



Diversité génétique et délimitation d'espèces par des approches conjointes de barcoding et de génétique des populations : application à l'identification d'espèces d'algues marines nouvellement cultivées

Alexandre Geoffroy

► To cite this version:

Alexandre Geoffroy. Diversité génétique et délimitation d'espèces par des approches conjointes de barcoding et de génétique des populations : application à l'identification d'espèces d'algues marines nouvellement cultivées. Génétique. Paris 6, 2012. Français. NNT : . tel-01115945

HAL Id: tel-01115945

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01115945>

Submitted on 12 Feb 2015

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Diversité du Vivant

Présentée par

M Alexandre GEOFFROY

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Diversité génétique et délimitation d'espèces par des
approches conjointes de barcoding et de génétique des
populations : application à l'identification d'espèces
d'algues marines nouvellement cultivées**

soutenue le 12 Novembre 2012, devant le jury composé de :

M. Olivier DE CLERCK, Professeur, Université de Gand, Belgique	(Rapporteur)
Mme Valérie STIGER-POUVREAU, Maître de conférences, UBO, Brest	(Rapporteur)
M. Frédéric MINEUR, ATER, MIO, Marseille	(Examineur)
M. Bernard KLOAREG, Professeur, UPMC, Roscoff	(Examineur)
Mme Line LE GALL, Maître de conférences, MNHN, Paris	(Co-directrice de thèse)
M. Christophe DESTOMBE, Professeur, UPMC, Roscoff	(Co-directeur de thèse)

Remerciements

« La vie c'est comme une boîte de chocolats, on sait jamais sur quoi on va tomber » (Forrest Gump). Finalement ça résume bien mon aventure dans cette thèse. L'arrivée en Bretagne (en venant de Montpellier) un 11 Novembre après 1200 km et un accueil digne d'un mois d'hiver. Franchement, la Bretagne c'était pour loin moi (ça s'est confirmé) et les algues, un truc qui t'embête quand tu veux nager tranquille mais les choses ont bien changé depuis le début de cette thèse.

Alors j'aimerais en tout premier lieu remercier mes deux encadrants, Christophe et Line, d'être « tombés » sur moi et de m'avoir fait confiance pour ce projet de thèse. Je n'oublierai pas les nombreuses histoires ou anecdotes de Christophe surtout sur les trajets pour aller à Quiberon, Concarneau, Plouguerneu...elles étaient variées, des combats de coqs à la façon de couler les bateaux sur les côtes bretonnes.

Merci également à mon équipe BEDIM où le nombre de gens croisé est impressionnant, nombre qui est sûrement proportionnel au nombre de gâteaux dégustés le vendredi. Un merci particulier à Steph pour le coup de main sur les usats et les nombreuses discussions pour mettre en place les PCR. Merci également à Lucia pour les nombreux conseils sur les logiciels. Merci à Amandine pour les quelques plaques d'extractions. Merci également aux filles d'à côté (team Divco, d'ailleurs y a jamais eu de mecs) pour m'accueillir souvent surtout quand je veux râler. Une pensée pour Sab, le premier contact au labo qui rédigeait quand je suis arrivé. Je n'oublierai pas non plus ma super CSP et son acolyte qui sont toujours passés les soirs de rédaction pour voir si je n'avais pas besoin de quelque chose !!

Je remercierais également les « industriels » comme on dit, car sans eux pas de projet mais surtout pour leur enthousiasme envers mes résultats même si je pense que je n'étais pas toujours très clair. Un bon exercice que d'adapter des résultats de recherches fondamentales aux attentes pratiques des industriels. Merci pour la disponibilité, les échantillons, l'attente et de m'avoir fait découvrir un monde inconnu. Merci à Patrick Podeur pour le temps passé sur l'expérimentation de dispersion qui me tenait temps à cœur et que je n'ai pas vraiment pu mener au bout !!

Merci à l'équipe « d'en face » pour les nombreux cafés que je suis venu boire surtout pendant les journées entières d'observations des algues.

Merci au bureau d'en bas (Léna, Mat, Jo, Mahdi, So) dans lequel j'ai passé de très bon moments. Les meilleurs thés du coin et toujours envie d'aller en reprendre un petit !

Cette thèse m'a aussi fait voyager pour les congrès ou missions d'échantillonnage d'algues. Souvenirs inoubliables avec Fanny, Laure et Jessie sur les routes de l'Ecosse avec les vaches à cheveux ; avec Choupinette en Allemagne et les fins de soirées ; avec Stacy, Steph et Lucia (et Licinia) sur les routes d'Espagne et du Portugal, intensif mais que du bonheur !!!

Merci à la team Pok, sans qui les longs week end d'hiver auraient été beaucoup plus difficiles à passer. Un mélange de l'Espagne, de la Bretagne et de la Bourgogne pour des soirées à la découverte des desserts les plus fous !

Merci à tous ceux croisés dans les murs de la station ou en dehors pour un moment, un instant, une discussion, une pause... Un merci spécial pour ma petite Brigitte, toujours prête à se décarcasser pour les nombreux envois de séquençage, d'algues ou autres. Une pensée pour Moustache qui m'a souvent nourri. Merci à mon fournisseur officiel de Cod. Merci à Pium, Baloo pour ces petits ronflements.

Une pensée pour les non-roscovites qui m'ont toujours encouragé, soutenu même si on ne se voyait pas autant qu'on le voulait. Les amis de Dijon, de Montpellier et tous les autres qui se sont disséminés depuis.

Merci aussi à ceux qui ont toujours été là sans faille depuis toutes ces années. Toujours intéressés par ce que je leur racontais et toujours compréhensifs dans le peu de temps que j'avais pour eux. Je terminerai par remercier celle qui m'accompagne depuis le master et qui a toujours été au rendez-vous dans les bons mais surtout dans les moins bons moments, et sans qui la route aurait été plus difficile.

La vie c'est comme une boîte de chocolats, on sait jamais
sur quoi on va tomber.

