

# Origine du sympatrisme des cytotypes du *Ranunculus auricomus* L. s.l. : le cas de la population à Mauensee (canton de Lucerne, Suisse)

Françoise Vuillemin, Neuchâtel

Manuscrit reçu le 15 novembre 1991

## Summary

In *Ranunculus auricomus* L. s.l., 3 different cytotypes (*R. cassubicifolius* Koch  $2n = 16$  and *R. auricomus* L.  $2n = 24$  and  $2n = 32$ ) grow in sympatry in Mauensee. Experimental crosses between diploid *Ranunculus cassubicifolius* Koch and tetraploid *R. auricomus* L. s.l. were made in order to test the probable origin of the triploid ( $2n = 24$ ).

The offspring of the tetraploid, when taken as female parent, was only maternal, tetraploid (apomixis). The reciprocal cross (*R. cassubicifolius* diploid, female  $\times$  *R. auricomus* tetraploid, male) produced 3 diploid individuals and 4 tetraploid ones, of which one was hypertetraploid ( $2n = 33$ ). Their possible formation is discussed. Triploids were never obtained.

## Introduction

Le complexe polyploïde et pseudogame compris sous le binôme *Ranunculus auricomus* L. s.l. a fait l'objet de nombreuses études (pour une synthèse bibliographique cf. en particulier VUILLEMIN 1989, 1990). 7 valences euploïdes ( $2\times$ ,  $3\times$ ,  $4\times$ ,  $5\times$ ,  $6\times$ ,  $7\times$ ,  $8\times$ ) et divers individus ou sous-populations aneuploïdes ont été mis en évidence en Europe. Les populations suisses n'échappent pas au polymorphisme, puisque tous les nombres chromosomiques euploïdes ont été observés, à l'exception du cytotype heptaploïde.

Dans les populations naturelles, la part du polymorphisme cytologique due à l'hybridation n'a pas été établie. Elle paraît importante à l'échelle de l'Europe si l'on considère la large répartition des valences euploïdes impaires. Quelques hybrides expérimentaux réalisés par IZMAILOW (1970) et RUTISHAUSER (1960) démontrent que plusieurs croisements impliquant des cytotypes différents sont fertiles, au moins partiellement.

En Suisse, la découverte près du Mauensee (VUILLEMIN 1990) d'une population mixte, associant des individus diploïdes (*R. cassubicifolius* Koch), triploïdes et tétraploïdes (*R. auricomus* L. s.l.) laissait penser que la valence impaire triploïde résultait d'une hybridation entre diploïde et tétraploïde. L'hypothèse devait cependant être nuancée à la lumière d'une autre observation, réalisée sur une population

jurassienne, où les triploïdes étaient présents en l'absence du parent diploïde présumé (VUILLEMIN 1989).

A notre connaissance, seul IZMAILOW (1970) et RUTISHAUSER (1960) ont réalisé des hybrides expérimentaux en utilisant des parents issus de populations naturelles du *R. auricomus* s.l. Dans le programme d'hybridation d'IZMAILOW (1970), les parents étaient tous polyplloïdes. Dans le deuxième cas, qui nous concerne plus directement, RUTISHAUSER (1960) a effectué le croisement *R. cassubicifolius* Koch (diploïde) et *R. auricomus* L. (tétraploïde) dont il a obtenu 6 hybrides triploïdes. A noter que seule l'origine de la plante-mère diploïde (*R. cassubicifolius* Koch, Aesch LU) était précisée. Rien n'indique donc que les deux cytotypes étaient sympatriques. A partir de ces 6 hybrides triploïdes, NOGLER (1971–1986) a produit un grand nombre d'hybrides (hybrides BII et BIII selon la terminologie de RUTISHAUSER 1948), par rétrocroisement avec les 2 parents.

La responsabilité des hybridations et des rétrocroisements dans la variabilité de la valence chromosomique est donc démontrée. Il nous restait à confirmer leurs implications dans le sympatrisme stationnel des races diploïdes, triploïdes et tétraploïdes.

### Matériel et méthodes

Les plantes diploïdes et tétraploïdes utilisées pour les croisements ont été prélevées à l'est du Mauensee, où elles croissaient en sympatrie avec des individus triploïdes.

Au printemps 1988, les boutons floraux ont été castrés avant l'anthèse et pollinisés quelques jours plus tard. Les fleurs ont ensuite été encapuchonnées pour éviter toute pollinisation incontrôlée. A maturité complète, les akènes ont été récoltés et triés en distinguant les fruits bien conformés, renflés et considérés comme fruits viables, des fruits plats, apparemment dépourvus d'albumen. Les fruits viables ont été semés peu après la récolte (juin 1988). La fertilité carpellaire est estimée en rapportant le nombre de carpelles viables à l'ensemble des carpelles récoltés.

