chromosomiques de base de $x = 12$ ou de $x = 10$. L'indice d'asymétrie intrachromosomique (M_{CA}) des taxons *Oncocyclus* variait de 68,4 à 73,6%. Pour *I. persica*, *I. unguicularis* var. *cretensis* et *I. mesopotamica*, M_{CA} était de 40,4%, 27,13% et 39,9% respectivement. L'indice d'asymétrie interchromosomique (CV_{CL}) des dix taxons variait de 20,9% à 33%. Les données morphométriques sont représentées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Principales données sur les caryotypes des taxa d'*Iris*.

Taxon	2n (x)	Formule chromosomique (2n)	M_{CA}	CV_{CL}
<i>I. antilibanotica</i>	20 (2x)	4t+2st-t+14st	71	33
<i>I. bismarckiana</i>	20 (2x)	10t+10st	73,2	28,1
<i>I. cedreti</i>	20 (2x)	10t+10st	73,6	31,6
<i>I. lortetii</i>	20 (2x)	18st+2t	68,4	29,6
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Falougha)	20 (2x)	6t+14st	70,6	31,4
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Hazzerta)	20 (2x)	6t+14st	71,6	31,7
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	20 (2x)	4t+16st	68,6	29,3
<i>I. westii</i>	20 (2x)	6t+14st	72,7	30,1
<i>I. mesopotamica</i>	48 (4x)	12m+24st+10sm+2sm-st	39,9	20,9
<i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	40 (4x)	12m+24sm+4st	27,13	24,42
<i>I. persica</i>	24 (2x)	2n=4M-m+12m+6sm+2st	40,4	31,7

M_{CA} - Indice d'asymétrie intrachromosomique (Peruzzi & Eroglu 2013); CV_{CL} - Indice d'asymétrie interchromosomique (Paszko 2006).

Les caryotypes des taxons étudiés ont été établis pour la première fois en utilisant des techniques de mesures classiques des chromosomes sur plusieurs plaques métaphasiques par espèce ou par population. Nos résultats montrent qu'en dépit des particularités de la couleur de la fleur, le caryotype des espèces *Oncocyclus* est resté essentiellement inchangé. Les espèces ont un complément chromosomique extrêmement similaire, bimodal et asymétrique ($2n = 20$) avec quatre paires (ou cinq pour *I. lortetii*) de chromosomes de grande taille et six paires de chromosomes de petite taille. Les petits chromosomes peuvent être différenciés en deux paires satellifères, deux paires avec « bouton visible » comme bras courts, et deux autres paires avec des bras courts « minuscules ». Toutes les espèces de la section *Oncocyclus* étudiées ici se sont révélées diploïdes avec un nombre chromosomique de base $x = 10$ et des caryotypes ayant des caractéristiques très similaires. Ceci est en accord avec les résultats rapportés par Avishai & Zohary (1967) et Mitra (1956) pour une douzaine de taxons *Oncocyclus* analysés. Le nombre constant des chromosomes et les caractéristiques similaires du caryotype peuvent être considérés comme une caractéristique de l'ensemble de la section et un trait de diagnostic séparant la section *Oncocyclus* d'autres sections d'*Iris* comme la section *Regelia* morphologiquement similaire à l'*Oncocyclus* avec un nombre chromosomique $2n = 22$ pour les diploïdes, exemple *I. korolkowii* Regel., et tétraploïdes $2n = 44$ exemple *I. stolonifera* Maxim. et *I. hoogiana* Dykes (Mitra 1956).

En plus du nombre de chromosomes de base de $x = 10$ trouvé dans les sections *Oncocyclus* et *Limniris* du sous-genre *Iris*, $x = 12$ a été trouvé dans *I. mesopotamica* (section *Iris*) et *I. persica* (sous-genre *Scorpiris*). Le nombre chromosomique de base de $x = 8, 10, 11$ et 12 a été rapporté pour le sous-genre *Iris* et $x = 10, 11, 12$ et 13 pour le sous-genre *Scorpiris* (Koçyiğit *et al.* 2013). Lorsque l'on compare le nombre chromosomique de base avec des arbres phylogénétiques du genre *Iris* (Wilson 2004), on n'a pas trouvé une tendance explicite ou corrélation entre le nombre chromosomique de base et la phylogénie. Dans chaque sous-genre, les différents nombres chromosomiques de base existent. Ainsi, nous ne pouvons pas supposer que le plus petit nombre chromosomique de base ni le plus grand soient le nombre de chromosomes ancestral.

Il est à noter que le statut taxonomique d'*I. persica* au Liban est encore un sujet de débat. En fait, Hall & Seisums (2014) ont examiné certaines populations d'*I. persica* du Liban et de la Syrie

comme une nouvelle espèce appelée *Iris wallisiae* contredisant Mouterde (1966) qui mentionnait *I. persica* dans son traitement de la flore de la Syrie et le Liban et ont déclaré qu'il n'existe aucune preuve qu'*I. persica* a jamais été trouvée au Liban. En outre, selon les mêmes auteurs, tous les rapports concernant *I. persica* par Tohmé & Tohmé (2002, 2011) pour la vallée de la Bekaa se réfèrent à *I. wallisiae*. Un comptage chromosomique de $2n = 22$ a été fait par Hall et Seisums (2014) à partir de trois populations syriennes d'*I. wallisiae* alors qu'il était $2n = 20$ dans six populations syriennes de d'*I. persica*. Nos résultats sont en conflit avec les deux comptages chromosomiques parce que nous avons trouvé $2n = 24$ pour le supposé *I. persica*, que nous avons analysé. D'autres études, sur un plus grand nombre de populations dans cette zone géographique, sont nécessaires pour mieux comprendre la taxonomie et la phytogéographie de ces taxons.

Pour *I. mesopotamica* nous avons trouvé $2n = 4x = 48$, ce qui est en accord avec les rapports précédents par Simonet (1932, 1934). *Iris mesopotamica* est considérée comme un synonyme d'*I. germanica* (Arano & Saito 1980). *Iris germanica* a été trouvée tétraploïde dans les Balkans (Siljak-Yakovlev *et al.* 2005). Les deux taxons sont considérés comme des hybrides et on a constaté qu'ils poussent dans les zones cultivées ou sauvages comme échappés de la culture. *Iris mesopotamica* est multiplié par voie végétative et distribué localement du sud de la Turquie à travers Syrie jusqu'au Israël (Mathew 1989). Souvent cultivée dans les cimetières et les jardins, cette espèce provient probablement des côtes méditerranéennes asiatiques (Mouterde 1966).

Pour *I. unguicularis* var. *cretensis*, nous confirmons le précédent rapport de $2n = 4x = 40$ (Davis & Jury 1990). Cette variété se retrouve également en Grèce, en Crète et en Asie Mineure. Les formes typiques d'*I. unguicularis* sont très répandues dans la région de la Méditerranée orientale et de l'Afrique du Nord où elles sont très variées.

La polyploïdie était importante dans la diversification précoce de la famille des Iridaceae (Goldblatt & Takei 1997). Dans le genre *Iris*, où des changements dans le nombre chromosomique de base sont communs, le nombre de base ancestral, cependant, reste douteux (Goldblatt & Takei 1997). Les reconstructions phylogénétiques ne fournissent pas une résolution suffisante pour interpréter soit une dysploïdie ascendante ou descendante. Bien que peu d'études ont évalué le phénomène de la dysploïdie dans un cadre phylogénétique, une diminution du

nombre chromosomique n'est pas inhabituelle (Cerbah *et al.* 1998 ; Siljak-Yakovlev *et al.* 1996). La dysploïdie descendante a déjà été proposée par (Goldblatt & Takei 1997) pour plusieurs genres de la famille des Iridaceae.

En se basant sur l'étude des caryotypes, nous pouvons conclure que la section *Oncocyclus* est plus récente que les sections *Iris*, *Limniris* et *Scorpiris*. Le nombre constant de chromosomes ($2n = 20$) et l'extrême similitude des caryotypes parmi les espèces de la section *Oncocyclus* peuvent être liés à sa petite répartition géographique et indiquent que l'*Oncocyclus* serait une section récente qui est en cours d'évolution.

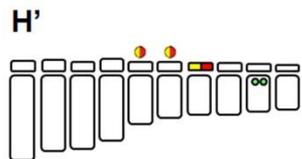
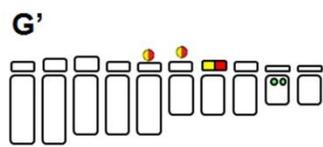
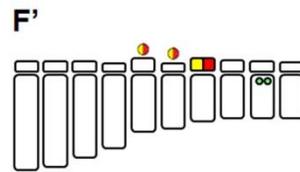
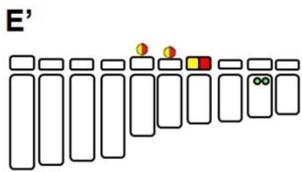
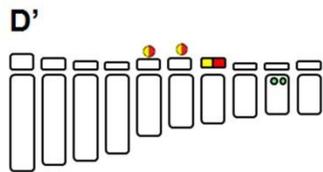
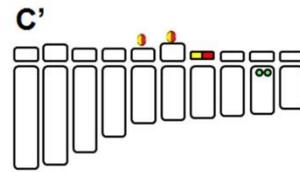
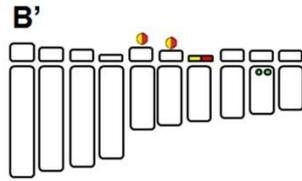
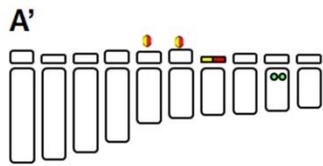
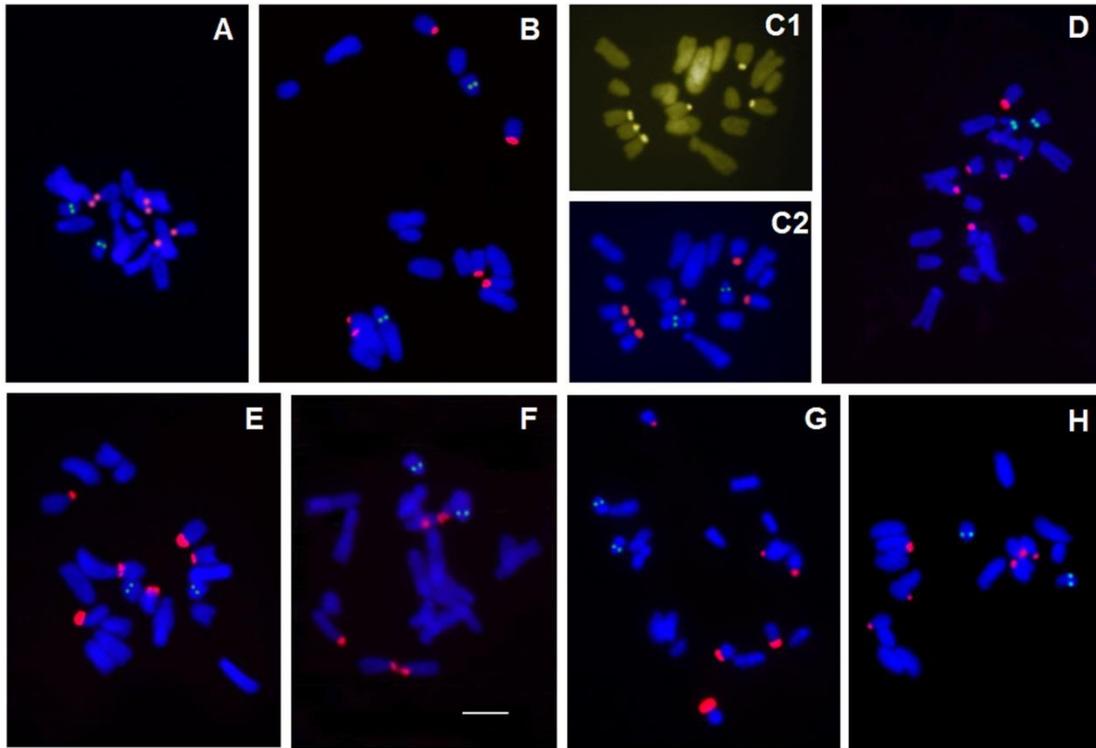
4- Cartographie de l'hétérochromatine et des gènes ribosomiques

La cartographie physique des deux familles de gènes d'ARNr 5S et 35S, et la distribution des régions d'ADN riches en GC (hétérochromatine) dans les chromosomes de dix taxons libanais ont été effectuées pour la première fois dans cette étude. Les résultats sont présentés dans le Tableau 9 et la Figure 25.

Tableau 9: La synthèse des résultats de l'approche cytogénétique moléculaire des taxa d'*Iris*.

Taxon	2n	Nombre et position des bandes CMA⁺	Nombre des signaux 35S	Nombre des signaux 5 S
<i>I. antilibanotica</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. bismarckiana</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. cedreti</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. lortetii</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. westii</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. mesopotamica</i>	48	4 (6, 11)*	4 (6, 11)*	2 (17)
<i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	40	4 (19, 20)*	4 (19, 20)*	2 (8)
<i>I. persica</i>	24	4 (11, 12)*	4 (11, 12)*	2 (6)

* Numéro de la paire de chromosome



CMA
 18-26S
 5S rDNA

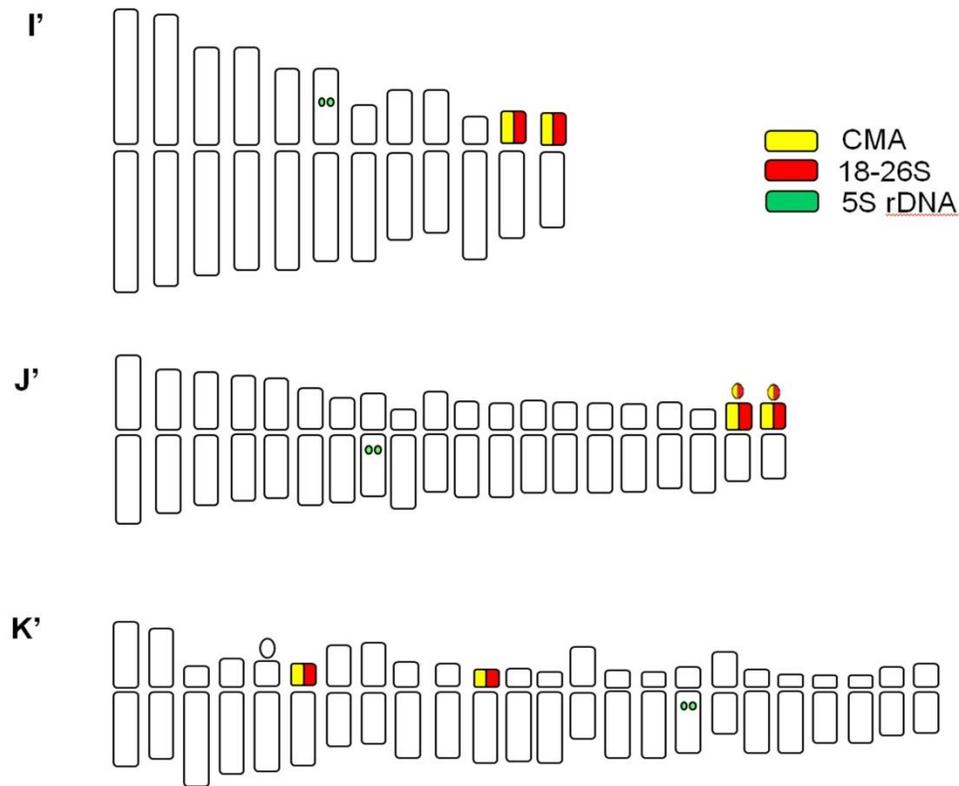
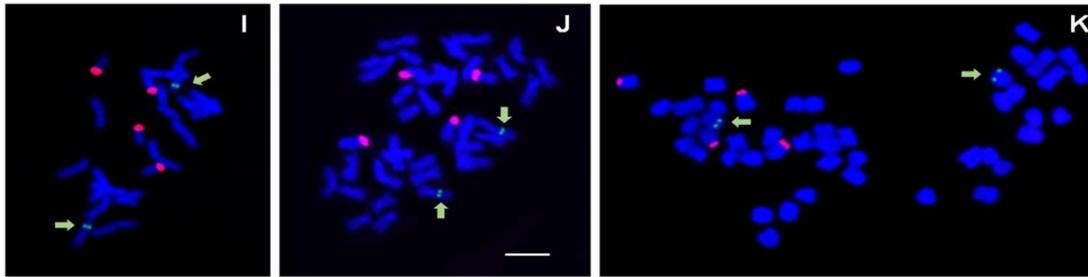


Figure 25: A-K: plaques métaphasiques des taxa d'*Iris* après FISH à double cible à l'aide de deux sondes d'ADNr 5S (signaux verts) et 35S (signaux rouges). C1 représente la coloration CMA (signaux jaunes). A' - K': idiogrammes avec emplacement de 5S (vert) et 35S (rouge) gènes d'ADNr. A': *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Falougha), B': *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Hazzerta) C': *I. sofarana* subsp. *kasruwana*, D': *I. cedreti*, E': *I. westii*, F': *I. bismarckiana*, G': *I. lortetii*, H': *I. antilibanotica*, I' : *I. persica*, J': *I. unguicularis* var. *cretensis*, K': *I. mesopotamica*. Barre d'échelle 10 μ m.

Le fluorochrome banding a révélé des régions d'hétérochromatine riches en GC (bandes CMA+) qui étaient toujours associées aux locus d'ADNr 35S. En conséquence, le nombre et la position des régions d'ADN riches en GC correspondent à celles du locus 35S (Tableau 9).

L'hétérochromatine et l'organisation d'ADNr ont été conservées et presque identiques pour tous les taxons *Oncocyclus* (Fig. 25 A-H). Les gènes 35S d'ARNr (signaux rouges) étaient situés dans les constriction secondaires (SC) et les satellites, qui correspondent aux régions organisatrices du nucléole (NORs) des paires chromosomiques satellifères 5 et 6 et sur le bras court de la paire de chromosome 7. Pour *I. persica* les gènes ribosomiques 35S étaient situés sur les bras courts des paires de chromosomes 11 et 12 (Fig. 25 I, I'), pour *I. unguicularis* var. *cretensis* sur les paires 19 et 20 (Fig. 25 J, J'), pour *I. mesopotamica* sur les paires 6 et 11 (Fig. 25 K, K'). Le seul locus 5S (signaux verts) a été localisé sur la position intercalaire paracentromérique de la paire chromosomique 9 dans tous les taxons *Oncocyclus* (Fig. 25 A-H), sur la paire 6 de *I. persica*, sur la paire 8 d'*I. unguicularis* var. *cretensis* et les paires 17 d'*I. mesopotamica* (Fig. 25 I-K).

Bien que ce genre d'études reste très rare pour le genre *Iris*, les localisations chromosomiques des loci 5S et 35S d'ADNr ont été préalablement déterminées pour 7 espèces du sous-genre *Xiphium* (The Plant List 2013) où le nombre de loci d'ADNr 35S a probablement augmenté au cours du processus de divergence (Martínez *et al.* 2010).

Dans cette étude, les deux familles de gènes d'ARNr sont situées sur des paires de chromosomes distincts. Ainsi, les gènes 5S sont d'arrangement de type S selon Garcia *et al.* (2012). Six signaux de 35S d'ADNr et 2 signaux d'ADNr 5S sont observés dans les iris *Oncocyclus* diploïdes tandis que 4 signaux de 35S et 2 signaux de 5S ont été révélés dans les tétraploïdes *I. unguicularis* var. *cretensis* et *I. mesopotamica*. Dans *Iris germanica* qui est actuellement considérée comme synonyme d'*I. mesopotamica*, Siljak-Yakovlev *et al.* (2005) ont trouvé 8 loci de 35S et 2 loci de 5S. Le nombre différent de signaux 35S d'ADNr entre ces deux espèces pose la question sur leur véritable synonymie. Les deux espèces sont tétraploïdes mais leur origine hybride présumée devrait être confirmée.

Nos résultats prouvent encore une fois ce qui a été rapporté dans les études précédentes: une perte de loci d'ADNr de 35S et peut-être 5S ; ces pertes peuvent être considérées comme une indication précoce de la diploïdisation du génome polyploïde. Si cela devrait être appliqué à la polyploïdie d'*I. germanica* et *I. mesopotamica*, le premier pourrait être un autopolyploïde tandis que le deuxième pourrait être un hybride interspécifique. Bien entendu, l'origine polyploïde doit être traitée avec plus d'attention en incluant dans l'étude, les parents putatifs. À ce stade, nous ne

pouvons confirmer que la cartographie des gènes d'ARN ribosomique permet la distinction entre *I. germanica* des Balkans et *I. mesopotamica*.

Étonnamment, cette technique n'a pas réussi à montrer les différences entre les sept iris *Oncocyclus* étudiés. Cette constatation renforce leur récente histoire évolutive commune, comme suggéré précédemment (Saad 2006). Le croisement entre les espèces de la section *Oncocyclus* est signalé comme possible, et avec des hybrides fertiles (Avishai & Zohary 1980). Cependant au Liban, les différentes populations de taxons analysées dans cette étude sont très fragmentées et ne sont pas suffisamment proches pour permettre à leurs pollinisateurs à courte distance de vol de maintenir le flux de gènes entre eux. D'autre part, ces taxons se trouvent à différentes altitudes, les dates de floraison ne se chevauchent pas, contribuant ainsi à l'isolement génétique de chaque taxon (Figure 26). Les iris *Oncocyclus* sont des plantes myrmécophiles, ayant leurs graines dispersées par les fourmis, ce qui entrave également le flux de gènes. Toutes ces raisons vont conduire à la spéciation et la sélection des génotypes localement adaptés. Pour les questions de conservation, puisque les différents taxons semblent très proches, le renforcement de la population serait l'approche à retenir compte tenu des résultats de ce travail et ceci en utilisant les différentes ressources génétiques. Toutefois, il est conseillé de réaliser des expériences de fertilisation croisée contrôlées afin de confirmer leur compatibilité biologique. Ce type d'information est cruciale pour faire face à l'état de la liste rouge de l'UICN de ces taxa.

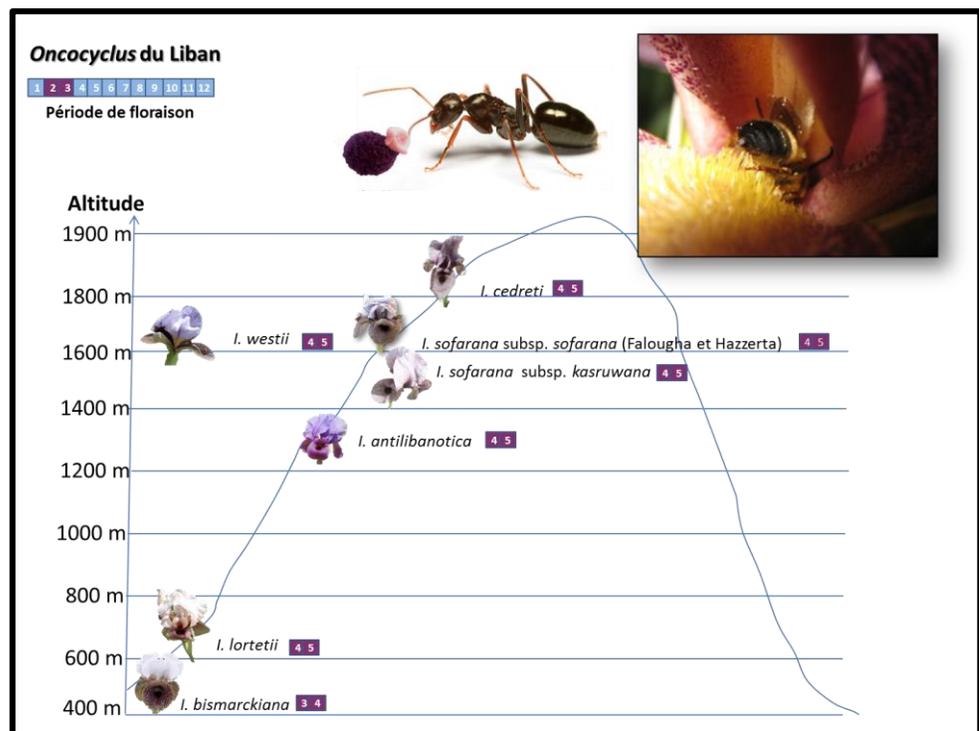


Figure 26 : La période de floraison des *Oncocyclus* Libanais.

5- Résultats de la coloration au nitrate d'argent

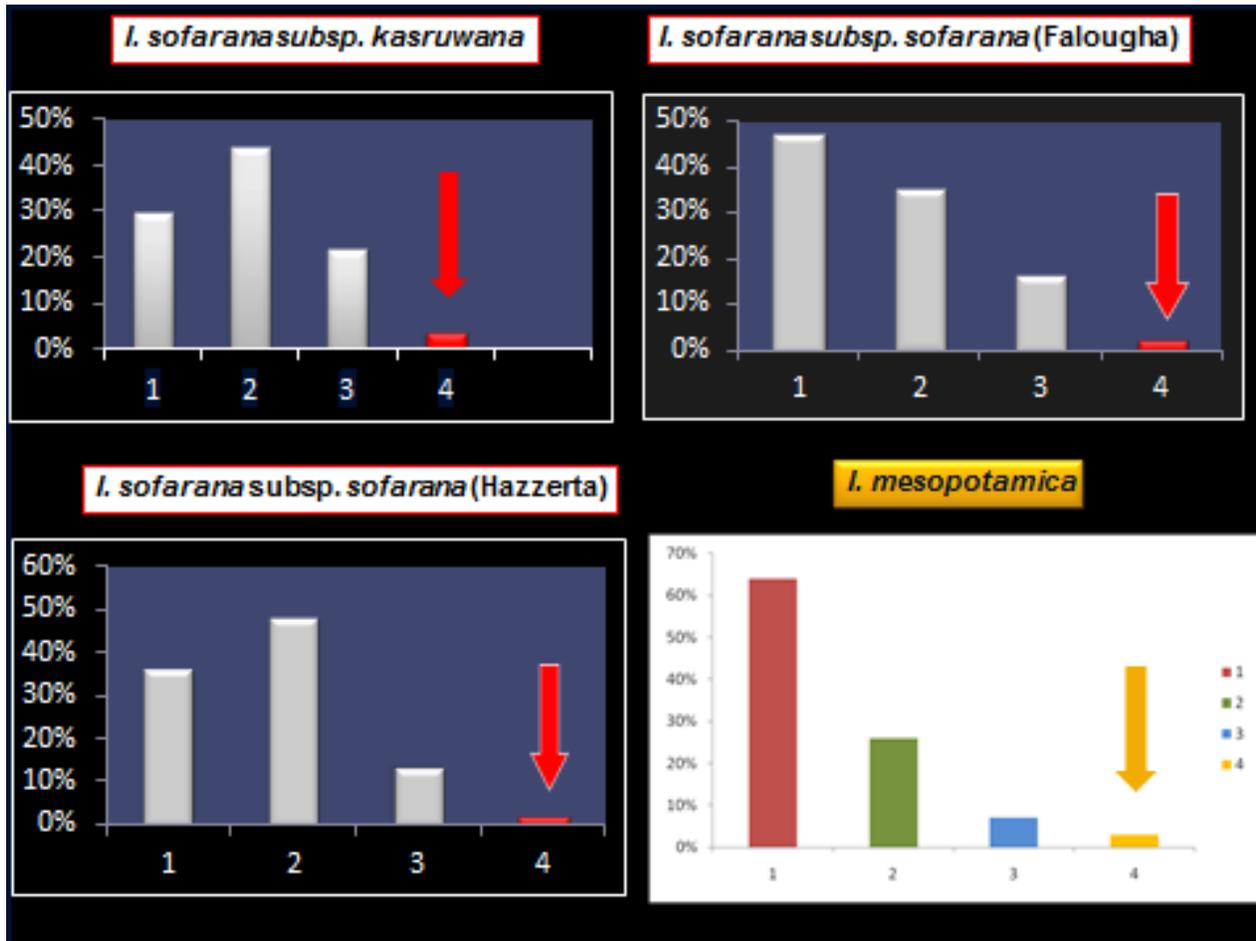


Figure 27 : Les résultats du nitrate d'argent des 2 espèces d'*Oncocyclus* endémiques du Liban, *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Falougha et Hazzerta) et *I. sofarana* subsp. *kasruwana* et *I. mesopotamica* montrant le nombre de nucléoles et son pourcentage (le nombre de nucléoles était mesuré dans 100 cellules de chaque espèce).



Figure 28 : Les nucléoles d'*I. sofarana* subsp. *kasruwana*

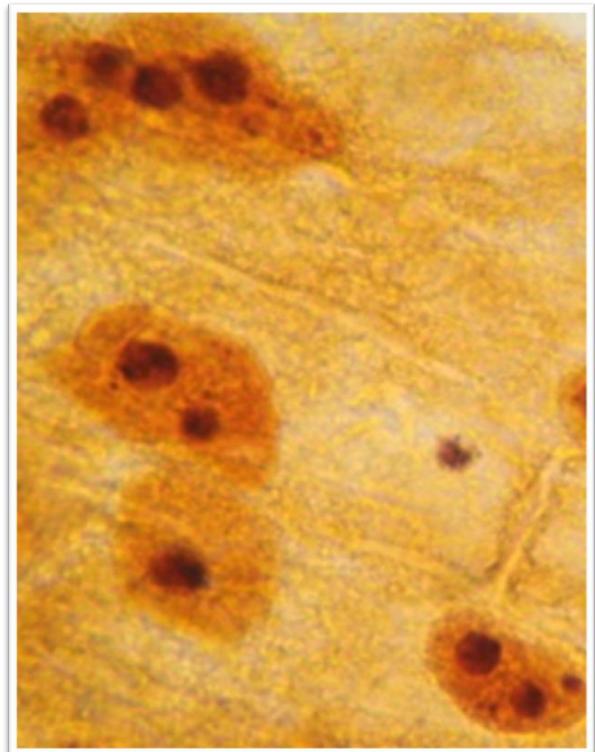
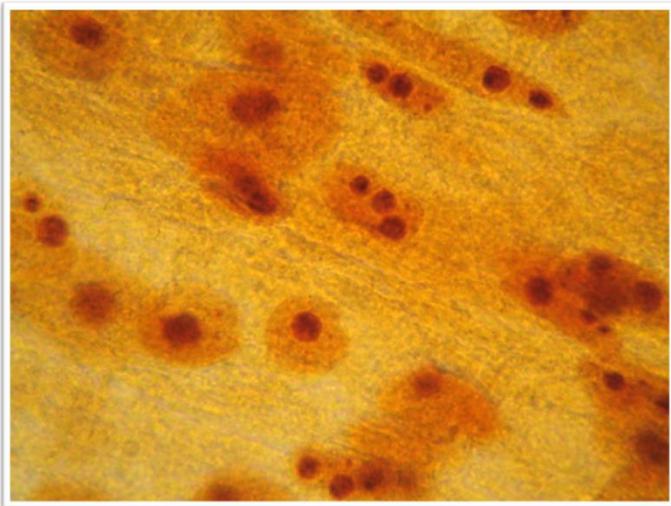


Figure 29 : Les nucléoles d'*I. mesopotamica*

La coloration au nitrate d'argent qui met en évidence les nucléoles permet d'évaluer l'activité des gènes ribosomiques 35S qui se trouvent dans les régions à organisateur nucléolaire (NORs). Les nucléoles souvent fusionnent et leur nombre varie d'un à un nombre maximale des sites de gènes ribosomiques 35S. Chez les espèces à petit génome, malgré le grand nombre des loci 35S, un seul nucléole est formé par fusion de nombreux autres nucléoles. C'est le cas chez les cultivars hexaploïdes d'*Ipomea batatas* (2C DNA = 3,26 pg) qui peuvent posséder jusqu'à 9 loci de gènes 35S rRNA (Srisuwan *et al.* 2006). Dans le cas de l'allopolyploïde *Brassica* un nucléole seulement a été présent (Hasterok & Maluszynska 2000).

Par contre, dans le grand génome de *Picea omorica* (2C DNA = 37 pg) 16 nucléoles ont été observé pour un nombre de 8 loci de gènes 35S rRNA (Siljak-Yakovlev *et al.* 2002) ce qui indiquait que tous les loci ont été actifs. Cependant, le pourcentage des cellules observées avec le maximum des nucléoles est toujours le plus faible.