(Forrest Gump)

Table des matières

Introduction générale	5
I. Contexte général de la thèse	7
A. Un projet entre recherche appliquée et recherche fondamentale	7
B. Les attentes des acteurs de la filière	9
II. Le concept d'espèce chez les algues	9
A. Les concepts d'espèce	9
B. La notion d'espèce chez les algues	11
III. La délimitation d'espèces par une approche de type « ADN barcoding »	12
A. Le barcoding	12
B. Le barcode chez les algues	14
IV. Structure du document	17
 Chapitre 1. Obtention de signatures ADN pour la traçabilité des algues nouvellement exploitées	 19
I. Introduction	21
II. Matériels et Méthodes	23
A. Les espèces sélectionnées	23
1. Les algues rouges	24
1. a. <i>Calliblepharis jubata</i> (Goodenough & Woodward) Kützing	24
1. b. <i>Polysiphonia elongata</i> (Hudson) Sprengel	25
2. Les algues brunes	30
2. a. <i>Bifurcaria bifurcata</i> R.Ross	30
2. b. <i>Pylaiella littoralis</i> (Linnaeus) Kjellman	30
3. L'algue verte	31
2. a. <i>Cladophora rupestris</i> (Linnaeus) Kützing	31

B. L'échantillonnage.....	32
C. L'approche moléculaire.....	35
D. RFLP.....	37
III. Résultats.....	37
IV. Discussion.....	43
Chapitre 2. Mise en évidence d'espèces cryptiques chez <i>Pylaiella littoralis</i>.....	47
I. Contexte de l'étude et principaux résultats.....	49
II. Article 1: « Unraveling sibling species within <i>Pylaiella littoralis</i> (Ectocarpales, Pheophyceae) using phylogenetic, ecological and biological evidences ».....	51
Chapitre 3. Mise en évidence d'une introduction cryptique, le cas de <i>Polysiphonia morrowii</i>.....	87
I. Contexte de l'étude et principaux résultats.....	91
II. Article 2: « Cryptic introduction of the red alga <i>Polysiphonia morrowii</i> Harvey (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in the North Atlantic Ocean highlighted by a DNA barcoding approach ».....	95
Chapitre 4 : Utilisation de marqueurs moléculaires pour inférer un scénario d'introduction.....	105
I. Contexte de l'étude et principaux résultats.....	109
II. Article 3: « Genetic diversity of the cryptic introduced species <i>Polysiphonia morrowii</i> (Ceramiales, Rhodophyta): evidence for multiple introductions ».....	113
Conclusion générale.....	145
Bibliographie.....	153
Annexes.....	169

Introduction générale

Introduction générale

I. Contexte général de la thèse

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet AQUACTIF (financée par le ministère de l'Industrie et par les collectivités locales). Ce projet (débuté en février 2009 et terminé juin 2012) visait à identifier de nouvelles espèces algues cultivables dans une démarche de contrôle qualité afin de produire des extraits cosmétiques parfaitement définis quant à leur efficacité et innocuité. Mon objectif était plus particulièrement d'appliquer des méthodes de type « barcode » pour identifier et caractériser génétiquement ces algues, comme gage de traçabilité et de sécurité quant à la qualité de la matière première employée.

Le projet AQUACTIF est interdisciplinaire, il a été labellisé par le pôle Mer Bretagne et regroupe 3 entreprises : la société C-WEED AQUACULTURE impliquée dans la culture d'algues, la société BIOCEAN impliquée dans l'exploitation des populations naturelles et la culture d'algues et la société AGRIMER (SAS) qui intègre les activités de récolte, de transformation et d'application (produits pour la thalassothérapie et produits de cosmétique). C'est dans ce contexte que j'ai mis au point et que j'ai utilisé des marqueurs moléculaires (phylogénétiques et populationnels) afin d'identifier les espèces et de caractériser les populations pour répondre aux attentes des acteurs de la filière algue en Bretagne. Les techniques et les outils mis au point m'ont permis par ailleurs de valider les approches taxonomiques antérieures, basées essentiellement sur la morphologie, mais également de mettre en évidence la présence d'une espèce cryptique et d'une espèce introduite sur les côtes de Bretagne. Plus globalement, les résultats obtenus ont permis de mieux appréhender la biodiversité intra- et péri-spécifique de certains genres sur les côtes Bretonnes.

A. Un projet entre recherche appliquée et recherche fondamentale

Depuis les années 1980, les algues sont utilisées dans l'élaboration de produits cosmétiques sous forme d'extraits, de masque, de bain et d'enveloppement (Winberg 2011). Ces dernières années, sous la dénomination de « cosmétique bleue » ce domaine a redoublé de créativité pour valoriser les richesses algales et il fait partie aujourd'hui des activités emblématiques de Bretagne. La valorisation des molécules actives issues des algues assure une grande part des 4000 emplois du secteur Breton de la cosmétique (©Centre d'Etude et de Valorisation des

Algues, CEVA, 2010). La compilation de données sur l'utilisation des algues par Zemke-White et Ohno (1999) montre que plus de 200 espèces d'algues sont cultivées dans le monde parmi lesquelles on dénombre 32 espèces de Chlorophyta, 125 de Rhodophyta et 64 de Phaeophyceae. Ces auteurs expliquent cependant que ces chiffres doivent être sous-estimés car les informations transmises par les cultivateurs correspondent le plus souvent au nom vernaculaire ou au nom d'espèce le plus représentatif du genre, mais non à une liste détaillée d'espèces. Par ailleurs, il est intéressant de noter que seul 52% de la biomasse algale utilisée dans l'industrie provient de l'algoculture et que seulement trois pays se partagent 90% de cette production, c'est-à-dire la Chine, la Corée et le Japon (Tableau 1). En ce qui concerne, les 48% restant, la biomasse exploitée provient des populations naturelles.

Tableau 1 : Production d'algues (poids frais en tonnes) dans trois régions d'Asie et quelques exemples d'autres pays (Lüning et Pang 2003).

