

Evolution des Neottieae, apport de la cytométrie en flux

Daniel PRAT^{1,2}, Spencer C. BROWN³ et Alain GEVAUDAN¹

¹ SFO, Commission scientifique, 17 Quai de la Seine, 75019 Paris, France

² UMR 5023, Laboratoire d'Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Université Lyon 1, 6 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne Cedex, France
daniel.prat@univ-lyon1.fr

³ UPR 2355, Institut des Sciences du Végétal, IBiSA imagerie Gif, CNRS et Imagif, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Abstract – Evolution of Neottieae: insights from flow cytometry. The Neottieae have long been recognized as a group of orchids well separated one from another. Their taxonomy has been successively remodelled with the recent integration of genus *Listera* into genus *Neottia* and the exclusion of genus *Thaia*. After this, Neottieae consists of 6 genera of which 4 are growing on French territory, each one represented by several taxa. Among many questions concerning their biology, the evolution of these taxa is still awaiting clarification. Despite the large development of genome analyses, even the genome size of these species remains poorly documented. Almost all Neottieae species growing in France have been investigated here. At least one population represented by five separate individuals was collected for each taxon. The most largely distributed species of the genus *Epipactis* were represented by several populations. The genome sizes were determined by flow cytometry. Investigated genera showed different ranges of values: the mean DNA content of diploid genome (in pg DNA per 2C nucleus) was 11.4 in genus *Limodorum*, 26.8 in genus *Epipactis*, 35.4 in genus *Cephalanthera* and 35.3 in genus *Neottia*. The genus *Epipactis* represented by 20 taxa showed DNA content ranging from 24.8 pg of DNA per nucleus in *E. helleborine* var. *minor* to 30.4 pg of DNA per nucleus in *E. kleinii*. Based on available phylogenies for Neottieae and genus *Epipactis*, closely related taxa do not share close DNA content. Nor is DNA content related to chromosome numbers of these species. Two plants of the genus *Epipactis* were triploids. No other ploidy variation was detected.

Résumé – Les Neottieae ont été reconnues depuis longtemps comme un groupe d'orchidées bien individualisées. Leur taxonomie a été régulièrement remaniée avec l'intégration récente du genre *Listera* dans le genre *Neottia* et l'élimination du genre *Thaia*. Parmi les 6 genres reconnus actuellement de cette tribu, 4 sont présents sur le territoire français, représenté chacun par plusieurs taxons. Beaucoup de questions concernant la biologie, l'évolution de ces taxons attendent encore des réponses. En cette période où les analyses de génomes se développent, la taille même du génome de ces espèces reste mal documentée, d'où les travaux présentés ici. Les différentes espèces de Neottieae présentes en France, ont été étudiées. Au moins une population représentée par 5 individus distincts a été collectée pour chaque taxon. Les taxons les plus abondants du genre *Epipactis* ont été représentés par plusieurs populations. Les tailles de génome ont été déterminées par cytométrie en flux. Les genres étudiés présentent différentes gammes de valeurs : les tailles de génome diploïde, en pg d'ADN par noyau 2C sont en moyenne de 11,4 pour le genre *Limodorum*, 26,8 pour le genre *Epipactis*, 35,4 pour le genre *Cephalanthera* et 35,3 pour le genre *Neottia*. Le genre *Epipactis* représenté par 20 taxons montre des variations de 24,8 pg d'ADN par noyau chez *E. helleborine* var. *minor* à 30,4 pg d'ADN par noyau chez *E. kleinii*. Sur la base des phylogénies disponibles pour les Neottieae et le genre *Epipactis*, les proximités entre taxons ne rendent pas compte de l'ensemble des variations de taille de génome observées. Deux individus du genre *Epipactis* dans deux espèces différentes étaient triploïdes.

Mots-clés : *Cephalanthera*, *Epipactis*, *Limodorum*, *Neottia*, Neottieae, taille de génome

INTRODUCTION

Au sein des Orchidacées, les Neottieae constituent un groupe identifié depuis

longtemps. Dès les premières classifications des Orchidacées, ce groupe est reconnu et Lindley (1830-1840) en fait l'une des 7 tribus de la famille, caractérisée par une anthère dorsale renfermant des masses polliniques sécables, poudreuses ou granuleuses. Cette tribu est maintenue dans de nombreuses classifications, y compris les plus récentes comme celle de Genera Orchidacearum (Pridgeon *et al.*, 2005) mais sa composition a été régulièrement remaniée (voir Burns-Balogh *et al.*, 1987). Ces Orchidacées classées dans la sous-famille des Epidendroideae (Pridgeon *et al.*, 2005) possèdent des caractères ancestraux qui les maintiennent à part : pollen souvent pulvérulent, absence de velamen, absence de pseudobulbe (Dressler, 1993). Leur labelle souvent articulé, des champignons symbiotiques particuliers (Sélosse *et al.*, 2004)... accentuent cette originalité. Depuis l'étude de Burns-Balogh *et al.* (1987), le genre *Rhizanthella* en a été exclu, les genres *Listera* et *Neottia* ont été regroupés sur la base d'approches phylogénétiques et le genre *Thaia* y a été incluí (Bateman *et al.*, 2005 ; Roy *et al.*, 2009) puis exclu par Xiang *et al.* (2012). La tribu comporte ainsi 6 genres dont quatre, *Cephalanthera*, *Epipactis*, *Limodorum* et *Neottia* présents en France et représentés par plusieurs taxons. Les deux autres genres, *Aphylorchis* et *Palmorchis* sont originaires, le premier d'Asie du sud-est et le deuxième d'Amérique du sud. Les relations évolutives de ces genres ont déjà été largement discutées (Burns-Balogh *et al.*, 1987 ; Bateman *et al.*, 2005 ; Xiang *et al.*, 2012 ; Barone Lumaga *et al.*, 2014) sur la base de la structure de la fleur, de la structure du pollen ou de données phylogénétiques. Parmi les quatre genres étudiés ici, *Cephalanthera* est considéré généralement comme le plus basal et *Neottia* comme le plus dérivé.