Dans le cas des *Iris* les résultats obtenus dans ce travail montrent que chez les 2 taxons d'*Oncocyclus* endémiques du Liban, *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Falougha et Hazzerta) et *I. sofarana* subsp. *kasruwana*, seulement 4 sites sur 6 d'ADNr 35S sont actifs, tandis que chez *I. mesopotamica* tous les 4 sites sont actifs (Figs 27, 28 et 29).

5- Remarques finales

Ce travail est une contribution à la connaissance de ce grand genre qui a été, jusqu'à présent, rarement étudié dans ce domaine de recherche. Il fournit une première caryomorphologie et une caractérisation cytogénétique moléculaire de dix espèces d'*Iris* libanaises. Une importante variation inter-sections a été détectée parmi les taxons étudiés. Une différence dans le nombre chromosomique, les données morphométriques du caryotype, le nombre et la position des régions d'ADN riches en GC, la cartographie des loci 5S et 35S d'ADNr étaient évidents chez les trois espèces restantes qui appartiennent aux sections *Iris*, *Limniris* et *Scorpiris*. Cependant, l'absence de la variabilité et la forte similitude dans les caractéristiques du caryotype observées chez les taxons *Oncocyclus* suggèrent qu'il s'agit probablement d'un groupe récent et que leur spéciation est toujours en cours, comme indique d'ailleurs une phylogénie récente de certains *Oncocyclus* (Wilson *et al.* 2016). Des études moléculaires et cytologiques supplémentaires, y compris un échantillonnage plus large d'*Iris* *Oncocyclus* de la Méditerranée orientale, sont

actuellement en cours. Ces études devraient contribuer à la meilleure connaissance sur la diversification et la spéciation de cette section.

Un article intitulé « Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora » a été publié par Bou Dagher-Kharrat *et al.* (2013). Cette étude a contribué à l'enrichissement de la base de données de la valeur-C des taxons endémiques libanais. Ces données ont renforcé les études d'évaluation de la biodiversité, de la systématique et de l'évolution impliquant des processus de spéciation tels que la polyploïdisation. Cette étude présente les valeurs C pour 225 taxons appartenant à 55 familles et 141 genres dont le genre *Iris* au Liban. Les valeurs C sont nouvelles pour 193 taxons dont 126 plantes sont endémiques à la région de la Méditerranée orientale et les premières valeurs pour 50 genres (Annexe 8).

Concernant la conservation *in situ* ; depuis 2013, et toujours dans le cadre du projet intitulé « Determination of Important Areas for Plants and Creation of Micro-Reserves to Conserve Rare or Endemic Species in Lebanon. Grant 63257 », notre laboratoire libanais travaille pour protéger deux espèces d'*Iris* :

- *Iris sofarana* subsp. *kasruwana* à Ehmej : le site dans lequel cette plante pousse est en partie propriété de l'Etat et en partie des propriétés privées. Des arrangements ont été conclus avec les propriétaires privés qui ont donné libre droit à notre équipe de recherche de récolter les graines chaque année pour la conservation *ex situ* et pour transférer les rhizomes des Iris vers les terrains publics protégés quand l'usage des terres changera. Les terrains publics ont été déclarés en 2015 comme un site naturel protégé par le décret numéro 2878.
- *Iris bismarckiana* à Sarada : Le site sur lequel poussent les iris appartient aux communautés religieuses. Une désignation du site comme réserve naturelle est en cours.

Chapitre V : Les perspectives

Dans ce manuscrit, nous avons rapporté les résultats des études cytogénétiques et phylogénétiques des iris du Liban et des espèces de la section *Oncocyclus* du Levant, visant à clarifier les limites taxonomiques et les relations entre ses espèces (Abdel Samad *et al.* 2016, accepté, Annexe 9). Ces outils permettent aussi de mieux comprendre la structuration des populations et les relations entre ces dernières, ce qui peut grandement aider à la définition des actions de conservation entreprises pour ces espèces et à leur ordre de priorité.

La nécessité de conserver les iris *Oncocyclus* est maintenant bien mise en évidence dans plusieurs pays. En Jordanie, par exemple, l'iris noir *I. nigricans* est un emblème national, et les iris dits royaux sont devenus le symbole de la protection de la nature en Israël. Certains taxons d'*Iris* sont protégés en Turquie (*I. sprengeri*) et en Arménie (*I. paradoxa*) (Archibald 1999, Gazit-Ginsburg 1974, Shmida *et al.* 2002, Tan *et al.* 2003).

Comment pouvons-nous compléter cet agenda de conservation des iris *Oncocyclus*?

1. Dans la partie phylogénétique, nous étions confrontés à un problème d'amplification de la région ITS causé par un champignon endophyte qui se situe dans les tissus des iris.

Pour cela, les études phylogénétiques sur la section *Oncocyclus* sont à poursuivre en appliquant d'autres marqueurs moléculaires : *matK*, *trnK5'*, *trnK3'*, *petL-psbE*, *psbM-trnD*, *trnL-F*, *rpl20-clpP*, *ycf1* (partial), AT1G08750 (Wilson *et al.* 2016) qui peuvent nous aider à différencier les différents taxons de la section *Oncocyclus* et éviter le problème causé par le champignon endophyte.

Il sera aussi intéressant d'étudier le polymorphisme détecté par les rétrotransposons IRRE, TY3/gypsy-like (Kentner *et al.* 2003).

2. Protéger l'habitat dans lequel les espèces végétales vivent (l'approche *in situ*), reste la manière la plus importante et durable de conservation. Ainsi on conserve aussi la multitude des interactions qui existent entre les plantes et autres organismes, tels que les interactions avec les pollinisateurs ou les acteurs de dispersion, ce qui permet la continuation du processus d'évolution (Prance 1997).

A l'avenir, si des mises en défens des zones concernées ne sont pas possibles (terrains privés et prisés), des transplantations pourraient être envisagées. Dans ce cas, il serait indispensable de vérifier si l'entomofaune associée à la pollinisation des *Iris* est suffisamment représentée dans le nouvel habitat. Simultanément, des études concernant la dispersion des diaspores devraient être menées, puisque les organismes garantissant cette dispersion sont, eux aussi, essentiels à une dynamique équilibrée des populations.

3. Coopérer avec les municipalités au Liban où poussent des iris *Oncocyclus* pour inaugurer plus de sites protégés à Sofar, Sarada, Mays El Jabal, Bcharré, Khreibé comme le site naturel d'El-Dichar à Ehmej. Ce dernier a été inauguré sous le patronage du ministère de l'Environnement, et en coopération avec la municipalité de Ehmej et l'Association de développement de Ehmej, la Faculté des sciences de l'Université Saint-Joseph, sous les directives de Dr. Magda Bou Dagher Kharrat, chef du département des Sciences de la Vie et de la Terre, le dimanche 24 mai 2015, dans le cadre du projet de « Détermination des zones importantes pour les plantes et création de micro-réserves pour conserver les espèces rares ou endémiques du Liban », financé par le Critical Ecosystem Partnership Fund (CEPF).

La désignation du site El-Dichar en tant que site naturel est une initiative qui vise principalement à sauver faune et flore de l'endroit, parmi lesquelles se distingue *Iris sofarana* subsp. *kasruwana*, combinant à la fois rareté et endémisme du Liban.

4. Transférer des iris *Oncocyclus* qui se trouvent dans des terrains privés à d'autres sites protégés comme nous avons déjà fait le 14 mai 2011, avec un groupe d'étudiantes de l'Université Saint-Joseph sous la direction de Dr. Magda Bou Dagher-Kharrat, dans le cadre de l'opération 7ème jour de l'USJ en coopération avec la municipalité d'Ehmej; centaines d'individus d'*Iris sofarana* subsp. *kasruwana* ont été sauvés et transférés d'un

terrain où la municipalité voulait construire une route à un autre site public qui lui appartient, où les iris seront toujours protégés.

5. Sensibiliser les jeunes et le grand public à l'importance de la biodiversité et des plantes menacées du Liban, surtout les iris, par création des expositions éducatives (sorties scolaires et des concours scientifiques et photographiques) et des campagnes de communication (émissions télévisées, conférences...) visant à valoriser aux yeux des jeunes (les élèves dans les écoles officielles et privées), l'importance et la beauté de notre patrimoine naturel, surtout des plantes endémiques menacées comme les iris.

La sauvegarde de l'environnement et celle du patrimoine naturel libanais, de la flore libanaise surtout endémique, sont la responsabilité de tous, à tous les niveaux. Agissons en humains responsables afin de redresser les tortsavenus et redonner à notre pays une partie de sa splendeur des siècles passés !

Références:

1. Abi Saleh, B., Nasser, N., Hanna, R., Safi, N., Safi, S., & Tohme, H. (1996). Lebanon Country Study on Biological Diversity. Terrestrial Flora. Republic of Lebanon, Ministry of Agriculture (MoA) and United Nations Development Programme. Lebanon, 3.
2. Albert, M., A. Escudero and J. Iriondo (2001). "Female reproductive success of narrow endemic *Erodium paularense* in contrasting microhabitats." *Ecology* 82(6): 1734-1747.
3. Al-Gabbiesh, A., D.S. Hassawi, and F.U. Afifi. (2006). In vitro propagation of endangered *Iris* species. *J. Biol. Sci.* 6(6): p. 1035-1040.
4. Al-Khasawneh, A.A., et al. (2010). Assessment of Genetic Variation in Black Iris (*Iris nigricans* Dinsm.) Using RAPD Markers. *Jordan Journal of Agricultural Sciences.* 3(3).
5. Allahverdioglu R.S., V.I.O., Ex situ conservation of endangered geophytes of the Hirkan National Park (Azerbaijan) in the Central Botanical Garden (Azerbaijan) *European Botanic Gardens in a Changing World: Insights into EUROGARD VI.*
6. Álvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29(3), 417-434.
7. Arafeh, R. M. H., Y. Sapir, A. Shmida, N. Iraki, O. Fragman and H. P. Comes (2002). "Patterns of genetic and phenotypic variation in *Iris haynei* and *I. atrofusca* (*Iris* sect. *Oncocyclus* = the royal irises) along an ecogeographical gradient in Israel and the West Bank." *Molecular Ecology* 11(1): 39-53.
8. Arano, H. and H. Saito (1980). "Cytological studies in family Umbelliferae, 5: Karyotypes of seven species in subtribe Seselinae." *Kromosomo* (Japan).
9. Archibald, J. (1999). "Silken Sad Uncertain Queens." *Bulletin of the Alpine Garden Society* 67: 245-264.
10. Arnheim, N. (1983). Concerted evolution of multigene families. In: Nei M, Koehn RK (eds) *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland MA pp 38–61.
11. Avishai, M. (1977). *Species relationships and cytogenetic affinities in section Oncocyclus of the genus Iris*. Jerusalem, Hebrew University.

12. Avishai, M. and D. Zohary (1977). "Chromosomes in the *Oncocyclus* Irises." *Botanical Gazette* 138(4): 502-511. Univ. Chicago Press.
13. Avishai, M. and D. Zohary (1980). "Genetic Affinities among the *Oncocyclus* irises." *Botanical Gazette* 141(1): 107-115.
14. Ayensu, E. S. (1981). *Medicinal plants of the West Indies [French West Indies]*, Algonac, Michigan, USA: Reference Publications.
15. Badaeva, E., O. Dedkova, G. Gay, V. Pukhalskyi, A. Zelenin, S. Bernard and M. Bernard (2007). "Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution." *Genome* 50(10): 907-926.
16. Bae, K.-H., et al. (2012). Callus induction and plant regeneration of *Iris dichotoma* Pall. in endangered species. *Journal of Plant Biotechnology* 39(3): 182-188.
17. Bae, K.-H., et al. (2013). Plant regeneration from callus of *Iris odaesanensis* YN Lee native to Korea via organogenesis. *Journal of Plant Biotechnology* 40(3): 163-168.
18. Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell and M. J. Donoghue (1995). "The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny." *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 247-277.
19. Ball Jr, R. M. and J. C. Avise (1992). "Mitochondrial DNA phylogeographic differentiation among avian populations and the evolutionary significance of subspecies." *The Auk* 109: 626-636.
20. Baskin, C. C. and E. Quarterman (1969). "Germination requirements of seeds of *Astragalus tennesseensis*." *Bulletin of the Torrey Botanical Club*: 315-321.
21. Baskin, J. and C. Baskin (1997). "Methods of breaking seed dormancy in the endangered species *Iliamna corei* (Sherff) sherff (Malvaceae), with special attention to heating." *Natural Areas Journal* 17(4): 313-323.
22. Baskin, J. M. and C. M. Baskin (1979). "Studies on the autecology and population biology of the weedy monocarpic perennial, *Pastinaca sativa*." *The Journal of Ecology* 67 No.2: 601-610.
23. Beaulieu, J. M., A. T. Moles, I. J. Leitch, M. D. Bennett, J. B. Dickie and C. A. Knight (2007). "Correlated evolution of genome size and seed mass." *New Phytologist* 173(2): 422-437.

24. Beaulieu, J. M., I. J. Leitch, S. Patel, A. Pendharkar and C. A. Knight (2008). "Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms." *New Phytologist* 179(4): 975-986.
25. Beaulieu, J. M., S. A. Smith and I. J. Leitch (2010). "On the tempo of genome size evolution in angiosperms." *Journal of Botany* doi:10.1155/2010/989152.
26. Bennett, M. and I. Leitch (2011). "Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow." *Annals of Botany* 107(3): 467-590.
27. Bennett, M. D., P. Bhandol and I. J. Leitch (2000). "Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses—807 new estimates." *Annals of Botany* 86(4): 859-909.
28. Bennett, S., I. Leitch and M. Bennett (1995). "Chromosome identification and mapping in the grass *Zingeria bebersteiniana* (2n= 4) using fluorochromes." *Chromosome research* 3(2): 101-108.
29. Blondel, J. (2010). *The Mediterranean region: biological diversity in space and time*. Oxford University Press.
30. Dagher-Kharrat, M. B., Mariette, S., Lefèvre, F., Fady, B., Grenier-de March, G., Plomion, C., & Savouré, A. (2007). Geographical diversity and genetic relationships among *Cedrus* species estimated by AFLP. *Tree Genetics & Genomes* 3(3) : 275-285.
31. Bou Dagher-Kharrat, M. (2013 - 2016). "Determination of Important Areas for Plants and Creation of Micro-Reserves to Conserve Rare or Endemic Species in Lebanon." from <http://www.cepf.net/blog/Pages/Conserving-the-floral-biodiversity-of-Lebanon.aspx>.
32. Bou Dagher-Kharrat, M. *et al.* (2016). *Iris sofarana* Foster. IUCN, Red List Assessment.
33. Bou Dagher-Kharrat, M. *et al.* (2013). Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 147(4): 1228-1237.
34. Boyce, M. S. (1992). "Population viability analysis." *Annual Review of Ecology and Systematics* 23: 481-506.
35. British Iris Society. Species Group (Ed.). (1997). *A guide to species irises: their identification and cultivation*. Cambridge University Press.
36. Bublyk, O.M., et al. (2013). Efficiency of different PCR-based marker systems for assessment of *Iris pumila* genetic diversity. *Biologia* 68(4): 613-620.

37. Cartes, J. E., & Carrassón, M. (2004). Influence of trophic variables on the depth-range distributions and zonation rates of deep-sea megafauna: the case of the Western Mediterranean assemblages. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 51(2) : 263-279.
38. Castañeda-Álvarez, N. P., H. Vincent, S. Kell, R. Eastwood and N. Maxted (2011). "Ecogeographic surveys." In Guarino L, Ramanatha Rao V, Goldberg E (editors). *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*. 2011 update. Bioversity International, Rome.
39. Catalán, P., E. A. Kellogg and R. G. Olmstead (1997). "Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast ndhf gene sequences." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8(2): 150-166.
40. Caughley, G. (1994). "Directions in conservation biology." *Journal of Animal Ecology* 63: 215-244.
41. Cerbah, M., T. Souza-Chies, M. Jubier, B. Lejeune and S. Siljak-Yakovlev (1998). "Molecular phylogeny of the genus *Hypochaeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution." *Molecular Biology and Evolution* 15(3): 345-354.
42. Charlesworth, B., P. Sniegowski and W. Stephan (1994). "The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes." *Nature* 371: 215–220.
43. Chaudhary, S. A. (1972). "Three new taxa of *Iris* subgenus *Oncocyclus* from Lebanon and Syria." *Bot. Notiser* 125: 497-500.
44. Chaudhary, S. A. (1974). "Taxonomy of *Oncocyclus* Irises from Lebanon and Syria." *ASI Yearbook*: 65-68.
45. Chester, M., A. R. Leitch, P. S. Soltis and D. E. Soltis (2010). "Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation)." *Genes* 1(2): 166-192.
46. Chung, M.Y., et al. (2015). Clonal and genetic structure of *Iris odaesanensis* and *Iris rossii* (Iridaceae): insights of the Baekdudaegan Mountains as a glacial refugium for boreal and temperate plants. *Plant Systematics and Evolution*. 301(5): p. 1397-1409.
47. Cigić, P., et al. (2004). The distribution of endemic species of the genus *Iris* L. (Iridaceae) in Croatia in XI OPTIMA Meeting.

48. Clampitt, C. A. (1987). "Reproductive biology of *Aster curtus* (Asteraceae), a Pacific Northwest endemic." *American Journal of Botany* 74(6): 941-946.
49. Clark, D. L., C. A. Ingersoll and K. K. Finley (1997). "Regeneration of *Erigeron decumbens* var. *decumbens* (Asteraceae), the Willamette Daisy." *Conservation and management of native plants and fungi*, 41-47.
50. Corien, O., & Avishai, M. (2001). The Irises Still Exist: The Conservation Status of Species *Iris* Section *Oncocyclus* in Israel, A Century after their description. *Annali Di Botanica* 1: 145.
51. Crowder, C. A. (1978). "The ecology and reproduction of *Sophora leachiana* Peck (Fabaceae)." M.S. thesis, Oregon State University, Corvallis, OR.
52. Davis, A. P. and S. L. Jury (1990). "A taxonomic review of *Iris* L. series *Unguiculares* (Diels) Lawrence." *Botanical Journal of the Linnean Society* 103(3): 281-300.
53. Davis, P. (1946). "Oncocyclus Irises in the Levant." *The Journal of the Royal Horticultural Society* 121: 93-97.
54. De Munk, W. and J. Schipper. (1993). "Iris-bulbous and rhizomatous." *The Physiology of Flower Bulbs*. A. De Hertogh and M. Le Nard (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands: 349-379.
55. Delić, A., J. Razlog-Grlica, and I.D. Grlica. (2001). Siberian Iris (*Iris sibirica* L.): endangered and rare plant species in Croatia. *Priroda*. 91(1): p. 24-25.
56. Deniz, İ.G., C. Aykurt, and M.A. Başaran. (2015). Taxonomic and Ecologic Properties of the Endangered *Iris pamphylica* (Iridaceae) Endemic to SW Anatolia. *Journal of Applied Biological Sciences* 9(2): 01-06.
57. Derneği, D. (2010). Ecosystem profile: Mediterranean basin biodiversity hotspot. CEPF—Critical Ecosystem Partnership Fund.
58. Deyrup, M. and E. Menges. (1997). "Pollination ecology of the rare scrub mint *Dicerandra frutescens* (Lamiaceae)." *Florida Scientist* 60(3): 143-157.
59. Dinsmore, J. E. (1934). "Plantae Postianae et Dinsmoreanae, Fasc. 2." American University Press, Beirut.
60. Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols* 2(9) : 2233-2244.

61. Dorman, M., et al. (2009). Factors affecting dormancy of *Oncocycclus iris* seeds. *Israel Journal of Plant Sciences* 57(4): 329-333.
62. Doyle, J., & Doyle, J. L. (1987). Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochemical Bulletin* 19(11) : 11-15.
63. Douaihy, B., et al. (2013). Eriophyoid mite of the genus *Trisetacus* reported on *Juniperus excelsa* in Lebanon. *American Journal of Plant Sciences*. 4(2A): p. 395.
64. Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* 7(1) : 1.
65. Drury, W. H. (1974). "Rare species." *Biological Conservation* 6(3): 162-169.
66. Drury, W. H. (1980). "Rare species of plants." *Rhodora* 82(829): 3-48.
67. Dudash, M. and C. B. Fenster (2000). "Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations." In: Young AG, Clarke GM, editors. *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge: Cambridge University Press; 35-54.
68. Dulloo, M., N. Maxted, L. Guarino, D. Florens, H. Newbury and B. F. Lloyd. (1999). "Ecogeographic survey of the genus *Coffea* in the Mascarene Islands." *Botanical Journal of the Linnean Society* 131(3): 263-284.
69. Duncan, D. H., A. B. Nicotra, J. T. Wood and S. A. Cunningham (2004). "Plant isolation reduces outcross pollen receipt in a partially self-compatible herb." *Journal of Ecology* 92(6): 977-985.
70. Dykes, W. R. (1913). *The genus Iris*. Cambridge, England The University Press.
71. El-Haber, M. T., & El-Haber, R. M. (1993). Seven established Lebanese wildflowers not described among the native flora. *Lebanese Science Bulletin (Lebanon)*.
72. Feliner, G.N. (2014). Patterns and processes in plant phylogeography in the Mediterranean Basin. A review. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 16(5): 265-278.
73. Ferguson, M., B. Ford-Lloyd, L. Robertson, N. Maxted and H. Newbury (1998). "Mapping the geographical distribution of genetic variation in the genus *Lens* for the enhanced conservation of plant genetic diversity." *Molecular Ecology* 7(12): 1743-1755.
74. Feulgen, R. and H. Rossenbeck (1924). "Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die-darauf beruhende elektive

- Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten." *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 135(5-6): 203-248.
75. Fiedler, P. L., B. Knapp and N. Fredricks. (1998). Rare plant demography: lessons from the Mariposa lilies (*Calochortus*: Liliaceae). *Conservation Biology*, Springer: 28-48.
 76. Fischer, M. and D. Matthies. (1998). "Effects of population size on performance in the rare plant *Gentianella germanica*." *Journal of Ecology* 86(2): 195-204.
 77. Florance, E. R. (1997). "Structure, dormancy, and germination of seeds from *Frasera albicaulis* and *F. umpquaensis* (Gentianaceae)." *Conservation and management of native plants and fungi*. Proceedings of the Oregon Conference on the Conservation and Management of Native Vascular Plants, Bryophytes, and Fungi: 62-65.
 78. Francis, D., M. S. Davies and P. W. Barlow (2008). "A strong nucleotypic effect on the cell cycle regardless of ploidy level." *Annals of Botany* 101(6): 747-757.
 79. Fraser, D. J. and L. Bernatchez. (2001). "Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units." *Molecular ecology* 10(12): 2741-2752.
 80. Furuya, H. (1999). Method of the seedling production of rare native plants with in vitro culture, 1: *Iris rossii* Baker. *Bulletin of the Hiroshima Prefectural Agriculture Research Center (Japan)*.
 81. Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma and E. Firoozabady. (1983). "Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues." *Science* 220(4601): 1049-1051.
 82. Garcia, S., T. Garnatje and A. Kovařík. (2012). "Plant rDNA database: ribosomal DNA loci information goes online." *Chromosoma* 121(4): 389-394.
 83. Gärdenfors, U., Hilton-Taylor, C., Mace, G. M., & Rodríguez, J. P. (2001). The application of IUCN Red List criteria at regional levels. *Conservation Biology* 15(5): 1206-1212.
 84. Gardes, M. and T. D. Bruns (1993). "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts." *Molecular Ecology* 2(2): 113-118.
 85. Gavrilenko, B. D. (1975). Kavkaz kak krupneishii tsentr formoobrazovaniya irisov podseksii *Oncocyclus*. (The Caucasus as the largest centre of form generation of irises from the subsection *Oncocyclus*). *Bot. Zhurn.* 60(7): 951-956.

86. Gazit-Ginsburg, Z. (1974). "The *Oncocyclus* irises in their connection with the phytogeographical territories of Israel." *Aril Society International Yearbook*: 76-81.
87. Germandt, D. S., A. Liston and D. Piñero (2001). "Variation in the nrDNA ITS of *Pinus* subsection *Cembroides*: implications for molecular systematic studies of pine species complexes." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21(3): 449-467.
88. Gielly, L., & Taberlet, P. (1994). The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11(5) : 769-777.
89. Gisler, S. D. and R. J. Meinke (1997). "Reproductive attrition by predispersal seed predation in *Sidalcea nelsoniana* (Malvaceae): implication for the recovery of a threatened species." *Conservation and management of native plants and fungi* 56: 61.
90. Goldblatt, P. and M. Takei (1997). "Chromosome cytology of Iridaceae-Patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change." *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 285-304.
91. Goldblatt, P., V. Walbot and E. A. Zimmer (1984). "Estimation of genome size (C-value) in Iridaceae by cytophotometry." *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: 176-180.
92. Grindeland, J. M., N. Sletvold and R. A. Ims (2005). "Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*." *Functional Ecology* 19(3): 383-390.
93. Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5) : 696-704.
94. Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, pp. 95-98).
95. Hall, T. and A. Seisums (2014). "793. IRIS WALLISIAE." *Curtis's Botanical Magazine* 31(3): 238-248.
96. Halse, R. and R. Mishaga (1988). "Seed germination in *Sidalcea nelsoniana* (Malvaceae)." *Phytologia (USA)*. 64:179–184.
97. Hannan, G.L. and M.W. Orick. (2000). Isozyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (Iridaceae). *American Journal of Botany* 87(3): 293-301.

98. Harper, K. (1979). "Some reproductive and life history characteristics of rare plants and implications of management." *Great Basin Naturalist Memoirs* 3: 129-137.
99. Hart, C.R. (1990). A New Station in Door County, Wisconsin, for the Rare *Iris lacustris* Nutt. (Dwarf Lake Iris). *Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts, and Letters (USA)*.
100. Hasterok, R. and J. Maluszynska. (2000). Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid Brassica species. *Genome* 43(3): 574-579.
101. Heller, F. O. (1973). "DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie1." *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86(5-9): 437-441.
102. Hewitt, G.M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological journal of the Linnean Society* 68(1-2): 87-112.
103. Hodgson, J., M. Sharafi, A. Jalili, S. Díaz, G. Montserrat-Martí, C. Palmer, B. Cerabolini, S. Pierce, B. Hamzehee and Y. Asri (2010). "Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog?" *Annals of Botany* 105(4): 573-584.
104. Hoffmann, A. A. and L. H. Rieseberg (2008). "Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation?" *Annual review of ecology, evolution, and systematics* 39: 21-42.
105. Hofrichter R., 2001;Das Mittelmeer, Fauna, Flora Ökologie; Band I - Allgemeiner Teil; Spektrum Verlag; Heidelberg - FRG
106. Holobiuc, I. and R. Blindu. (2006). In vitro culture introduction for ex situ conservation of some rare plant species. *Rom. J. Biol.–Plant Biol.* 51, 52: 13-23.
107. Hughes, J., S. J. Longhorn, A. Papadopoulou, K. Theodorides, A. de Riva, M. Mejia-Chang, P. G. Foster and A. P. Vogler (2006). "Dense taxonomic EST sampling and its applications for molecular systematics of the Coleoptera (beetles)." *Molecular biology and evolution* 23(2): 268-278.
108. Jacobs, J. (1993). "New hope for the Peters Mountain mallow." *Endangered species technical bulletin (USA)*. 18(3):13-14.
109. Janzen, D. H. (1993, May). Taxonomy: universal and essential infrastructure for development and management of tropical wildland biodiversity. In *Proceedings of the*

- Norway/UNEP expert conference on biodiversity (pp. 100-113). pp. 100-113. Trondheim, Norway: NINA.
110. Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein (1985). "Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA." *Nature* 314(6006): 67-73.
 111. Jevremović, S., et al. (2009). Cryopreservation of *Iris pumila* shoot tips by vitrification. in I International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species 908.
 112. Jevremović, S., et al. (2009). Plant regeneration of Southern Adriatic iris by somatic embryogenesis. *Arch. Biol. Sci.* 61: 413-418.
 113. Johnson, D. H. and T. A. O'Neil (2001). *Wildlife-habitat relationships in Oregon and Washington*, Oregon State University Press.
 114. Johnson, L. A., & Soltis, D. E. (1995). Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using matK sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 149-175.
 115. Jurka, J., V. V. Kapitonov, A. Pavlicek, P. Klonowski, O. Kohany and J. Walichiewicz (2005). "Rebase Update, a database of eukaryotic repetitive elements." *Cytogenetic and Genome Research* 110(1-4): 462-467.
 116. Kamenetsky, R. and H. Okubo (2012). *Ornamental geophytes: from basic science to sustainable production*, CRC Press.
 117. Kandemir, N. (2006). An investigation on the autecological endemic *Iris taochia* Woronow Ex Grossh. (Iridaceae) distributed in the North East Anatolia Region. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9: 2753-2760.
 118. Kandemir, N., A. Çelik, and A. Sürücü. (2011). Ecological response of some *Iris* L. taxa (Iridaceae) in Turkey. *Bangladesh Journal of Botany* 40(2): 177-184.
 119. Karron, J. D. (1987). "The pollination ecology of co-occurring geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae)." *Biological Conservation* 39(3): 179-193.
 120. Karron, J. D. (1989). Breeding systems and levels of inbreeding depression in geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 76 : 331-340.

121. Kearns, C. A., D. W. Inouye and N. M. Waser (1998). "Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions." *Annual review of ecology and systematics* 29: 83-112.
122. Kemler, M. (2015). "Education: Botanists still need to tell plants apart." *Nature* 521(7550): 32-32.
123. Kentner, E. K., M. L. Arnold and S. R. Wessler (2003). "Characterization of High-Copy-Number Retrotransposons from the Large Genomes of the Louisiana Iris Species and Their Use as Molecular Markers." *Genetics* 164(2): 685-697.
124. Kereša, S., A. Mihovilović, and M. Ćurković-Perica. (2009). In vitro regeneration of the Croatian endemic species *Iris adriatica* Trinajstić ex Mitić. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51(2): 7-12.
125. Khouzami, M., M. Bassil, L. Fortunat and A. Hayek (1996). "Etude de la diversité biologique du Liban. Liste des espèces basée sur les rapports de l'étude de la diversité biologique du Liban." Ministère de l'Agriculture et Programme des Nations Unies pour l'Environnement, Liban.
126. Koçyiğit M., E. K., Özhatay F.N., Kaya E. (2013). *Iris* L. Subgen. *Iris* Ve Subgen. *Scorpiris* Tabanında Kültür Bitkileri Üzerindeki Karyolojik Çalışmaların Önemi. V. SÜS Bitkileri Kongresi. Yalova, Türkiye.
127. Köhlein, F. (1987). *Iris*. Portland, Oregon, Timber Press.
128. Kostrakiewicz, K. (2000). The analysis of spatial structure of *Iris sibirica* (Iridaceae) population on the station in Stanisławice near Bochnia (southern Poland). *Fragmenta Floristica et Geobotanica, Series Polonica* 7: 209-214.
129. Kostrakiewicz, K. (2007). The effect of dominant species on numbers and age structure of *Iris sibirica* L. population on blue moor-grass meadow in southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 76(2).
130. Kostrakiewicz, K. and A. Wróblewska. (2008). Low genetic variation in subpopulations of an endangered clonal plant *Iris sibirica* in southern Poland. In *Annales Botanici Fennici*. BioOne. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board 45(3) : 186-194.
131. Kostrakiewicz-Gierałt, K. (2013). The influence of neighbouring species on ecological variation of the selected subpopulations of *Iris sibirica* L. *Biodiversity Research and Conservation* 32(1): 45-52.