	Algues brunes	Algues rouges	Algues vertes
Production mondiale	5987490	1974110	71779
Chine	4474090	426733	47
Japon	231443	413057	313
Corée	270717	208610	6447
Philippines	–	617715	3538
USA	7955	81	–
Norvège	17892	–	–
France	6939	2492	119
Espagne	28	14790	–
Portugal	–	1949	–

Kain et Dawes (1987) remarquaient cependant que les ressources algales de l'Atlantique Nord restaient encore largement inexploitées, même si elles étaient soumises à des pressions anthropiques de plus en plus importantes (pollution, réchauffement climatique, etc..). De part, sa diversité spécifique (et génétique) la Bretagne est considérée comme un « hot-spot » de biodiversité algale (Kerswell 2006). En effet, la région de Roscoff, par exemple, présente un nombre d'espèces d'algues tout à fait remarquable (Feldmann 1954) et constitue donc un facteur essentiel pour l'essor et la diversification des activités ayant trait à l'exploitation et à la culture des algues.

Le projet AQUACTIFS avait pour but de valoriser cette biodiversité tout en s'affranchissant de l'exploitation intensive des populations naturelles comme elle est encore pratiquée actuellement, en favorisant le développement et la diversification de la culture d'algue. Le

projet « Cultiver et génotyper de nouvelles espèces d'algues pour la cosmétique bleue » est le fruit de la collaboration entre deux entreprises de culture et d'exploitation d'algues, une entreprise de transformation et un laboratoire de recherche CNRS/UPMC.

B. Les attentes des acteurs de la filière

Pour les acteurs de la filière algue, le projet avait pour finalité de démontrer la faisabilité technique et économique de la culture de nouvelles espèces d'algues en Bretagne pour des applications cosmétiques et d'obtenir des algues parfaitement identifiées (« certificats d'espèces », teneur en composés actifs garantie, traçabilité, innocuité cosmétique).

Pour concurrencer les algues d'importation, la filière algue de Bretagne doit se démarquer par la commercialisation de matières premières locales de qualité homogène (Moretti et al. 2003). En effet, assurer la qualité et la régularité des récoltes par la culture (Buck et al. 2008) est un des moyens pour se démarquer des algues d'importation et ainsi, de s'inscrire dans un contexte de développement durable, tout en préservant le milieu naturel. Dans ce contexte, les espèces d'intérêt économique potentiellement cultivables ont été caractérisées génétiquement, en développant des méthodes rapides de traçabilité (comme proposé par Moretti et al. 2003) pouvant être utilisées directement par les acteurs de la filière afin d'évaluer les ressources génétiques des espèces cibles (identifier les souches cultivées).

II. Le concept d'espèce chez les algues

A. Les concepts d'espèce

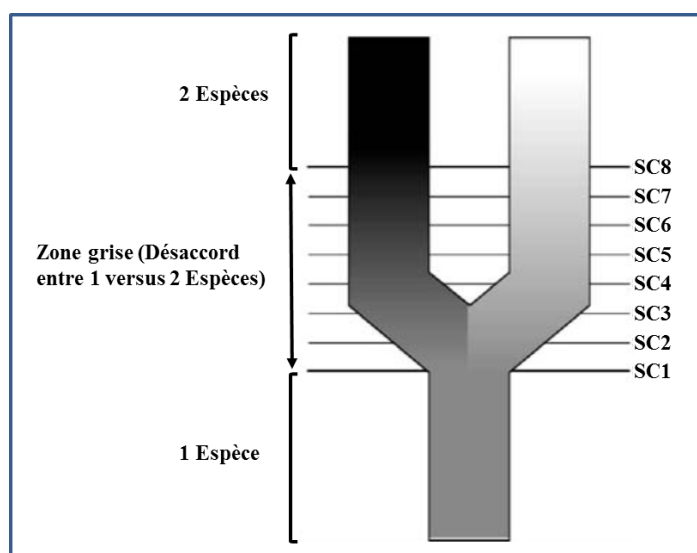
L'espèce est couramment utilisée comme unité fondamentale pour les études de biogéographie, d'écologie, de macroévolution et de biologie de la conservation (Sites et Marshall 2004). On dénombre plus de 77 000 publications scientifiques utilisant le mot espèce dans leur titre sur ces cinq dernières années (données de Web of knowledgeSM). Mayden (1997) recense plus de 22 concepts d'espèce différents parmi lesquels il est souvent difficile de faire un choix à la vue de la multitude de définitions (Mallet 1995). De ces définitions va dépendre la façon de délimiter les espèces (Winker et al. 2007), c'est-à-dire des méthodes ou des critères utilisés pour séparer différentes espèces (ex. caractères

morphologiques, flux géniques, niches écologiques). Le choix du concept d'espèce dépendra donc en grande partie du matériel biologique étudié et des critères disponibles. Chacun appliquera son propre concept (Agapow et al. 2004). Il existe un large débat sur la définition du concept d'espèce (Noor 2002) dans lequel je ne rentrerai pas. Les quatre principaux concepts d'espèce permettant la délimitation d'espèce sont listés dans le tableau 2. Parmi ceux-ci, le concept d'espèce morphologique est sans nul doute le plus ancien et concerne les taxons reconnus par des discontinuités de caractères morphologiques. Le concept d'espèce biologique (Mayr, 1942) quant à lui définit une espèce comme un groupe d'individus reproductivement isolés d'autres groupes. Le concept d'espèce phylogénétique désigne l'espèce comme un groupe d'individus monophylétique partageant tous au moins une synapomorphie (état de caractère dérivé partagé) hérité d'un ancêtre commun de ce groupe (Donoghue 1985). Enfin, le concept d'espèce écologique désigne des taxons occupant la même niche écologique (Van Valen 1976). Malgré ces apparentes divergences, la plupart des biologistes conviennent que les espèces correspondent à des lignées, et finalement le seul désaccord est de définir le meilleur critère pour la distinction de ces lignées (Mayden 1997). Il s'agit donc de trouver des caractères permettant de définir l'existence d'entités discrètes or il existe une certaine variabilité au sein d'une espèce sur laquelle va agir la sélection naturelle entraînant la spéciation (Darwin 1859). de Queiroz (1998) souligne, le fait que les processus de spéciation créent des limites floues entre groupes et que par conséquent, suivant les groupes étudiés, il serait difficile de favoriser un concept d'espèce par rapport à un autre. Il propose donc la notion de Concept Unifié de l'espèce (de Queiroz 1998, 2005, 2007) selon lequel les espèces sont envisagées comme des lignées héritant de caractères par ascendance verticale, qui évoluent sous l'influence des mêmes contraintes et des mêmes forces évolutives dans un espace spatio-temporel donné (Figure 1). Cet auteur suggère donc qu'un consensus est possible entre les délimitations conflictuelles d'espèces. Lorsque des divergences s'accumulent entre deux lignées (divergence génétique à différents locus, isolement génétique, etc.), le réseau disparaît, et deux lignées distinctes apparaissent. A terme, l'ensemble des critères énoncés par les différents concepts d'espèce devraient être acquis pour considérer deux lignées définitivement distinctes. Le phénomène est progressif et illustré par la zone grise où les différents concepts d'espèce peuvent entrer en conflit. Il est donc essentiel d'aborder la délimitation des espèces par des approches intégratives (ex. Barrett et Freudenstein 2011, Chesters et al. 2012, Roe et Sperling 2007) au vu du nombre important de méthodes disponibles (Sites et Marshall, 2004).