L'évolution des taxons peut être analysée au niveau chromosomique. La littérature signale une variabilité des nombres chromosomiques, même sur une même station (Bernardos *et al.*, 2003). La formation de gamètes aneuploïdes a été observée (Giuseppina *et al.*, 2010), ce qui peut conduire à de telles observations. Le caryotype des Neottieae révèle deux classes de taille de chromosomes, quelques grands et une majorité de petits (D'Emérico *et al.*, 1999). Les nombres chromosomiques sont plus élevés ($2n=56$) pour *Limodorum* et plus faibles

($2n=32$ à $2n=44$) pour les autres genres (D'Emérico *et al.*, 1999). Ces caryotypes varient aussi entre espèces d'un même genre. Dans le cas du genre *Cephalanthera* les variations du nombre de copies des séquences ribosomiques et de leur localisation entre espèces laissent penser à des remaniements importants avec des fusions et fissions de chromosomes (Moscone *et al.*, 2007). Des espèces du genre *Epipactis* peuvent être regroupées en fonction d'une similitude de leur caryotype et pas seulement en fonction des nombres de chromosomes observés, $2n=38$ et $2n=40$ (D'Emérico *et al.*, 1999). Ces changements de structure chromosomique des Neottieae devraient se traduire par des variations de la quantité d'ADN par noyau, donc de la taille du génome avec éventuellement des variations intraspécifiques. Or peu de données sont disponibles sur cette taille de génome chez les Neottieae. La base de données des tailles de génome (<http://data.kew.org/cvalues/>) ne fait apparaître que deux valeurs non publiées concernant le genre *Cephalanthera*. Cette taille de génome est corrélée à des paramètres biologiques comme les tailles de cellules et la vitesse de division cellulaire (Cavalier-Smith, 1978). Par ces propriétés, elle est reliée aux traits d'histoire de vie des espèces en influençant les dimensions des plantes et leur temps de génération (Knight *et al.*, 2005). Ces données de cytométrie peuvent apporter des informations sur l'écologie des espèces (Leitch et Bennett, 2007 ; Vesely *et al.*, 2012). Chez les Orchidacées, Leitch *et al.* (2009) ont montré l'intérêt de confronter des données de cytométrie aux données phylogénétiques. De plus, ces données seront utiles pour les analyses plus poussées du génome qui arriveront dans les prochaines années.

Dans cet objectif, nous avons mené une analyse sur le contenu en ADN du génome nucléaire afin de donner une estimation de sa taille et d'en préciser les variations. Cette étude s'est focalisée sur les quatre genres de Neottieae présents en France avec la plupart des taxons qu'ils comportent.

MATERIELS ET METHODES

Les espèces des genres *Cephalanthera*, *Epipactis*, *Limodorum* et *Neottia* ont été prospectées afin de disposer de la quasi totalité des taxons répertoriés et cartographiés en

France (Bournérias et Prat, 2005 ; Dusak et Prat, 2010). Les collectes ont été menées principalement dans la région Rhône-Alpes qui présente une large majorité de ces taxons. Les taxons plus largement répandus ont été collectés dans plusieurs stations. Les prélèvements ont été réalisés si possible sur 5 plantes par site (Tableau 1). La portion de feuille collectée sur chaque plant a été maintenue entre papiers filtre faiblement humecté pour éviter le dessèchement de l'échantillon et conservée autant que possible à 4 °C jusqu'à l'analyse. Dans le cas du genre *Limodorum*, ce sont des capsules immatures qui ont été collectées. Des capsules ont également été collectées pour quelques plantes en plus des feuilles.

Tableau 1. – Origine des échantillons prélevés pour la cytométrie en flux (N : nombre de plantes collectées).