Après la germination, au printemps 1989, chaque plantule a été rempotée séparément et, peu après, les racines ont été fixées dans un mélange alcool-acide acétique glacial 3:1, après un traitement de 2 h 15 par une solution saturée d' $\alpha$ -monobromonaphtalène. L'observation des mitoses a été réalisée par écrasement entre lame et lamelle après coloration au carmin acétique.

### Résultats et discussions

Les résultats des croisements sont figurés dans le tableau 1. Le taux de fertilité carpellaire est particulièrement bas, soit 27,6% lorsque *R. cassubicifolius* Koch est pris comme parent femelle et 10,5% lorsque le parent femelle appartient au cytotype tétraploïde. En fécondation libre, le taux de fertilité carpellaire est supérieur. Il atteint près de 78% en moyenne chez *R. cassubicifolius* et 47% chez les tétraploïdes du *R. auricomus*. Il nous est difficile actuellement d'attribuer la proportion importante de carpelles stériles à un facteur interne, à savoir le degré élevé d'incompatibilité gamétophytique – sporophytique entre parents (hypothèse la plus probable), ou à un facteur externe tel que le traumatisme provoqué par la castration.

RUTISHAUSER (1954) obtient 18,2% de germination en moyenne, tout croisement confondu.

Tableau 1: Résultats des croisements

parent ♀	parent ♂	nombres de fleurs pollinisées	nombres de graines par fleurs	nombres d'akènes	germination printemps 1989	F1 2n (individus)
Ranunculus cassubicifolius 2n = 16	Ranunculus auricomus 2n = 32	12	9,4	113 (27,6%)	7 (6,2%)	16 (3) 32 (3) 33 (1)
Ranunculus auricomus 2n = 32	Ranunculus cassubicifolius 2n = 16	24	3,2	77 (10,5%)	38 (50%)	32 (36)

*Ranunculus auricomus* L. s.l. tétraploïde ♀ × *R. cassubicifolius* Koch diploïde ♂

Nous avons obtenu 77 graines dont 38 ont germé. Les 36 individus qui ont fait l'objet d'un contrôle cytologique se sont révélés tétraploïdes. Ce résultat était attendu, car le même croisement effectué par RUTISHAUSER (1960) n'a produit qu'une descendance maternelle (2 n = 32), engendrée par apomixie.

*Ranunculus cassubicifolius* Koch diploïde ♀ × *R. auricomus* L. s.l. tétraploïde ♂

Dans le croisement impliquant des cytotypes différents, les meilleurs résultats (souvent même les seuls) sont obtenus lorsque l'individu offrant la valence la plus élevée est pris comme parent femelle. L'équilibre caryologique de l'albumen est en cause. Le rapport du nombre de génomes d'origine maternel au nombre de génomes paternels devrait être égal à 2 dans l'albumen (JOHNSTON et al. 1980).

Compte tenu du sens du croisement, le parent femelle étant diploïde, la production d'akènes a été bonne. En revanche, sur les 113 akènes semés, seuls 7 ont germé, Le faible taux de germination ne paraît pas imputable à un défaut de l'albumen car les akènes mis à germer avaient l'aspect et la consistance de fruits mûrs et normaux.

Les valences chromosomiques des plantules se sont révélées inattendues. Trois individus étaient diploïdes et 4 tétraploïdes, dont 1 hypertétraploïde à 2 n = 33. Contre toute attente et contrairement aux résultats de RUTISHAUSER (1960) aucun triploïde n'a été produit.

Dans les croisements impliquant les mêmes parents, RUTISHAUSER (1954) a également obtenu un individu diploïde, seule germination de 66 graines. Après avoir écarté l'hypothèse d'un développement aposporique, il admet une autofécondation accidentelle. A l'origine des 3 individus diploïdes, nous retiendrons aussi comme probable une autopollinisation accidentelle. Pourtant, au vu de l'ensemble de nos résultats, une autre explication n'est pas exclue. En effet, alors que nous attendions une majorité d'hybrides triploïdes, les 4 individus apparemment hybrides sont tous tétraploïdes (2n = 32) et hypertétraploïde (2n = 33). Trois processus au moins peuvent conduire à une telle valence:

– Le parent mâle tétraploïde produit des gamètes incomplètement réduits, triploïde. Le seul indice appuyant cette hypothèse est l'existence d'un individu aneuploïde. Les irrégularités méiotiques chez le tétraploïde conduiraient à des gamètes qui ne seraient

pas tous euploïdes. L'hypothèse reste en partie gratuite, car HÄFLIGER (1943) et NOGLER (1982) affirment que les gamètes mâles non réduits sont rares chez les polyplloïdes. En revanche, NOGLER (op. cit.) obtient chez un triploïde des gamètes haploïdes et diploïdes dans une proportion de 2 pour 1. La réduction incomplète, démontrée chez le triploïde semble pourtant démentie par les faits chez le tétraploïde. NOGLER n'a jamais observé un tel phénomène parmi les nombreux hybrides réalisés.