Tableau 2 : Principaux choix de concepts d'espèces utilisés et les propriétés qui les distinguent (d'après de Quiroz 2007).

Concept d'espèce	Propriétés et source
Morphologique	Population morphologiquement distincte d'une autre par des critères diagnostiques, Cronquist 1978
Biologique	Croisement possible et isolement reproductif intrinsèque, Mayr 1942
Ecologique	Zone adaptative distincte (niche), Van Valen 1976
Phylogénétique	Groupe monophylétique partageant des caractères moléculaires ou morphologiques hérités d'un ancêtre commun direct, Donoghue 1985

Figure 1 : Le processus de divergence de lignées de métapopulation (spéciation) est illustré ici. L'obscurcissement progressif et l'éclaircissement des lignées filles représentent leur divergence progressive dans le temps (de bas en haut), et les lignes étiquetées SC (critère d'espèce) 1 - 8 représentent les moments où les lignées acquièrent des propriétés différentes par rapport à l'autre (par exemple, quand elles deviennent phénologiquement distinguables, séparable par un caractère



fixe différent, réciproquement monophylétiques, reproductivement incompatibles, écologiquement distinctes, etc.) Avant l'évolution de la première propriété (SC1), les auteurs conviennent qu'il y a une seule espèce, et après une évolution de la dernière propriété (SC8), ils seront d'accord qu'il y en a deux. Entre ces événements, cependant, il y aura désaccord entre les auteurs quant à savoir si une ou deux espèces sont impliquées. La «zone grise» est la zone de conflit. Les désaccords des auteurs résultent du fait d'adopter différentes propriétés contingentes (critères d'espèce) comme base pour leurs définitions d'espèces.

B. La notion d'espèce chez les algues

Les algues sont les principaux producteurs de tous les océans et mers et elles contribuent à 40% de la photosynthèse globale. Elles sont très diverses et représentent un assemblage artificiel d'organismes photosynthétiques produisant de l'oxygène (Wattier et Maggs 2001). Feldmann (1963) écrivait « les algues constituent en réalité un vaste ensemble hétérogène

d'embranchements très distincts les uns des autres et n'ayant entre eux que peu de caractères communs ». Au cours de leur évolution, elles ont formé des groupes très divers colonisant un très grand nombre d'habitats et présentant, entre autre, une diversité de tailles, de structures cellulaires et de cycle de vie (de Reviers 2003). Cet assemblage polyphylétique regroupe au moins sept lignées phylogénétiques distinctes. Les macroalgues sont représentées par la lignée des algues rouges (Rhodophycées) avec environ 6000 espèces reconnues et environ 500 à 15 000 nouvelles espèces restent à décrire (Andersen 1992) ; la lignée d'algues vertes (Chlorophycées) avec environ 16 000 espèces existantes reconnues et jusqu'à 100 000 espèces restant à décrire (Andersen 1992) et la lignée des Chromophycées (incluant les Phéophycées) avec environ 15 000 espèces existantes et de un à dix millions d'espèces non encore décrites (Andersen 1992).

Malgré leur morphologie relativement simple (absence de cormus et de fleur), la taxonomie des algues a été principalement basée sur le concept morphologique de l'espèce. Cependant, l'incapacité à distinguer les traits diagnostiques de la plasticité phénotypique a souvent contribué à des erreurs dans la délimitation d'espèce (Tronholm et al. 2010). En effet, les algues présentent généralement une morphologie qui peut varier en fonction des conditions environnementales (plasticité phénotypique). Par ailleurs, l'insuffisance du nombre de caractères diagnostiques a souvent conduit à une sous-estimation du nombre d'espèces. À ce jour, les données moléculaires permettent d'obtenir des informations sur l'histoire évolutive des organismes. Le développement d'outils moléculaires performants permet aujourd'hui d'appréhender différemment l'identification ou la délimitation des espèces (Saunders 2005) et a permis de montrer l'existence d'espèces cryptiques, espèces non distinguables morphologiquement mais génétiquement différentes (Bickford et al. 2007).

III. La délimitation d'espèces par une approche de type «ADN barcoding »

A. Le barcoding

Le but initial du barcoding (ou barcode) était de pouvoir identifier facilement et rapidement les espèces animales à l'aide d'une séquence génétique à l'instar des codes barres sur les produits commerciaux (Hebert et al. 2003). La principale difficulté d'un tel projet résidait dans le choix d'une séquence nucléotidique suffisamment conservée au niveau intra espèce, suffisamment divergente pour distinguer deux espèces et suffisamment universelle pour

pouvoir être utilisée sur un large spectre d'organismes. Le choix s'est porté sur un gène mitochondrial (aux dépens de l'ADN nucléaire) et plus particulièrement la partie 5' du gène *cox1* codant pour la cytochrome *c* oxydase 1 (Herbert et al. 2003, 2004b) (Figure 2) ; en raison d'une transmission uniparentale (dans la majorité des phylums d'animaux), d'un taux élevé d'évolution, de l'absence d'introns, de grands nombres de copies dans chaque cellule, et d'une recombinaison limitée (Galtier et al. 2009).