Taxon	Commune	N
<i>Cephalanthera damasonium</i>	Sévrier (74)	6
<i>Cephalanthera longifolia</i>	Sévrier (74)	6
<i>Cephalanthera rubra</i>	Sablons (38)	5
<i>Epipactis atrorubens</i>	Allevard (38)	5
<i>Epipactis atrorubens</i>	Chamrousse (38)	5
<i>Epipactis atrorubens</i>	Le Monestier du Percy (38)	5
<i>Epipactis atrorubens</i>	Passy (74)	5
<i>Epipactis atrorubens</i>	Saint Etienne de Crossey (38)	6
<i>Epipactis atrorubens</i>	Saint François de Sales (73)	5
<i>Epipactis atrorubens</i>	Saint Gervais les Bains (74)	4
<i>Epipactis atrorubens</i>	Saint Nizier du Moucherotte (38)	5
<i>Epipactis atrorubens</i>	Saint Pierre de Chartreuse (38)	6
<i>Epipactis atrorubens</i>	Trept (38)	4
<i>Epipactis atrorubens</i>	Vertrieu (38)	11
<i>Epipactis atrorubens</i>	Viuz (74)	5
<i>Epipactis distans</i>	Dieulefit (26)	5
<i>Epipactis distans</i>	Lalley (38)	5
<i>Epipactis exilis</i>	Malors et L'Izi (30)	4

Taxon	Commune	N
<i>Epipactis fageticola</i>	Saint Romain en Gal (69)	4
<i>Epipactis fibri</i>	Ile de Chèvre (38)	7
<i>Epipactis helleborine</i>	Allevard (38)	6
<i>Epipactis helleborine</i>	Ordonnaz (01)	5
<i>Epipactis helleborine</i>	Chamrousse (38)	6
<i>Epipactis helleborine</i>	Chapareillan (38)	5
<i>Epipactis helleborine</i>	La Chapelle Saint Maurice (74)	5
<i>Epipactis helleborine</i>	Lalley (38)	5
<i>Epipactis helleborine</i>	Saint François de Sales (73)	5
<i>Epipactis helleborine</i>	Saint Nizier du Moucherotte (38)	5
<i>Epipactis helleborine</i>	Saint-Pierre d'Allevard (38)	3
<i>Epipactis helleborine</i>	Saint-Pierre de Chartreuse (38)	6
<i>Epipactis helleborine</i>	Vertrieu (38)	5
<i>Epipactis helleborine</i>	Thônes (74)	5
<i>Epipactis helleborine</i>	Vif (38)	5
<i>Epipactis helleborine</i> var. <i>castanearum</i>	Malarce sur la Thines (07)	5
<i>Epipactis helleborine</i> var. <i>minor</i>	Still (67)	5
<i>Epipactis kleinii</i>	Le Collet (64)	5
<i>Epipactis kleinii</i>	Montbolo (64)	5
<i>Epipactis kleinii</i>	Opoul (64)	7
<i>Epipactis kleinii</i>	Montner (64)	7
<i>Epipactis leptochila</i>	Parmilieu (38)	2
<i>Epipactis leptochila</i>	Saint Nizier du Moucherotte (38)	5
<i>Epipactis leptochila</i>	Siccieu-Saint-Julien-et-Carisieu (38)	2
<i>Epipactis microphylla</i>	Orgnac l'Aven (07)	5
<i>Epipactis microphylla</i>	Saint Nizier du Moucherotte (38)	5
<i>Epipactis muelleri</i>	Lalley (38)	5
<i>Epipactis muelleri</i>	Optevoz (38)	5
<i>Epipactis muelleri</i>	Saint-Pierre d'Allevard (38)	3

Taxon	Commune	N
<i>Epipactis palustris</i>	Bernex (74)	5
<i>Epipactis palustris</i>	Chirens (38)	6
<i>Epipactis palustris</i>	Cras (38)	6
<i>Epipactis palustris</i>	La Salette Fallavaux (38)	6
<i>Epipactis palustris</i>	Monestier du Percy (38)	5
<i>Epipactis palustris</i>	Roybon (38)	5
<i>Epipactis palustris</i>	Saint-Paul en Chablais (74)	6
<i>Epipactis palustris</i>	Saint-Pierre d'Alleverd (38)	5
<i>Epipactis palustris</i>	Saint-Pierre de Chartreuse (38)	5
<i>Epipactis palustris</i>	Thônes (74)	5
<i>Epipactis palustris</i>	Vertrieu (38)	5
<i>Epipactis palustris</i>	Vertrieu (38)	5
<i>Epipactis palustris</i>	Villette d'Anthon (38)	6
<i>Epipactis phyllanthos</i>	Irlande	5
<i>Epipactis placentina</i>	Saint-Pierre d'Alleverd (38)	8
<i>Epipactis provincialis</i>	Orgnac l'Aven (07)	4
<i>Epipactis purpurata</i>	Hauteville- Lompnes (01)	5
<i>Epipactis rhodanensis</i>	Saint-Maurice l'Exil (38)	5
<i>Epipactis rhodanensis</i>	Vertrieu (38)	5
<i>Epipactis rhodanensis</i>	Crépieux (69)	5
<i>Epipactis tremolsii</i>	Rochefort en Valdaine (26)	5
<i>Limodorum abortivum</i>	Optevoz (38)	4
<i>Neottia cordata</i>	Alleverd (74)	6
<i>Neottia nidus-avis</i>	Saint Nizier du Moucherotte (38)	5
<i>Neottia ovata</i>	Albigny sur Saone (69)	6
<i>Neottia ovata</i>	Sévrier (74)	7