132. Krijgsman, W., Hilgen, F. J., Raffi, I., Sierro, F. J., & Wilson, D. S. (1999). Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* 400(6745): 652-655.
133. Kruckeberg, A. R. and D. Rabinowitz (1985). "Biological aspects of endemism in higher plants." *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 447-479.
134. Kubešová, M., L. Moravcova, J. Suda, V. Jarošík and P. Pyšek (2010). "Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora." *Preslia* 82(1): 81-96.
135. Kunakh, V. (2013). A study of the effect of habitat fragmentation on the population status of *Iris pumila* L. in Ukraine. *Dry Grasslands of Europe: Grazing and Ecosystem Services*, p. 252.
136. Lande, R. (1988). "Genetics and demography in biological conservation." *Science (Washington)* 241(4872): 1455-1460.
137. Lande, R. (1998). "Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation." *Researches on Population Ecology* 40(3): 259-269.
138. Larson, B. M. and S. C. Barrett (1998). "Reproductive biology of island and mainland populations of *Primula mistassinica* (Primulaceae) on Lake Huron shorelines." *Canadian Journal of Botany* 76(11): 1819-1827.
139. Lavergne, S., et al. (2004). The biology and ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *Oikos* 107(3): 505-518.
140. Lavergne, S., et al. (2010). Biodiversity and climate change: integrating evolutionary and ecological responses of species and communities. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41: 321-350.
141. Lawrence, G. H. M. (1953). A reclassification of the genus *Iris*. *Gentes Herb*, 8, 346-71.
142. Leitch, I. J. and A. R. Leitch (2013). Genome size diversity and evolution in land plants. *Plant Genome Diversity Volume 2*, Springer: 307-322.
143. Leitch, I. J., J. M. Beaulieu, M. W. Chase, A. R. Leitch and M. F. Fay (2010). "Genome size dynamics and evolution in monocots." *Journal of Botany* 2010: 18 pages.
144. Leitch, I., D. Soltis, P. Soltis and M. Bennett (2005). "Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta)." *Annals of Botany* 95(1): 207-217.

145. Leitch, I., I. Kahandawala, J. Suda, L. Hanson, M. J. Ingrouille, M. Chase and M. Fay (2009). "Genome size diversity in orchids: consequences and evolution." *Annals of botany* 104(3): 469–481.
146. Levin, D. A., B. G. Palestis, R. N. Jones and R. Trivers (2005). "Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms." *Evolution* 59(5): 962-969.
147. Mace, G. M. (2004). "The role of taxonomy in species conservation." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359(1444): 711-719.
148. Macior, L. W. (1978). "Pollination ecology of vernal angiosperms." *Oikos* 30(3): 452-460.
149. Maddock, A., & Du Plessis, M. A. (1999). Can species data only be appropriately used to conserve biodiversity? *Biodiversity & Conservation* 8(5): 603-615.
150. Magri, D., Fineschi, S., Bellarosa, R., Buonamici, A., Sebastiani, F., Schirone, B., and Vendramin, G. G. (2007). The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology* 16(24) : 5259-5266.
151. Makarevitch, I., K. Golovnina, S. Scherbik and A. Blinov (2003). "Phylogenetic Relationships of the Siberian Iris Species Inferred from Noncoding Chloroplast DNA Sequences." *International Journal of Plant Sciences* 164(2): 229-237.
152. Margaret A. T, J. and G. Adil (2002). "Iris stenophylla Hausskn. & Siehe ex Baker from Turkey and its cytology." *Botanical Journal of the Linnean Society* 140(2): 115-127.
153. Marinescu, M., A. Teodorescu, and N. Şuţan. (2013). Preliminary results on the in vitro propagation by leaf explants and axillary buds of *Iris aphylla* L. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 17(1): p. 279-282.
154. Marinescu, V.M. and V. Alexiu, *Iris aphylla* L. ssp. *Hungarica* Critically Endangered Taxon. In Europa. Editorial Board: p. 96.
155. Marrero-Gomez, M. V., A. Bañares-Baudet and E. Carqué-Alamo (2003). "Plant resource conservation planning in protected natural areas: an example from the Canary Islands, Spain." *Biological Conservation* 113(3): 399-410.
156. Martínez J., P. V., M. Luceño, and A. Cuadrado (2010). "Evolution of *Iris* subgenus *Xiphium* based on chromosome numbers, FISH of nrDNA (5S, 45S) and trnL-trnF sequence analysis." *Plant Systematics and Evolution* 289: 223-235.

157. Massey, J. and P. D. Whitson (1980). "Species biology, the key to plant preservation." *Rhodora* 82(829): 97-103.
158. Mathew, B. (1989). *The Iris*. London, Batsford.
159. Maxted, N. (1995). An ecogeographical study of *Vicia* subgenus *Vicia*, Rome, IT: IPGRI.
160. Mayr, E. (1982). *The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance*. Harvard University Press.
161. Médail, F. and K. Diadema. (2006). Biodiversité végétale méditerranéenne et anthropisation: approches macro et micro-régionales. In *Annales de géographie*. Armand Colin 5: 618-640.
162. Médail, F. and K. Diadema. (2009). "Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin." *Journal of Biogeography* 36(7): 1333-1345.
163. Médail, F. and P. Quézel. (1997). Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84(1): 112-127.
164. Menges, E. S. (1992). Stochastic modeling of extinction in plant populations. *Conservation biology*, Springer 10: 253-275.
165. Menges, E. S. (1995). "Factors limiting fecundity and germination in small populations of *Silene regia* (Caryophyllaceae), a rare hummingbird-pollinated prairie forb." *American Midland Naturalist* 133(2): 242-255.
166. Menges, E. S., D. M. Waller and S. C. Gawler (1986). "Seed set and seed predation in *Pedicularis furbishiae*, a rare endemic of the St. John River, Maine." *American Journal of Botany*: 1168-1177.
167. Meulenkamp, J.E. and W. Sissingh. (2003). Tertiary palaeogeography and tectonostratigraphic evolution of the Northern and Southern Peri-Tethys platforms and the intermediate domains of the African–Eurasian convergent plate boundary zone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 196(1): 209-228.
168. Miller, A. L. and R. P. Duncan (2003). "Extrinsic and intrinsic controls on the distribution of the critically endangered cress, *Ischnocarpus exilis* (Brassicaceae)." *Biological Conservation* 110(1): 153-160.

169. Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010, November). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Gateway Computing Environments Workshop (GCE) IEEE: 1-8.
170. Mitra, J. (1956). "Karyotype Analysis of Bearded Iris." *Botanical Gazette* 117(4): 265-293.
171. Mittermeier, R.A., et al. (2005). Wilderness conservation in a biodiversity hotspot. *International Journal of Wilderness* 11(3): 42-46.
172. Molina, W. F. (2007). "Chromosomal changes and stasis in marine fish groups." *Fish cytogenetics*: 69-110.
173. Molvray, M., Kores, P. J., & Chase, M. W. (2000). Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters. *Monocots: systematics and evolution*. Collingwood, Australia: CSIRO, 441-448.
174. Monty, A., L. Saad and G. g. Mahy (2006). "Bimodal pollination system in rare endemic *Oncocyclus* irises (Iridaceae) of Lebanon." *Canadian Journal of Botany* 84(8): 1327-1338.
175. Morley, R. (1982). "A palaeoecological interpretation of a 10,000 year pollen record from Danau Padang, Central Sumatra, Indonesia." *Journal of Biogeography*: 151-190.
176. Mousavi, S. A., Li, L., Wei, G., Räsänen, L., & Lindström, K. (2016). Evolution and taxonomy of native mesorhizobia nodulating medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *Systematic and Applied Microbiology* 39(4) : 260-265.
177. Mouterde, P. (1966-1983). *Nouvelle flore du Liban et de la Syrie*. Beyrouth (Liban), Imprimerie catholique.
178. Myers, N., et al. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403(6772): 853-858.
179. Nadkarni, A. (1976). *KM Nadkarni's Indian Materia Medica*. Bombay Popular Prakashana, Vol. 2, Bombay, India.
180. Nasircilar, A.G. and I.G. Deniz. (2014). An alternative plant propagation and conservation process for *Iris pampyphlica* an endemic and endangered geophyte. in *Book of proceedings: Fifth International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2014"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, October 23-26, 2014. University of East Sarajevo, Faculty of Agriculture.

181. Naves, Y. R., G. Mazuyer and E. Sagarin (1947). "Natural perfume materials."
182. Neto, C. C. M., M. B. Cioffi, L. A. C. Bertollo and W. F. Molina (2011). "Extensive chromosomal homologies and evidence of karyotypic stasis in Atlantic grunts of the genus *Haemulon* (Perciformes)." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 401(1): 75-79.
183. Nordbakken, J. F., K. Rydgren and R. Økland (2004). "Demography and population dynamics of *Drosera anglica* and *D. rotundifolia*." *Journal of Ecology* 92(1): 110-121.
184. Nunney, L. and K. A. Campbell (1993). "Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics." *Trends in Ecology & Evolution* 8(7): 234-239.
185. O'Brien, S. J. and E. Mayr (1991). "Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies." *Science (Washington)* 251(4998): 1187-1188.
186. Ohri, D. (2005). "Climate and growth form: the consequences for genome size in plants." *Plant Biology* 7(05): 449-458.
187. Olivieri, I. and R. Vitalis (2001). "La biologie des extinctions." *Revue médecine/sciences* 17 : 63-69.
188. Oostermeijer, J., S. Luijten and J. Den Nijs (2003). "Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation." *Biological conservation* 113(3): 389-398.
189. Oran, S.A. and A.H. Al-Gabbiesh. (2014). Conservation of *Iris bismarckiana* Regel (Iridaceae) Using Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis. *Journal of Agricultural Science and Technology*. A. 4(7A).
190. Östergren, G. and W. K. Heneen (1962). "A squash technique for chromosome morphological studies." *Hereditas* 48(1-2): 332-341.
191. Pacifici, M., Foden, W.B., Visconti, P., Watson, J.E., Butchart, S.H., Kovacs, K.M., Scheffers, B.R., Hole, D.G., Martin, T.G., Akçakaya, H.R. and Corlett, R.T., (2015). Assessing species vulnerability to climate change. *Nature Climate Change* 5(3):215-224.
192. Park, Y.-W., et al. (2006). Karyotype analysis of three Korean native *Iris* species. *Horticulture Environment and Biotechnology*. 47(1): p. 51-54.
193. Paszko, B. (2006). "A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices." *Plant Systematics and Evolution* 258(1-2): 39-48.

194. Pavlik, B. M., D. L. Nickrent and A. M. Howald (1993). "The recovery of an endangered plant. I. Creating a new population of *Amsinckia grandiflora*." *Conservation Biology* 7(3): 510-526.
195. Pavlik, B. M., N. Ferguson and M. Nelson (1993). "Assessing limitations on the growth of endangered plant populations, II. Seed production and seed bank dynamics of *Erysimum capitatum* ssp. *angustatum* and *Oenothera deltooides* ssp. *howellii*." *Biological conservation* 65(3): 267-278.
196. Penn, O., Privman, E., Ashkenazy, H., Landan, G., Graur, D., & Pupko, T. (2010). GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic acids research* 38(suppl 2): W23-W28.
197. Peruzzi, L. and H. Eroglu (2013). "Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure?" *Comparative cytogenetics* 7(1): 1.
198. Petit, R. J., El Mousadik, A., & Pons, O. (1998). Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12(4) : 844-855.
199. Petit, R.J., Aguinagalde, I., de Beaulieu, J.L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M. and Mohanty, A. (2003). Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300(5625): 1563-1565.
200. Pinkel, D., T. Straume and J. Gray (1986). "Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(9): 2934-2938.
201. Planisek, S. L. (1983). "The breeding system, fecundity and dispersal of *Iris lacustris*." *Mich. Bot.* 22(3): 93-102.
202. Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution* 25(7) : 1253-1256.
203. Post, G. (1933). *Flora of Syria, Palestine and Sinai*. Beirut, American University Press.
204. Prance, G. (1997). "The conservation of botanic diversity." *Plant Genetic Conservation- The in situ Approach*. Chapman and Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras 3.
205. Pullin A. S. (2002). *Conservation Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, 345 pp.

206. Ráb, P., J. Bohlen, M. Rábová, M. Flajšhans and L. Kalous (2006). "Cytogenetics as a tool box in fish conservation: the present situation in Europe." *Fish cytogenetics*. Science Publishers, Enfield: 215-241.
207. Rabinowitz D. S. (1981). Seven forms of rarity, pp. 205–217. In: *The Biological aspects of rare plant conservation*. (H. Synge editor) Wiley, Chichester, United Kingdom.
208. Raven, P.H., et al. (2013). *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Vol. 3: Island Press.
209. Regato, P. (2001). *The Mediterranean Forests, a New Conservation Strategy*. WWF-MedPO Ed, Rome.
210. Rix, M. (1997). Section *Oncocyclus*. In: *A guide to Species Irises*. London, Cambridge Press.
211. Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12) : 1572-1574.
212. Ryder, O. A. (1986). "Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies." *Trends in Ecology & Evolution* 1(1): 9-10.
213. Saad, L. (2006). *Etude écogéographique et biologie de la conservation des Iris Oncocycles endémiques du Liban*. Thèse de doctorat, Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux.
214. Saad, L. and G. Mahy (2009). "Molecular and morphological variation of rare endemic oncocyclus irises (Iridaceae) of Lebanon." *Botanical Journal of the Linnean Society* 159(1): 123-135.
215. Saad, L. and S. Khuri (2003). "Hanging in there by a fall-the *Oncocyclus* Irises of Lebanon." *British Iris Society*. 3p.
216. Saad, L., S. N. Talhouk and G. Mahy (2009). "Decline of endemic *Oncocyclus* irises (Iridaceae) of Lebanon: survey and conservation needs." *Oryx* 43(01): 91-96.
217. Saarela, J. M., H. S. Rai, J. A. Doyle, P. K. Endress, S. Mathews, A. D. Marchant, B. G. Briggs and S. W. Graham (2007). "Hydatellaceae identified as a new branch near the base of the angiosperm phylogenetic tree." *Nature* 446(7133): 312-315.
218. Sang, T., D. J. Crawford and T. F. Stuessy (1995). "Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear

- ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(15): 6813-6817.
219. Sapir, Y. and A. V. I. Shmida (2002). "Species concepts and ecogeographical divergence of *Oncocyclus* irises." *Israel Journal of Plant Sciences* 50(sup1): 119-127.
 220. Sapir, Y. and R. Mazzucco. (2012). Post-zygotic reproductive isolation among populations of *Iris atropurpurea*: the effect of spatial distance among crosses and the role of inbreeding and outbreeding depression in determining niche width. *Evolutionary Ecology Research* 14(4): 425-445.
 221. Sapir, Y., A. Shmida and G. Ne'eman (2005). "Pollination of *Oncocyclus* irises (*Iris*: Iridaceae) by Night-Sheltering Male Bees." *Plant Biology* 7: 417-424.
 222. Sapir, Y., Shmida, A., and Fragman, O. (2003). "Constructing Red Numbers for endangered plant species: Israeli flora as a test case." *Journal for Nature Conservation* 11 91-107.
 223. Sarukhan, J., M. Martinez-Ramos and D. Pinero (1984). "Analysis of demographic variability at the individual level and its population consequences." *Perspectives on plant population ecology*/edited by Rodolfo Dirzo and Jose Sarukhan.
 224. Schemske, D. W., B. C. Husband, M. H. Ruckelshaus, C. Goodwillie, I. M. Parker and J. G. Bishop (1994). "Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants." *Ecology* 75(3): 584-606.
 225. Schinz, H., L. Ruzicka, C. Seidel and C. Tavel (1947). "Produits à odeur de violette. Synthèse de la d, l- α -irone." *Helvetica Chimica Acta* 30(6): 1810-1814.
 226. Schwarzscher, T. (2003). "DNA, chromosomes, and in situ hybridization." *Genome* 46(6): 953-962.
 227. Schweizer, D. (1976). "Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI." *Chromosoma* 58(4): 307-324.
 228. Segal, B., Y. Sapir, and Y. Carmel. (2006). Fragmentation and pollination crisis in the self-incompatible *Iris bismarckiana* (Iridaceae), with implications for conservation. *Israel Journal of Ecology & Evolution* 52(2): 111-122.
 229. Shibli, R.A. and M. Ajlouni. (2000). Somatic embryogenesis in the endemic black iris. *Plant cell, tissue and organ culture* 61(1): 15-21.

230. Shmida, A., O. Fragman, R. Nathan, Z. Shamir and Y. Sapir (2002). "The Red Plants of Israel: a proposal of updated and revised list of plant species protected by the law." *Ecologia mediterranea* 28: 55-64.
231. Siljak-Yakovlev, S., Bogunić, F., Muratović, E., Šolić, M.E., Pavlović, D. & Medjedović, S. (2005). Genome organization of some Iris species assessed by molecular cytogenetics. XVII International Botanical Congress. Vienne: 384.
232. Siljak-Yakovlev, S., M. Cerbah, J. Coulaud, V. Stoian, S. C. Brown, V. Zoldos, S. Jelenic and D. Papes (2002). "Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*." *Theor Appl Genet* 104(2-3): 505-512.
233. Siljak-Yakovlev, S., S. Benmalek, M. Cerbah, T. C. DelaPeña, N. Bounaga, S. C. Brown and A. Sarr (1996). "Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm." *Sexual Plant Reproduction* 9(3): 127-132.
234. Simberloff, D. (1998). "Small and declining populations." *Conservation science and action*, ed. W.J. Sutherland: 116-134.
235. Simonet, M. (1932). "Recherches cytologiques et génétiques sur les Iris." *Bull. Biol. France Belg.* 78: 696-707.
236. Simonet, M. (1934). "Nouvelles recherches cytologiques et génétiques chez les iris." *Ann. sci. Nat, Bot. Annales des sciences naturelles Botanique* 25.
237. Simonich, M.T. and M.D. Morgan. (1994). Allozymic uniformity in *Iris lacustris* (dwarf lake iris) in Wisconsin. *Canadian Journal of Botany* 72(11): 1720-1722.
238. Soulé, M. E. (1986). "Conservation biology and the " real world." *Conservation biology. The science of scarcity and diversity*: 1-12.
239. Srisuwan, S., D. Sihachakr, and S. Siljak-Yakovlev. (2006). The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science* 171(3): 424-433.
240. Swift, H. (1950). "The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei." *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 36(11): 643.
241. Taberlet, P., L. Fumagalli, A. G. Wust-Saucy and J. F. Cosson (1998). "Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe." *Molecular Ecology* 7(4): 453-464.

242. Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet (1991). "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA." *Plant Molecular Biology* 17(5): 1105-1109.
243. Talhouk, S., R. Zurayk and S. Khuri (2001). "Conservation of the coniferous forests of Lebanon: past, present and future prospects." *Oryx* 35(3): 206-215.
244. Tan, A., H. Duman, F. N. Ýnal and A. Karagöz (2003). "Ecosystem conservation and management for threatened species projects: description of target species and their habitats." TACN (Turkish Association for the Conservation of Nature).
245. Taylor, J. J. (1976). A reclassification of *Iris* species bearing arillate seeds. *Proceedings Biol. Soc. Washington* 89, 35:411-420.
246. The Plant List. (2013). "Version 1.1." Retrieved 2/2/2016.
247. Tohmé, G. and H. Tohmé (2002). *A thousand and one flowers of Lebanon*, Lebanese University.
248. Tohmé, G. and H. Tohmé (2004). "Recherches sur le statut actuel des plantes endémiques du Liban." *Archaeology & history in Lebanon* (19): 64-69.
249. Tohmé, G. and H. Tohmé (2011). "Nouvelles recherches sur la flore endémique et naturalisée du Liban." *Lebanese Science Journal* 12(2): 133-141.
250. Tohmé, G. and H. Tohmé (201). *Illustrated flora of Lebanon*, National Council for Scientific Research.
251. Tohmé, G., & H. Tohmé (1981). *Extinct and disappearing animals in Lebanon*. Biology International.
252. Trias-Blasi, A. and M. Vorontsova (2015). "Botany: plant identification is key to conservation." *Nature* 521(7551): 161
253. Tzedakis, P. et al. (2002). Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. *Science* 297 (5589) : 2044-2047.
254. Uzun, S. et al. (2014). Efficient in vitro plant regeneration from immature embryos of endemic *Iris sari* and *I. schachtii*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 38 (3): 348-353.
255. Van Kley, J. and D. Wujek. (1993). *Habitat and ecology of Iris lacustris (the dwarf lake iris)*. Michigan botanist (USA).

256. Velterop, O. (2000). "Effects of fragmentation on pollen and gene flow in insect-pollinated plant populations." Groningen: s.n., 156p.
257. Vereecken, N. J., A. Dorchin and A. C. Dafni (2015). "Reply to Lavi & Sapir (2015): floral colour and pollinator-mediated selection in *Oncocyclus irises* (Iridaceae)." *New Phytologist* 207 (4): 948-949.
258. Vereecken, N. J., A. Dorchin, A. Dafni, S. Hötling, S. Schulz and S. Watts (2013). "A pollinators' eye view of a shelter mimicry system." *Annals of Botany* 111 (6): 1155-1165.
259. Violeta, M.M., A. Teodorescu, and Ş.N. Anca. (2003). Preliminary results on the in vitro propagation by leaf explants and axillary buds of *Iris aphylla* L. *In vitro* 2 (24): 40-48.
260. Vogel, J. C., Rumsey, F. J., Schneller, J. J., Barrett, J. A., & Gibby, M. (1999). Where are the glacial refugia in Europe? Evidence from pteridophytes. *Biological Journal of the Linnean Society* 66 (1) : 23-37.
261. Volis, S., et al. (2015). *Iris atrofusca* genetic and phenotypic variation, the role of habitat-specific selection in this variation structuring, and conservation implications using quasi in situ guidelines. *Israel Journal of Plant Sciences*, p. 1-8.
262. Volis, S., M. Blecher, and Y. Sapir. (2010). Application of complex conservation strategy to *Iris atrofusca* of the Northern Negev, Israel. *Biodiversity and conservation*. 19 (11): p. 3157-3169.
263. Walter, K. S. and H. J. Gillett (1998). 1997 IUCN Red List of threatened plants, IUCN.
264. Watts, S., Y. Sapir, B. Segal and A. Dafni (2013). "The endangered *Iris atropurpurea* (Iridaceae) in Israel: honey-bees, night-sheltering male bees and female solitary bees as pollinators." *Annals of Botany* 111(3): 395-407.
265. Wesselingh, R. A. and M. L. Arnold (2000). "Pollinator behaviour and the evolution of Louisiana iris hybrid zones." *Journal of Evolutionary Biology* 13 (2): 171-180.
266. West, W. A. (1963). New *Oncocyclus* Irises, *ASI Yearbook* 60-61.
267. West, W. A. (1967). "*Iris antilibanotica*." *ASI Yearbook*: 64-66.
268. White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18 (1): 315-322.
269. Wilson, C. A. (2004). "Phylogeny of *Iris* based on chloroplast *matK* gene and *trnK* intron sequence data." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33(2): 402-412.

270. Wilson, C. A., Padiernos, J. & Sapir Y. (2016). "The royal irises (*Iris* subg. *Iris* sect. *Oncocyclus*): Plastid and low-copy nuclear data contribute to an understanding of their phylogenetic relationships." *Taxon*: 12 pp.
271. Wilson, E. O. (2002). *The future of life*, Vintage.
272. Wilson, E. O. (2004). "Taxonomy as a fundamental discipline." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 359(1444): 739-739.
273. Wroblewska, A. and E. Brzosko. (2006). The genetic structure of the steppe plant *Iris aphylla* L. at the northern limit of its geographical range. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152 (2): 245-255.
274. Wroblewska, A., et al. (2003). High levels of genetic diversity in populations of *Iris aphylla* L. (Iridaceae), an endangered species in Poland. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142 (1): 65-72.
275. Wróblewska, A., Brzosko, E., Chudzińska, E., Bordács, S., and Ivanovych Prokopiv, A. (2010). Cytotype distribution and colonization history of the steppe plant *Iris aphylla*. *Annales Botanici Fennici*. *BioOne* 47 (1): 23-33.
276. Wu, Q. G. and D. F. Cutler (1985). "Taxonomic, evolutionary and ecological implications of the leaf anatomy of rhizomatous *Iris* species." *Botanical Journal of the Linnean Society* 90 (4): 253-303.
277. Young, N. D. (1996). "An analysis of the causes of genetic isolation in two Pacific Coast iris hybrid zones." *Canadian Journal of Botany* 74: 2006-2013.
278. Zimmer, E., S. Martin, S. Beverley, Y. Kan and A. C. Wilson (1980). "Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (4): 2158-2162.
279. Zohary, M., *Geobotanical foundations of the Middle East*. 1973.

Annexe 1 : Solutions utilisées

Préparations des plaques de chromosomes métaphasiques, Nitrate d'argent, tampons:

- Colchicine à 0,05%:

Eau distillée	100 ml
Colchicine	50 mg

- Ethanol acétique 3 :1:

	40 ml
Ethanol	30 ml
Acide acétique glacial	10 ml

- Ethanol à 70%:

	100 ml
Ethanol	70 ml
Eau distillée	30 ml

- Acide acétique glacial à 45%:

	10 ml
Acide acétique glacial	4,5 ml
Eau distillée	5,5 ml

- Nitrate d'argent à 50% :

AgNO ₃	5 g
-------------------	-----

Eau distillée	10 ml
---------------	-------

- Tampon citrate 0,1M pH 4,6:

Tri-sodium citrate	882 mg
Acide citrique	420 mg
Eau	50 ml
(dilution au 1/10 ^e au moment de l'utilisation)	

- Solution enzymatique R:

Tampon citrate 5mM pH 4,6	10 ml
Hémicellulase	0,4 g
Pectolyase Y23	0,1 g
Cellulase R10	0,4 g

Tampons, CMA:

Solution A	100 ml d'H ₂ O
Acide citrique	2,10 g
Solution B	100 ml d'H ₂ O
NA ₂ HPO ₄	5,361 g
Tampon Mac Ilvaine pH de 7	100 ml d'H ₂ O distillée (compléter)
Solution A	3,53 ml
Solution B	16,47 ml

Tampon MacIlvaine pH de 7 avec MgSO ₄	100 ml Tampon Mac Ilvaine pH de 7
MgSO ₄ (PM 246,47 g) à 0,005 M	0,123 g
Tampon MacIlvaine pH de 5,5	100 ml d'H ₂ O distillée (compléter)
Solution A	8,85 ml
Solution B	11,5 ml
Chromomycine A3 à 0,2 mg/ml	50 ml
Chromomycine A3 SIGMA	10 mg (flacon entier)
Tampon Mac Ilvaine pH de 7 avec MgSO ₄	50 ml

- Fluorochrome DAPI 2µg/ml dans MacIlvaine pH=7

Tampons, FISH:

- 20X SSC (Stérilisation à autoclave: 110 °C, 30 min.)

A diluer 5, 10 et 20 fois avec de l'eau ultra pure stérilisée pour obtenir les solutions 4X, 2X et 0,1X SSC

	2000 ml
NaCl	350,64 g
Trissodium citrate	176,46 g
Eau ultra pure	Qsp 2000 ml

- 4X SSC Tween (Stérilisation à l'autoclave: 110 C, 30 min.)

	1000 ml
Tween	2 ml
20X SSC	200 ml
Eau ultra pure	800 ml

- 4X SSC

	1000 ml
20X SSC	200 ml
Eau ultra pure	800 ml

- 2X SSC

	1000 ml
20X SSC	100 ml
Eau ultra pure	900 ml

- 0,1X SSC

	260 ml
2X SSC	13 ml
Eau ultra pure	247 ml

- Formamide 20%

	200 ml
0,1X SSC	160 ml
Formamide	40 ml

- RNase A (Stock à 20 mg.ml⁻¹)

	1 ml
RNase à 100 mg/ml (Qiagen)	200 µl
2X SSC	800 µl

A diluer 200 X dans du 2X SSC au moment de l'utilisation

- Pepsine (Stock à 500 mg.^{ml}⁻¹)

	1 ml
Pepsine	500 mg
0,01 M HCl	1 ml

- Solution BSA (Bovine serum albumin) (Stériliser sur filter millipore 0,22 µm)

	2 ml
BSA	100 mg
4X SSC Tween	2 ml

Solutions pour la cytométrie en flux:

TNP	200 ml
CPW-A (x100)	2 ml
CPW-B (x100)	2 ml
Mannitol	18,2 ml
PEG	500 ml
Triton X-100	1 ml
pH	6,5-7,0

- Le tampon d'extraction

Produit	Volume (mL)	Masse (g)	Concentration	Entreprise
NaCl (5M)	28		1.4 M	MERCK 106404
CTAB		2	0.02	SIGMA, H 5882
EDTA (0,5M)	4		20 mM	SIGMA, 35H0356
Tris HCl (1M, pH=8)	10		100 mM	BIOPROBE, TRIS 03
PVP soluble (40000)		2	0.02	SIGMA, 7443
		100		

**Annexe 2 : Le protocole et les produits utilisés pour la préparation de la sonde
de l'hybridation *in situ***

Solutions	Remarques	Concentration finale	1 lame
Formamide	Améliore la dénaturation.	50%	25µl
Dextran sulfate	Forme un réseau autour de la sonde.	50% W/V	10µl
20% SDS	Détergent.	0,1% W/V	0,25µl
Salmon sperm	Bloque les sites pour éviter les fixations aspécifiques.	250µL/mg	1,5µl
20×SSC	Solution saline où les chromosomes se sentent bien.		5µl
H2O pure	Le volume ajouté dépend du volume de sonde ajouté.		Qsp 6,75µl
ADN 18S	Les sondes sont préparées par PCR. Bien prélevé dans le fond du tube pour ne pas contaminer les sondes avec l'huile utilisée pour la PCR. Essuyer le cône.	20 à 30 ng/lame	1,5 µl
ADN 5S			1,5 µl
Volume final			50µl

Annexe 3: Tépales scannés des iris *Oncocyclus* du Liban

Iris sofarana

Foster 1889



Forma *westii*

(Dinsm.) n.

comb. — *Iris*

westii Dinsm.



<p>Forma <i>kasruwana</i> (Dinsm.) n. comb. — <i>Iris</i> <i>kasruwana</i> Dinsmore.</p>	
<p><i>Iris cedreti</i> Dinsm. in sched.</p>	
<p><i>Iris</i> <i>bismarckiana</i> Regel — /. <i>saari</i> Schott, v. <i>nazarena</i> Foster, /. <i>nazarena</i> (Foster) Dinsmore, /. <i>hermona</i> Dinsmore</p>	

Iris lortetii

Barbey



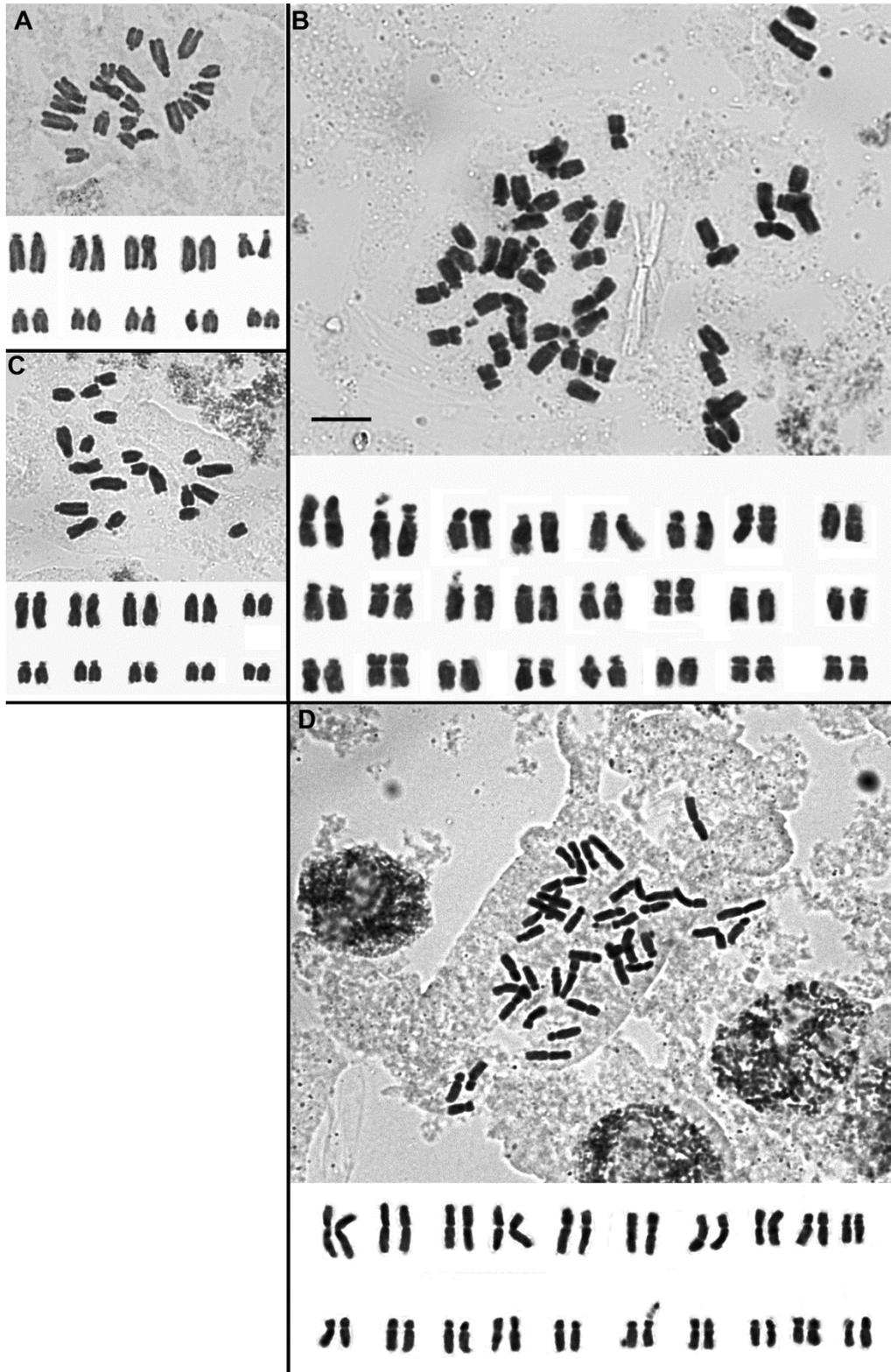
Iris

antilibanotica

Dinsm.