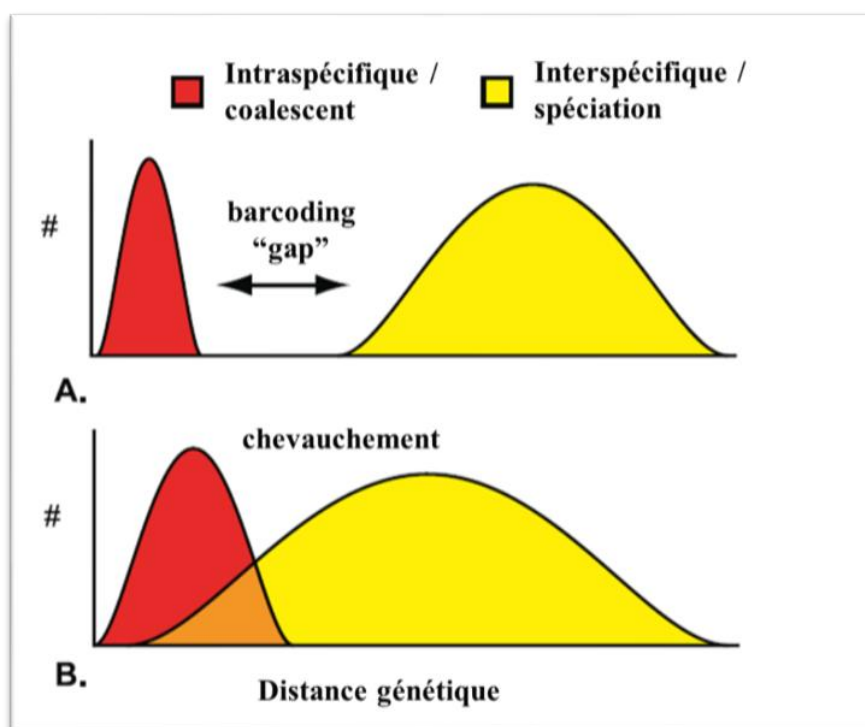


Figure 2 : Schéma de la délimitation d'espèces par le « barcode gap » et ses limites. En rouge, la distribution de la variation intraspécifique, et en jaune, la divergence interspécifique. (A) Le monde idéal pour le barcoding, avec des distributions discrètes et pas de chevauchement. (B) Une version alternative du monde avec un chevauchement important et aucun « gap » (d'après Meyer et Paulay 2005).

Le projet barcode of Life initié sous l'impulsion de Paul Hebert (2003, <http://www.barcoding.si.edu/>) a pour objectif la mise en place d'une base de données de référence qui a terme permet d'assigner un nom d'espèce à des spécimens non identifiés tout en favorisant la découverte de nouvelles espèces (Schindel et Mindler 2005). Afin de coordonner les projets scientifiques, l'initiative internationale CBOL (Consortium for the Barcode Life) fut créée en 2004 pour promouvoir et coordonner ce projet à l'international. Pierre angulaire de ce projet, la base de données BOLD (Barcode of Life Database) (<http://www.barcodinglife.com>, Ratnasingham et Herbert 2007) a été mise en place avec la volonté de maintenir un lien fort entre les spécimens (géoréférencement, données biologiques

et lieu de conservation dans une collection accessible...) et les séquences. Cette base de données compte aujourd'hui 2 020 080 séquences répertoriées dont 161 862 espèces officiellement identifiées.

Outre l'identification de spécimens, le barcode est également présenté comme une solution pour la délimitation d'espèces cryptiques (organismes identiques morphologiquement mais présentant une divergence génétique importante ; Bickford et al. 2007) et pseudo-cryptiques (organismes avec une divergence génétique importante mais pouvant être distingués morphologiquement sur la base de différences subtiles mises en évidences *a posteriori* de l'étude moléculaire).

Ainsi, le barcode est devenu un outil de choix pour évaluer la biodiversité, permettant l'identification de spécimens en s'affranchissant des données morphologiques. Cet outil permet ainsi l'identification d'individus quel que soit leur stade de développement (cycle de vie), ou leur état, qu'ils soient frais ou conservés avec une méthode de préservation ne dégradant pas complètement l'ADN. De plus, dans un contexte de paupérisation des experts taxonomiques, le barcode s'avère être un outil rapide et fiable d'identification à la portée des non-spécialistes. Enfin, outre l'étude fondamentale de la biodiversité, cet outil a trouvé de nombreux débouchés en recherche appliquée et même pour des applications industrielles. Par exemple, les approches de type barcode se sont révélées être un atout précieux en répression des fraudes, dans l'identification des organismes, en particulier dans les cas où l'identification morphologique n'était pas (ou plus) possible du fait de la transformation des produits. Par exemple, par une approche moléculaire, Marko et al. (2004) ont montré que dans 77% des cas, dans les préparations alimentaires surgelées, l'espèce de poisson *Lutjanus campechanus* (le vivaneau ou la perche rouge «red-snapper»), correspond à une autre espèce de poisson.

B. Le Barcode chez les algues

Le projet du barcode of Life a suscité un intérêt particulier auprès des biologistes marins qui y ont vu, une alternative à l'identification et à la délimitation d'espèces sur la base de caractères morphologiques diagnostiques souvent difficiles à observer et/ou sporadiques (Radulovici et al. 2010). De plus, en milieu marin, les barrières environnementales qui sous-tendent l'isolement des populations et peuvent être à l'origine d'événements de spéciations sont largement moins bien appréhendées qu'en milieu terrestre. En effet, il existe un paradigme comme quoi les mers et les océans ont une connectivité importante, cependant des études

récentes mettent en évidence que la présence de ces barrières ont été largement sous-évaluées (ex. Tellier et al. 2009, Neiva et al. 2011).