Les feuilles prélevées ont été découpées en fines bandelettes avec une lame de rasoir en même temps que des fragments de feuille d'un échantillon de référence (armoïse et blé, de valeurs connues : respectivement 11,43 pg et 30,90 pg) dans un tampon d'isolement de noyaux complété par du métabisulfite de

sodium 10 mM et du polyvinylpyrrolidone 10000 à 1 %. La suspension est ensuite filtrée à travers un tissu en nylon à mailles de 50 µm. Les noyaux ont été colorés après traitement par de la RNase (2,5 U/mL) avec l'iodure de propidium (100 µg/mL) qui est un fluorochrome intercalant spécifique de l'ADN (Catrice *et al.*, 2006). La mesure de coloration a été effectuée après au moins 20 minutes d'incubation à l'aide d'un cytomètre en flux (CyFlow 532nm, Partec) qui mesure l'intensité de coloration des noyaux passant devant un capteur. Les quantités d'ADN par noyau, exprimées en pg, ont été obtenues à partir des mesures de plusieurs milliers de noyaux pour chaque échantillon et par comparaison avec les mesures d'intensité de coloration des noyaux de l'échantillon de référence mesurés en même temps et de valeur connue. La quantité d'ADN par noyau est reliée à la longueur du génome en paires de base d'ADN : 1 pg d'ADN de noyau diploïde correspond à une longueur de génome haploïde de 489 10⁶ paires de bases. Les valeurs des noyaux ayant dupliqué leur teneur en ADN ont servi à valider la bonne linéarité des mesures.

RESULTATS

Des valeurs ont été obtenues pour la plupart des échantillons, seulement quelques uns qui se sont dégradés lors des transports ou d'une conservation trop longue n'ont pas pu être analysés. Les analyses des capsules ou des feuilles d'une même plante n'ont pas montré de différences, ce qui a conforté l'utilisation des capsules pour le genre *Limodorum*.

Les tailles de génome (Figure 1) sont plus importantes pour les genres *Cephalanthera* (35,38 pg d'ADN) et *Neottia* (35,26 pg d'ADN) que pour le genre *Limodorum* (11,42 pg d'ADN). Le genre *Epipactis* montre des contenus en ADN (26,78 pg d'ADN) plus faibles que ceux de *Cephalanthera* et *Neottia*. A l'intérieur de ces genres, il existe des différences entre espèces. Les genres *Cephalanthera* et *Neottia* présentent des tailles de génome semblables.

L'analyse a révélé deux individus triploïdes, l'un pour *Epipactis atrorubens* (station de Saint-François de Sales), l'autre pour *E. rhodanensis* (station de Vertrieu).

Des différences faibles mais significatives de taille de génome sont notées entre stations différentes pour une même espèce.

Les tailles de génome exprimées en longueur de génome haploïde (Tableau 2) indiquent une variation de taille pour le genre *Epipactis* de 11 980 Mpb chez *E. helleborine* var. *minor* à 14 740 Mpb chez *E. kleinii*. Les

variations sont plus faibles pour le genre *Cephalanthera* avec la plus forte valeur chez *C. damasonium* et la plus faible chez *C. rubra*. Dans le genre *Neottia*, les valeurs observées pour *N. nidus-avis* sont intermédiaires entre

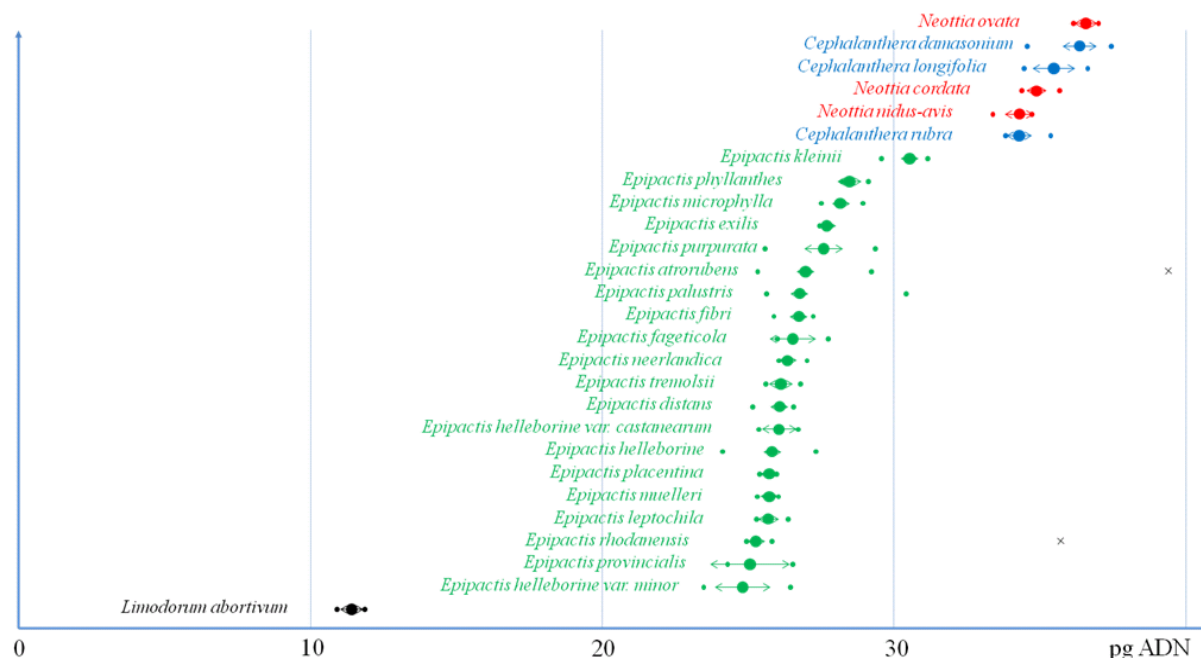


Figure 1. – Tailles de génome des différents taxons analysés classés par valeurs en pg d'ADN par noyau 2C. Les valeurs extrêmes observées sont mentionnées de part et d'autre de la valeur moyenne entourée par son intervalle de confiance calculé avec une probabilité de 95%. Les individus triploïdes observés sont signalés par le symbole x.