Annexe 4: Les plaques métaphasiques et les caryotypes de 4 espèces d'*Iris* :
 A : *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Hazzerta), B : *I. mesopotamica*, C : *I. sofarana*
 subsp. *sofarana* (Falougha), D : *I. unguicularis* var. *cretensis*.



Annexe 5 : Les données morphométriques pour chaque caryotype.

Morphometric data concerning the karyotype of *Iris* taxa **l** -long arm; **s** -short arm; **TL** -Total chromosome length; **TKL** = total haploid length of the chromosome complement; **r** -ratio long/short arms; **Ci%** -Centromeric index = $100 \times s/TL$; **AsI%** - Index expressed by the ratio of the sum of the lengths of the long arms of individual chromosomes to the TKL; **Ct** -Chromosome type (according to Levan & *al.*, 1964); **M_{CA}** -Mean Centromeric Asymmetry = $A \times 100$ [$A = \text{Mean (long arm-short arm)/(long arm+short arm)}$]; **CV_{CL}** -Coefficient of Variation of Chromosome Length = $A2 \times 100$ [$A2 = \text{standard deviation of chromosome length/mean chromosome length (Romero Zarco 1986)}$]; **TF%** index is expressed by the ratio of the sum of the lengths of the short arms of individual chromosomes to the TKL; **Syi%** -Value indicates the ratio of the mean length of the short arms against the mean length of the long arms in a chromosome set; **m** -metacentric; **sm** -submetacentric; **sat** -satellite **SD** -Standard Deviation. All the values are in μm .

hr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.6	5	5.6	8.3	10.7	85.28	t	70.6	31.4	14.7	17
2	0.5	4.8	5.3	9.6	9.4		t				
3	0.5	4.3	4.8	8.6	10.4		t				
4	0.5	3.8	4.3	7.6	11.6		st				
5	0.6	2.8	3.4	4.7	17.6		st-sat				
6	0.7	2.5	3.2	3.6	21.9		st-sat				
7	0.6	2.3	2.9	3.8	20.7		st				
8	0.5	2.3	2.8	4.6	17.9		st				
9	0.5	2.1	2.6	4.2	19.2		st				
10	0.5	2	2.5	4.0	20.0		st				
Total	5.5	32	37.4								
Average	0.5	3.2	3.7								
SD	0.1	1.2	1.2								

I. sofarana subsp. sofarana (Falougha)

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	MCA%	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.9	5.8	6.7	6.3	13.7	85.7	st	71.6	31.7	14.1	16.6
2	0.7	5.5	6.2	7.9	11.3		t				
3	0.6	5.3	5.8	8.9	10.1		t				
4	0.4	4.9	5.2	13.6	6.9		t				
5	0.7	3.3	4.0	4.8	17.3		st-sat				
6	0.6	3.1	3.7	5.5	15.4		st-sat				
7	0.8	2.9	3.7	3.6	21.7		st				
8	0.6	2.7	3.3	4.4	18.6		st				
9	0.6	2.5	3.1	4.5	18.3		st				
10	0.5	2.3	2.8	4.3	18.9		st				
Total	6.3	38.2	44.5	63.7							
Average	0.6	3.8	4.5								
SD			1.4								

I. sofarana subsp. sofarana (Hazzerta)

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	MCA%	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.7	5.4	6.1	7.6	11.6	84.3	t	68.6	29.3	15.7	18.5
2	0.6	5.1	5.7	8.9	10.1		t				
3	0.7	4.5	5.2	6.1	14.1		st				
4	0.6	3.7	4.3	5.7	14.9		st				
5	0.6	3.0	3.6	4.7	17.6		st-sat				
6	0.9	2.8	3.7	3.1	24.1		st-sat				
7	0.6	2.7	3.3	4.4	18.4		st				
8	0.6	2.6	3.1	4.4	18.4		st				
9	0.5	2.5	3.0	4.8	17.1		st				
10	0.5	2.2	2.7	4.3	18.8		st				
Total	6.4	34.4	40.9								
Average	0.6	3.4	4.1								
SD			1.2								

I. sofarana subsp. *kasruwana*

Chr. p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.8	5.1	5.9	6.4	13.5	86.8	st	73.6	31.6	13.19	15.20
2	0.6	4.7	5.3	7.6	11.6		t				
3	0.4	4.5	4.9	10.9	8.4		t				
4	0.4	4.1	4.5	11.5	8.0		t				
5	0.5	3.2	3.7	6.2	14.0		st-sat				
6	0.6	2.7	3.3	4.7	17.7		st-sat				
7	0.6	2.6	3.1	4.5	18.0		st				
8	0.5	2.3	2.8	4.3	18.9		st				
9	0.3	2.2	2.5	7.2	12.2		t				
10	0.4	2.1	2.4	5.3	15.8		t				
Total	5.1	33.4	38.5								
Average	0.5	3.3	3.8								
SD			1.2								

I. cedreti

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/T L	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.7	5.0	5.7	6.7	12.9	86.3	st	72.7	30.1	13.7	15.7
2	0.5	4.7	5.2	9.8	9.3		t				
3	0.5	4.5	5.0	8.8	10.2		t				
4	0.5	4.4	4.8	9.1	9.9		t				
5	0.7	3.2	3.9	4.8	17.4		st-sat				
6	0.5	2.8	3.3	5.8	14.8		st-sat				
7	0.7	2.6	3.3	3.6	21.6		st				
8	0.4	2.5	2.9	5.9	14.4		st				
9	0.4	2.2	2.6	4.9	17.1		st				
10	0.4	2.1	2.5	4.9	16.9		st				
Total	5.4	33.8	39.2								
Average	0.5	3.4	3.9								
SD			1.2								

I. westii

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/T L	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.5	5.0	5.5	9.8	9.3	86.6	t	73.2	28.1	13.3	15.5
2	0.5	4.8	5.3	9.4	9.6		t				
3	0.5	4.4	4.9	8.5	10.5		t				
4	0.4	3.8	4.2	10.0	9.1		t				
5	0.6	2.9	3.6	4.6	17.9		st-sat				
6	0.4	2.8	3.2	7.3	12.0		t-sat				
7	0.6	2.4	3.1	3.8	20.8		st				
8	0.6	2.3	2.9	4	20.0		st				
9	0.5	2.3	2.8	4.5	18.2		st				
10	0.4	2.3	2.8	5.1	16.3		st				
Total	5.1	33.1	38.3								
Average	0.5	3.3	3.8								
SD			1.1								

I. bismarckiana

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.6	3.6	4.2	6	14.3	84.2	st	68.4	29.6	15.7	16.7
2	0.5	3.6	4.1	5.6	12.2		st				
3	0.8	3.1	3.8	4	20.0		st				
4	0.5	3.1	3.6	6	14.3		st				
5	0.4	3.1	3.5	8	11.1		t-sat				
6	0.5	2.1	2.6	4	20.0		st-sat				
7	0.5	2.1	2.6	4	20.0		st				
8	0.5	2.1	2.6	4	20.0		st				
9	0.3	1.5	1.8	6	14.3		st				
10	0.3	1.5	1.8	6	14.3		st				
Total	4.9	25.6	30.5								
Average	0.3	1.5	3								
SD			0.9								

I. lortetii

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	0.56	4.44	5	8	11	86	t	71	33	14.3	16.7
2	0.60	3.93	5	7	13		st-t				
3	0.47	3.85	4	8	11		t				
4	0.64	3.42	4	5	16		st				
5	0.51	2.56	3	5	17		st-sat				
6	0.51	2.22	3	4	19		st-sat				
7	0.43	2.05	2	5	17		st				
8	0.38	2.05	2	5	16		st				
9	0.34	1.88	2	6	15		st				
10	0.30	1.79	2	6	14		st				
Total	5	28	33								
Average	0	3	3								
SD			1								

I. antilbanotica

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci=100s/T L	AsI%	Ct	M_{CA}%	CV_{CL}%	TF%	Syi%
1	5.1	5.3	10.5	1	49	60.4	m	40.4	31.7	39.6	65.7
2	4.9	5.1	10.1	1	49		m				
3	3.7	4.7	8.4	1.3	43.9		m				
4	3.7	4.5	8.2	1.2	45		m				
5	2.9	4.5	7.4	1.6	38.9		m				
6	2.9	4.1	7.0	1.4	41.2		m				
7	2.1	3.3	5.3	1.6	38.5		m				
8	2.1	3.1	5.1	1.5	40		m				
9	1.4	4.1	5.5	2.9	25		sm				
10	1	4.1	5.1	4	20		st				
11	1.2	3.3	4.5	2.7	27.3		sm				
12	1.2	2.9	4.1	2.3	30		sm				
Total	32.2	49	81.2								
Average	2.7	4.1	6.8								
SD			2.1								

I. persica

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	2.8	3.38	6.20	1.20	45.5	63.57	m	27.13	24.42	36.3	57.2
2	2.3	2.95	5.26	1.28	43.9		m				
3	2.1	2.65	4.79	1.24	44.6		m				
4	2.1	2.52	4.57	1.23	44.9		m				
5	2.0	2.39	4.36	1.22	45.1		m				
6	1.5	2.65	4.19	1.72	36.7		sm				
7	1.4	2.35	3.72	1.72	36.8		sm				
8	1.5	2.22	3.68	1.53	39.5		m				
9	1.2	2.56	3.76	2.14	31.8		sm				
10	0.8	2.82	3.59	3.67	21.4		st				
11	1.0	2.35	3.38	2.29	30.4		sm				
12	1.0	2.35	3.38	2.29	30.4		sm				
13	1.1	2.22	3.33	2.00	33.3		sm				
14	0.9	2.14	3.08	2.27	30.6		sm				
15	1.0	2.18	3.21	2.13	32.0		sm				
16	0.7	2.18	2.88	3.09	24.4		st				
17	1.0	2.18	3.21	2.13	32.0		sm				
18	1.0	2.05	3.08	2.00	33.3		sm				
19	1.0	1.79	2.82	1.75	36.4		sm				
20	0.8	1.67	2.44	2.17	31.6		sm				
Total	27.29	47.61	74.89								
Average	1.36	2.38	3.74								
SD			0.91								

I. unguicularis var. *cretensis*

Chr.p	s	l	TL=l+s	r=l/s	Ci%=100s/TL	AsI%	Ct	M _{CA} %	CV _{CL} %	TF%	Syi%
1	2.7	3.0	5.6	1.1	47.3	69.9	m	39.9	20.9	30.1	43
2	2.4	2.7	5.0	1.1	46.9		m				
3	1.6	2.2	3.8	1.3	43.2		m				
4	1.7	2.1	3.8	1.2	45.9		m				
5	1.6	1.8	3.4	1.2	46.3		m				
6	1.4	1.6	3.1	1.1	46.7		m				
7	0.8	3.8	4.6	4.6	17.8		st				
8	1.1	3.3	4.4	2.9	25.6		sm				
9	1.0	3.2	4.2	3.1	24.4		st				
10	0.9	3.0	3.8	3.4	22.7		st				
11	0.7	2.9	3.6	4.0	20.0		st				
12	0.6	2.9	3.5	4.7	17.6		st				
13	0.8	2.8	3.6	3.4	22.9		st				
14	1.0	2.7	3.7	2.6	27.8		sm				
15	0.9	2.7	3.6	2.9	25.7		sm				
16	0.7	2.7	3.4	3.7	21.2		st				
17	0.7	2.7	3.4	3.7	21.2		st				
18	0.7	2.5	3.2	3.4	22.6		st				
19	0.8	2.5	3.3	3.0	25.0		sm-st				
20	0.5	2.5	3.0	4.8	17.2		st				
21	0.9	2.1	3.0	2.2	31.0		st				
22	0.5	2.1	2.6	4.0	20.0		st				
23	0.8	1.7	2.6	2.1	32.0		sm				
24	0.9	1.6	2.6	1.8	36.0		sm				
Total	26.1	60.6	86.7								
Average	1.1	2.5	3.6								
SD			0.8								

I. mesopotamica

Annexe 6 : Les fiches d'information sur des produits utilisés

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:

Chloroform - anhydrous, ≥99%, contains 0.5-1.0% ethanol as stabilizer

Product Number: 288306
CAS Number: 67-66-3
MDL: MFCD00000826
Formula: CHCl₃
Formula Weight: 119.38 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	Colorless
Appearance (Form)	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure
Purity (GC)	≥ 99.0 %
Excluding Stabilizer	
Ethanol as Stabilizer	0.5 - 1.0 % (V)
Residue on Evaporation	≤ 0.0003 %
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.001 %
Note	-----

For 100 mL unit size, water content may exceed above specification; not to exceed 0.005%

Specification: PRD.2.ZQ5.10000025862



ISO 9001 CERTIFIED
 ISO 13485 CERTIFIED

AMRESCO LLC

28600 Fountain Parkway
 Solon, Ohio USA 44139
 440/349-1199 FAX: 440/349-1182
 www.amresco-inc.com
 Email: info@amresco-inc.com

CERTIFICATE OF QUALITY / CERTIFICATE OF ANALYSIS

Isoamyl Alcohol

Code: 0944

Chemical Formula:	C5H11OH	Manufacture Date:	(batch specific)
Molecular Weight:	88.15	Expiration/Reassay Date:	(batch specific)
CAS #:	123-51-3		
Appearance:	Clear liquid	Storage:	
		Grade:	ULTRA PURE GRADE

Additional Information

TEST	SPECIFICATION	DISPOSITION
Color (APHA)	<= 20	PASS
Moisture (KF)	<= 1.0 %	PASS
Purity	>= 99.0 %	PASS

Spec Set: 0944UP

Analysis may have been rounded to significant digits in specification limits.
 Product meets analytical specifications of the grades listed.

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

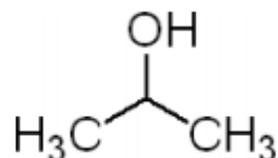
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
2-Propanol - ACS reagent, ≥99.5%

Product Number: **437522**
CAS Number: 67-63-0
MDL: MFCD00011674
Formula: C₃H₈O
Formula Weight: 60.1 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	Colorless
Appearance (Form)	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure
Color Test	≤ 10 APHA
Purity (GC)	≥ 99.50 %
Acetone	≤ 0.002 %
Carbonyl compounds as Propionaldehyde	≤ 0.002 %
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.2 %
Residue on Evaporation	≤ 0.001 %
Solubility	Pass
Titrateable Acid or Base	≤ 0.0001 meq
Meets ACS Requirements 10th Edition	Current ACS Specification
Recommended Retest Period 2 years	-----

Specification: PRD.0.ZQ5.10000021096

**Annexe 7: Evaluation élaborée par la liste rouge de l'IUCN sur le status de l'*Iris sofarana*
Foster au Liban**



Iris sofarana - Foster

PLANTAE - TRACHEOPHYTA - LILIOPSIDA - LILIALES - IRIDACEAE - Iris - sofarana

Common Names: Sofar Iris (English), سوسن صوفر (Arabic)

Synonyms: No Synonyms

Expert opinion from the Med Monocot project (Y. Sapir pers. comm 2016) is that *I. susiana* is a plant of uncertain (cultivated?) origin and should be considered a synonym of *I. sofarana* subsp. *kasruwana*. The Plant List notes *Iris sofarana* as a synonym of *Iris susiana* L. based on information from the iPlants project; however, this seems to note two sources that accept *I. sofarana* and only one that accepts the synonymy (an older publication and one based at RBG Kew). We keep *I. sofarana* and *I. susiana* separate here following the recommendation from RBG Edinburgh.

Taxonomic Note:

Wilson *et al.* (2016) confirmed the separation of two subspecies; *I. s. sofarana* and *I. s. kasruwana* (Dinsm.) Chaudhary, G.Kirkw. & C.Weymouth.

Red List Status

EN - Endangered, B1ab(i,ii,iii,v)+2ab(i,ii,iii,v) (IUCN version 3.1)

Red List Assessment

Assessment Information

Date of Assessment: 2016-02-05

Reviewed?	Date of Review:	Status:	Reasons for Rejection:	Improvements Needed:
true	2016-02-04	Passed	-	-

Assessor(s): Bou Dagher Kharrat, M., El Zein, H., Semaan, M., Forrest, A. & Christian, T.

Reviewer(s): Sapir, Y. & Allen, D.J.

Regions: Mediterranean, Global & Lebanon

Assessment Rationale

Global and Mediterranean regional assessment: Endangered (EN)

The species is endemic to the western slopes of Mount Lebanon where it is known from several localities with a highly restricted extent of occurrence (EOO) estimated at 347 km² and an area of occupancy (AOO) of 60 km². A number of threats are present, including urban development in the northern parts of its range and quarrying in the southern parts, which define the two locations. The species is assessed as Endangered (EN (B1ab(i,ii,iii,v)+2ab(i,ii,iii,v))) on the basis of declining EOO and AOO, area and quality of habitat, number of subpopulations, and number of mature individuals.

Distribution

Geographic Range

The species is endemic to the western slopes of Mount Lebanon where it is known from several localities. The extent of occurrence (EOO) is estimated at 347 km² and the area of occupancy (AOO) as 60 km².

The species was first described in 1889 by Sir Michael Foster, an English physiologist, with specimens collected around the village of Sofar. Two other forms within this species were described later by Mouterde (1966) and differ mainly in size and colour:

- the forma *kasruwana* having smaller flowers than the forma *sofarana* and inner tepals that are as coloured as outer tepals;
- and the forma *westii* having bigger flowers than the forma *sofarana* and inner tepals lighter than the outer tepals.

The two forms are here considered as subspecies: *Iris sofarana* subsp. *sofarana* and *Iris sofarana* subsp. *kasruwana* (Dinsm.) Chaudhary, G.Kirkw. & C.Weymouth according to Wilson *et al.* (2016). *Iris sofarana* forma *westii* (Dinsm.) Mouterde, it is also here considered as a valid species, *Iris westii* Dinsm., separate from *Iris sofarana*.

The species was observed from six different localities in Mount Lebanon according to Mouterde (1966):

- *Iris sofarana* forma *sofarana* at three localities: Sofar, Dahr el-Baidar, between the Zahle Pass and Hazzerta;
- *Iris sofarana* forma *kasruwana* at three localities: Nabaa el-Aasal (Faraya), Laqlouq, Ehmej.

Further localities are known within the above distribution range (M. Semaan pers. comm. 2016).

Area of Occupancy (AOO)

Estimated area of occupancy (AOO) - in km2	Justification
44	Revised from 24 HZ; revised again from Athens workshop (60 km2)
Continuing decline in area of occupancy (AOO) Qualifier	Justification
Yes	Observed -
Extreme fluctuations in area of occupancy (AOO)	Justification
No	-

Extent of Occurrence (EOO)

Estimated extent of occurrence (EOO)- in km2	Justification
347	Revised from 247 HZ; revised again from Athens workshop (110 km2)
Continuing decline in extent of occurrence (EOO) Qualifier	Justification
Yes	Observed -
Extreme fluctuations in extent of occurrence (EOO)	Justification
No	-

Locations Information

Number of Locations	Justification
2	See Threats section Revised from 1 location HZ

Elevation / Depth / Depth Zones

Elevation Lower Limit (in metres above sea level): 1200

Elevation Upper Limit (in metres above sea level): 2000

Map Status

Map Status	Data Sensitive?	Justification	Geographic range this applies to:	Date restriction imposed:
Done	-	-	-	-

Biogeographic Realms

Biogeographic Realm: Palearctic

Occurrence

Countries of Occurrence

Country	Presence	Origin	Formerly Bred	Seasonality
Lebanon	Extant	Native	-	Resident

Population

Saad and Mahy (2009) estimated the population size at around 4,500 individuals and the population is decreasing.

M. Bou Dagher Kharrat and H. Elzein (unpublished data of 2014 and 2015) estimated the subpopulation of Ehmej (*Iris sofarana* forma *kasruwana*) at around 1100 individuals (around 950 in El-Dichar and around 150 in Al-Mokhada) on a total area of around 15,74 ha.

Population Information

Current Population Trend: Decreasing

Number of mature individuals (=population size): 4500

Severely fragmented? Justification	
Yes	-

Continuing decline in mature individuals? Qualifier Justification	
Yes	Observed -

Habitats and Ecology

The plant is a geophyte with rhizomes that is found on a sandstone rock formation with low-herbaceous vegetation on rocky slopes in mountainous regions between 1,300 and 2,000 m altitude.

As with other *Oncocyclus iris* taxa, *Iris sofarana* is strictly allogamous. The sexual reproduction of this species totally depends on pollination by solitary bees of the Eucerini tribe, contrary to other plant species that have a long flowering period and that are pollinated by many types of insects. The lifespan of these flowers is very short and lasts for around four to five days.

Outside the flowering period of the irises, the bees spend usually the night in rock crevices or hollow branches. They are thus dependant on well preserved habitats with many flowers available. Orchards and fields which are generously sprayed with insecticide are deadly obstacles for these wild bees and jeopardise the survival of the species.

IUCN Habitats Classification Scheme

Habitat	Season Suitability	Major Importance?
4.4. Grassland -> Grassland - Temperate	resident Suitable	Yes

Continuing Decline in Habitat

Continuing decline in area, extent and/or quality of habitat? Qualifier Justification	
Yes	Observed -

Systems

System: Terrestrial

Plant Specific

Plant Growth Forms
Geophyte

Use and Trade

General Use and Trade Information

The flower is picked locally for domestic ornamental use.

End Use	Subsistence	National	International	Other (please specify)
13. Pets/display animals, horticulture	true	-	-	-

Is there harvest from captive/cultivated sources of this species? No

Trend in level of total offtake from wild sources: Unknown

Trend in level of total offtake from domesticated sources: Unknown

Threats

The different spots where the species occur are all located on the western slopes of Mount Lebanon. Due to its altitudinal range, the species has many potential threats amongst which are urban development for housing and recreational activities (ski resort and chalets) are the most important ones in the northern parts of its distribution.

Grazing does seem to be a threat (Saad *et al.* 2009) and collection of flowers by locals impacts all populations.

Sand quarrying is the most extensive threat in the southern part of the plants distribution, where land reclamation for agriculture and orchards is also increasing.

Threats Classification Scheme

Threat	Timing	Scope	Severity	Impact Score
1.1. Residential & commercial development -> Housing & urban areas	Ongoing	Minority (<50%)	Very Rapid Declines	Medium Impact: 7
1.3. Residential & commercial development -> Tourism & recreation areas	Ongoing	Minority (<50%)	Very Rapid Declines	Medium Impact: 7
2.1.2. Agriculture & aquaculture -> Annual & perennial non-timber crops -> Small-holder farming	Ongoing	Minority (<50%)	Very Rapid Declines	Medium Impact: 7
3.2. Energy production & mining -> Mining & quarrying	Ongoing	Minority (<50%)	Rapid Declines	Medium Impact: 6
4.1. Transportation & service corridors -> Roads & railroads	Ongoing	Minority (<50%)	Very Rapid Declines	Medium Impact: 7
5.2.1. Biological resource use -> Gathering terrestrial plants -> Intentional use (species is the target)	Ongoing	Majority (50-90%)	Slow, Significant Declines	Medium Impact: 6

Conservation

In situ conservation: The Plant Micro-Reserve of El-Dichar, based on work supported by a fund granted by the Critical Ecosystem Partnership Fund to the Saint Joseph University was designated as a Natural Site (Decree number 2878) in 2015 to protect *Iris sofarana* in Ehmej.

Ex situ conservation: Since some *Iris sofarana* plants occur on private lands adjacent to the *El-Dichar* microreserve, translocation of rhizomes is undertaken when habitat destruction is imminent and seed collection is performed every year for seed banking and for population reinforcement in the protected area. Memoranda of understanding with the private land owners were signed allowing the implementation of the above mentioned *ex situ* conservation actions. DNA based studies will be performed to assess gene-flow within and between the two subspecies.

Conservation Actions In- Place

Action Recovery Plan	Note
Yes	In the neighbourhood of the Natural Site of El-Dichar, irises threatened by construction projects are moved to be planted within the borders of the protected area.

Conservation sites identified	Note
Yes, over part of range	-

Occur in at least one PA	Note
Yes	El-Dichar Natural Site in Ehmej.

Percentage of population protected by PAs (0-100)	Note
1-10	-

Important Conservation Actions Needed

Conservation Actions	Note
1.2. Land/water protection -> Resource & habitat protection	-
3.4.2. Species management -> Ex-situ conservation -> Genome resource bank	-

Research Needed

Research	Note
1.1. Research -> Taxonomy	-
1.5. Research -> Threats	-
3.1. Monitoring -> Population trends	-
3.4. Monitoring -> Habitat trends	-

Bibliography

Mouterde, P. 1966. *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie*. Editions de l'Impr. catholique, Beirut.

Saad, L. and Mahy, G. 2009. Molecular and morphological variation of rare endemic oncocyclus irises (Iridaceae) of Lebanon. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159(123–135).

Saad, L., Talhouk, S.N. and Mahy, G. 2009. Decline of endemic *Oncocyclus* (Iridaceae) of Lebanon: Survey and conservation needs. *Oryx* 43(1): 91-96.

Tohme, G. and Tohme, H. 2014. *Illustrated Flora of Lebanon*. National Council for Scientific Research (CNRS), Beirut.

Wilson, C.A., Padiernos, J. and Sapir, Y. 2016. The royal irises (*Iris* subg. *Iris* sect. *Oncocyclus*): Plastid and low-copy nuclear data contribute to an understanding of their phylogenetic relationships. *Taxon* DOI: <http://dx.doi.org/10.12705/651.3>.

Annexe 8: Article: Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora.

M. Bou dagher-Kharrat, N. Abdel-Samad, B. Douaihy, M. Bourge, A. Fridlender, S. Siljak-Yakovlev & S. C. Brown.

Plant Biosystems, 2013

This article was downloaded by: [Spencer BROWN]

On: 03 December 2013, At: 10:55

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK

Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/tplb20>

Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora

M. Bou dagher-Kharrat^a, N. Abdel-Samad^{ab}, B. Douaihy^a, M. Bourge^c, A. Fridlender^d, S. Siljak-Yakovlev^b & S. C. Brown^c

^a Faculté des Sciences, Département Sciences de la Vie et de la Terre, Laboratoire Caractérisation Génomique des Plantes, Campus Sciences et Technologies, Université Saint-Joseph, Mar RoukosMkallésLiban

^b CNRS, Ecologie, Systématique, Evolution, UMR 8079, Université Paris-Sud, Bâtiment 360, 91405, Orsay Cedex, France

^c Compartimentation Cellulaire et IMAGIF, Institut des Sciences du Végétal, CNRS UPR 2355 et IFR87, 91198, Gif-sur-Yvette, France

^d Faculté des Sciences Université de Provence (AMU) - case 75, 3 place Victor Hugo, Marseille Cedex 3, France

Accepted author version posted online: 05 Nov 2013. Published online: 29 Nov 2013.

To cite this article: M. Bou dagher-Kharrat, N. Abdel-Samad, B. Douaihy, M. Bourge, A. Fridlender, S. Siljak-Yakovlev & S. C. Brown, Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology (2013): Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora, Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana, DOI: 10.1080/11263504.2013.861530

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/11263504.2013.861530>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora

M. BOU DAGHER-KHARRAT¹, N. ABDEL-SAMAD^{1,2}, B. DOUAIHY¹, M. BOURGE³,
A. FRIDLENDER⁴, S. SILJAK-YAKOVLEV², & S. C. BROWN³

¹Faculté des Sciences, Département Sciences de la Vie et de la Terre, Laboratoire Caractérisation Génomique des Plantes, Campus Sciences et Technologies, Université Saint-Joseph, Mar Roukos, Mkalles, Liban; ²CNRS, Ecologie, Systématique, Evolution, UMR 8079, Université Paris-Sud, Bâtiment 360, 91405 Orsay Cedex, France; ³Compartmentation Cellulaire et IMAGIF, Institut des Sciences du Végétal, CNRS UPR 2355 et IFR87, 91198, Gif-sur-Yvette, France and ⁴Faculté des Sciences Université de Provence (AMU) - case 75, 3 place Victor Hugo, Marseille Cedex 3, France

Abstract

The geographic position of Lebanon in the Mediterranean basin at the transition of two major landmasses, Eurasia and Africa, has contributed to its high plant diversity and makes its flora particularly interesting to study. This paper contributes to the plant DNA C-value database of native Lebanese taxa. These data should reinforce biodiversity evaluation, systematic and evolution studies involving processes of speciation such as polyploidisation. C-values have been estimated by flow cytometry using propidium iodide as intercalary fluorochrome stain. Each sample comprised at least five individuals. Where possible, several populations were measured for each species. This study presents C-values for 225 taxa belonging to 55 families and 141 genera. C-values are novel for 193 taxa including 126 plants endemic to the Eastern Mediterranean region. These are the first values for 50 genera. In this panel, genome size ranged from $1C = 0.28$ pg in *Hypericum thymifolium* to 54.69 pg in *Fritillaria alfredae*. The life growth form and life cycle type are analysed according to the genome size class. Cases of polyploidy are reported for some species usually considered as only diploid. Examination of C-value variation through flow cytometry constitutes a powerful tool to screen taxonomic heterogeneity, opening further investigations.

Keywords: Chromosome number, endemism, genome size, Lebanon, nuclear DNA C-value, plant diversity, polyploidy

Introduction

The Mediterranean Basin is one hotspot of world biodiversity and an important site of floral exchange and active plant speciation (Quézel 1995). According to phylogeographic studies, it may be considered as a major refugium where many plant species have survived during periods of glaciation and interglaciation cycles (Taberlet et al. 1998; Petit et al. 2002; Médail & Diadema 2009).

Consequently, numerous domesticated plants have originated from this region. Its phylogenetic resources are valuable and of particular importance to avoid severe genetic erosion (Zohary 1972, 1996; Zeder 2008). Despite a high human impact, this region is still conserving high proportions of endemic

plants. From a genetic conservation viewpoint, endemic plants are valuable because they are only found in restricted regions and therefore harbour unique genetic information.

One of the 10 hotspots in the Mediterranean basin is the Syria–Lebanon–Israel/Palestine area (Médail & Quézel 1997). Lebanon is a hinge between three continents, Europe, Asia and Africa, and thus its flora is influenced by the bio-geographical adjacent regions. Hence, it constitutes a natural laboratory for evolutionary studies.

The Lebanese territory is divided between mountainous slopes, fertile valleys which separate two mountainous chains parallel with the sea, and the steppe areas in the North-East. Deep canyons and numerous rivers characterise the mountainous relief.

Correspondence: M. Bou Dagher-Kharrat, Faculté des Sciences, Département Sciences de la Vie et de la Terre, Laboratoire Caractérisation Génomique des Plantes, Campus Sciences et Technologies, Université Saint-Joseph, Mar Roukos, Mkalles, Liban. Tel: + 961 1 421 382. Fax: + 961 4 532567. Email: boudagher@fs.usj.edu.lb

The singularity of geomorphological regions gives rise to many bio-climatic zones and several habitat types, including several distinct semi-natural habitats that have evolved and adapted to anthropogenic activities. Lebanon boasts one of the highest densities of floral diversity in the Mediterranean basin, which in turn is one of the biologically most diverse regions in the world (Médail & Quézel 1997). Endemism in Lebanon is significant, owing to its geomorphologic diversity and the isolation effect of its diverse topography. In Lebanon, floristic richness is estimated to include 2600 vascular plant species, of which 311 (12%) are endemic taxa (Khouzami et al. 1996). The last published flora of Lebanon (Mouterde 1984) was completed 60 years ago and needs to be reviewed and upgraded. Many species declared to be strict endemics are found today to be more widespread and, furthermore, many other species have been discovered (Tohmé & Tohmé 2004, 2007, 2008).