L'identification des algues marines est particulièrement ardue en raison, entre autres, de leur morphologie simple, de leur plasticité phénotypique et de l'alternance de générations parfois hétéromorphes (Saunders 2005). Le marqueur *cox1* initialement proposé pour les animaux a été testé chez les algues afin de se conformer à l'universalité théorique du marqueur barcode. Ces dernières années, le nombre d'études utilisant des méthodes de type barcoding en utilisant le *cox1* dans le but d'identifier ou de délimiter des espèces s'est multiplié chez les algues rouges (Saunders 2005, Robba et al 2006, Sherwood et al. 2008, Le Gall et Saunders 2009, Clarkston et Saunders 2010, Le Gall et Saunders 2010, Freshwater et al. 2010, Kucera et Saunders 2012) et brunes (Lane et al. 2007, Kucera et Saunders 2008, McDevit et Saunders 2009, 2010, Macaya et Zuccarello 2010, Mattio et Payri 2010). Chez les algues vertes, le *cox1* n'apparaît pas comme un bon candidat du fait de l'impossibilité à séquencer ce gène. Effectivement dans ce groupe, ce gène peut contenir plusieurs introns (par exemple, cinq chez *Chaetosphaeridium*, Turmel et al. 2002 ; Pombert 2006) dont la position et le nombre ne sont pas connus pour la plupart des espèces. L'idée du barcode universel avec un gène standard, applicable à l'ensemble de la biodiversité n'est donc pas réalisable, en particulier pour les algues qui appartiennent à plusieurs grandes lignées de l'arbre de la vie eucaryote (Hampl et al. 2009). Une étude récente de Saunders et Kucera (2010) a consisté à évaluer de nouveaux marqueurs pour les approches de barcode chez les algues vertes. Les résultats ont montré que le gène *tufA* (localisé dans le plaste) était le meilleur candidat mis à part pour les Cladophoraceae où l'amplification et le séquençage des différents marqueurs testés restent problématique.

Les inférences phylogénétiques à partir d'un gène permettent de reconstruire l'histoire évolutive de ce gène et d'en inférer l'histoire évolutive de l'organisme. De nombreuses limites biaisent cette inférence. En effet l'histoire des gènes et celle des organismes n'est pas toujours verticale. De plus en plus d'études semblent opter pour une approche multilocus afin de pallier à ces limites, comme la faible résolution dans certains cas (hybrides, divergence récente des espèces, complexes d'espèces ou lente évolution des groupes), la présence de pseudogènes (Song et al. 2008) ou les cas d'introgression mitochondriale (Kemppainen et al. 2009) (pour revue Frézal et Leblois 2008, Mitchell 2008). Ainsi l'utilisation de plusieurs marqueurs non-recombinants permet d'accumuler assez d'informations pour converger vers un scénario évolutif et gagner en précision lors de la délimitation des espèces (Figure 3). Pour

complémenter les marqueurs cytoplasmiques, l'inclusion d'un ou plusieurs marqueurs nucléaires permettent de mettre ou non en évidence des événements de recombinaisons. Ainsi quelques études chez les algues ont permis de comparer les niveaux de divergence observés suivant le marqueur utilisé. Par exemple Freshwater et al. (2010), dans une étude sur l'identification d'espèces de Gelidiales, ont montré que la *rbcL* (marqueur chloroplastique) et le *cox1* présentaient le même groupement de spécimens par espèce mais les séquences du *cox1* étaient plus variables que celles de la *rbcL* et montraient un « barcode gap » (Figure 2) plus grand entre les espèces jumelles. Une autre étude sur le genre *Sargassum* (Mattoo et Payri 2010) compare l'efficacité de trois marqueurs mitochondriaux (*cox1*, *mtsp* et *cox3*) à un marqueur chloroplastique (*rbcL*) et un marqueur nucléaire (ITS2) sur l'identification de 13 espèces proches. Les résultats soulignent l'efficacité de ces marqueurs mitochondriaux dans les problématiques de délimitation d'espèces.

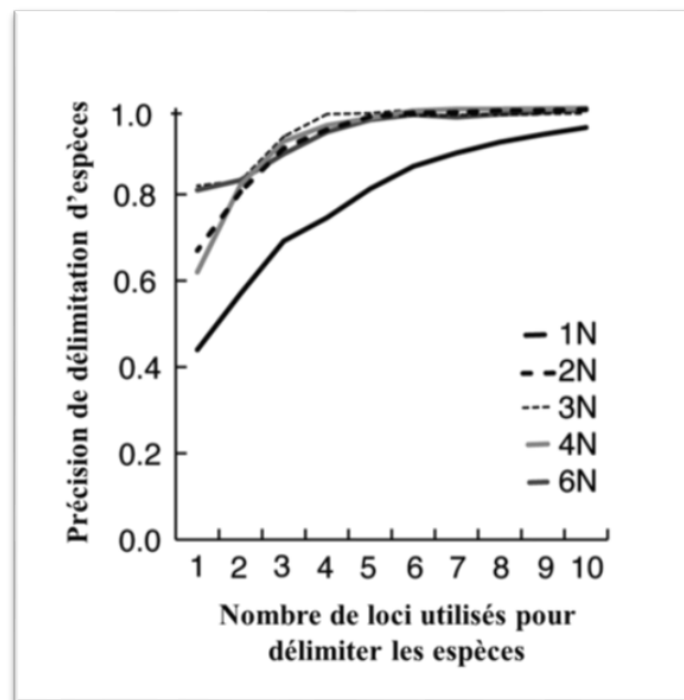


Figure 3 : Précision de l'approche basée sur la coalescence pour délimiter les espèces A et B avec différents efforts d'échantillonnage, montrant que le taux de faux négatifs diminue à mesure que le nombre de loci échantillonnés augmente de 1 à 10 loci, chaque ligne représente un ensemble de simulations pour un temps de divergence spécifique (Knowles et Carstens 2007).

IV. Structure du document

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'intègrent dans la problématique générale de la délimitation des espèces dans le but de caractériser et d'identifier des macroalgues marines nouvellement cultivées. L'utilisation d'une approche barcode a été le point essentiel pour aborder ce projet. Les applications sont nombreuses et le document visera à mettre en relief l'utilité de ce type d'approche dans différents domaines.

Le premier chapitre est consacré à l'application directe de l'approche barcode dans le but d'identifier des espèces d'algues. Il vise à caractériser génétiquement les espèces cibles d'intérêt économique afin de préciser leurs statuts taxonomiques et le cas échéant de confirmer leurs identifications morphologiques. Il sera ainsi possible de fournir une librairie génétique de la diversité des différentes espèces. Ces données permettront d'avoir une traçabilité du matériel biologique, de la production des plantules jusqu'à la transformation des algues. Les exploitants et les industriels de la filière algue pourront ainsi se servir des données génétiques pour garantir et certifier génétiquement leurs produits.