Tableau 2. – Taille de génome estimée par cytométrie flux de différents taxons de Neottieae, en millions de paires de bases.

Taxon	Taille de génome haploïde (Mpb) ^a
<i>Cephalanthera damasonium</i>	17 550 ± 280
<i>Cephalanthera longifolia</i>	17 120 ± 352
<i>Cephalanthera rubra</i>	16 540 ± 212
<i>Epipactis atrorubens</i>	13 000 ± 111
<i>Epipactis distans</i>	12 580 ± 101
<i>Epipactis exilis</i>	13 360 ± 19
<i>Epipactis fageticola</i>	12 800 ± 386
<i>Epipactis fibri</i>	12 900 ± 116
<i>Epipactis helleborine</i>	12 450 ± 87
<i>Epipactis helleborine</i> var. <i>castanearum</i>	12 570 ± 285
<i>Epipactis helleborine</i> var. <i>minor</i>	11 980 ± 468

<i>Epipactis kleinii</i>	14 740 ± 82
<i>Epipactis leptochila</i>	12 400 ± 145
<i>Epipactis microphylla</i>	13 580 ± 121
<i>Epipactis muelleri</i>	12 420 ± 68
<i>Epipactis neerlandica</i>	12 720 ± 135
<i>Epipactis palustris</i>	12 920 ± 101
<i>Epipactis phyllanthes</i>	13 750 ± 198
<i>Epipactis placentina</i>	12 420 ± 63
<i>Epipactis provincialis</i>	12 100 ± 671
<i>Epipactis purpurata</i>	13 310 ± 318
<i>Epipactis rhodanensis</i>	12 510 ± 63
<i>Epipactis tremolsii</i>	12 600 ± 188
<i>Limodorum abortivum</i>	5 510 ± 198
<i>Neottia cordata</i>	16 830 ± 169
<i>Neottia nidus-avis</i>	16 550 ± 236
<i>Neottia ovata</i>	17 650 ± 43

a : valeur ± intervalle de confiance calculé avec une probabilité de 95 %

celles des deux autres taxons. Le génome de *Limodorum abortivum* (5 510 Mpb) a une longueur inférieure à la moitié de celui des autres espèces analysées.

Le positionnement des valeurs de taille de génome sur la phylogénie la plus complète disponible des Neottieae ne fait pas apparaître de clade avec des valeurs particulières au sein d'un genre (Figure 2).

DISCUSSION

Taille de génome des Neottieae

Les Neottieae sont incluses dans la sous-famille des *Epipendroideae* qui est celle avec la plus forte variation de taille de génome chez les Orchidaceae (Leitch *et al.*, 2009). Les plus fortes valeurs de cette sous famille sont observées pour les plantes terrestres comme les Neottieae. Les autres sous-familles montrent de grandes tailles de génome, atteignant 55 pg d'ADN par noyau haploïde. Seule, la sous-famille des *Orchioideae* a une taille de génome inférieure à 18 pg d'ADN (Leitch *et al.*, 2009).

Les valeurs disponibles de taille de génome pour les Neottieae sont sensiblement différentes, surtout pour le genre *Limodorum* (Tableau 3). Dans le genre *Cephalanthera*, c'est *C. rubra* qui présente la plus faible valeur pour toutes les études et *C. damasonium* qui a le plus souvent la valeur la plus élevée. Les tailles de génome de la présente étude sont significativement supérieures à celles publiées. Le genre *Epipactis* a fait l'objet de moins d'analyses et seulement une valeur moyenne du genre est disponible, celle-ci est supérieure

à la valeur maximale observée dans le présent travail chez *E. kleinii*.