Since an integrative knowledge of the taxa is a prerequisite for appropriate management and conservation of this unique plant genetic resource, we undertook the screening of native Lebanese flora, assessing its distribution according to the present land cover and land use patterns. In the framework of this study, genome size assessment was used as a tool to help identify groups with taxonomic problems.

Indeed, genome size is an important biodiversity character of fundamental significance (Bennett et al. 2000) and it varies considerably between angiosperm species (Bennett & Smith, 1976, 1991). The amount of DNA per chromosome set is known to be a fairly constant characteristic of species. Its interspecific variation may be of assistance when addressing taxonomic questions. The C-value variation is a basic plant diversity character significant in many fields including ecology (Bennett 1987; Grime 1996), cell and molecular biology (Rees & Durrant 1986; Bennett & Laurie 1995), systematics and evolution (Muratović et al. 2005; Bogunic et al. 2007; Pellicer et al. 2010). Knowledge of genome size is also beneficial when planning genetic fingerprinting (Bou Dagher-Kharrat et al. 2001, 2007) and quantitative genetics.

Our initiative reinforces the international effort to achieve a better coverage of C-value data, increasing plant generic and familial representation, in order to gain a better understanding of the mechanisms of genome size evolution and its relationships with geographic and ecological factors (Bennett & Leitch, 2005, 2011). Furthermore, in the framework of karyological databases (Bareka et al. 2008; Gacek et al. 2011; Bedini et al. 2012; Garcia et al. 2012; Jara-Seguel & Urrutia 2012), new karyological information is certainly welcome.

The aims of this study were (1) to determine DNA C-values of numerous species native to Lebanon, focusing on endemics and (2) to compare

our values with previous published data in order to identify possible taxonomic problems or complexity. From our observations, certain priorities emerge concerning taxonomic groups that need to be revisited. The data-set will be available after publication on the Lebanon-flora database website (Bou Dagher-Kharrat et al. 2007) accessible at: <http://www.lebanon-flora.org>.

Material and methods

Plant material

Plant material (leaves, seedlings and bulbs) was collected in wild populations from Lebanon. The taxonomic treatment, geographical origin, endemism, life cycle and growth form of collected samples are given in Appendix S1. Investigated taxa belong to 55 families and 141 genera. For plant identification, we used the “Nouvelle flore du Liban et de la Syrie” (Mouterde 1984), considered as the basic reference for Lebanese flora. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the families of flowering plants was done according to APG III (2009). Our panel comprised plants from various biotopes and different altitudes from sea level to 2684 m. Some of investigated taxa are presented in Figure 1.

Flow cytometry

Nuclear DNA content was assessed by flow cytometry according to the protocol of Marie and Brown (1993). Measurements were taken on nuclei extracted from fresh leaves. Each taxon was represented by at least five individuals. Conditions recommended by Doležel and Bartoš (2005) to estimate genome size reliably were fulfilled. Moreover, the ratio of positions between 2C and 4C nuclei (or higher classes in the case of endoreplication) was regularly noted as an assurance of linearity: for larger genomes, the propidium iodide concentration was raised to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Five calibration standards, differing in DNA amount, were used (footnote Appendix S1). The nuclei were isolated by chopping together sample and internal standard leaves using a razor blade in plastic Petri dishes containing 800 μl of Galbraith's nuclear isolation buffer (Galbraith et al. 1983) which was supplemented with 10 mM sodium metabisulfite and 1% polyvinylpyrrolidone 10,000. The suspension of nuclei was filtered through nylon mesh (pore size 50 μm). After RNase treatment (2.5 U ml^{-1} ; Roche, Meylan, France), the nuclei were stained with 50–100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ propidium iodide (Sigma-Aldrich, Lyon, France), a DNA intercalating dye without base-specificity. DNA content of at least 5000 nuclei was determined for each sample using an

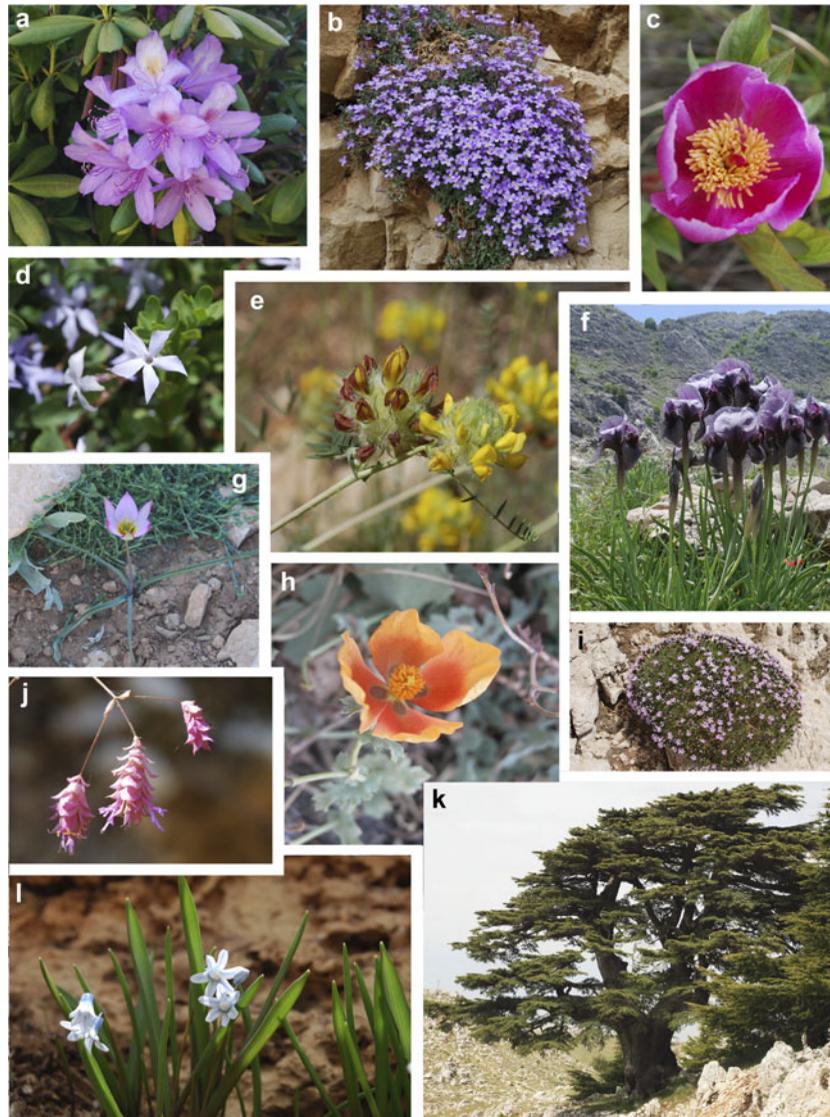


Figure 1. Some of the analysed taxa from Lebanon flora: (a) *Rhododendron ponticum* var. *brachycarpum*, (b) *Aubrieta libanotica*, (c) *Paeonia kesrouanensis*, (d) *Vinca libanotica*, (e) *Astragalus ehrenbergii*, (f) *Iris sofarana* subsp. *kasruwana*, (g) *Tulipa aucheriana* subsp. *westii*, (h) *Glaucium leiocarpum*, (i) *Acantholimon libanoticum*, (j) *Origanum libanoticum*, (k) *Cedrus libani*, (l) *Puschkinia scilloides* var. *libanotica*. Photographs taken by Magda Bou Dagher-Kharrat.

Elite ESP cytometer (Beckman-Coulter, Roissy, France) or a PartecCyFlow SL2 532 nm laser cytometer (Munster, Germany). The 2C DNA content was calculated assuming a linear relationship between the fluorescent signals from stained nuclei of the unknown specimen and the known internal standard. Values reported for each taxon are the mean of measurements done on five individuals from the same population. The dispersion of this value was low: expressing the SD of these means as coefficients of variation (CV), the modal CV was about 1.6%.

The DNA histograms themselves had CV of the 2C peak generally <5% (data not shown). In order to test the reproducibility of our analysis, we resampled the same population of some taxa twice at different times or seasons. This was the case for

Centaurium erythraea, *Pancratium maritimum* and *Reichardia glauca*: the same values were obtained (cf. Appendix S1).

Chromosome number determination

When possible, the chromosome number was determined from root-tip meristems. The root-tips obtained from seed germinations in Petri dishes were pretreated with 0.05% (m/v) colchicine for 2–4 h at room temperature or with 0.002 M 8-hydroxyquinoline for 3–4 h at 16° C. Fixation of pretreated root-tips was performed in freshly prepared 3:1 (v/v) ethanol:acetic acid at least for 24–48 h. After hydrolysis in 1N HCl (5–12 min depending on species) at 60°C and staining in Schiff reagent

following standard Feulgen method, the squash was performed in a drop of acetic carmine 45%.

Results and discussion

This study reports DNA C-values for 225 taxa from Lebanon, of which 193 are not included in any previous compilation (Bennett & Leitch 2011) (Appendix S1). This includes novel data for 126 endemic species: 24 taxa strictly endemic to Lebanon, 19 taxa endemic to Lebanon and Syria, 12 endemic to Lebanon, Syria and Turkey and 71 endemic to the Eastern Mediterranean region.

Of the studied taxa, 70% belong to eudicots, 25% to monocots, 4% to the gymnosperms and 2% to monilophytes. A total of 56 families and 141 genera are represented (Table I). To our knowledge and according to available databases, the data are novel for 50 genera.

The derived 1C-values in both pg and Mbp are presented in Appendix S1. The 1C-values range from 0.28 to 54.69 pg, respectively, for *Hypericum thymifolium* and *Fritillaria alfredae*. These values fall within the range defined by the smallest [1C = 0.0648 pg in *Genlisea margaretae*, Lentibulariaceae (Greilhuber et al. 2006)] and the largest [1C = 152.2 pg in *Paris japonica*, Melanthiaceae (Pellicer et al. 2010)] genome sizes known.

According to the classification of Leitch et al. (1998), 45% of the analysed taxa have “very small” 1C values (< 1.4 pg), 17% have “small” genomes ($1.4 < 1C \leq 3.5$ pg), 27.5% of the panel are species having “intermediate” values ($3.5 < 1C \leq 14$ pg) and few (8.4%) are classified as having “large” ($14 < 1C \leq 35$ pg) or 2% “very large” ($C > 35$ pg) genomes (Figure 2). Although eudicots constitute 70% of our panel, they account for almost all (96.4%) of the taxa having small and very small genomes. The large and very large genomes classes

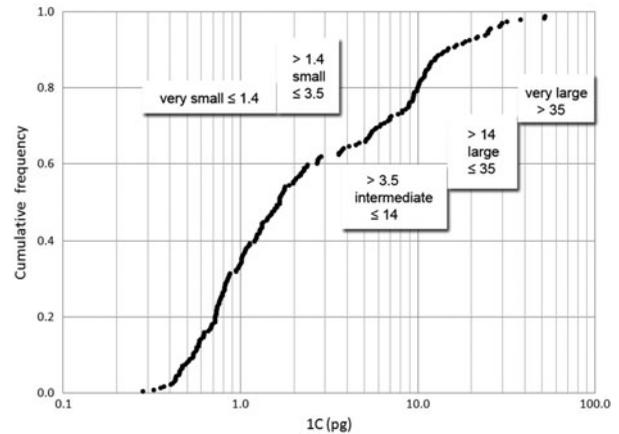


Figure 2. Cumulative frequency of 1C-values for 225 Lebanese taxa. The classifications of Leitch (Leitch et al. 1998) are indicated.

are constituted by gymnosperms, geophyte monocots and only four eudicot species: *Paeonia mascula*, *P. kesrouanensis*, *Anemone blanda* and *Ficaria grandiflora* (cf. Appendix S1). The two *Paeonia* species were polyploid with $2n = 4x = 20$ chromosomes. *Anemone blanda* and *Ficaria grandiflora* are two representatives of the Ranunculaceae family which is known to include some species with large C-values (Leitch et al. 1998).

When we analysed genome size distribution according to the Life Growth Form *sensu* Raunkier (1934), we found that intermediate, large and very large genome size categories are dominated by geophytes (Figure 3). Moreover, low nuclear DNA content was clearly associated with short life cycles (Figure 4). This is a general finding corroborated by Arumuganathan and Earle (1991) and Chase et al. (2005) who showed that orchids that are effectively annuals do appear to have smaller genomes than the

Table I. C-value data at various taxonomic levels.

	Number of taxa listed in Appendix S1
Taxa	225
Monocots	56
Eudicots	156
Gymnosperms	9
Monilophytes	4
Genera	141
Monocots	28
Eudicots	104
Gymnosperms	5
Monilophytes	4
Families	55
Monocots	6
Eudicots	42
Gymnosperms	3
Monilophytes	4

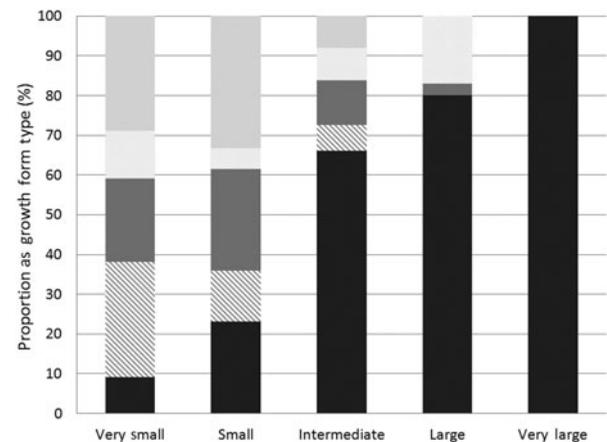


Figure 3. Life growth form *sensu* Raunkier (1934) according to the genome size class: Geophyte (dark grey), therophyte (diagonal lines), chamaephyte (grey), phanerophyte (dotted) and hemicryptophyte (light grey).

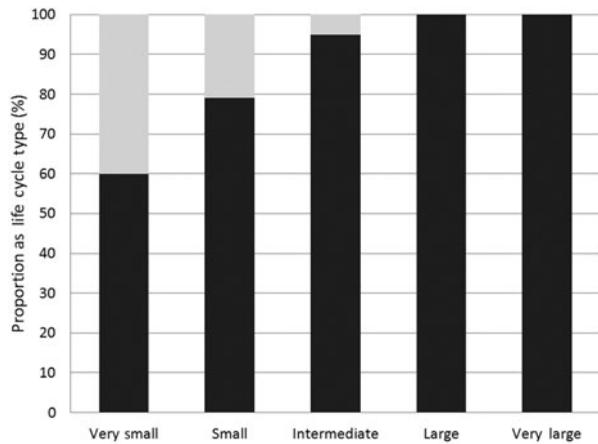


Figure 4. Life cycle type according to genome size class: Annual and biennial (light), perennial (dark).

average of Orchidaceae representatives. In fact, it seems that the largest genomes are in plants that have distinct and short periods of growth followed by long

periods of dormancy (e.g. geophytes in the monocot orders Asparagales and Liliales).

For the 32 taxa for which 2C-values already exist in the databases (Table II), we found some differences. These discrepancies could be due to different factors such as species determination errors or real cases of intraspecific variation. They could also reflect methodological differences or errors. There was a positive correlation ($r = 0.85$, $p < 0.01$) between previously published and our present data. For 11 of these 32 taxa, C-values reported were multiples of polyploidy (Table II). After exclusion of these taxa, the correlation became $r = 0.95$, $p < 0.01$ (Figure 5). Our estimates are generally 10% lower than those in other reports.

The case of polyploidy was confirmed for two species for which we verified the chromosome number. For *Puschkinia scilloides* var. *libanotica*, we found $2n = 4x = 20$ chromosomes corresponding to 13.57 pg/C. The chromosome number of

Table II. Comparison of previously published 1C-values (pg) and our data for 32 taxa.

Taxa	1C (pg)		Reference
	Our data	Published data	
<i>Anemone blanda</i>	16.06	15.08	Bennett and Smith (1991)
<i>Arisarum vulgare</i>	13.90	17.55	Zonneveld et al. (2005)
<i>Centaureum erythraea</i>	1.03	1.23	Bennett and Smith (1991)
<i>Cephalanthera longifolia</i>	16.53	16.75	Bennett and Laurie (1995)
<i>Cyclamen persicum</i>	1.67	1.59	Winkelmann et al. (1998)
<i>Foeniculum vulgare</i> ^a	1.60	4.55	Das and Mallick (1989)
<i>Fritillaria alfredae</i>	54.69	57.10	Leitch et al. (2007)
<i>Fritillaria crassifolia</i>	51.93	66.50	Zonneveld et al. (2005)
<i>Fritillaria elwesii</i> ^a	51.81	103.65	Zonneveld (2010)
<i>Hyacinthus orientalis</i>	25.63	21.33; 32.38; 46.60	Brandham and West (1993)
<i>Iris pseudacorus</i>	5.52	6.43	Bennett and Smith (1991)
<i>Iris histrio</i> ^a	12.48	28.20	Goldblatt et al. (1984)
<i>Lupinus digitatus</i>	0.62	0.69	Naganowska et al. (2003)
<i>Narcissus tazetta</i>	12.50	15.15	Zonneveld (2008)
<i>Odontites luteus</i> ^a	1.11	0.565	Hanson et al. (2005)
<i>Paeonia mascula</i> ^a	29.25	17.75	Mulry (1999)
<i>Pancreatum maritimum</i>	24.83	30.05	Zonneveld et al. (2005)
<i>Pinus pinea</i>	25.19	30.40	Grotkopp et al. (2004)
<i>Polypodium australe</i>	8.16	10.70	Murray (1985)
<i>Primula vulgaris</i>	0.45	0.50	Bennett and Smith (1991)
<i>Prospero autumnale</i> ^a	14.62	4.48	Ainsworth et al. (1983)
<i>Puschkinia scilloides</i> ^a	13.57	6.63	Greilhuber (1977)
<i>Reichardia glauca</i>	2.60	2.51	Siljak-Yakovlev et al. (1998)
<i>Rhamnus catharticus</i> ^a	0.42	1.33	Bennett and Smith (1991)
<i>Tulipa aucheriana</i>	23.85	22.15	Southern (1967)
<i>Tulipa montana</i> ^a	31.68	15.13	Leitch et al. (2007)
<i>Tussilago farfara</i>	1.66	37.46	Peruzzi et al. (2009)
<i>Veronica arvensis</i> ^a	1.66	2.3	Grime and Mowforth (1982)
<i>Veronica cymbalaria</i>	0.75	0.33	Albach and Greilhuber (2004)
<i>Veronica syriaca</i>	0.54	0.83	Albach and Greilhuber (2004)
<i>Vicia canescens</i>	3.57	0.7	Albach and Greilhuber (2004)
<i>Viola riviniana</i> ^a	0.73	3.12	Akpinar and Bilaloglu (1997)
		1.35	Grime et al. (1985)

^a Supposed to have different ploidy levels, which could explain discrepancies. Twenty taxa are graphed in Figure 5 to depict the correlation and discrepancies.

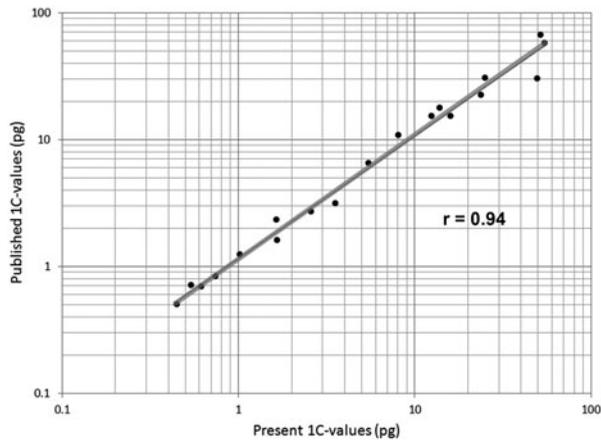


Figure 5. Comparison of previously published and our 1C data (20 taxa) after removal of taxa with different ploidy levels which could be a primary cause of discrepancy. The solid line is the perfect correlation, with a $\pm 5\%$ discrepancy range shown in grey. The correlation equation is shown in the figure. The sources are indicated [Table II](#).

“*Puschkinia libanotica*” was first accurately established by Darlington (1936) then by Greilhuber (1977) as $2n = 10$ with 6.63 pg/C ([Table II](#)), who also realised that plants may possess supernumerary B-chromosomes. This species may carry up to seven B-chromosomes (Barlow & Vosa 1969) and this variability may account for the inconclusive work of Sato (1942) in establishing the true chromosome number. But in our case, karyotype analysis showed that the whole genome was duplicated with an absence of B-chromosomes.

For *Paeonia mascula*, Mulry (1999) found 17.75 pg/C for $2n = 2x = 10$ chromosomes while Tzanoudakis (1983) found Greek taxa to be tetraploid. Putatively, the same taxon in Lebanon has 29.25 pg/C. This finding indicates a polyploidisation of the genome. If autopolyploidisation occurred, the genome would have doubled to 35.5 pg, higher than the 29.25 pg/C found. According to Leitch and Bennett (2004), many polyploids show a reduction in nuclear DNA amount relative to simple multiples of their respective diploids. Hence, genome downsizing following polyploid formation is a widespread phenomenon of considerable biological significance. Our karyotype analysis showed that this species is effectively $2n = 4x = 20$, but chromosome morphology suggests that this is an allopolyploid plant. Since the exact parental genome donors of the allopolyploid taxon are unknown, comparison between the polyploidy form and its respective diploids is not possible. At the taxonomic level, these *Paeonia mascula* should probably not be considered as the same species. This polyploidy complex in the Mediterranean area needs a complete revision.

For *Hyacinthus orientalis*, different ploidy levels have already been reported (diploid, triploid and tetraploid) corresponding to 21.33, 32.38 and 46.60 pg/C, respectively (Brandham & West 1993). However, our value (25.62 pg/C) is between the diploid and the triploid. This must be addressed by cytogenetic analysis to see whether this value reflects the presence of B-chromosomes or aneuploidy, which is common in this species according to the same authors.

Genome doubling through auto- or allopolyploidy, contributing to speciation and evolution, is a well-documented phenomenon occurring in the plant kingdom. In some groups, polyploidy occurs frequently and represents the major force of divergence. Allopolyploidy results from hybridisation that affects manifold genome size variation through a series of different ploidy levels. For many species around the Mediterranean, taxa present in Lebanon are considered as varieties. Our study shows that they are found to be polyploid when compared to the widely distributed species. These taxa represent the apoenemics (following the classification of Siljak-Yakovlev & Peruzzi 2012). This was the case, for example, of the Lebanese taxa *Puschkinia scilloides* var. *libanotica* which has 13.57 pg/C with $2n = 20$ chromosomes (Appendix S1) while *P. scilloides* from Iran has 6.63 pg/C with $2n = 10$ chromosomes (Greilhuber 1977). Likewise, according to Hanson et al. (2005), *Odontites luteus* has 0.565 pg/C, while our study reveals that the Lebanese variety has double namely 1.11 pg/C (Appendix S1). Further investigations are needed to establish the appropriate taxonomic rank of these endemic taxa.

Our results indicate that polyploidy has had a significant role in shaping the Lebanese flora and represents a frequent speciation mechanism.

Focus on some genera

Astragalus, *Iris*, *Ophrys* and *Orchis* genera are well represented in Lebanon. Numerous taxa are considered in our sampling. In fact, for the Orchidaceae family, only 223 taxa are reported in genome size compilations (Bennett & Leitch 2011). However, many of these values must be taken with caution as flow cytometry of the Orchidaceae is difficult. Their tissues display strong somatic endoreplication with scarcely a trace at the true 2C level which may then be overlooked accidentally. Moreover, strictly partial endoreplication is observed in many species, further confusing interpretation of cytometric histograms from foliar, shoot and root tissues. This has been clearly demonstrated for the *Vanilla* spp. (Lepers-Andrzejewski et al. 2011), but holds for many other orchids. In our panel, 18 Orchidaceae species were measured: one species for each of the four genera

Cephalanthera, *Dactylorhiza*, *Neotinea* and *Serapias*; three species for *Anacamptis*, five species for *Orchis* and six for *Ophrys* genera. Three genera included in our study are novel reports. For *Cephalanthera longifolia*, we found 16.53 pg/C (the largest in our panel) while 16.75 pg/C was obtained in the literature (Bennett & Laurie 1995). Compared to other genera of Orchidaceae, *Orchis* and *Ophrys* show relatively large genomes, ranging from 5.07 pg/C for *Ophrys apifera* (our smallest) to 10.49 pg/C for *Ophrys fusca*. With its 788 genera and ~18,500 species, Orchidaceae is the most species-rich plant family, displaying extraordinary floral diversity. The Orchidaceae are currently the most variable Angiosperm family with genome sizes ranging 168-fold ($1C = 0.33\text{--}55.4\text{ pg}$) (Leitch et al. 2009).

Greilhuber and Ehrendorfer (1975) proposed an evolutionary pathway in which *Ophrys* evolved from *Orchis s.l.* (part of which is currently included under the genus *Anacamptis s.l.*; Bateman et al., 1997), through *Serapias* as an evolutionary step genus. Bernardos et al. (2003) give $2n = 2x = 36$ chromosomes as the most common chromosome number in subtribe *Orchidinae* (*Anacamptis*, *Himantoglossum*, *Serapias* and *Ophrys*) with different karyotype morphologies. Apparently, genome size differs between species having the same chromosome number (our unpublished data). By combining with cytogenetic and molecular analysis, C-values should contribute to better understanding the evolution of this complex group.

Noteworthy is the 10-fold variation in genome size observed in *Romulea* genus (1.29 pg/C for *R. bulbocodium*; 11.65 pg/C for *R. phoenicia*). Peruzzi et al. (2011) reported tetra-, penta- and hexaploid cytotypes in 11 Mediterranean *Romulea* species. Moreover, different ploidy levels were reported for this genus with high dysploidy rate giving rise to contrasting chromosome numbers, even for a single species. *Romulea bulbocodium* was, for instance, firstly reported by Castroviejo (1984) as triploid $2n = 3x = 28$ chromosomes, while Peruzzi et al. (2011) found Italian taxa as tetraploid $2n = 4x = 36$. The latter authors highlighted, however, the negative correlation between the ploidy level and chromosome size, which disfavours the genome size increasing. In the absence of data associating the genome size to chromosome number, it would be difficult to explain this issue. More investigations are necessary including both genome size and karyological studies.

Pancreaticum maritimum (Amaryllidaceae) is widely distributed along the coastlines of the Mediterranean, the Atlantic, the Black and Caspian seas. The two analysed Lebanese populations, separated by almost 200 km, had a 5% significantly different genome size (24.83 pg/C for Tyr population and

26.10 pg/C for Ramkin population). The analyses (each $n = 5$) were repeated twice in different seasons. An accession studied by Zonneveld et al. (2005) had 30.1 pg/C, a 15% difference. Despite the wide Mediterranean distribution of *P. maritimum*, De Castro et al. (2012) found identical sequences for four plastid DNA markers in 11 different accessions of *P. maritimum* reflecting a low variability in this species. Similarly, Grassi et al. (2005) analysed 10 different Mediterranean populations by AFLP markers and found their genomes extremely homogeneous and conserved. Nevertheless, there are difficulties to differentiate closely related *Pancreaticum* taxa sharing comparable ecological niches using morphometric data (Di Silvestro et al. 2010). Thus, the sampling should be considered with caution.

In the genus *Iris*, despite a constant chromosome number $2n = 20$ and a uniform karyotype in *Oncocyclus* section, our results show a difference in the C-values between the eight studied taxa. Moreover, this genome size screening revealed a real problem of population identification for endemic taxa. In fact, *Iris kasruwana* is considered as a subspecies of *I. sofarana*. However, this classification based on morphological character is inaccurate and failed to discriminate between taxa and/or populations since quantitative criteria varied gradually and flower color cannot be used as a diagnostic character for Lebanese representatives of *Oncocyclus* section. We sampled one *I. sofarana s.l.* population and two putative *I. sofarana* subsp. *kasruwana* populations. *I. sofarana s.l.* had 5.75 pg/C while the two other populations showed distinctive values: 8.18 and 5.77 pg/C. All the known Lebanese populations of these two taxa will now be screened for their C-value as a possible indicator of population differentiation in this complex. For conservation purpose, it is important to distinguish these two taxonomic units.

Conclusion

Like other regions of the Mediterranean basin, Lebanon constitutes a melting-pot of geological activity, climatic evolution and human civilisations. The combination of geological variation and altitude, along with strong climatic variation among different slopes, can create marked heterogeneity in the ecological forces acting on the evolution of plant differentiation. This localised mosaic vegetation common to many Mediterranean landscapes is considered as a hotspot of plant diversity due to the coexistence of plants with diverse biogeographical origins and the large number of narrow endemic taxa.

In the Mediterranean, polyploidy resulting or not from hybridisation and having auto- or allopolyploid

origin has played a major role in the diversification of new (apo-) endemic Mediterranean taxa (Verlaque & Contandriopoulos 1990; Siljak-Yakovlev & Peruzzi 2012). Instructive for our understanding of evolution, the endemic taxa illustrate the immense value of marginal populations of widespread species for the conservation of evolutionary potential. The existence of such populations in Lebanon should thus be recognised in the elaboration of priorities for conservation. Examination of C-value variation constitutes a powerful tool to screen such cases to elucidate taxonomic heterogeneity, as prelude to cytotaxonomic (Guerra 2012) and DNA barcoding approaches (Sandionigi et al. 2012).

Half of the 225 taxa addressed herein are endemic species for the East Mediterranean region. For 86% of the taxa and for 50 genera, these are the first C-values. Starting from these data, several genera such as *Astragalus*, *Iris*, *Cyclamen* and *Pancreatum* are currently being studied in our laboratories using molecular markers and advanced cytogenetic techniques in order to better understand the different microevolutionary processes which occur during the speciation.

Acknowledgements

We thank Olivier Catrice for his help in flow cytometry, Fatima Pustahija and Nadine Haddad for the statistical analysis and the students of Saint-Joseph University for their help in plant material collection.

Funding

Part of this work was supported by *AUF réseau BIOVEG* [grant number P2.2092RR707], by UNESCO-L'Oreal for Women in Science Fellowship 2008, UNESCO-HP Brain Gain Initiative 2010 and by the National Council for Scientific Research Lebanon (1 June 2008). This work has benefitted from the facilities of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif campus (www.imagif.cnrs.fr) which is supported by the *Conseil Général de l'Essonne*.

Supplemental data

Supplementary material relating to this article is available online at <http://dx.doi.org/10.1080/11263504.2013.861530>.

References

Ainsworth C, Parker J, Horton D. 1983. Chromosome variation and evolution in *Scilla autumnalis*. In: Bennett ePEBMD, editor. Kew chromosome conference II. London: Allen & Unwin. pp. 261–268.