Le second chapitre est consacré à la mise en évidence de l'existence de deux espèces cryptiques par une approche intégrative de barcoding et de génétique des populations. En utilisant des marqueurs mitochondriaux, chloroplastiques et nucléaires, couplés à une analyse de marqueurs hypervariables (microsatellites), nous avons abordé le cas de *Pylaiella littoralis*, espèce dont la taxonomie était controversée. Notre étude met en évidence la présence de deux entités génétiques distinctes dans les mêmes types de milieu mais occupant des niches écologiques différentes décalées dans le temps.

Le troisième chapitre montre l'utilité du barcode dans la détection d'espèces introduites. Une approche de type barcode en utilisant un gène chloroplastique (*rbcL*) a permis de révéler la présence d'une introduction cryptique sur les côtes Bretonnes. En effet l'introduction de *Polysiphonia morrowii*, originaire du Nord-Est Asiatique, est passée inaperçue en raison de son caractère cryptique avec des espèces de *Polysiphonia* natives.

Le dernier chapitre a consisté à inférer un scénario d'introduction de *Polysiphonia morrowii*, à l'aide d'une approche barcode multilocus (*cox1* et *rbcL*), dans deux aires introduites, la France et l'Argentine, en comparaison avec des populations de Corée du Sud, son aire d'origine supposée. Les aires introduites présentent une forte diversité de cytotypes non identifiés en Corée du Sud suggérant des événements d'introductions multiples en provenance d'une aire native plus large que les populations d'origine échantillonnées.

Chapitre 1

Chapitre 1. Obtention de signatures ADN pour la traçabilité des algues nouvellement exploitées

I. Introduction

L'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estimait à 19 millions de tonnes la production mondiale d'algues en 2010 dont 95,5% était le fruit de l'algoculture (FAO, 2012, www.fao.org/index_fr.htm); cette production rapporterait 5,7 milliard de dollars EU. L'algoculture ne concerne cependant qu'un petit nombre d'espèces comme par exemple l'algue brune *Saccharina japonica* (Areschoug) C.E.Lane, C.Mayes, Druehl & G.W.Saunders, dont 98,9% de la production mondiale provient de cultures réalisées en Chine (le plus gros pays producteur d'algues, Qin et al. 2004). Les autres espèces les plus cultivées appartiennent aux genres *Eucheuma*, *Gracilaria* et *Undaria* (Figure 1).

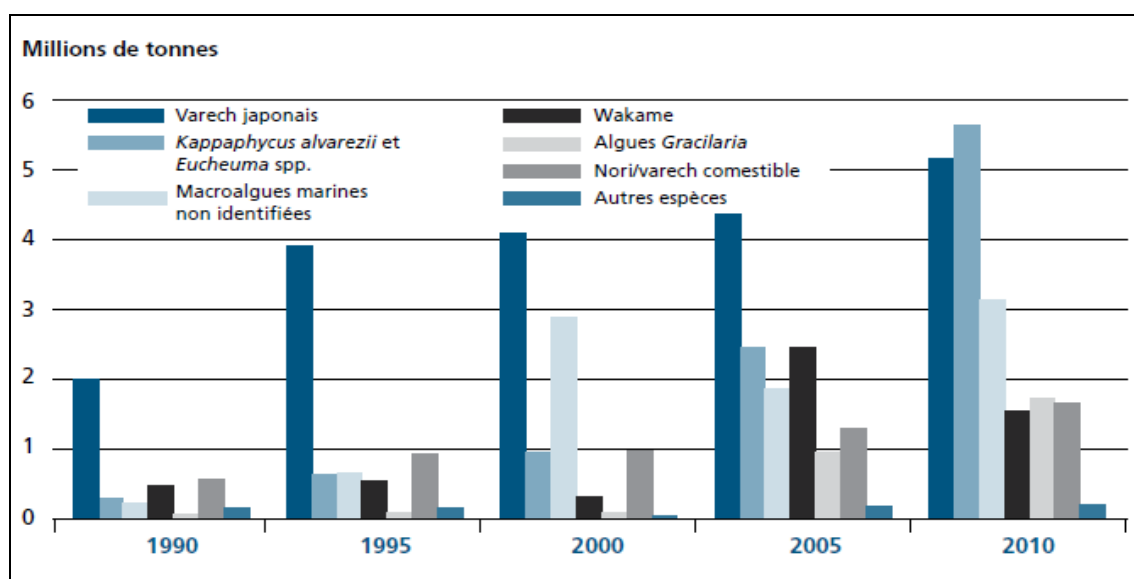


Figure 1. Production aquacole mondiale d'algues par espèce ou groupes d'espèces (source © FAO, 2012)

La France récolte environ 70 000 tonnes d'algues par an (Chambre syndicale des algues et des végétaux marins 2011) dont 65 000 tonnes pour les algines (principalement des Laminaires), 5 500 tonnes d'algues de rives et 50 tonnes d'algues de culture. Cette production provient principalement de Bretagne et la majorité des algues sont issues de l'exploitation des populations naturelles (99%). La Bretagne est une région où l'exploitation des algues est à la

base d'une filière économique spécifique qui regroupe la quasi-totalité des exploitants français ainsi que des entreprises de transformation de ces algues. Les applications présentes et futures des produits issus des algues sont nombreuses dans le secteur alimentaire (Fleurence et al. 2012), la fertilisation des sols (engrais, Lôpez et Mosquera 2011), les compléments alimentaires pour animaux (Craigie 2011), l'énergie (biofuel, Burton et al. 2009) ou encore la cosmétique (Winberg 2011).

Au vu du faible nombre d'espèces d'algues exploitées (Zemke-White and Ohno 1999), il semble aujourd'hui que la ressource algale reste encore largement inexplorée, en particulier en Bretagne, région considérée comme un « hot-spot » de biodiversité (Kerwell 2006) où 93% des algues exploitées sont des Laminaires. Cependant cette ressource potentielle n'est pas inépuisable et la culture de nouvelles espèces autochtones apparaît comme une opportunité de développement durable de cette activité pour la région Bretagne. C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet « Cultiver et génotyper de nouvelles espèces d'algues pour la cosmétique bleue » dont l'objectif était de valoriser la biodiversité algale, tout en s'affranchissant de l'exploitation intensive des populations naturelles.