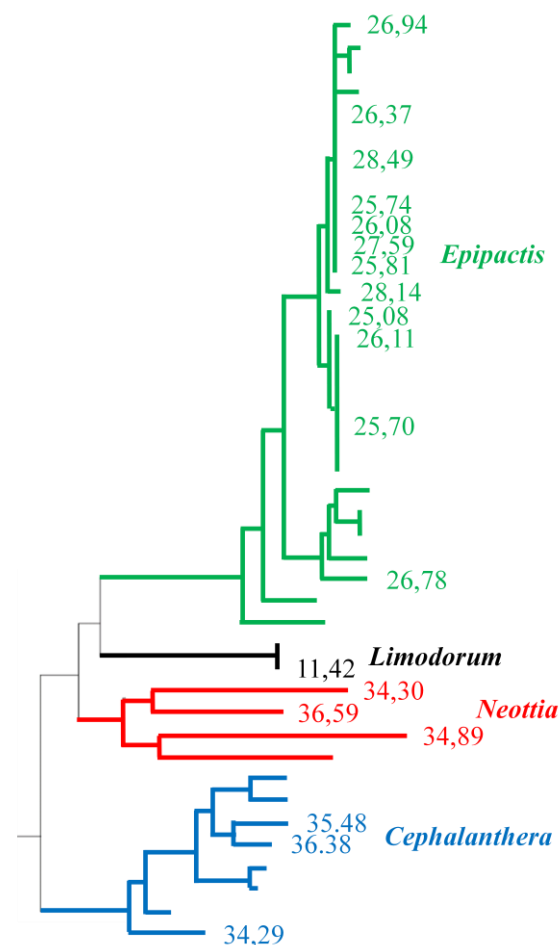


Figure 2. – Relations phylogénétiques entre taxons des Neottieae (d'après Bateman *et al.*, 2005) et valeurs des tailles de génomes (en pg d'ADN par noyau 2C).

Tableau 3. – Comparaison de différentes valeurs de taille de génome publiées (pg d'ADN par noyau haploïde).

Taxon	Présente étude	Base de données Kew	Leitch <i>et al.</i> , 2009	Vesely <i>et al.</i> , 2012
Genre <i>Cephalanthera</i>	17,70		16,6	
<i>C. damasonium</i>	18,19	16,4		17,33
<i>C. longifolia</i>	17,74	16,7		16,35
<i>C. rubra</i>	17,15	15,8		16,07
Genre <i>Epipactis</i>	13,38		19,82	
<i>Limodorum abortivum</i>	5,71			19,76
Genre <i>Neottia</i>	17,63		19,53	
<i>N. nidus-avis</i>	17,15			17,60

Les valeurs moyennes du genre *Neottia* données par (Leitch *et al.*, 2009) sont supérieures à celles observées dans cette étude. Les différences les plus importantes sont pour le genre *Limodorum* représenté par un seul taxon, *L. abortivum* pour lequel la valeur publiée par Vesely *et al.* (2012) est environ quatre fois plus élevée.

Taille de génome et nombres chromosomiques

Chez les Orchidacées, Leitch *et al.* (2009) mettent en évidence une relation positive entre nombre de chromosomes et taille de génome. Ici, cette relation est infirmée pour le genre *Cephalanthera* puisque c'est l'espèce *C. rubra* à $2n=44$ qui a la plus petite taille de génome. *C. damasonium* ($2n=36$) a toutefois un génome plus grand que *C. longifolia* ($2n=32$).

Les nombres chromosomiques varient probablement moins dans le genre *Epipactis* que ce qui est signalé dans la littérature. Les principaux nombres sont de $2n=38$ et $2n=40$, les différences ne sont pas significatives ici.

Considérant les tailles de génome obtenues dans cette étude pour le genre *Limodorum* ($2n=56$), la tendance à l'échelle de la tribu est là encore une relation négative entre taille de génome et nombre de chromosomes puisque les plus grandes tailles de génome des genres *Cephalanthera* et *Neottia* correspondent aux plus petits nombres chromosomiques, *C. rubra* excepté.

Les caryotypes à chromosomes plus nombreux et taille de génome réduite soutiennent des évolutions basées sur des fissions de chromosomes comme le supposent Moscone *et al.* (2007). L'évolution chromosomiques des Neottieae implique probablement différents processus qui en compliquent l'analyse. La présence potentielle de chromosomes B surnuméraires et de gamètes aneuploïdes conduisent à des plantes atypiques. Deux plantes seulement ont été identifiées comme triploïdes et aucun tétraploïde n'a été reconnu dans cette étude mais leur présence ne peut pas être exclue.

Taille de génome et phylogénie

Les données disponibles ne concernent que quatre genres de la tribu. Aucune information n'existe pour les genres *Aphyllorchis* et *Palmorchis* qui est positionné à la base des Neottieae.

Les différentes espèces du genre *Neottia* ont des génomes de taille similaire, ce qui est compatible avec le regroupement des genres *Listera* et *Neottia* basé sur des données moléculaires proposé par Bateman *et al.* (2005) qui a conduit à l'intégration du genre *Listera* dans le genre *Neottia*.

Les phylogénies des Neottieae publiées (Bateman *et al.*, 2005 ; Roy *et al.*, 2009 ; Xiang *et al.*, 2012) présentent une différence sur la position des genres dérivés : *Epipactis* et *Limodorum*, groupe frère du genre *Neottia* pour Bateman *et al.* (2005) et *Limodorum* et *Neottia* groupe frère du genre *Epipactis* pour Xiang *et al.* (2012). La plus forte similitude des génomes (nombres chromosomiques, tailles de génome) entre *Cephalanthera* et *Neottia* d'une part et les tailles de génome réduites pour *Epipactis* et surtout *Limodorum* d'autre part sont plus en faveur de la phylogénie publiée par Bateman *et al.* (2005)

Evolution des Neottieae

Une difficulté pour retracer l'évolution de cette tribu est le changement assez régulier des taxons qui la constituent. Les caractères floraux ont été utilisés par Burns-Balogh *et al.* (1987) pour reconstruire les événements successifs caractérisant les différents genres. La différenciation des genres établie sur ces caractères correspond à la phylogénie publiée par Bateman *et al.* (2005) mais le genre *Palmorchis* en était exclu et un autre genre difficile à classer morphologiquement était inclus par erreur dans cette tribu. C'est aussi le schéma évolutif le plus vraisemblable sur la base des tailles de génomes.