- Akpınar N, Bilaloglu R. 1997. Cytological investigations of certain species of *Vicia* L. *Turk J Bot* 21: 197–207.
- Albach D, Greilhuber J. 2004. Genome size variation and evolution in *Veronica*. *Ann Bot (London)* 94: 897–911.
- APG III TAPG 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linnean* 161: 105–121.
- Arumuganathan K, Earle ED. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208–218.
- Bareka P, Mitsainas GP, Constantinidis T, Kamari G. 2008. PhytoKaryon: A karyological database of European and Mediterranean plants. *Flora Mediterranea* 18: 109–116.
- Barlow PW, Vosa CG. 1969. The chromosomes of *Puschkinia libanotica* during mitosis. *Chromosoma* 27: 436–447.
- Bateman R, Pridgeon A, Chase M. 1997. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 2. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis sensu stricto*. *Lindleyana* 12: 113–141.
- Bedini G, Garbari F, Peruzzi L. 2012. Chromosome number variation of the Italian endemic vascular flora. State-of-the-art, gaps in knowledge and evidence for an exponential relationship among even ploidy levels. *Comp Cytogenet* 6: 191–211.
- Bennett M. 1987. Variation in genic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist* 106: 177–200.
- Bennett MD, Bhandol P, Leitch IJ. 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. *Ann Bot (London)* 86: 859–909.
- Bennett MD, Laurie D. 1995. Chromosome size in maize and *Sorghum* using EM serial section reconstructed nuclei. *Maydica* 40: 199–204.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2005. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects. *Ann Bot (London)* 95: 45–90.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2011. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Targets, trends and tomorrow. *Ann Bot (London)* 107: 467–590.
- Bennett M, Smith J. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc London (Biol)* 274: 227–274.
- Bennett M, Smith J. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc London (Biol)* 334: 309–345.
- Bernardos S, Amich F, Gallego F. 2003. Karyological and taxonomic notes on *Ophrys* (Orchidoideae, Orchidaceae) from the Iberian Peninsula. *Bot J Linnean Soc* 142: 395–406.
- Bogunic F, Muratovic E, Ballian D, Siljak-Yakovlev S, Brown S. 2007. Genome size stability among five subspecies of *Pinus nigra* Arnold s.l. *Environ Exper Bot* 59: 354–360.
- Bou Dagher-Karrat M, Abdel Samad N, Khater K, Siljak-Yakovlev S. 2007. La flore virtuelle du Liban. Available: <http://www.lebanon-flora.org>. Accessed Feb 2013 23.
- Bou Dagher-Kharrat M, Grenier G, Bariteau M, Brown S, Siljak-Yakovlev S, Savoré A. 2001. Karyotype analysis reveals interspecific differentiation in the *Cedrus* genus despite genome size and base composition constancy. *Theor Appl Genet* 103: 846–854.
- Bou Dagher-Kharrat M, Mariette S, Fady B, Lefevre F, Grenier G, Plomion C, et al. 2007. Geographical diversity and genetic relationships among *Cedrus* species assayed by AFLP. *Tree Genet Genomes* 3: 275–285.
- Brandham P, West J. 1993. Correlation between nuclear DNA values and differing optimal ploidy levels in *Narcissus*, *Hyacinthus* and *Tulipa* cultivars. *Genetica* 90: 1–8.
- Castroviejo S. 1984. Números comosomáticos de plantas occidentales, 280–289. *Anales Jard Bot Madrid* 40: 457–462.
- Catrice O, Coba de la Peña T, Brown SC. 2006. Applications en biologie végétale: Contraintes, succès, espoirs. Chapter 12. In: Ronot X, Grunwald D, Mayol J-F, Boutonnat J, editors. *La cytométrie en flux*. Paris: Tec & Doc – Lavoisier. pp. 235–253.

- Chase M, Hanson M, Albert V, Whitten M, Williams N. 2005. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *Ann Bot (London)* 95: 191–199.
- Darlington C. 1936. The internal mechanics of the chromosomes V. Relational coiling of chromatids at mitosis. *Cytologia* 7: 248–255.
- Das A, Mallick R. 1989. Variation in karyotype and nuclear DNA content in different varieties of *Foeniculum vulgare* Mill. *Cytologia* 54: 129–134.
- De Castro O, Brullo S, Colombo P, Jury S, De Luca P, Di Maio A. 2012. Phylogenetic and biogeographical inferences for *Pancretrium* (Amaryllidaceae), with an emphasis on the Mediterranean species based on plastid sequence data. *Bot J Linnean Soc* 170: 12–28.
- Di Silvestro D, Ardenghi NMG, Parolo G. 2010. Il Progetto FORMARE, FORMazione e Ricerca scientifica in aree marine protette: Stage di Ecologia marina e Geobotanica applicate. XIX Congresso del Gruppo per l'ecologia di Base G. Gadio Italy: Olbia. pp. 21–23.
- Doležel J, Bartoš J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot (London)* 95: 99–110.
- Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51: 127–128.
- Gacek P, Grzegorz G, Andrzej J. 2011. Chromosome numbers and polyploidy in Polish angiosperms. *Acta Biol Cracov Bot* 53: 37–49.
- Galbraith D, Harkins K, Maddox J, Ayres N, Sharma D, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049–1051.
- Garcia S, Garnatje T, Kovarik A. 2012. Plant rDNA database: Ribosomal DNA loci information goes online. *Chromosoma* 121: 389–394.
- Goldblatt P, Walbot V, Zimmer EA. 1984. Estimation of genome size (C-value) in Iridaceae by cytophotometry. *An Missouri Bot Gard* 71: 176–180.
- Grassi F, Cazzaniga E, Minuto L, Peccenini S, Barberis G, Basso B. 2005. Evaluation of biodiversity and conservation strategies in *Pancretrium maritimum* L. for the Northern Tyrrhenian Sea. *Biodiversity Conserv* 14: 2159–2169.
- Greilhuber J. 1977. Nuclear DNA and heterochromatin contents in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica*, and *Puschkinia scilloides* (Liliaceae). *Plant Syst Evol* 128: 243–257.
- Greilhuber J, Borsch T, Muller K, Worberg A, Porembski S, Barthlott W. 2006. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae with chromosomes of bacterial size. *Plant Biol* 8: 770–777.
- Greilhuber J, Ehrendorfer F. 1975. Chromosome number and evolution in *Ophrys* (Orchidaceae). *Plant Syst Evol* 124: 125–138.
- Grime J. 1996. Testing predictions of the impacts of global change on terrestrial ecosystems. *Asp Appl Biol* 45: 3–13.
- Grime J, Mowforth M. 1982. Variation in genome size – An ecological interpretation. *Nature* 299: 151–153.
- Grime J, Shacklock J, Band S. 1985. Nuclear DNA contents, shoot phenology and species co-existence in a limestone grassland community. *New Phytol* 100: 435–445.
- Grotkopp E, Rejmánek M, Sanderson MJ, Rost TL. 2004. Evolution of genome size in pines (*Pinus*) and its life-history correlates: Supertree analyses. *Evolution* 58: 1705–1729.
- Guerra M. 2012. Cytotaxonomy: The end of childhood. *Plant Biosyst* 146: 703–710.
- Hanson L, Leitch I, Bennett M. 2005. Kew, Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens. Available: <http://data.kew.org/cvalues/>. Accessed Feb 2013 23.
- Jara-Seguel P, Urrutia J. 2012. Cytogenetics of Chilean angiosperms: Advances and prospects. *Revista Chilena de Historia Natural* 85: 1–12.
- Khouzami M, Hayek A, Bassil M. 1996. Biological diversity of Lebanon. Comprehensive report, Beyrouth, Ministère de l'Agriculture.
- Leitch I, Beaulieu J, Cheung K, Hanson L, Lysak M, Fay M. 2007. Punctuated genome size evolution in Liliaceae. *J Evol Biol* 20 (2296): 2308.
- Leitch I, Bennett MD. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biol J Linnean Soc* 82: 651–663.
- 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 (London)* 82: 85–94.
- Leitch I, Kahandawala I, Suda J, Hanson L, Ingrouille MJ, Chase MW, et al. 2009. Genome size diversity in orchids: Consequences and evolution. *Ann Bot (London)* 104: 469–481.
- Lepers-Andrzejewski S, Siljak-Yakovlev S, Brown S, Wong M, Dron M. 2011. Diversity and dynamics of plant genome size: An example of polysomaty from a cytogenetic study of Tahitian vanilla (*Vanilla x tahitensis*, Orchidaceae). *Am J Bot* 98: 986–997.
- Marie D, Brown SC. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell* 78: 41–51.
- Médail F, Diadema K. 2009. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *J Biogeogr* 36: 1333–1345.
- Médail F, Quézel P. 1997. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean. *Ann Mo Bot Gard* 84: 112–127.
- Mouterde P. 1984. Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. Beyrouth: Impr. catholique.
- Mulry M. Available: <http://data.kew.org/cvalues/>. Accessed Feb 2013 23 1999.
- Muratović E, Bogunić F, Šoljan D, Siljak-Yakovlev S. 2005. Does *Lilium bosniacum* merit species rank? A classical and molecular-cytogenetic analysis. *Plant Syst Evol* 252: 97–109.
- Murray B. 1985. Karyotypes and nuclear DNA amounts in *Polypodium* L. (Polypodiaceae). *Bot J Linnean Soc* 90: 209–216.
- Naganowska B, Wolko B, Sliwiska E, Kaczmarek Z. 2003. Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Ann Bot (London)* 92: 349–355.
- Pellicer J, Fay MF, Leitch IJ. 2010. The largest eukaryotic genome of them all? *Bot J Linnean Soc* 164: 10–15.
- Peruzzi L, Iiriti G, Frignani F. 2011. Contribution to the karyological knowledge of Mediterranean *Romulea* Species (Iridaceae). *Folia Geobot* 46: 87–94.
- Peruzzi L, Leitch IJ, Caparelli KF. 2009. Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. *Ann Bot (London)* 103: 459–475.
- Petit RJ, Brewer S, Bordács S, Burg K, Cheddadi R, Coart E, et al. 2002. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *For Ecol Manage* 156: 49–74.
- Quézel P. 1995. La flore du bassin méditerranéen: Origine, mise en place, endémisme. *Ecol Mediterr* 21: 19–39.
- Raunkier C. 1934. The life forms of plants and statistical plant geography. Clarendon: Oxford.
- Rees H, Durrant A. 1986. Recombination and genome size. *Theor Appl Genet* 73: 72–76.
- Sandionigi A, Galimberti A, Labra M, Ferri E, Panunzi E, De Mattia F, et al. 2012. Analytical approaches for DNA barcoding data – How to find a way for plants? *Plant Biosyst* 146: 805–813.
- Sato D. 1942. Karyotype alteration and phylogeny in Liliaceae and allied families. *Jap J Bot* 12: 157–161.

- Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Zoldos V, Godelle B. 1998. Heterochromatin and rDNA organisation and evolution in the genus *Reichardia*. *Cytogen Cell Genet* 81: 114.
- Siljak-Yakovlev S, Peruzzi L. 2012. Cytogenetic characterization of endemics: Past and future. *Plant Biosyst* 146(3): 694–702.
- Southern D. 1967. Species relationships in genus *Tulipa*. *Chromosoma* 23: 80–94.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A-G, Cosson JF. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol Ecol* 7: 453–464.
- Tohmé G, Tohmé H. 2004. Nouvelles plantes non citées dans la flore du Liban. *Leb Sci J* 5: 109–114.
- Tohmé G, Tohmé H. 2007. Nouvelles plantes du Liban. *Leb Sci J* 8: 131–137.
- Tohmé G, Tohmé H. 2008. Nouvelles plantes du Liban et redescription de certaines espèces. *Leb Sci J* 9: 121–129.
- Tzanoudakis D. 1983. Karyotypes of four wild *Paeonia* species from Greece. *Nord J Bot* 3: 307–318.
- Verlaque R, Contandriopoulos J. 1990. Analyse des variations chromosomiques en région méditerranéenne: Polyploidie, différenciation et adaptation. *Ecol Mediterr* 16: 93–112.
- Winkelmann T, Sangwan R, Schwenkel H. 1998. Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Cyclamen persicum* Mill: Relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Report* 17: 400–404.
- Zeder MA. 2008. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *PNAS* 105: 11597–11604.
- Zohary D. 1972. The wild progenitor and the place of origin of the cultivated lentil: *Lens culinaris*. *Econ Bot* 26: 326–332.
- Zohary D. 1996. The mode of domestication of the founder crops of Southwest Asian agriculture. In: Eurasia Harris D, editor. Origins and spread of agriculture and pastoralism in Eurasia. London: University College London Press. pp. 142–158.
- Zonneveld B. 2008. The systematic value of nuclear DNA content for all species of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae). *Plant Syst Evol* 275: 109–132.
- Zonneveld B. 2010. New record holders for maximum genome size in eudicots and monocots. *J Bot* 2010: 527357.
- Zonneveld BJM, Leitch IJ, Bennett MD. 2005. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Ann Bot (London)* 96: 229–244.

Bou Dagher-Kharrat M, Abdel-Samad N, Douaihy B, Bourge M, Siljak-Yakovlev S, Brown S.C. (2013) Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora, *Plant Biosystems*, **147** (4), 1228-1237 DOI: 10.1080/11263504.2013.861530

Appendix S1(17 pages): Alphabetical list of 225 taxa studied by cytometry with: family and group affiliation, Endemism status (ES), Life Cycle Type (LCT), Life Growth Form (LGF), derived 1C DNA values in Mbp and pg, locality, and the internal standard species (S).

Infrageneric taxa	Family	Higher group	ES	LCT	LGF	1C (Mbp)	1C (pg)	Locality altitude (m)	S
<i>Abies cilicica</i> (Antoine & Kotschy) Carrière	Pinaceae	G		P	PH	18153	18.56	Quammouah, 1500 m	E
<i>Acantholimon libanoticum</i> Boiss.	Plumbaginaceae	E	L	P	CH	6905	7.06	Arsal, 2130 m	B
<i>Acer obtusifolium</i> Sm.	Sapindaceae	E	EMR	P	PH	699	0.72	Nahr el kaleb, 50 m	A
<i>Achillea maritima</i> (L.) Ehrend. & Y.P.Guo	Asteraceae	E		P	CH	2787	2.85	Tyr, 0 m	C
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	Adiantaceae	P		P	G	5355	5.48	Nahr Ibrahim, 70 m	B
<i>Aethionema cordifolium</i> Boiss.	Brassicaceae	E		P	CH	2088	2.14	Afqua, 1500 m	A
<i>Ajuga chamaepitys</i> Schreber subdp. <i>tridactylites</i> Davis	Lamiaceae	E	EMR	P	PH	993	1.02	Afqua, 1650 m	B
<i>Alkanna leiocarpa</i> Rech. fil.	Boraginaceae	E		P	CH	10856	11.1	Afqua, 1500 m	E
<i>Allium libani</i> Boiss.	Amaryllidaceae	M	L, S	P	G	19154	19.59	Aarsal, 2130	E
<i>Anacamptis coriophora</i> (L.) R.M.Bateman	Orchidaceae	M		P	G	11159	11.41	Baakline 940 m	E
<i>Anacamptis papilionacea</i> (L.) R.M.Bateman	Orchidaceae	M		P	G	9912	10.14	Botmeh, 1000 m	E
<i>Anacamptis pyramidalis</i> (L.) Rich.	Orchidaceae	M		P	G	12685	12.97	Baakline,	E
<i>Anagallis foemina</i> Mill.	Primulaceae	E		A	T	1697	1.74	Tyr, 0 m	B
<i>Anarrhinum orientale</i> Benth.	Plantaginaceae	E	EMR	P	H	489	0.5	Aquoura, 2000 m	A

<i>Anemone blanda</i> Schott & Kotschy	Ranunculaceae	E	EMR	P	G	15707	16.06	Ehden, 1500 m	C
<i>Arabis alpina</i> L. subsp. <i>caucasica</i> (Willd.) Briq.	Brassicaceae	E	EMR	P	CH	416	0.43	Afqua, 1650 m	B
<i>Arceuthobium oxycedri</i> (DC.) M.Bieb	Loranthaceae	E		P	PH	9296	9.51	Ehden, 1600 m	E
<i>Arenaria deflexa</i> Dec.	Caryophyllaceae	E	EMR	A	CH/H	993	1.02	Afqua, 1650	B
<i>Arisarum vulgare</i> O.Targ.Tozz.	Araceae	E	EMR	P	G	13599	13.9	Zeita, 600 m	C
<i>Arum elongatum</i> Stev.	Araceae	E	EMR	P	G	4362	4.46	Aarsal, 2130 m	B
<i>Arum hygrophilum</i> Boiss.	Araceae	E	EMR	P	G	4587	4.69	Moukhtara, 1000 m	E
<i>Asperugo procumbens</i> L.	Boraginaceae	E		A	T	318	0.33	Afqua, 1500 m	A
<i>Asphodeline damascena</i> (Boiss.) Baker	Xanthorrhoeaceae	M	L, S	B	G	2655	2.72	Aarsal, 2130 m	E
<i>Asphodelus ramosus</i> Viv. subsp. <i>ramosus</i>	Xanthorrhoeaceae	M		P	G	3726	3.81	Jabal Torbol, 500 m	E
<i>Asplenium ceterach</i> L.	Aspleniaceae	P		P	H	11540	11.8	Nahr Ibrahim, 70 m	E
<i>Astragalus angulosus</i> DC.	Fabaceae	E	L	P	CH	822	0.84	Tawmet Jezzine, 1000 m	B
<i>Astragalus berytheus</i> Boiss.	Fabaceae	E	L, P	P	G	1374	1.41	Bir Hassan, 50 m	A
<i>Astragalus bethlehemitica</i> (Boiss.) Podl.	Fabaceae	E	EMR	P	CH	2201	2.25	Ayha, 1350 m	B
<i>Astragalus dictyocarpus</i> Boiss.	Fabaceae	E	L,S	P	H	836	0.86	Barqa, 1730 m	B

<i>Astragalus ehdenensis</i> Mout.	Fabaceae	E	L	P	H	1531	1.57	Ehden, 1700 m	A
<i>Astragalus ehrenbergii</i> Bunge	Fabaceae	E	L, S	P	H	1056	1.08	Barqa, 1730 m	B
<i>Astragalus hirsutissimus</i> DC.	Fabaceae	E	L	P	H	1941	1.99	Bcharreh, 2600 m	B
<i>Astragalus pinetorum</i> Boiss.	Fabaceae	E	EMR	P	H	988	1.01	Arz Bcharreh, 1900 m	B
<i>Astragalus schizopterus</i> Boiss.	Fabaceae	E	L,S	P	H	1183	1.21	Qammouaa, 1460 m	B
<i>Astragalus sofarensis</i> (J. Thiébaud) Podl.	Fabaceae	E	L	B	CH	5110	5.23	Ehden, 1700 m	B
<i>Aubrieta libanotica</i> Boiss.	Brassicaceae	E	L, S, T	P	H	420	0.43	Laqlouq, 2000 m	A
<i>Bellardia latifolia</i> (L.) Cuatrec.	Orobanchaceae	E		A	T	553	0.57	Afqua, 1500 m	A
<i>Bellardia latifolia</i> (L.) Cuatrec.var. <i>flaviflora</i> Boiss.	Orobanchaceae	E		A	T	567	0.58	Afqua, 1500 m	A
<i>Bellevalia trifoliata</i> (Ten.) Kunth	Asparagaceae	M		P	G	20831	21.3	Aley, 880 m	E
<i>Bellis sylvestris</i> Cirillo	Asteraceae	E		P	H	2235	2.29	Hamat, 260 m	E
<i>Berberis libanotica</i> C. K. Schneider	Berberidaceae	E	L	P	CH	709	0.73	Barouk, 1200 m	B
<i>Brunnera orientalis</i> (Schenk) I. M. Johnston	Boraginaceae	E	EMR	P	H	1477	1.51	Afqua, 1500 m	A
<i>Calicotome villosa</i> (Poiret) Link	Fabaceae	E		P	PH	2320	2.37	Baabda, 300 m	B
<i>Campanula peregrina</i> L.	Campanulaceae	E		B	PH	797	0.82	Lassa, 1300 m	B

<i>Cedrus libani</i>	Pinaceae	G	EMR	P	PH	15587	16	Barouk 1200	E
<i>Centaurea crocodylium</i> L.	Asteraceae	E	L, P	A	T	1286	1.32	Yohmor litani, 930 m	A
<i>Centaurea drabifolia</i> subsp. <i>libanotica</i> (Boiss.) Wagenitz	Asteraceae	E	L, S, T	P	G	1012	1.04	Ouyoun Orgosh 2684 m	B
<i>Centaurea hololeuca</i> Boiss.	Asteraceae	E	L, S	P	H	714	0.73	Ehden, 1740 m	A
<i>Centaurea procurrens</i> Spreng.	Asteraceae	E	EMR	B	CH	773	0.79	Tyr, 0 m	B
<i>Centaurea triumfettii</i> (Klok.) Soják	Asteraceae	E	EMR	P	H	1839	1.88	Aquoura, 2000 m	A
<i>Centaurium erythraea</i> Rafn.	Gentianaceae	E		A	T	1022	1.05	Ras el Maten, 880 m	B
<i>Centaurium erythraea</i> Rafn	Gentianaceae	E		A	T	1002	1.03	Nahr Ibrahim, 70 m	B
<i>Centranthus longiflorus</i> Stev. var. <i>latifolius</i> Boiss.	Caprifoliaceae	E	EMR	P	H	611	0.63	Barouk, 1200 m	B
<i>Centranthus ruber</i> (L.) DC.	Caprifoliaceae	E		P	CH	499	0.51	Aley, 880 m	B
<i>Cephalanthera longifolia</i> Huds.	Orchidaceae	M		P	G	16161	16.53	Baakline, 940 m	E
<i>Clematis cirrhosa</i> L.	Ranunculaceae	E		P	CH	9330	9.54	Barij, 500 m	D
<i>Colchicum libanoticum</i> Ehr.	Colchicaceae	M		P	G	4983	5.1	Ehmej, 1170 m	C
<i>Colchicum steveni</i> Kunth.	Colchicaceae	M	EMR	P	G	3592	3.67	Hamat, 260 m	C

<i>Convolvulus coelestriacus</i> Boiss.	Convolvulaceae	E		A	T	533	0.55	Aquoura, 2000 m	B
<i>Convolvulus secundus</i> Desr.	Convolvulaceae	E	EMR	P	CH	1682	1.72	Tyr, 0 m	A
<i>Cyclamen coum</i> Mill.	Primulaceae	E	EMR	P	G	6777	6.93	Barouk, 1100 m	C
<i>Cyclamen libanoticum</i> Hildebr.	Primulaceae	E	L	P	G	5684	5.81	Qamez, 1100 m	C
<i>Cyclamen persicum</i> Mill.	Primulaceae	E	EMR	P	G	1630	1.67	Zgharta, 120 m	E
<i>Cytisopsis dorycniifolia</i> Jaub. & Spach	Fabaceae	E	EMR	P	H	828	0.85	Baakline, 940 m	B
<i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>romana</i> .	Orchidaceae	M	L	P	G	8303	8.49	Bmohrey, 1300 m	E
<i>Daphne oleoides</i> Schreb.	Thymelaeaceae	E		P	CH	5221	5.34	Quammouah, 1460 m	C
<i>Dioscorea orientalis</i> (J. Thiébaud) Caddick & Wilkin cfr.	Dioscoreaceae	E	L, S, P	P	G	445	0.46	Beit-meri, 800 m	B
<i>Doronicum orientale</i> Hoffm.	Asteraceae	E		P	G	2655	2.72	Afqua, 1500 m	B
<i>Echium angustifolium</i> Mill.	Boraginaceae	E	EMR	A	T	782	0.8	Tyr, 0 m	A
<i>Ephedra campylopoda</i> C.A. Mey.	Ephedraceae	G		P	CH	8600	8.79	Zeita, 600 m	C
<i>Eremostachys laciniata</i> (L.) Bunge	Lamiaceae	E	EMR	P	H	6308	6.45	Mayrouba, 1360 m	C
<i>Erica manipuliflora</i> Salisb	Ericaceae	E		P	CH	528	0.54	Mar Roukoz, 300 m	A

<i>Erica sicula</i> subsp. <i>libanotica</i> (Barb.-Boiss. & Barbey) Stevens	Ericaceae	E	EMR	P	CH	474	0.49	Nahr Ibrahim, 70 m	A
<i>Erodium gaillardotii</i> Boiss.	Geraniaceae	E	L, S	P	G	1032	1.06	Aarsal, 2130 m	C
<i>Eryngium creticum</i> Lam.	Apiaceae	E	EMR	P	H	1721	1.76	Mrouje, 1200 m	E
<i>Erysimum goniocaulon</i> Boiss.	Brassicaceae	E	L, S, T	B	H	675	0.69	Afqua, 1650 m	B
<i>Euphorbia paralias</i> L.	Euphorbiaceae	E		P	PH	763	0.78	Tyr, 0 m	B
<i>Euphorbia phymatosperma</i> Boiss. & Gaill.	Euphorbiaceae	E	L, S, T	A	T	1946	1.99	Aarsal, 2130 m	A
<i>Ficaria grandiflora</i> Robert	Ranunculaceae	E		P	CH	17457	17.85	Ehden, 1400 m	B
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Apiaceae	E		P	H	1565	1.6	Baakline, 940 m	A
<i>Fritillaria alfredae</i> Post	Liliaceae	M	L, S	P	G	53487	54.69	Baadarane, 1100 m	E
<i>Fritillaria crassifolia</i> Boiss. & Huet	Liliaceae	M	EMR	P	G	50783	51.93	Afqa, 1500 m	E
<i>Fritillaria elwesii</i> Boiss.	Liliaceae	M	L, S, T	P	G	50670	51.81	Ehden, 1740 m	E
<i>Fritillaria libanotica</i> (Boiss.) Baker	Liliaceae	M	L, S, T	P	G	36929	37.76	Jdeyde El-Chouf, 930 m	E
<i>Gagea peduncularis</i> (J.Presl & C.Presl) Pascher	Liliaceae	M	EMR	P	G	12445	12.73	Terbol, 1260 m	E
<i>Gagea reticulata</i> (Pall.) Schult. & Schult.f.	Liliaceae	M		P	G	6802	6.96	Afqua, 1500 m	C

<i>Galium libanoticum</i> Ehrend.	Rubiaceae	E	L, S, T	P	CH	1198	1.23	Ehden, 1740 m	B
<i>Galium pestalozzae</i> Boiss.	Rubiaceae	E	L	P	CH	665	0.68	Haut Afqua, 1650 m	B
<i>Galium prusense</i> Koch	Rubiaceae	E	L, S, T	P	CH	919	0.94	Haut Afqua, 1650 m	B
<i>Gladiolus imbricatus</i> var. <i>libanoticus</i> Boiss.	Iridaceae	E		P	G	1389	1.42	Quammouah, 1460 m	C
<i>Glaucium leiocarpum</i> Boiss.	Papaveraceae	E		P	H	983	1.01	Barouk, 1800 m	B
<i>Halimium umbellatum</i> (L.) Spach f.var. <i>syriacum</i> (Boiss.) Willk.	Cistaceae	E	L	P	CH	1985	2.03	Mayrouba, 1360 m	B
<i>Helianthemum ledifolium</i> (L.) Mill.	Cistaceae	E		A	T	2342	2.4	Barouk, 1800 m	C
<i>Helichrysum pallasii</i> (Spreng.) Ledeb.	Asteraceae	E	EMR	P	CH	1658	1.7	Tannourine, 1700 m	A
<i>Helichrysum sanguineum</i> (L.) Kostel	Asteraceae	E	EMR	P	CH/H	1741	1.78	Ras el Maten, 880 m	A
<i>Hyacinthella nervosa</i> Chouard	Asparagaceae	M	EMR	P	G	13829	14.14	Quamez, 1100 m	D
<i>Hyacinthus orientalis</i> L.	Asparagaceae	M	EMR	P	G	25061	25.63	Barouk, 1100 m	E
<i>Hyoscyamus aureus</i> L.	Solanaceae	E		P	CH	1046	1.07	Niha, 1150 m	B
<i>Hyoscyamus reticulatus</i> L.	Solanaceae	E	EMR	A/B	H	1296	1.33	Aarsal, 2130 m	C
<i>Hypecoum imberbe</i> Sibth. & Smith	Papaveraceae	E	EMR	A	T	523	0.54	Aarsal, 2130 m	B

<i>Hypericum thymifolium</i> Banks & Sol.	Hypericaceae	E	EMR	A	CH	275	0.28	Zeïta, 1500 m	B
<i>Ipomoea stolonifera</i> J.F. Gmel.	Convolvulaceae	E		P	G	802	0.82	Tyr, 0 m	A
<i>Iris histrio</i> Reichenb.	Iridaceae	M	EMR	P	G	12205	12.48	Barouk, 1100 m	E
<i>Iris lortetii</i> Barbey ex Boiss.	Iridaceae	M	EMR	P	G	7555	7.73	Mays el Jabal, 600 m	E
<i>Iris mesopotamica</i> Dykes	Iridaceae	M	EMR	P	G	14590	14.92	Mrouje, 1200 m	D
<i>Iris palaestina</i> Baker	Iridaceae	M	L, P	P	G	10538	10.78	Joun, 460 m	E
<i>Iris pseudacorus</i> L.	Iridaceae	M		P	H/G	5394	5.52	Kfarzabad, 980	E
<i>Iris sofarana</i> Foster	Iridaceae	M	L	P	G	5619	5.75	Dahr El-Baydar, 1640 m	E
<i>Iris sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> (Dinsm.) Chaudhary, G.Kirkw. & C.Weymouth	Iridaceae	M	L	P	G	8000	8.18	Chabrouh, 1900 m	C
<i>Iris unguicularis</i> Poiret var. <i>cretensis</i> (Janka) Maire	Iridaceae	M	EMR	P	G	8704	8.9	Baadarane, 1100 m	E
<i>Juniperus drupacea</i> Labill.	Cupressaceae	G		P	PH	9297	9.51	Danniyeh, 920 m	E
<i>Juniperus excelsa</i> M.Bieb.	Cupressaceae	G		P	PH	10706	10.95	Quammouah, 1460	E
<i>Juniperus foetidissima</i> Willd	Cupressaceae	G		P	PH	29215	29.87	Quammouah, 1460	E
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Cupressaceae	G		P	PH	9853	10.08	Ehden, 1740	E

<i>Lactuca triquetra</i> (Labill.) Boiss.	Asteraceae	E	L, C	P	CH	2002	2.05	Hamat, 260 m	B
<i>Lamium amplexicaule</i> L.	Lamiaceae	E		A	T	1262	1.29	Ehden, 1400 m	A
<i>Lamium moschatum</i> Mill	Lamiaceae	E	EMR	A	T	1518	1.55	Aley, 880 m	A
<i>Lamium striatum</i> Sibth. & Smith var. <i>minus</i> Boiss.	Lamiaceae	E	EMR	P	H	1394	1.43	Afqua, 1650 m	B
<i>Lamium striatum</i> Sibth. & Smith	Lamiaceae	E		P	H	743	0.76	Afqua, 1500 m	B
<i>Lamium truncatum</i> Boiss.	Lamiaceae	E	EMR	P	H	1433	1.47	Ehden, 1740 m	A
<i>Legousia falcata</i> (Ten.) Fritsch.	Campanulaceae	E		A	T	719	0.74	Afqua, 1650 m	A
<i>Lotus gebelia</i> Vent.var. <i>libanoticus</i> Boiss.	Fabaceae	E	L	P	G	792	0.81	Tannourine, 1700 m	B
<i>Lupinus digitatus</i> Forssk.	Fabaceae	E		A	T	606	0.62	Khardali, 400 m	A
<i>Malcolmia crenulata</i> (DC.) Boiss.	Brassicaceae	E		A	CH	919	0.94	Bir Hassan, 200 m	B
<i>Malus trilobata</i> (Poir.) C. K. Schneid.	Rosaceae	E	EMR	P	PH	670	0.69	Ehden, 1700 m	B
<i>Malva neglecta</i> Wallr.	Malvaceae	E		A/B	T	660	0.68	Mrouje, 1200 m	B
<i>Marrubium libanoticum</i> Boiss.	Lamiaceae	E	L	P	H	1311	1.34	Aarsal, 2130 m	A
<i>Matthiola crassifolia</i> Boiss. & Gaill.	Brassicaceae	E		P	G	2169	2.22	Tyr, 0 m	B
<i>Matthiola crassifolia</i> Boiss. & Gaill.	Brassicaceae	E		P	G	2228	2.28	Raouche, 0 m	B

<i>Melissa inodora</i> Bornm.	Lamiaceae	E	L	P	H	1731	1.77	Ammatour, 900 m	B
<i>Minuartia hybrida</i> (Vill.) Schiskine	Caryophyllaceae	E		A	T	773	0.79	Afqua, 1500 m	A
<i>Minuartia juniperina</i> var. <i>legitima</i> Boiss.	Caryophyllaceae	E	EMR	A	T	1167	1.19	Laqlouq, 2000 m	B
<i>Moraea sisyrinchium</i> (L.) Ker Gawl.	Iridaceae	M		P	G	11379	11.64	Douar, 1230 m	E
<i>Muscari pinardi</i> Boiss.	Asparagaceae	M	EMR	P	G	554	0.57	Douar, 1230 m	A
<i>Myosotis sicula</i> Guss.	Boraginaceae	E		A	T	450	0.46	Afqua, 1500 m	A
<i>Narcissus tazetta</i> L.	Amaryllidaceae	M		P	G	12224	12.5	El Aleli, 930 m	E
<i>Neotinea tridentata</i> (Scop.) R.M.Bateman	Orchidaceae	M		P	G	9058	9.26	Nahr Ibrahim, 70 m	E
<i>Odontites lutea</i> (L.) Clairv. var. <i>hispidula</i> Boiss.	Orobanchaceae	E	L	A	T	1086	1.11	Dlebta, 800 m	B
<i>Ononis adenotricha</i> Boiss.	Fabaceae	E	L, T	P	CH	606	0.62	Kfardebian, 1900 m	B
<i>Onopordum carduiforme</i> Boiss.	Asteraceae	E	EMR	B	H	1251	1.28	Zgharta, 120 m	B
<i>Onosma sericea</i> Willd.	Boraginaceae	E	EMR	P	H	1217	1.24	Nahr-Ibrahim, 70 m	B
<i>Ophrys apifera</i> Huds.	Orchidaceae	M		P	G	4954	5.07	Baakline, 940 m	E
<i>Ophrys attica</i> (Boiss. & Orph.)	Orchidaceae	M	EMR	P	G	9198	9.41	Baakline, 1000 m	E