– Les hybrides tétraploïdes seraient issus d'embryons androgénétiques, le noyau spermique non réduit se développant sans fusionner avec le gamète femelle. L'androgenèse de gamètes réduits est évoquée par NOGLER (1986) à l'origine de certains dihaploïdes. Le phénomène n'est pas exclu mais il exige la conjonction de 2 événements rares, la non-réduction du gamète mâle et son développement androgénétique. Sa répétition paraît donc improbable, à moins que les événements ne soient liés. Le cas échéant, il serait surprenant qu'il n'ait jamais été observé.

– Les hybrides tétraploïdes associeraient deux génomes de chacun des parents, soit un gamète femelle non réduit et un gamète réduit (diploïde ou hyperdiploïde). NOGLER (1982) évoque cette hypothèse pour expliquer l'apparition d'un individu pentaploïde dans la descendance d'un croisement entre le parent femelle *R. cassubicifolius* diploïde et un individu triploïde.

NOGLER (1982) suppose que la non-réduction des gamètes femelles est peut-être moins rare qu'il n'y paraît, mais il ajoute aussitôt que la formation de sacs embryonnaires non réduits chez le *R. cassubicifolius* diploïde est «due to failure of meiosis in certain megaspore mother cells, but certainly not from aposporous initials» (p. 18). La fréquence relative du phénomène, dans nos croisements en particulier, tiendrait peut-être au rapport des génomes parentaux dans l'albumen. En effet, seuls les albumens formés dans des sacs embryonnaires non réduits offriraient un équilibre caryologique de 2, considérés comme viables par JOHNSTON et al. (1980). Cet équilibre n'est pourtant pas respecté chez les triploïdes rapportés par RUTISHAUSER (1954).

## Conclusion

Les premiers résultats de nos croisements n'apportent aucun éclaircissement sur l'origine du sympatrisme des cytotypes diploïdes, triploïdes et tétraploïdes au Mauensee. Au contraire, ils posent de nouvelles questions.

L'absence de triploïdes dans la descendance du croisement entre *R. cassubicifolius*, diploïde, et *R. auricomus* s.l., tétraploïde, est inattendue. Dans une expérience impliquant les mêmes valences chromosomiques, RUTISHAUSER (1954) avait obtenu six individus triploïdes. Reconnaissons cependant que nos croisements n'intéressent que deux individus parentaux. Nos résultats reflètent peut-être plus le comportement particulier des individus utilisés qu'un phénomène général, à l'échelle de la population du Mauensee. Il n'est cependant pas inintéressant de rappeler que dans le Jura les individus triploïdes ne coexistent pas avec les diploïdes (VUILLEMIN 1989). Si leur caractère hybridogène reste difficilement contestable, leur origine pourrait remonter à la mise en place du complexe dans son aire actuelle, à la suite des glaciations. La présence des triploïdes parmi les cytotypes diploïdes et tétraploïdes serait alors fortuite et ne révélerait en tout cas aucun lien direct (contemporain) de parenté entre les trois cytotypes présents au Mauensee. Le sympatrisme serait secondaire et ne

résulterait pas d'une hybridation in situ des cytotypes diploïde et tétraploïde actuellement présents dans la station.

Toutes les hypothèses restent encore ouvertes pour expliquer l'apparition d'individus tétraploïdes dans la descendance du croisement d'un individu femelle diploïde par un individu mâle tétraploïde. Un nouveau programme d'hybridations est en cours. Les individus parentaux et leur descendance seront soumis à une analyse enzymologique afin d'assurer en particulier le caractère uniparental ou biparental du génome nucléaire. Sous ce même angle, le polymorphisme enzymatique des différents cytotypes du Mauensee sera étudié afin de mieux comprendre la structure de la population et d'établir les liens éventuels de filiation entre individus diploïdes, triploïdes et tétraploïdes.

Nous tenons vivement à remercier M. le professeur P h. K ü p f e r pour ses conseils et son aide lors de la rédaction de notre manuscrit. Nous remercions également Monsieur E. J e a n l o z, jardinier-chef et responsable des cultures expérimentales, les assistants et collaborateurs du Laboratoire de Phanérogamie qui, à titre divers, ont facilité notre travail.

### Résumé

Chez *Ranunculus auricomus* L. s.l., 3 cytotypes différents (*R. cassubicifolius* Koch  $2n = 16$  et *R. auricomus* L.  $2n = 24$  et  $2n = 32$ ) croissent en sympatrie au Mauensee. Des croisements réciproques entre *R. cassubicifolius* diploïde et *R. auricomus* tétraploïde ont été effectués pour tenter de démontrer l'origine hybridogène, récente, des individus triploïdes.