Les modes de reproduction, acquisition à plusieurs reprises de l'autogamie, influencent l'évolution des différents genres de Neottieae avec l'individualisation de nouveaux taxons.

CONCLUSION

La cytométrie en flux appliquée à diverses espèces des Neottieae a conduit à préciser leurs tailles de génome et à conforter un schéma évolutif de la tribu. Cette tribu est caractérisée par une grande taille de génome. Il apparaît des différences notables avec les valeurs déjà publiées, notamment pour le genre *Limodorum*. De nouveaux échantillons devront être étudiés pour expliquer cette situation. Les relations éventuelles avec des caractéristiques écologiques des espèces n'ont pas été abordées

ici. Un échantillonnage plus large de quelques taxons a été mené dans cet objectif et les résultats sont donnés par ailleurs.

Remerciements

Nous remercions très sincèrement la *Société botanique de France* et la *Société française d'Orchidophilie* qui grâce à leur soutien commun apporté aux recherches sur les Orchidacées nous ont permis de conduire ce travail. Nous sommes également très reconnaissants auprès du *Conseil Général de l'Isère* qui a aussi soutenu entre autres les travaux de cytométrie menés sur les échantillons prélevés dans le département de l'Isère. Nous remercions aussi Mickaël Bourge qui par sa contribution au bon fonctionnement de la plateforme Imagif du CNRS à Gif-sur-Yvette a permis cette étude.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans l'aide des orchidophiles de la SFO qui ont guidé les prospections ou même collecté des échantillons, ainsi nous sommes redevables entre autres à Jacques Bry, Sophie Daulmerie, Philippe Durbin, Olivier Gerbaud, Jean-Marc Lewin et Michel Seret pour leur aide précieuse.

Références

- Barone Lumaga M.R., Cozzolino S., Kocyan A., Menale B., Rudall P.J. 2014. Exine micromorphology and ultrastructure in Neottieae (Epidendroideae, Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.*, 300: 505-515.
- Bateman R., Hollingsworth P.M., Squirrell J., Hollingsworth M.L. 2005. Tribe Neottieae. In: *Genera Orchidacearum. Vol. 4. Epidendroideae (Part one)*. Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W. & Rasmussen F.N. (eds.), Oxford University Press, Oxford. pp. 487-495.
- Bernardos S., Amich F., Crespi A. 2003. Karyological and Taxonomical Notes on Three Species of the Genus *Epipactis* (Neottioideae, Orchidaceae) in the Central-Western Iberian Peninsula. *Folia Geobotanica*, 38: 319-331.
- Bournérias M., Prat D. (eds.) 2005. Les orchidées de France, Belgique et Luxembourg. Biotope, Mèze. 504 p.
- Burns-Balogh P., Szlachetko D.L., Dafni A. 1987. Evolution, pollination, and systematics of the tribe Neottieae (Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.*, 156: 91-115.
- Catrice O., Coba de la Peña T., Brown S.C. 2006. Applications en biologie végétale : contraintes, succès, espoirs. In: *La cytométrie en flux*. Ronot X., Grunwald D., Mayol J.F., Boutonnat J. (eds). Tec & Doc - Lavoisier, Paris. pp. 235-253.
- Cavalier-Smith T. 1978. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J. Cell Sci.*, 34: 247-278.
- D'Emerico S., Grunangr P., Scrugli A., Pignone D. 1999. Karyomorphological parameters and C-band distribution suggest phyletic relationships within the subtribe Limodorinae (Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.*, 217:147-161.
- Dressler R.L. 1993. Phylogeny and classification of the Orchid family. Dioscorides Press, Portland, Oregon. 330 p.
- Dusak F., Prat D. (eds.) 2010. Atlas des orchidées de France. Biotope, Mèze et MNHN, Paris. 400 p.
- Giuseppina B. Brullo C., Pulvirenti S., Scrugli A., Terrasi M.C., D'Emerico S. 2010. Advances in chromosomal studies in Neottieae (Orchidaceae): constitutive heterochromatin, chromosomal rearrangements and speciation. *Caryologia*, 63: 184-191.
- Knight C.A., Molinari N.A., Petrov D.A. 2005. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Ann. Bot.*, 95: 177-190.
- Leitch I.J., Bennett M.D. 2007. Genome size and its uses: the impact of flow cytometry. In: *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. Dolezel J., Greilhuber J., Suda J. (eds.), Wiley, Weinheim. pp. 153-176.
- Leitch I.J., Kahandawala I., Suda J., Hanson L., Ingrouille M.J., Chase M.W., Fay M.F. 2009. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Ann. Bot.*, 104: 469-481.
- Lindley J. 1830-1840. The genera and species of orchidaceous plants. Ridgways, London. 553 p.
- Moscone E.A., Samuel R., Schwarzacher T., Schweizer D. Pedrosa-Harand A. 2007. Complex rearrangements are involved in *Cephalanthera* (Orchidaceae)