<i>Ophrys attica</i> var. <i>orientalis</i> (Renz.) Mouterde	Orchidaceae	M	EMR	P	G	9702	9.92	Khaldeh, 35 m	E
<i>Ophrys fusca</i> Link	Orchidaceae	M		P	G	10259	10.49	Botmeh, 1100 m	E
<i>Ophrys scolopax</i> Cav.	Orchidaceae	M		P	G	10137	10.37	Baakline, 940 m	E
<i>Ophrys sintenesii</i> Fleischm. & Bornm.	Orchidaceae	M	EMR	P	G	9164	9.37	Baakline, 940 m	E
<i>Orchis anatolica</i> Boiss.	Orchidaceae	M	EMR	P	G	9932	10.16	Baakline, 940 m	E
<i>Orchis galilaea</i> (Bornm. & M.Schulze) Schltr.	Orchidaceae	M	L, S	P	G	8763	8.96	Baakline, 940 m	E
<i>Orchis italica</i> Poir.	Orchidaceae	M		P	G	8721	8.92	Nahr Ibrahim, 70 m	E
<i>Orchis patens</i> Desf. var. <i>asiatica</i> Renz.	Orchidaceae	M	L, S, T	P	G	9785	10.01	Ehden, 1740 m	E
<i>Orchis picta</i> Raf.	Orchidaceae	M	EMR	P	G	9682	9.9	Mansourieh, 350m	E
<i>Origanum libanoticum</i> Boiss.	Lamiaceae	E	L	P	CH	704	0.72	Nahr Ibrahim, 70 m	A
<i>Origanum syriacum</i> L.	Lamiaceae	E	EMR	P	CH	802	0.82	Ehden 1740	A
<i>Ornithogalum billardieri</i> Mout.	Asparagaceae	M	EMR	P	G	11692	11.95	Afqa, 1500 m	E
<i>Ornithogalum libanoticum</i> Boiss. & Bl.	Asparagaceae	M	L	P	G	10714	10.96	Ehden , 1740 m	E
<i>Paeonia kesrouanensis</i> Thièb.	Paeoniaceae	E		P	G	28509	29.15	Quamez, 1100 m	E

<i>Paeonia mascula</i> (L.) Mill.	Paeoniaceae	E		P	G	28602	29.25	Ehmej, 1170 m	E
<i>Pancreatium maritimum</i> L.	Amaryllidaceae	M	EMR	P	G	24279	24.83	Tyr, 0 m	E
<i>Pancreatium maritimum</i> L.	Amaryllidaceae	M	EMR	P	G	25526	26.1	Ramkin island, 0 m	E
<i>Phlomis brevilabris</i> Ehrenb.	Lamiaceae	E	L, S	P	CH	1203	1.23	Afqua, 1500 m	A
<i>Phlomis viscosa</i> Poir.	Lamiaceae	E	EMR	P	CH	5276	5.4	Ras el Maten, 880 m	C
<i>Pinus brutia</i> Ten.	Pinaceae	G		P	PH	21193	21.67	Choueir, 1100 m	E
<i>Pinus pinea</i> L.	Pinaceae	G		P	PH	24638	25.19	Jezzine , 830 m	E
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Anacardiaceae	E		P	PH	567	0.58	Seydet el Nourieh, 160 m	A
<i>Pistacia palaestina</i> Boiss.	Anacardiaceae	E		P	PH	582	0.6	Seydet el Nourieh, 160 m	A
<i>Polypodium australe</i> Fée	Polypodiaceae	P		P	H	7980	8.16	Nahr Ibrahim, 70 m	E
<i>Potentilla libanotica</i> Boiss.	Rosaceae	E	L	P	H	445	0.46	Aquoura , 2000 m	A
<i>Poterium spinosum</i> L.	Rosaceae	E		P	CH	460	0.47	Hamat, 260 m	A
<i>Primula vulgaris</i> Huds.	Primulaceae	E		P	H	440	0.45	Afqa, 1500 m	A

<i>Prospero autumnale</i> (L.) Speta	Asparagaceae	M		P	G	14298	14.62	Mar Charbel, 500 m	D
<i>Pteris vittata</i> L.	Pteridaceae	P		P	G	6626	6.78	Nahr Ibrahim, 70 m	C
<i>Puschkinia scilloides</i> var. <i>libanotica</i> (Zucc.) Boiss.	Asparagaceae	M	L	P	G	13267	13.57	Afqa, 1500 m	E
<i>Reichardia glauca</i> Matthews	Asteraceae	E	EMR	P	H	2709	2.77	Ehden, 1740 m	A
<i>Reichardia glauca</i> Matthews	Asteraceae	E	EMR	P	H	2631	2.69	Ehmej, 1700 m	C
<i>Reseda lutea</i> L.	Resedaceae	E		B	H	949	0.97	Aintoura, 1400 m	B
<i>Rhamnus catharticus</i> L.	Rhamnaceae	E		P	PH	406	0.42	Ehden, 1740 m	B
<i>Rhododendron</i> <i>ponticum</i> L. var. <i>brachycarpum</i> Boiss.	Ericaceae	E	L	P	PH	724	0.74	Mayrouba, 1300 m	B
<i>Ricotia lunaria</i> L.	Brassicaceae	E	L, P	A	T	575	0.59	Bourjein, 540 m	B
<i>Romulea bulbocodium</i> Seb. & Mauri	Iridaceae	M		P	G	1262	1.29	Baakline, 940 m	D
<i>Romulea nivalis</i> (Boiss. & Kotschy) Klatt	Iridaceae	M	L, S	P	G	1286	1.32	Faqra, 1850 m	B
<i>Romulea phoenicia</i> Mout.	Iridaceae	M	L	P	G	11389	11.65	Beit-meri, 800 m	D
<i>Salvia bracteata</i> Banks & Sol.	Lamiaceae	E	L, S	P	H	699	0.72	Majdel Tarchich, 1600 m	B
<i>Salvia fruticosa</i> var. <i>libanotica</i> Mill.	Lamiaceae	E	L	P	H	817	0.84	Nahr Ibrahim, 400 m	B

<i>Salvia microstegia</i> Boiss. & Bal.	Lamiaceae	E	EMR	P	H	611	0.63	Faraya, 2000 m	A
<i>Salvia multicaulis</i> Vahl var. <i>simplicifolia</i> Boiss.	Lamiaceae	E	EMR	P	CH	1100	1.13	Naheleh, 1280	B
<i>Salvia viridis</i> L.	Lamiaceae	E		A	T	421	0.43	Ehden, 1740 m	A
<i>Salvia viscosa</i> Jacq.	Lamiaceae	E	L, S, T	A	T	1105	1.13	Ammatour, 900 m	B
<i>Scabiosa prolifera</i> L.	Caprifoliaceae	E	EMR	A	T	963	0.99	Hamat, 260 m	B
<i>Scilla cilicica</i> Siehe	Asparagaceae	M	EMR	P	G	22963	23.48	Quamez, 1100 m	E
<i>Scorzonera mollis</i> M. Bieb.	Asteraceae	E		P	H	3668	3.75	Afqua, 1500 m	D
<i>Scutellaria brevibracteata</i> Stapf	Lamiaceae	E		P	H	362	0.37	Nahr Ibrahim, 400 m	B
<i>Serapias vomeracea</i> (Burm.) Briquet	Orchidaceae	M		P	G	10699	10.94	Khaldeh, 35 m	E
<i>Serratula pusilla</i> Dittrich	Asteraceae	E		P	G	1462	1.5	Kfardebian, 1600 m	A
<i>Silene aegyptiaca</i> L. fil.	Caryophyllaceae	E		A	T	1633	1.67	Bakaata, 1000 m	B
<i>Silene palaestina</i> Boiss.	Caryophyllaceae	E		A	T	714	0.73	Khyem, 750 m	B
<i>Silene succulenta</i> Forsk.	Caryophyllaceae	E		P	CH	2137	2.19	Tyre, 0 m	B
<i>Sorbus flabellifolia</i> (Spach) Schneider	Rosaceae	E		P	PH	751	0.77	Ehden, 1740 m	A

<i>Sorbus torminalis</i> (L.) Crantz	Rosaceae	E		P	PH	792	0.81	Ehden, 1740 m	A
<i>Stachys distans</i> Benth.	Lamiaceae	E	L, S, P	P	H	748	0.77	Ehden, 1740 m	B
<i>Stachys neurocalycina</i> Boiss.	Lamiaceae	E	L, S, P	A	T	954	0.98	Hamat, 260 m	B
<i>Stachys nivea</i> Labill.	Lamiaceae	E	L, S	P	CH	1623	1.66	Aarsal, 2130 m	B
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	Caryophyllaceae	E		A	T	699	0.72	Mrouje, 1200 m	A
<i>Styrax officinalis</i> L.	Styracaceae	E		P	PH	641	0.66	Ehmej, 1500 m	B
<i>Torilis leptophylla</i> var. <i>erythrotricha</i> (Rechb. f.) Zohary	Apiaceae	E	L, S	A	T	846	0.87	Aarsal, 2130 m	B
<i>Tracheliopsis tubulosa</i> (Boiss.) Busser.	Campanulaceae	E	L, S, T	P	H	777	0.79	Nahr el Kelb, 30 m	B
<i>Tragopogon longirostris</i> Sch.Bip	Asteraceae	E	EMR	B	H	2127	2.18	Nahr-Ibrahim, 70 m	D
<i>Trifolium clypeatum</i> L.	Fabaceae	E	EMR	A	T	505	0.52	Aley, 1000 m	B
<i>Tulipa aleppensis</i> Regel	Liliaceae	M	L, S	P	G	28132	28.77	Baskinta, 1400 m	E
<i>Tulipa aucheriana</i> Baker subsp. <i>westii</i> Mout.	Liliaceae	M	L, S	P	G	23320	23.85	Aarsal, 2130 m	E
<i>Tulipa montana</i> Lindley	Liliaceae	M		P	G	30978	31.68	Barouk, 1700 m	E
<i>Tussilago farfara</i> L.	Asteraceae	M		P	G	1619	1.66	Ehden, 1400 m	B

<i>Valeriana discoridis</i> Sbirth. & Sm.	Caprifoliaceae	E	EMR	P	H	3998	4.09	Nahr-Ibrahim, 70 m	D
<i>Valerianella dactylophylla</i> Boiss. & Hohen.	Caprifoliaceae	E	EMR	A	T	3506	3.59	Laqlouq, 2000 m	D
<i>Velezia fasciculata</i> Boiss.	Caryophyllaceae	E	L, S	A	T	460	0.47	Aarsal, 2130 m	B
<i>Verbascum aliciae</i> Post.	Scrophulariaceae	E	L, S	P	H	425	0.44	Aarsal, 2130 m	A
<i>Verbascum cedreti</i> Boiss.	Scrophulariaceae	E	EMR	B	H	347	0.36	Ehden, 1600 m	B
<i>Veronica arvensis</i> L.	Plantaginaceae	E		A	T	1619	1.66	Afqua, 1600 m	C
<i>Veronica bombycina</i> subsp. <i>bombycina</i> Boiss. & Kotschy	Plantaginaceae	E	L, S	P	H	396	0.41	Makmel, 24000 m	B
<i>Veronica cymbalaria</i> Bodard	Plantaginaceae	E		A	T	729	0.75	Niha, 1150 m	B
<i>Veronica leiocarpa</i> Boiss.	Plantaginaceae	E		P	H	1575	1.61	Afqua, 1150 m	C
<i>Veronica polifolia</i> Benth.	Plantaginaceae	E	L, S, T	A	H	572	0.59	Aarsal, 2130 m	B
<i>Veronica syriaca</i> Roem. & Schult.	Plantaginaceae	E	EMR	A	T	528	0.54	Jezzine, 830 m	B
<i>Vicia canescens</i> Labill.	Fabaceae	E		P	T	3491	3.57	Ouyoun Orgosh, 2680 m	B
<i>Vicia sericocarpa</i> Henzl	Fabaceae	E	EMR	A	T	6050	6.19	Jezzine, 830 m	C
<i>Vinca libanotica</i> Zucc.	Apocynaceae	E	EMR	P	H	851	0.87	Mrouje, 1200 m	B

<i>Viola libanotica</i> Boiss.	Violaceae	E	L	A	G	738	0.76	Kfardebian, 1600 m	C
<i>Viola riviniana</i> Reichenb.	Violaceae	E		P	T	714	0.73	Mrouje, 1200 m	B
<i>Ziziphora canescens</i> Benth.	Lamiaceae	E	EMR	P	CH	549	0.56	Laqlouq, 2000 m	A

Higher groups: E = Eudicot; G= Gymnosperm; M= Monocot; P= Monilophyte. ES, plant status: L= endemic to Lebanon; L, S, T, = endemic to Lebanon, Syria and Turkey; EMR= endemic to East Mediterranean Region. LCT, Life Cycle Type: A = Annual; B = Biennial; A/B = Annual-Biennial; P = Perennial; LGF, Life growth form: Ph = Phanerophyte, CH= Chamephyte, G= Geophyte, T = Therophyte, H= Hemicryptophyte. 1C: This value was calculated using the conversion factor 1 pg DNA = 978 Mbp (Doležel et al. 2003). S, Calibration standard species: A – *Solanum lycopersicum* L. “Montfavet 63-5” (1.99 pg); B – *Petunia hybrida* (Hook) Vilm. ‘PxPC6’ (2.85 pg); C – *Pisum sativum* L. ‘Long Express’ (8.37 pg); D – *Artemisia arborescens* L. origin Crete (11.43 pg); E – *Triticum aestivum* L. ‘Chinese Spring’ (30.9 pg) (Catrice et al. 2006). All standards are available from MB or SCB in Gif-sur-Yvette.

**Annexe 9: Article: Unlocking the karyological and cytogenetic diversity of *Iris* from Lebanon:
Oncocyclus section shows a distinctive profile and relative stasis during its continental
radiation**

Sort title: FISH of rRNA genes in four *Iris* subgenera

**Authors: Nour Abdel Samad, Magda Bou Dagher-Kharrat, Oriane Hidalgo, Rana El Zein, Bouchra Douaihy,
Sonja Siljak-Yakovlev**

PLOS ONE

2016

RESEARCH ARTICLE

Unlocking the Karyological and Cytogenetic Diversity of *Iris* from Lebanon: *Oncocyclus* Section Shows a Distinctive Profile and Relative Stasis during Its Continental Radiation

Nour Abdel Samad^{1,2}, Magda Bou Dagher-Kharrat^{1*}, Oriane Hidalgo³, Rana El Zein¹, Bouchra Douaihy^{1‡}, Sonja Siljak-Yakovlev²

1 Faculté des Sciences, Département Sciences de la Vie et de la Terre, Laboratoire Caractérisation Génomique des Plantes, Campus Sciences et Technologies, Université Saint-Joseph, Mar Roukos Mkalles, Lebanon, **2** Ecologie, Systématique, Evolution, UMR 8079 Univ. Paris-Sud, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Bat. 360, 91405 Orsay, France, **3** Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AB, United Kingdom

‡ Current address: Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon
* magda.boudagher@usj.edu.lb



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Abdel Samad N, Bou Dagher-Kharrat M, Hidalgo O, El Zein R, Douaihy B, Siljak-Yakovlev S (2016) Unlocking the Karyological and Cytogenetic Diversity of *Iris* from Lebanon: *Oncocyclus* Section Shows a Distinctive Profile and Relative Stasis during Its Continental Radiation. PLoS ONE 11(8): e0160816. doi:10.1371/journal.pone.0160816

Editor: Lorenzo Peruzzi, Università di Pisa, ITALY

Received: March 21, 2016

Accepted: July 26, 2016

Published: August 15, 2016

Copyright: © 2016 Abdel Samad et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the National Council for Scientific Research Lebanon under Grant [01-06-08] to MBK and the Research Council of Saint Joseph University under Grant FS-56 to MBK. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Despite being an important target of conservation concern and horticultural interest, Lebanese irises yet have a confusing taxonomic history and species' delimitation is often considered problematic, more especially among royal irises (*Iris* section *Oncocyclus*). Indeed, these irises of exceptionally large and spectacular flowers have radiated across Caucasus and eastern Mediterranean giving rise to a number of strict endemic taxa, many of them being considered under threat. Whilst efforts have mostly focused on clarifying the evolutionary relationships in the group based on morphological and molecular data, karyological and cytogenetic characters have been comparatively overlooked. In this study, we established for the first time the physical mapping of 35S rDNA loci and heterochromatin, and obtained karyo-morphological data for ten Lebanese *Iris* species belonging to four sections (*Iris*, *Limniris*, *Oncocyclus* and *Scorpiris*). Our results evidenced distinctive genomic profiles for each one of the sections, where *Oncocyclus* irises, while having the lowest chromosome numbers, exhibit both the highest number of 35S loci and CMA3+ sites. The continental radiation of royal irises has been accompanied by a relative karyological and cytogenetic stasis, even though some changes were observed regarding karyotype formula and asymmetry indexes. In addition to that, our results enabled taxonomic differentiation between *I. germanica* and *I. mesopotamica*—two taxa currently considered as synonyms—and highlighted the need for further studies on populations of *I. persica* and *I. wallisiae* in the Eastern Mediterranean Region.

Introduction

The genus *Iris* L. includes about 280 species distributed across the temperate region of the Northern Hemisphere [1]. Recurrent hybridization, which has given rise to a myriad of garden forms [2] has also largely contributed to make this genus the largest and most complex of Iridaceae [3]. The classification of *Iris* is indeed a difficult task to tackle; botanists and taxonomists are still far from reaching a consensus on this issue. This problem is certainly reflected through the different subgeneric and sectional classifications established on the basis of morpho-anatomical features, ecological and cytogenetic traits [4,5,6,7]. The most recent taxonomic revision [5] recognizes six subgenera: *Nepalensis* Dykes, *Xiphium* (Miller) Spach, *Scorpiris* Spach, *Hermodactyloides* Spach, *Iris* L. and *Limniris* Tausch. According to Mouterde [8], only the four latter subgenera occur in Lebanon. The subgenus *Iris* is represented by two sections: *Iris* L. with two taxa and *Oncocyclus* (Siemssen) Baker with seven taxa, while the subgenus *Limniris* is represented by two taxa, the subgenus *Hermodactyloides* with one taxon and subgenus *Scorpiris* with two taxa.

This study focused on *Iris* section *Oncocyclus*—the royal irises—which includes numerous strict endemic species. These irises are native to the Near East, especially the Caucasus region, eastern Turkey, Syria, Lebanon and Israel and extend to the Negev Desert. In the east they are found in Iraq, Iran and Afghanistan [9]. *Oncocyclus* section includes 33 species (up to 45 taxa considering subspecies, forms and varieties), which are all regional endemics [10]. In the eastern Mediterranean region, they grow in disjunctive populations separated by short geographical distances [11]. In a recent study, Wilson *et al.* (2016) [12] suggested the Caucasus as the ancestral area for *Oncocyclus* section and the Eastern Mediterranean region as an important area of diversification. From a nomenclature and systematic point of view, *Oncocyclus* section is particularly challenging within Iridaceae [5] and species concept has already been debated [13]. Taxonomic circumscription has been based on minor differences in plant size, leaf shape and flower color. It appears that many local forms have been considered as species, which increased the number of taxa. In addition, the sympatric distribution of some species and interfertility among *Oncocyclus* species [14] could have led to a large number of hybrids, often recognized as full species.

Over the years, taxonomic treatment of the section *Oncocyclus* has experienced a ‘lumping’ change. From 65 species considered by Avishai in 1977 [15], Mathiew in 1989 [5] proposed 41 species and in 1997 Rix [10] proposed only 30. Some sympatric species were recognized as hybrids, but the grouping trend affected mainly the Caucasian species, and no complete or inclusive taxonomic revision of *Oncocyclus* section in the Levant has been carried out to date.

The Lebanese *Oncocyclus* irises are represented by seven taxa (Fig 1) of which four are considered to be strict endemics [11]: *I. cedreti* Dinsmore ex Chaudhary, *I. sofarana* Foster subsp. *kasruwana* (Dins.) Chaudhary, *I. sofarana* subsp. *sofarana* and *I. westii* Dinsmore. They occur in distinct populations across the Mount Lebanon chain [10] between 1200 and 2000 m of altitude. The three other Lebanese *Oncocyclus* species are *I. bismarckiana* Regel (Lebanon, Syria and Israel) and *I. lortetii* Barbey ex Boiss. (Lebanon and Israel) and *I. antilibanotica* Dinsm. (Lebanon and Syria).

The botanical descriptions of the endemic Lebanese *Oncocyclus* species, that have been written more than 30 years ago on the basis of a limited sample size, provide however a good illustration of the variability found in populations nowadays [16]. *Oncocyclus* irises are morphologically very close and may be confused because they all have different variants with similar colors, more or less dark purple [5,8,9,17,18]. It is worth noting that the differentiation between *I. sofarana* subsp. *sofarana*, *I. sofarana* subsp. *kasruwana* and *I. westii* according to Mouterde, is only based on the size of the individuals and the shade of standards color.

From a conservation point of view, *Iris* genus includes 53 taxa that are threatened worldwide, of which 29 belong to the *Oncocyclus* section [19]. *Oncocyclus* irises are narrow endemic



Fig 1. Diversity of Lebanese royal irises, illustrated by some of the studied taxa. A: *Iris sofarana* subsp. *sofarana*, B: *I. sofarana* subsp. *kasruwana*, C: *I. cedreti*, D: *I. westii*, E: *I. bismarckiana*, F: *I. lortetii*, G: *I. antilibanotica*. Photographs from M. Bou Dagher-Kharrat

doi:10.1371/journal.pone.0160816.g001

and of high conservation priority in Lebanon [20,21]. These plants with conspicuous flowers are threatened by intensive collection and habitat destruction. In Lebanon, conservation efforts are now undertaken in order to conserve *Iris* populations through legislation and establishment of micro-reserves [22]. Based on their complete self-incompatibility, fertilization of *Oncocyclus* irises relies on pollination by night-sheltering solitary male bees [23,24,25,26] and Honey bees as frequent diurnal visitors [27]. Nevertheless, pollination is dramatically hindered by the intensive use of pesticides on the adjacent agriculture lands (Bou Dagher-Kharrat, personal

observation). Even though they show a dense clonal growth, populations can be sometimes restricted to few dozens of individuals.

Rescue from possible extinction could be performed through the reinforcement of populations by introducing individuals from adjacent populations. In this regard, defining species and differentiating taxa is a crucial and a prerequisite in order to define conservation units. Indeed, conservation strategies require knowing which units (species, subspecies, or populations) need to be preserved and how unique they are.

Wilson *et al.* [12] used in 2016 plastid and nuclear DNA sequences to infer *Oncocyclus* phylogenetic relationships. They found that the species diversified in isolation especially in the Eastern Mediterranean region where populations are scattered on the mountains across rocky hillsides and steppes. However, continental radiation of the royal irises did not involve necessarily chromosome rearrangements, since chromosome number ($2n = 20$) and their karyotype feature remained basically unchanged throughout *Oncocyclus* taxa [15]. Could molecular cytogenetic bring more insight into this complex *Iris* group?

The physical mapping of rDNA and the distribution of heterochromatin turn out to be a source of chromosomal markers for identifying several chromosome regions [28,29,30,31,32,33] and provides according to Dobigny *et al.* “valuable information on homologies between chromosomal segments, mainly between closely related species” [34,35,36]. In addition, this set of markers may constitute a phylogenetic tool to detect genome evolution during speciation [37,38,39]. Molecular cytogenetics allowed indeed to detect interesting variation in the rDNA markers as revealed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) patterns in *Iris* subgenus *Xiphium* and evidenced a species-dependent pattern of rDNA sites [40]. However, such studies on the *Iris* genus remain scarce.

The present study combines classical karyological approach and physical mapping of heterochromatin and rRNA genes in order to characterize the genome organization of ten Lebanese *Iris* taxa. The main objective of this study was to contribute to the understanding of phylogenetic relationships, more particularly for the species of *Oncocyclus* section, by checking possible cytogenetic differences between the investigated taxa. For this purpose, besides classical karyological approach, karyotypes were characterized using molecular cytogenetic techniques: FISH for physical mapping of 18S-5.8S-26S (35S) and 5S rRNA genes and fluorochrome banding for distribution patterns of GC-rich heterochromatin regions.

Material and Methods

Plant material

In order to obtain fresh root meristems for chromosome preparations, rhizomes of ten *Iris* taxa were collected from ten Lebanese natural populations. Their geographical origins are presented in Table 1.

Rhizomes were then potted in perlite.

We followed the nomenclature of Mouterde published in 1983 [41], although its correspondence with recent nomenclature [42] is also provided in S1 Table. No specific permissions were required for populations located on public lands. Permissions are obtained from religious communities and private land owners for the other populations. Irises are not yet protected in Lebanon. Herbarium specimens are deposited in the National Herbarium at the Lebanese University of Beirut.

Chromosome preparation and construction of karyotypes

Root tips obtained from rhizomes were pre-treated 24h in 0.05% Colchicine at 4°C or 5h at room temperature. The fixation was performed in Carnoy's solution (3:1 absolute ethanol: glacial acetic acid) at 4°C for at least 24–48h.

Table 1. Geographical origin (locality and altitude) and flowering date of the investigated taxa.

Subgenus	Section	Taxa	Locality*	Flowering date**	Altitude
<i>Iris</i> L.	<i>Oncocyclus</i> (Siemssen) Baker	<i>I. antilibanotica</i> Dinsm.	Khreibeh-Baalback	April-May	1337 m
		<i>I. bismarckiana</i> Damman & Sprenger	Sarada	March-April	435 m
		<i>I. cedreti</i> Dinsm.	Bcharreh	May-June	1900 m
		<i>I. lortetii</i> Barbey ex Boiss.	Mays El Jabal	April-May	640 m
		<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> Fost	Falougha	April-May	1640 m
			Hazzerta	April-May	1530 m
		<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i> (Dinsm.) Chaudh.	Ehmej	April-May-June	1217 m
		<i>I. westii</i> Dinsm.	Tawmet Jezzine	April-May	1300 m
<i>Iris</i> L.	<i>I. mesopotamica</i> Dykes	Mrouje	April-May	1200 m	
<i>Limniris</i> Tausch	<i>Limniris</i> Tausch	<i>I. unguicularis</i> Poiret var. <i>cretensis</i> Dinsm.	Baadaran	April-May	1100 m
<i>Scorpiris</i> Spach		<i>I. persica</i> L.	Quaa	April-May	700 m

*Latitude and longitude of sites were not indicated in this table for protection purpose.

**flowering period is generally extended over 3 to 4 weeks. Its starting date may change from year to year according the meteorological conditions.

doi:10.1371/journal.pone.0160816.t001

For morphometrical karyotype analysis, the meristems were hydrolyzed in 1 N HCl at 60°C for 12 min, stained in and squashed in 2% (w/v) aceto-orcein. Slides were freezed at -80°C during 24 h, then cover slips were removed, preparations were dried at least 24 h and then mounted in Euparal. Chromosome counts were made on well-spread metaphase plates. The karyotype was determined by examining five metaphase plates per species. Determination of centromere position and chromosome type were made according to Levan *et al.* (1964) [43]. The following characters were measured: long arm (l); short arm (s); total chromosome length (TL); arms ratio ($r = \text{ratio long/short arms}$); centromeric index ($Ci\% = 100 \times s/TL$); chromosome type (Ct; according to Levan *et al.*, 1964) [43]; mean centromeric asymmetry ($M_{CA} = A \times 100$ according to Peruzzi & Eroğlu, 2013) [44]; $A = \text{Mean}(\text{long arm-short arm})/(\text{long arm} + \text{short arm})$ according to Watanabe *et al.* (1999) [45]; coefficient of variation of chromosome length $CV_{CL} = A2 \times 100$ (Paszko, 2006) [46] where $A2 = \text{standard deviation of chromosome length}/\text{mean chromosome length}$ (Romero Zarco, 1986) [47];

Chromosome preparation for fluorochrome banding and FISH

Chromosome plates for fluorochrome banding and the FISH experiment were prepared using the air-drying technique of [48], with slight modifications. Root tips were washed in a citrate buffer (pH 4.6) for 10 min and then transferred into the enzyme mixture [4% R-10 cellulase (Yakult Honsha Co. Tokyo, Japan), 1% pectolyase Y-23 (Seishin Co. Tokyo, Japan), 4% hemicellulase (Sigma)] in a moist chamber at 37°C for 15 min. The digested meristems were gently squashed in a drop of acetic-acid 45%. Cover slips were removed after freezing over night at -80°C.

For detection of GC-rich DNA regions, chromomycin A₃ banding (CMA, Sigma) was performed following the technique of [49] with minor modifications [50]: slides were stained with 0.2 µg/ml of CMA solution for 1 h in the dark and mounted in Citifluor AF1 anti-fade agent (Agar Ltd). Some slides stained with chromomycin were destained in fixative (3:1 absolute ethanol:glacial acetic acid), dehydrated in a graded ethanol series (70%, 90%, 100%), air-dried for at least 12 h at room temperature, and then used for the FISH experiment.

A double FISH experiment was carried out with two DNA probes. The 35S rDNA probe was a 4 kb clone from the *EcoRI* fragment, including 18S-5.8S-26S rDNA sequences from *Arabidopsis thaliana* labeled with direct Cy3 fluorochrome (Amersham, Courtaboeuf, France) by nick translation, according to the manufacturer's protocol. The 5S rDNA probe was the

pTa794 clone [51] containing a complete 410 bp *Bam*HI fragment of wheat, including the gene (120 bp) and the spacer (290 bp). The probe was labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics, Meylan, France) after polymerase chain reaction (PCR) using universal M13 primers, and antibody detection was made with anti-digoxigenin-fluorescein (Roche Diagnostics GmbH). The probe mixture consisted of 1–2 ng/ μ l of each probe, 50% (v/v) formamide, 10% (w/v) dextran-sulfate, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 250 μ g/ml salmon sperm, 20 \times sodium saline citrate (SSC), completed with ultrapure water. *In situ* hybridization was carried out following the method of [52]. Slides were counterstained and mounted in Vectashield medium containing DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories). For rDNA site distribution analyzes, a minimum of 10 well-spread metaphase plates were analyzed for each *Iris* species.

Microscopy and chromosome analysis

Chromosome observations were performed using an Epifluorescence Zeiss Axiophot microscope with different combinations of excitation and emission filter sets (01, 07, 15 and triple filter set 25). The signals were analyzed using the highly sensitive CCD camera (RETIGA 2000R; Princeton Instruments, Every, France) and an image analyzer (Metavue, Every, France).

Results

Chromosome number and karyotype analysis

A diploid chromosome number of $2n = 2x = 20$ with basic chromosome number $x = 10$ was observed in the seven studied *Oncocyclus* taxa. Their detailed karyotypes were established for the first time in this study. Morphometric data for each karyotype are presented in S2 Table. The karyotypes of the *Oncocyclus* taxa were quite similar in size and symmetry (S1 Fig). However, small differences are perceptible at closer look. *I. lortetti* for instance is the only taxa among the *Oncocyclus* analyzed to have $(2t+18st)$. Chromosome lengths varied from 1.8 to 6.7 μ m.

The remaining non *Oncocyclus* taxa presented cytotypes with different chromosome numbers and ploidy levels: diploid $2n = 2x = 24$ for *I. persica*, tetraploid $2n = 4x = 40$ for *I. unguicularis* var. *cretensis* and $2n = 4x = 48$ for *I. mesopotamica* with basic chromosome numbers of $x = 12$ and $x = 10$ respectively. Morphometric data are represented in Table 2.