Lorsque *R. auricomus* est pris comme parent femelle, la descendance était exclusivement maternelle, tétraploïde, engendrée par aposporie. Le croisement réciproque (*R. cassubicifolius* diploïde, femelle  $\times$  *R. auricomus* tétraploïde, mâle) a produit 3 individus diploïdes et 3 individus tétraploïdes ( $2n = 32$ ) et un individu hypertétraploïde ( $2n = 33$ ). Leur origine est discutée. Aucun triploïde n'a été obtenu.

### Zusammenfassung

Möglicher Ursprung zum Sympatrismus von verschiedenen Chromosomensippen der Sammelart *Ranunculus auricomus* L. s.l.: das Beispiel einer Mischpopulation bei Mauensee (Kanton Luzern, Schweiz)

*Ranunculus auricomus* L. s.l. weist bei Mauensee mit *R. cassubicifolius* Koch ( $2n = 16$ ) und *R. auricomus* L. ( $2n = 24$  und  $32$ ) nebeneinander drei verschiedene Chromosomenrassen auf.

Um den vermuteten hybridogenen Ursprung der triploiden Sippe ( $2n = 24$ ) zu belegen, wurden *R. cassubicifolius* diploid und *R. auricomus* tetraploid gekreuzt. Die Nachkommenschaft der tetraploiden Mutterelter war ausschliesslich tetraploid und matroclin (Apomixis). Aus dem entgegengesetzten Kreuzungsversuch (*R. cassubicifolius* diploid, weiblich und *R. auricomus* tetraploid, männlich) gingen 3 diploide, 3 tetraploide und mit  $2n = 33$  ein hypertetraploider Nachkomme hervor. Die Verschiedenheit der F1 wird besprochen.

## Bibliographie

- HÄFLIGER, E., 1943: Zytologisch-embryologische Untersuchungen pseudogamer Ranunkeln der *Auricomus*-Gruppe. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 53: 317–382.
- IZMAILOW, R., 1970: Cytogenetic studies in the apomictic species *Ranunculus cassubicus* L. Acta Biol. Cracov., Ser. Bot. 13: 37–50.
- JOHNSTON, S.A., T.P.M. DEN NIJS, S.J. PELOQUIN & R.E. HANNEMAN, jr., 1980: The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. Ther. Appl. Genet. 57: 5–9.
- NOGLER, G.A., 1971: Genetik der Aposporie bei *Ranunculus auricomus* s. l. W. Koch I. Embryologie. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 81: 139–179.
- NOGLER, G.A., 1972: Genetik der Aposporie bei *Ranunculus auricomus* s. l. W. Koch II. Endospermzytologie. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 82: 54–63.
- NOGLER, G.A., 1973a: Genetik der Aposporie bei *Ranunculus auricomus* III. F<sub>2</sub>-Rückkreuzungsbastarde. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 83: 295–305.
- NOGLER, G.A., 1973b: Neues zur Genetik der Aposporie bei *Ranunculus auricomus*. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. 153: 86–89.
- NOGLER, G.A., 1975: Genetics of apospory in *Ranunculus auricomus* IV. Embryology of F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub> backcross offspring. Phytomorphology 25: 485–490.
- NOGLER, G.A., 1982: How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. Bot. Helv. 92/1: 13–22.
- NOGLER, G.A., 1984: Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus* V. Conclusion. Bot. Helv. 94: 411–422.
- NOGLER, G.A., 1986: Old and new aspects of gametophytic apomixis. IOPB Newsletter 7: 3–5.
- RUTISHAUSER, A., 1948: Pseudogamie und Polymorphie in der Gattung *Potentilla*. Arch. J.Klaus-Stift. f. Vererb'forschg. XXIII, 267–424.
- RUTISHAUSER, A., 1954: Die Entwicklungserregung des Endosperms bei pseudogamen *Ranunculus*-Arten. Mitt. Naturf. Ges. Schaffhausen 25: 1–45.
- RUTISHAUSER, A., 1960: Untersuchung über die Evolution pseudogamer Arten. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 70: 113–125.
- VUILLEMIN, F., 1989: Observations cytologiques et morphologiques sur *Ranunculus auricomus* L. s. l. dans le canton de Neuchâtel. Bull. Soc. Neuchâtel. Sci. Nat. 112: 19–28.
- VUILLEMIN, F., 1990: Index des nombres chromosomiques des Spermatophytes de la Suisse: IV. Distribution des cytodèmes du *Ranunculus auricomus* L. s.l. Bot. Helv. 100/2: 207–223.

### Adresse de l'auteur:

Françoise Vuillemin, Laboratoire de Phanérogamie de l'Institut de Botanique, Université de Neuchâtel, Chantemerle 22, CH-2000 Neuchâtel.