- chromosome evolution. *Chrom. Res.*, 15: 931-943.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W. & Rasmussen F.N. 2005. *Genera Orchidacearum*. Vol. 4. Epidendroideae (Part one). Oxford University Press, Oxford. 672 p.
- Roy M., Watthana S., Stier A., Richard F., Vessabutr S., Selosse M.A. 2009. Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biology*, 7: 51.
- Selosse M.A., Faccio A., Scappaticci G., Bonfante P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla*, (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microb. Ecol.*, 47: 416-426.
- Vesely P., Bures P., Smarda P., Pavlíček T. 2012. Genome size and DNA base composition of geophytes: the mirror of phenology and ecology? *Ann. Bot.*, 109: 65-75.
- Xiang X.G., Li D.Z., Jin W.T., Zhou H.L., Li J.W., Jin X.H. 2012. Phylogenetic placement of the enigmatic orchid genera *Thaia* and *Tangtsinia*: evidence from molecular and morphological characters. *Taxon*, 61: 45-54.

CAHIERS DE
LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE D'ORCHIDOPHILIE

N°8 – 2014

1^{er} et 2
MARS 2014
16^e Colloque
SFO



BLOIS
Halle aux grains

Orchidées



**Actes du 16^e colloque
sur les Orchidées
de la
Société Française d'Orchidophilie**

*Quel avenir pour les orchidées
dans leur milieu ?*



**1^{er} et 2 mars 2014
Blois, La Halle aux Grains**

Avec le soutien de la Société botanique de France

**Colloque organisé par la Commission Scientifique de la SFO :
Pascal Descourvière, Philippe Feldmann, Alain Gévaudan, Daniel Prat,
Marc-Andre Selosse, Bertrand Schatz, Daniel Tyteca**

Coordination des Actes : Daniel Prat

Affiche du Colloque : Sabrina Jallet

Cahiers de la Société Française d'Orchidophilie, N° 8, Actes du 16^e Colloque sur les orchidées de la Société Française d'Orchidophilie : Quel avenir pour les orchidées dans leur milieu ?

ISSN 0750-0386

© SFO, Paris, 2014

Certificat d'inscription à la commission paritaire N° 55828

ISBN 978-2-905734-18-1

Actes du 16^e colloque sur les Orchidées de la Société Française d'Orchidophilie, SFO, Paris, 2014, 168 p.

**Société Française d'Orchidophilie
17 Quai de la Seine, 75019 Paris**

Publications de la Société Française d'Orchidophilie

L'Orchidophile

200 fascicules publiés depuis 1970

4 fascicules par an

Cahiers de la Société Française d'Orchidophilie

N° 1 (1993) : *Synopsis des orchidées européennes*, par Pierre Quentin

N° 2 (1995) : *Synopsis des orchidées européennes, deuxième édition*, par Pierre Quentin

N° 3 (1996) : *Actes du 13^{ème} colloque de la SFO, Grenoble, 29 juin – 2 juillet 1995*

N° 4 (1999) : *Compte-rendu des premières journées rencontres orchidophiles Rhône-Alpes, Lyon, 30 mai-1er juin 1998*

N° 5 (1999) : *Les hybrides des genres Nigritella et/ou Pseudorchis*, par O. Gerbaud et W. Schmid (coédition SFO-AHO)

N° 6 (2000) : *Actes du 14^e colloque de la SFO, Paris, 20-21 novembre 1999*

N° 7 (2010) : *Actes du 15^e colloque sur les orchidées de la Société Française d'Orchidophilie, Montpellier, 30 mai - 1er juin 2010*

N° 8 (2014) : *Actes du 16^e colloque sur les orchidées de la Société Française d'Orchidophilie, Quel avenir pour les orchidées dans leur milieu ? Blois, 1-2 mars 2014*

Cartographies

18 cartographies départementales publiées en fascicules supplémentaires à l'Orchidophile

Plus de 15 autres cartographies départementales ou régionales publiées ou co-publiées

Ouvrages

Divers ouvrages sur les orchidées tempérées et tropicales, de France, d'Europe et du monde, dont :

Les orchidées de France, Belgique et Luxembourg. 2005. (M. Bournérias et D. Prat, coordinateurs)

Atlas des orchidées de France. 2010. (F. Dusak et D. Prat, coordinateurs)

Sabots de Vénus, orchidées fascinantes. 2013. (Collectif SFO, supplément à l'Orchidophile)

La Société Française d'Orchidophilie, fondée en 1969, a pour objectifs majeurs :

- d'étudier la répartition et l'écologie des Orchidées en France et dans d'autres pays ;
- de protéger les espèces sauvages les plus menacées ;
- de favoriser la culture des espèces horticoles ;
- d'encourager les études sur la biologie des orchidées.

Ces objectifs sont atteints grâce :

- à des réunions et colloques ;
- à des voyages d'étude ;
- au réseau de cartographes ;
- aux activités régionales menées dans les associations locales affiliées ;
- aux publications (bulletin, cartographies, ouvrages).

The "Société Française d'Orchidophilie" (French Orchid Society), formed in 1969, aims the main following activities:

- studying orchid distribution and ecology in France and everywhere else;
- protecting most endangered wild species;
- promoting cultivation of horticultural species;
- encouraging studies on orchid biology.

These goals are reached through:

- meetings and symposiums;
- field trips;
- network of cartographers;
- local activities of regional affiliated associations;
- publications (bulletin, cartographies, books).