Total chromosome length of haploid complement varied from 30.5 to 44.5 μ m in *Oncocyclus* irises while karyotype symmetry index varied between 84.2% and 86.8%. Total chromosome length and the karyotype symmetry index were respectively 81.2 μ m and 60.4% for *I. persica*, 74.89 μ m and 63.57% for *I. unguicularis* var. *cretensis* and 86.7 μ m and 43% for *I. mesopotamica*.

The mean centromeric asymmetry (M_{CA}) of *Oncocyclus* taxa varied from 68.4 to 73.6%. For *I. persica*, *I. unguicularis* var. *cretensis* and *I. mesopotamica*, M_{CA} were 40.4%, 27.13% and 39.9% respectively. The CV_{CL} of the ten taxa, ranged from 20.9% to 33% (Table 2).

Heterochromatin and ribosomal genes mapping

The physical mapping of two rRNA gene families 5S and 35S, and the distributional pattern of GC-rich DNA regions (heterochromatin) in the chromosomes of ten Lebanese taxa have been performed for the first time in this study. The results are presented in Table 3 and Fig 2.

Fluorochrome banding revealed GC-rich heterochromatin regions (CMA^+ bands) which were always associated with 35S rDNA loci. Consequently, the number and position of GC-rich DNA regions correspond to those of 35S loci (Table 3). G-C rich heterochromatin and rDNA organization was conserved and almost identical for all *Oncocyclus* taxa (Fig 2A–2H). The 35S rRNA genes (red signals) were situated in the secondary constrictions (SC) and

Table 2. Main data on karyotype features of investigated *Iris* taxa.

Taxon	2n (x)	Karyotype formula (2n)	M _{CA}	CV _{CL}
<i>I. antilibanotica</i>	20 (2x)	4t+2st-t+14st	71	33
<i>I. bismarckiana</i>	20 (2x)	10t+10st	73.2	28.1
<i>I. cedreti</i>	20 (2x)	10t+10st	73.6	31.6
<i>I. lortetii</i>	20 (2x)	18st+2t	68.4	29.6
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Falougha)	20 (2x)	6t+14st	70.6	31.4
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i> (Hazzerta)	20 (2x)	6t+14st	71.6	31.7
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>Kasruwana</i>	20 (2x)	4t+16st	68.6	29.3
<i>I. westii</i>	20 (2x)	6t+14st	72.7	30.1
<i>I. mesopotamica</i>	48 (4x)	24st + 12m+10sm+2sm-st	39.9	20.9
<i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	40 (4x)	4st+12m+24sm	27.13	24.42
<i>I. persica</i>	24 (2x)	2st+ 4M-m+12m+6sm	40.4	31.7

M_{CA} – mean centromeric asymmetry [53]; CV_{CL} – coefficient of variation of chromosome length [54].

doi:10.1371/journal.pone.0160816.t002

satellites, which correspond to Nuclear Organized Regions (NORs) of chromosome pair 5 and 6 and on the short arm of chromosome pair 7. Four nucleolar silver-stained granules of active nucleolus organizer regions in interphase cells of *I. sofarana* and on *I. mesopotamica* were obtained confirming that all the 35S rRNA genes detected by FISH were active in *I. mesopotamica* while just 4 out of 6 were active in *I. sofarana* (Data not shown). This experiment should be conducted on the other species to confirm this tendency.

In *I. persica* ribosomal genes 35S were situated on the short arms of chromosome pairs 11 and 12 (Fig 2I and 2I'), in *I. unguicularis* var. *cretensis* on the pairs 19 and 20 (Fig 2J and 2J'), and in *I. mesopotamica* on the pairs 6 and 11 (Fig 2K and 2K'). The only 5S locus (green signals) was located intercalary on paracentromeric position of telomeric chromosome pair 9 in all *Oncocyclus* taxa (Fig 2A–2H), on chromosome pair 6 in *I. persica*, on pair 8 in *I. unguicularis* var. *cretensis* and on pair 17 in *I. mesopotamica* (Fig 2I–2K).

Discussion

Chromosome number and karyotype features

The karyotypes of investigated taxa were established for the first time using conventional measurements of chromosomes on several metaphase plates per species or population.

Table 3. Synthesis of results concerning molecular cytogenetic approach of investigated *Iris* taxa.

Taxon	2n	Nb and position of CMA ⁺ bands	Nb of 35S signals	Nb of 5S signals
<i>I. antilibanotica</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. bismarckiana</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. cedreti</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. lortetii</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>sofarana</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. sofarana</i> subsp. <i>kasruwana</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. westii</i>	20	6 (5, 6, 7)*	6 (5, 6, 7)*	2 (9)
<i>I. mesopotamica</i>	48	4 (6, 11)*	4 (10, 11)*	2 (17)
<i>I. unguicularis</i> var. <i>cretensis</i>	40	4 (19, 20)*	4 (19, 20)*	2 (8)
<i>I. persica</i>	24	4 (11, 12)*	4 (11, 12)*	2 (6)

* Chromosome pair number

doi:10.1371/journal.pone.0160816.t003

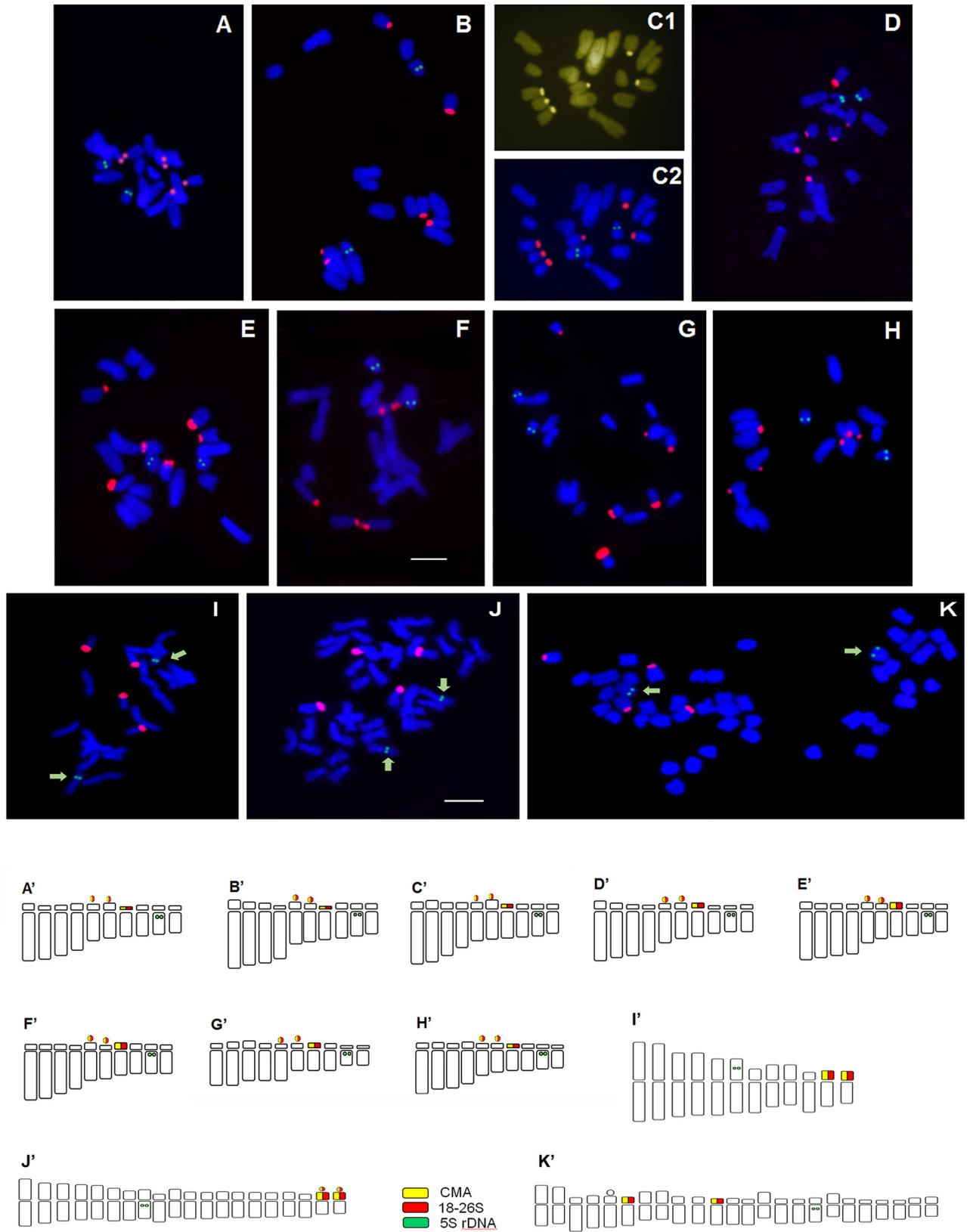


Fig 2. Metaphase chromosome plates and Idiograms of *Iris* taxa A–K: Metaphase chromosome plates of *Iris* taxa after double target FISH with 5S (green signals) and 18-26S rDNA (red signals) probes. C1 represents CMA staining (yellow signals). A*–K*: Idiograms with location of 5S (green) and 18-26S rDNA (red) rRNA genes. A*: *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Falougha), B*: *I. sofarana* subsp. *sofarana* (Hazzerta) C*: *I. sofarana* subsp. *kasruwana*, D*: *I. cedreti*, E*: *I. westii*, F*: *I. bismarckiana*, G*: *I. lortetii*, H*: *I. antilibanotica*, I*: *I. persica*, J*: *I. unguicularis* var. *cretensis*, K*: *I. mesopotamica*. Scale bar 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0160816.g002

Our results show that the karyotype of *Oncocyclus* species remained mainly unchanged. The species showed an extremely similar, bimodal, asymmetric chromosome complement ($2n = 20$) with four pairs (or five in *I. lortetii*) of long chromosomes and six pairs of small ones (Fig 2). Among the long chromosomes, two pairs with a “conspicuous knoblike” short arm and two pairs with “minute”, almost indistinct short arms were observed. The small chromosomes could be differentiated into two satellite pairs, two pairs with knoblike short arms, and two other pairs with minute short arms. All the species from *Oncocyclus* section studied here were found to be diploid with basic chromosome number $x = 10$ and to present a very close karyotype profile. This is in accordance with results reported by [15,55] for a dozen of *Oncocyclus* taxa analyzed. The constant chromosome number and similar karyotype feature should be considered as a characteristic of the entire section and a diagnostic trait separating the *Oncocyclus* from other *Iris* sections.

In addition to the basic chromosome number of $x = 10$ found in the *Oncocyclus* and *Limniris* sections of the subgenus *Iris*, $x = 12$ was found in *I. mesopotamica* (*Iris* section) and *I. persica* (subgenus *Scorpiris*). Basic chromosome numbers of $x = 8, 10, 11$ and 12 were reported in subgenus *Iris* and $x = 10, 11, 12$ and 13 in subgenus *Scorpiris* [56]. When comparing basic chromosome number with phylogenetic inferences of *Iris* genus [57], we did not find an explicit trend or correlation between basic chromosomes number and evolutionary history. In each subgenus, different basic chromosome numbers exists. Therefore, we cannot assume neither the smallest nor the biggest basic chromosome number is attributed to the ancestral number.

It is noteworthy that *I. persica* taxonomic status in Lebanon is still debated. In fact, Hall & Seisums [58] considered some *Iris persica* populations of Lebanon and Syria as a new species called *Iris wallisiae*. They contradicted Mouterde (1966) who included *I. persica* in his treatment of the flora of Syria and Lebanon and declared that there is no evidence of *I. persica* ever having been found in Lebanon. Furthermore, according to Hall & Seisums (2014) [58] all reports of *I. persica* by Tohmé & Tohmé [59,60,61] for Bekaa valley refer to *I. wallisiae*. A chromosome count of $2n = 22$ was found by Hall and Seisums (2014) in individuals from three Syrian populations of *I. wallisiae* whereas it was $2n = 20$ in six Syrian populations of *I. persica*. Unexpectedly, our results differ from these chromosome counts, since we found $2n = 24$ in the presumed *I. persica* population analyzed. Further studies carried out on a larger number of populations in this geographical area need to be conducted to better understand the taxonomy and phytogeography of these taxa.

For *I. mesopotamica* we found $2n = 4x = 48$ which is in agreement with earlier reports by [62,63]. *Iris mesopotamica* is considered a synonym of *I. germanica* [42]. *Iris germanica* was found by Siljak-Yakovlev [64] to be also tetraploid. Both are considered as hybrids and found only in cultivated areas or in the wild having escaped from cultivation. *Iris mesopotamica* is propagated vegetatively and distributed locally, giving the impression of having a stable population with a distinct geographical range [5]. Frequently grown in cemeteries and gardens, it is supposed to come from the Asian Mediterranean coasts (Mouterde, 1983).

For *I. unguicularis* var. *cretensis*, we confirm the previous report of $2n = 4x = 40$ [65]. This variety is also found in Greece, Crete and Minor Asia. Typical forms of *I. unguicularis* are widespread in the Eastern Mediterranean region and North Africa where they display a great variability.

Polyploidy was clearly important in the early diversification of the Iridaceae [66]. In *Iris*, where changes in basic chromosome numbers are common, the ancestral base number, however, remains unclear [66]. The phylogenetic reconstructions do not provide an adequate resolution to interpret neither an increasing nor a decreasing (descending) dysploidy. Although, few studies evaluate dysploidy variation of chromosome number in a phylogenetic framework, a decrease in chromosome numbers comes out not to be unusual [67,68,69,70]. Decreasing dysploidy has been already proposed for several genera of the Iridaceae [66].

Based on the study of the karyotypes feature, we can conclude that *Oncocyclus* is more recent than *Iris*, *Limniris* and *Scorpiris* sections. The constant chromosome number ($2n = 20$) and extreme similarity of karyotypes among the species of *Oncocyclus* section can be related to its small geographical distribution and shows that *Oncocyclus* is a recent–still evolving–section.

Distribution pattern of GC-rich DNA regions and rRNA genes

The comparative chromosome mapping of rRNA genes and GC-rich DNA regions have been established here for the first time for all ten investigated taxa. The rDNA is known to participate actively in genome rearrangements [71,72], thus analyzing and comparing 35S and 5S rDNA profiles across related species potentially allow to test hypotheses on their relationships.

Although this kind of studies remains very scarce for the *Iris* genus, the chromosomal locations of 5S and 35S rDNA loci have been previously determined for seven species of subgenus *Xiphium* [40], with a possible trend of increased 35S rDNA loci number during the diversification of the group.

In our study, the two rRNA gene families were located on separate chromosome pairs; thus, the 5S genes are of S-type arrangement [73]. Six signals of 35S rDNA and two signals of 5S rDNA are observed in diploid *Oncocyclus* irises while four signals of 35S and two signals of 5S were detected in tetraploid *I. unguicularis* var. *cretensis* and *I. mesopotamica*. Polyploidy is frequently associated with epigenetic silencing of rDNA loci [74,75]. Those units and loci that are inactive could be most vulnerable to deletion since their loss would have no selective consequence [76]. In *Iris germanica* which is currently considered as synonym of *I. mesopotamica*, Siljak-Yakovlev [64] found eight loci of 35S and two loci of 5S. This different 35S rDNA signals number between these two species questions their real synonymy and call for further studies. Both are tetraploid but their presumed hybrid origin should be confirmed.

Our results prove once again what was reported in previous studies: a loss in 35S and perhaps 5S rDNA loci can be considered as an early indication of genome diploidization in polyploid. In allopolyploids, various types of genetic alterations are observed as reduction in copy number, locus loss, intra- and intergenomic recombination [77,78,79,80]. It was the case for *I. versicolor*, an allopolyploid hybrid for which 18–26S rDNA is likely to have undergone a locus loss rather than locus co-evolution [76]. If this should be applied to the polyploidy of *I. germanica* and *I. mesopotamica*, the first one could be an autopolyploid while the other one could be an interspecific hybrid. Of course, the polyploidy origin should be addressed more carefully by including in the study the putative parents. At this point we can only confirm that ribosomal RNA genes mapping enables the distinction between *I. germanica* from Balkans and *I. mesopotamica*.

Outlandishly, this technique failed to show differences between the seven *Oncocyclus* irises studied. This finding supports their recent common evolutionary history, as previously suggested [18] Although molecular markers found the two *I. sofariana* subspecies as polyphyletic [12], interbreeding between the *Oncocyclus* species is reported to be possible, and creates vital progenies, with fertile hybrids [11]. However, several factors limiting gene flow between populations could have conducted to speciation and selection of the locally adapted genotypes:

indeed, (i) the different populations of the Lebanese taxa analyzed in this study are highly fragmented and not close enough for allowing their short flying distance pollinators to maintain gene flow; furthermore, (ii) these taxa are found at different altitudes and flowering dates do not overlap thus contributing to their genetic isolation; finally, (iii) *Oncocyclus* irises are myrmecochory plants, and having their seeds dispersed by ants could also contribute to hinder gene flow. For conservation issues, when population reinforcement will be considered as an option, it is advisable to realize controlled cross-fertilization experiments before in order to confirm their biological compatibility. This kind of information is crucial in order to address IUCN red list status of these taxa.

Concluding Remarks

This is a contribution to the knowledge of this large genus which has been, until now, rarely studied in this area of research. It provides a first karyomorphological and molecular cytogenetic characterization of ten Lebanese *Iris* species. An important inter-sections variation was detected among the studied taxa. Difference in chromosome number, morphometric data of karyotypes, number and position of GC rich DNA regions and 5S and 35S rDNA loci were evidenced among three species belonging to sections *Iris*, *Limniris* and *Scorpiris*. However the absence of variability and the strong similarity in the karyotype features observed among *Oncocyclus* taxa suggest that this is probably a very young group whose speciation is still in progress as reported in a recent phylogeny including some *Oncocyclus* representative [12]. Additional molecular and cytological studies, including a wider sampling of *Oncocyclus* irises from the eastern Mediterranean, are currently underway. These studies should clearly describe the diversification and speciation of this section.

Supporting Information

S1 Fig. Metaphase plates and karyotypes of selected *Iris* taxa stained with acetoorcein (TIF)

S1 Table. Accepted names of studied irises and their synonyms according to The Plant List, 2013
(DOCX)

S2 Table. Morphometric data concerning the karyotype of *Iris* taxa
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Odile Robin and Fatima Pustahija for their technical assistance in molecular cytogenetics (Ecologie, Systématique, Evolution, UMR 8079, Université Paris Sud), Dr. Georges Tohmé and Mr. Nasser Chreif for their help in collecting some of the plant material.

Author Contributions

Conceptualization: MBK SSY.

Data curation: SSY NAS.

Formal analysis: NAS OH.

Funding acquisition: MBK.

Investigation: BD REZ NAS.

Methodology: MBK SSY.

Project administration: MBK.

Resources: BD REZ NAS.

Software: OH.

Supervision: MBK SSY.

Validation: MBK SSY.

Visualization: MBK.

Writing - original draft: MBK SSY NAS.

Writing - review & editing: MBK.

References

1. Rasoul TN (1984) Ornamental bulbs. Mosul: Al-Mousel University.
2. Glasgow K (1997) Irises. A practical gardening guide. Portland, Oregon: Timber Press.
3. Makarevitch I, Golovnina K, Scherbik S, Blinov A (2003) Phylogenetic Relationships of the Siberian *Iris* Species Inferred from Noncoding Chloroplast DNA Sequences. *Int J Plant Sci* 164: 229–237.
4. Doronkin VM (1987) Iridaceae Juss. Nauka, Novosibirsk. 113–125 p.
5. Mathew B (1989) The Iris. London: Batsford.
6. Rodionenko GI (1987) The genus *Iris* L.: questions of morphology, biology, evolution, and systematics. London: British Iris Society.
7. Wu Q-G, Cutler DF (1985) Taxonomic, evolutionary and ecological implications of the leaf anatomy of rhizomatous *Iris* species. *Bot J Linn Soc* 90: 253–303.
8. Mouterde P (1966–1983) Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. Beyrouth (Liban): Imprimerie catholique.
9. Köhlein F (1987) Iris. Portland, Oregon: Timber Press.
10. Rix M (1997) Section *Oncocyclus*. In: A guide to Species Irises. London: Cambridge Press.
11. Avishai M, Zohary D (1980) Genetic Affinities among the *Oncocyclus* irises. *Botanical Gazette* 141: 107–115.
12. Wilson CA, Padiernos, J. & Sapir Y. (2016) The royal irises (*Iris* subg. *Iris* sect. *Oncocyclus*): Plastid and low-copy nuclear data contribute to an understanding of their phylogenetic relationships. *Taxon*: 12 pp.
13. Sapir Y, Shmida AVI (2002) Species concepts and ecogeographical divergence of *Oncocyclus* irises. *Isr J Plant Sci* 50: 119–127.
14. Avishai M (1977) Species relationships and cytogenetic affinities in section *Oncocyclus* of the genus *Iris*. Jerusalem: Hebrew University.
15. Avishai M, Zohary D (1977) Chromosomes in the *Oncocyclus* Irises. *Botanical Gazette* 138: 502–511.
16. West WA (1967) *Iris antilibanotica*. *ASI Yearbook*: 64–66.
17. Chaudhary SA (1972) Three new taxa of *Iris* subgenus *Oncocyclus* from Lebanon and Syria. *Bot Notiser* 125: 497–500.
18. Saad L (2006) Etude écogéographique et biologie de la conservation des *Iris* *Oncocycles* endémiques du Liban [PhD thesis]. Gembloux: Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux.
19. Walter KS, Gillett HJ (1998) 1997 IUCN Red List of threatened plants: IUCN.
20. Saad L, Mahy G (2009) Molecular and morphological variation of rare endemic *oncocyclus* irises (*Iridaceae*) of Lebanon. *Bot J Linn Soc* 159: 123–135.
21. Sapir Y, Shmida A., and Fragman O. (2003) Constructing Red Numbers for endangered plant species: Israeli flora as a test case. *J Nat Conserv* 11 91–107.
22. Bou Dagher-Kharrat M (2013–2016) Determination of Important Areas for Plants and Creation of Micro-Reserves to Conserve Rare or Endemic Species in Lebanon. In: Fund CEP, editor.

23. Lavi R, Sapir Y (2015) Are pollinators the agents of selection for the extreme large size and dark color in *Oncocyclus* irises? *New Phytol* 205: 369–377. doi: [10.1111/nph.12982](https://doi.org/10.1111/nph.12982) PMID: [25157604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25157604/)
24. Monty A, Saad L, Gg Mahy (2006) Bimodal pollination system in rare endemic *Oncocyclus* irises (Iridaceae) of Lebanon. *Canadian Journal of Botany* 84: 1327–1338.
25. Sapir Y, Shmida A, Ne'eman G (2005) Pollination of *Oncocyclus* irises (Iris: Iridaceae) by Night-Sheltering Male Bees. *Plant Biol* 7: 417–424. PMID: [16025415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16025415/)
26. Vereecken NJ, Dorchin A, Dafni A, Hötling S, Schulz S, Watts S (2013) A pollinators' eye view of a shelter mimicry system. *Ann Bot* 111: 1155–1165. doi: [10.1093/aob/mct081](https://doi.org/10.1093/aob/mct081) PMID: [23599249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23599249/)
27. Watts S, Sapir Y, Segal B, Dafni A (2013) The endangered *Iris atropurpurea* (Iridaceae) in Israel: honey-bees, night-sheltering male bees and female solitary bees as pollinators. *Ann Bot* 111: 395–407. doi: [10.1093/aob/mcs292](https://doi.org/10.1093/aob/mcs292) PMID: [23275630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23275630/)
28. Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW, Leitch AR (2000) Ribosomal DNA Evolution and Phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *Am J Bot* 87: 1578–1583. PMID: [11080107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11080107/)
29. Bareka P, Siljak-Yakovlev S, Kamari G (2012) Molecular cytogenetics of *Bellevia* (Hyacinthaceae) species occurring in Greece. *Plant Syst Evol* 298: 421–430.
30. Garnatje T, Hidalgo O, Vitales D, Pellicer J, Vallès J, Robin O, et al. (2012) Swarm of terminal 35S in *Cheirolophus* (Asteraceae, Centaureinae). *Genome* 55: 529–535. doi: [10.1139/g2012-041](https://doi.org/10.1139/g2012-041) PMID: [22794166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22794166/)
31. Jang T-S, Emadzade K, Parker J, Temsch EM, Leitch AR, Speta F, et al. (2013) Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *BMC Evol Biol* 13: 1.
32. Ruas CdF Vanzela ALL, Santos MO Fregonezi JN, Ruas PM Matzenbacher N, et al. (2005) Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genet Mol Biol* 28: 129–139.
33. Souza G, Crosa O, Guerra M (2015) Karyological, morphological, and phylogenetic diversification in *Leucocoryne* Lindl (Allioideae, Amaryllidaceae). *Plant Syst Evol* 301: 2013–2023.
34. Bogunić F, Siljak-Yakovlev S, Muratović E, Ballian D (2011) Different karyotype patterns among allopatric *Pinus nigra* (Pinaceae) populations revealed by molecular cytogenetics. *Plant Biol* 13: 194–200. doi: [10.1111/j.1438-8677.2010.00326.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00326.x) PMID: [21143741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21143741/)
35. Dobigny G DJ-F, Robinson TJ, Volobouev V (2004) Cytogenetics and cladistics. *Syst Biol* 53: 470–484. PMID: [15503674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15503674/)
36. Muratović E, Hidalgo O, Garnatje T, Siljak-Yakovlev S (2010) Molecular phylogeny and genome size in European lilies (Genus *Lilium*, Liliaceae). *Advanced Science Letters* 3: 180–189.
37. Cuadrado A, Schwarzacher T, Jouve N (2000) Identification of different chromatin classes in wheat using in situ hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. *Theor Appl Genet* 101: 711–717.
38. Cuadrado A, Vitellozzi F, Jouve N, Ceoloni C (1997) Fluorescence in situ hybridization with multiple repeated DNA probes applied to the analysis of wheat-rye chromosome pairing. *Theor Appl Genet* 94: 347–355.
39. Stace CA (2000) Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon*: 451–477.
40. Martínez J. PV, Luceño M., and Cuadrado A. (2010) Evolution of *Iris* subgenus *Xiphium* based on chromosome numbers, FISH of nrDNA (5S, 45S) and trnL-trnF sequence analysis. *Plant Syst Evol* 289: 223–235.
41. Mouterde P (1983) Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. Beyrouth (Liban): Imprimerie catholique.
42. The Plant List (2013) Version 1.1.: Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>
43. Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.
44. Peruzzi L, Eroglu H (2013) Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure? *Comparative cytogenetics* 7: 1. doi: [10.3897/CompCytogen.v7i1.4431](https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v7i1.4431) PMID: [24260685](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24260685/)
45. Watanabe K, Yahara T, Denda T, Kosuge K (1999) Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. *Journal of Plant Research* 112: 145–161.
46. Paszko B (2006) A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution* 258: 39–48.
47. Zarco CR (1986) A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon*: 526–530.

48. Geber G, Schweizer D (1988) Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. *Plant Syst Evol* 158: 97–106.
49. Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307–324. PMID: [137107](#)
50. Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Coulaud J, Stoian V, Brown SC, Zoldos V, et al. (2002) Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. *Theor Appl Genet* 104: 505–512. PMID: [12582725](#)
51. Gerlach WL, Dyer TA (1980) Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 8: 4851–4865. PMID: [7443527](#)
52. Heslop-Harrison J (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3: 109–116.
53. Peruzzi L, Eroğlu H (2013) Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure? *Comparative Cytogenetics* 7.
54. Paszko B (2006) A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Syst Evol* 258: 39–48.
55. Mitra J (1956) Karyotype Analysis of Bearded Iris. *Botanical Gazette* 117: 265–293.
56. Koçyiğit M, Erken K, Özhatay FN, Kaya E (2013) Iris L. Subgen. Iris Ve Subgen. Scorpiris Tabanında Kültür Bitkileri Üzerindeki Karyolojik Çalışmaların Önemi. V Süs Bitkileri kongresi. Yalova, Turkey. pp.
57. Wilson CA (2004) Phylogeny of Iris based on chloroplast matK gene and trnK intron sequence data. *Mol Phylogen Evol* 33: 402–412.
58. Hall T, Seisums A (2014) 793. *Iris wallisiae*. *Curtis's Botanical Magazine* 31: 238–248.
59. Tohmé G, Tohmé H (2002) A thousand and one flowers of Lebanon: Lebanese University.
60. Tohmé G, Tohmé H (2007) Illustrated flora of Lebanon. Beirut: The Lebanese University Publications Department. 309 p.
61. Tohmé G, Tohmé H (2011) Nouvelles recherches sur la flore endémique et naturalisée du Liban. *Lebanese Science Journal* 12: 133–141.
62. Simonet M (1932) Recherches cytologiques et génétiques sur les Iris. *Bull Biol France Belg* 78,: 696–707.
63. Simonet M (1934) Nouvelles recherches cytologiques et génétiques chez les iris. *Ann sci nat, Bot Annales des sciences naturelles Botanique* 25.
64. Siljak-Yakovlev S, Bogunić, F., Muratović, E., Šolić, M.E., Pavlović, D. & Medjedović, S. (2005) Genome organization of some Iris species assessed by molecular cytogenetics. XVII International Botanical Congress. Vienne. pp. 384.
65. Davis AP, Jury SL (1990) A taxonomic review of *Iris* L. series Unguiculares (Diels) Lawrence. *Bot J Linn Soc* 103: 281–300.
66. Goldblatt P, Takei M (1997) Chromosome cytology of Iridaceae—Patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 285–304.
67. Cerbah M, Souza-Chies T, Jubier M, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S (1998) Molecular phylogeny of the genus *Hypochaeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution. *Mol Biol Evol* 15: 345–354. PMID: [9501501](#)
68. Hidalgo O, Garcia-Jacas N, Garnatje T, Susanna A, Siljak-Yakovlev S (2007) Karyological evolution in *Rhaponticum* Vaill.(Asteraceae, Cardueae) and related genera. *Bot J Linn Soc* 153: 193–201.
69. Martel E, Poncet V, Lamy F, Siljak-Yakovlev S, Lejeune B, Sarr A (2004) Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. *Plant Syst Evol* 249: 139–149.
70. Siljak-Yakovlev S, Benmalek S, Cerbah M, DelaPeña TC, Bounaga N, Coba de la Pena T, et al. (1996) Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm. *Sexual Plant Reproduction* 9: 127–132.
71. Clarkson J, Lim K, Kovařík A, Chase M, Knapp S, Leitch A (2005) Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (Solanaceae). *New Phytol* 168: 241–252. PMID: [16159337](#)
72. Schubert I, Wobus U (1985) *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92: 143–148.
73. Garcia S, Crhák Khaitová L, Kovařík A (2012) Expression of 5 S rRNA genes linked to 35 S rDNA in plants, their epigenetic modification and regulatory element divergence. *BMC Plant Biol* 12:95. doi: [10.1186/1471-2229-12-95](#) PMID: [22716941](#)

74. Lacadena J, Cermeno M, Orellana J, Santos J (1984) Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in Triticale by silverstaining procedure. *Theor Appl Genet* 67: 207–213. doi: [10.1007/BF00317037](https://doi.org/10.1007/BF00317037) PMID: [24258550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24258550/)
75. Pikaard C (2001) Genomic change and gene silencing in polyploids. *Trends Genet* 17: 675–677. PMID: [11718903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11718903/)
76. Lim K, Matyasek R, Kovarik A, Leitch A (2007) Parental Origin and Genome Evolution in the Allopolyploid *Iris versicolor*. *Ann Bot* 100: 219–224. PMID: [17591610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17591610/)
77. Alvarez I, Wendel J (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogen Evol* 29: 417–434.
78. Dadejova M, Lim K, Souckova´-Skalicka´ K, Matyasek R, Grandbastien M, Leith A, et al. (2007) Transcription activity of rRNA genes correlates with a tendency towards intergenomic homogenisation in Nicotiana allotetraploids. *New Phytol* 174: 658–668. PMID: [17447920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17447920/)
79. Kovarik A, Pires J, Leitch A, Lim K, Sherwood A, Matyasek R, et al. (2005) Rapid concerted evolution of nuclear ribosomal DNA in two allopolyploids of recent and recurrent origin. *Genetics* 169: 931–944. PMID: [15654116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15654116/)
80. Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss G, Stuessy T, Mabuchi T, Park J, Jang CG et al. (2007) Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto- and allopolyploid taxa of *Hepatica* (Ranunculaceae). *New Phytol* 174: 669–682. PMID: [17447921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17447921/)