En effet, l'aquaculture est un moyen de réduire la pression d'exploitation sur les stocks sauvages (Diana 2009), de garantir une régularité dans les récoltes et de s'inscrire dans un contexte de développement durable en préservant le milieu naturel. Par exemple, Seeley et Schlesinger (2012) constatent qu'à l'échelle commerciale, la cueillette d'*Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis dans le milieu naturel présente un risque non négligeable pour les écosystèmes côtiers et les communautés humaines qui dépendent de ces écosystèmes. Ces auteurs recensent des impacts indirects comme le changement d'architecture de l'habitat, la disponibilité d'abris ou de nourriture des communautés associées ; et des impacts directs comme le recrutement des espèces et le renouvellement des populations d'*Ascophyllum*. Tout cela contribue à la diminution de la richesse spécifique dans ces écosystèmes. Enfin, l'avantage de la culture est aussi de pouvoir contrôler certains facteurs pouvant influencer la qualité des algues produites. En effet, les contenus biochimiques des algues provenant des stocks naturels varient en fonction de la période, du lieu de récolte et des génotypes prélevés (Fleurence 1999, Rouxel et al. 2001, Denis et al. 2010).

Le projet « Cultiver et génotyper de nouvelles espèces d'algues pour la cosmétique bleue » est le fruit de la collaboration entre deux entreprises de culture et d'exploitation d'algues, une entreprise de transformation et un laboratoire de recherche CNRS/UPMC. Le choix des algues

s'est fait dans un premier temps d'après leur potentialité à être cultivées et leur intérêt cosmétique et même si de nombreuses études ont déjà montré l'intérêt des substances issues des algues dans la cosmétique (e.g. Kim 2011, Phang 2010, Wijesinghe et Jeon 2011), la production de certaines espèces dans un contexte industriel reste encore un domaine inexploré. En effet, la mise au point de l'algoculture dépend non seulement d'une connaissance approfondie des conditions de cultures mais aussi de l'aptitude des espèces à se développer en culture, de leur cycle de vie (domestication), de la sélection des espèces et des souches et du contrôle de qualité (Winberg 2011).

Le premier objectif de ce projet visait à caractériser génétiquement les espèces sélectionnées, pour leur intérêt économique et leur potentiel de développement en culture, et de les comparer aux espèces phylogénétiquement proches en utilisant des outils de biologie moléculaire de type barcoding (Hebert et Gregory, 2005). Nous avons utilisé pour cela des séquences nucléotidiques de gènes et/ou d'espaces intergéniques appartenant aux différents compartiments chloroplastiques, mitochondriaux et nucléaires. Puis, afin de mettre au point une méthode rapide pour identifier les espèces nous avons développé des méthodes basées sur le principe des RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction), pouvant être utilisée directement par les cultivateurs et/ou les industriels (Antoine et Fleurence 2003, Abe et al. 2012).

Le second objectif consistait à étudier les ressources génétiques des espèces cibles et à identifier les souches cultivées (ou variétés). Une première estimation de la variabilité génétique intraspécifique a été faite le long des côtes bretonnes (du golfe Normano-Breton au sud Bretagne).

II. Matériels et Méthodes

A. Les espèces sélectionnées

Notre étude a porté sur cinq espèces qui ont été sélectionnées par les industriels; deux espèces de Rhodophyta: *Calliblepharis jubata* (Goodenough & Woodward) Kützinger (Cystocloniacées) et *Polysiphonia elongata* (Hudson) Sprengel (Rhodomélacées); deux espèces de Phaeophyceae: *Pylaiella littoralis* (Linnaeus) Kjellman (Acinetosporacées) et *Bifurcaria bifurcata* R.Ross (Sargassacées) et une espèce de Chlorophyceae : *Cladophora rupestris* (Linnaeus) Kützinger (Cladophoracées).

1. Algues rouges :

1. a. *Calliblepharis jubata* (Goodenough & Woodward) Kützing

Dans ce genre, les frondes sont plus ou moins aplaties et peuvent atteindre 30 cm de long. La plupart des espèces présentent une base ramifiée caractéristique. La systématique du genre *Calliblepharis* a conduit à une classification simple et stable qui ne comprend que cinq espèces mondialement (Guiry et Guiry 2012). Les deux espèces présentes en Bretagne *Calliblepharis ciliata* (Hudson) Kützing et *Calliblepharis jubata* sont facilement identifiables morphologiquement.

Calliblepharis jubata est une espèce commune qui se présente sous la forme de frondes aplaties, épais et cartilagineux. Les lames de couleur rouge brun sont plus ou moins cassantes et étroites. Des proliférations épineuses sont observées sur le thalle et/ou sur la marge de celui-ci. Ces proliférations sont plus ou moins abondantes selon la saison et peuvent se détacher pour former de nouveaux thalles par bouturage (Feldmann 1954). Les individus sont pérennants par leur base formée de nombreux crampons (Loiseaux-de Goër et Noailles 2008). Son cycle de reproduction est haplo-diplontique isomorphe (alternance d'individus haploïdes et diploïdes). Le gamétophyte est dioïque. Les tétrasporophytes apparaissent d'avril à juin. Cette espèce se trouve sur les rochers (epilithé) ou encore épiphyte sur diverses algues (Corallines en particulier, *Lithothamnium calcareum*, Feldmann 1954) dans l'infralittoral depuis la ceinture de *Fucus serratus* Linnaeus jusqu'au plus profondes ceintures de Laminaires (-25 m). Cette algue atteint sa taille maximale au printemps (avril) période à laquelle peut s'observer de nombreuses formes de thalle, avec des axes plats plus ou moins cylindriques, (Annexe 1). Sa distribution s'étend de l'Europe à l'Amérique du Sud et dans le Sud-Ouest Asiatique (Guiry et Guiry 2012).



1. b. *Polysiphonia elongata* (Hudson) Sprengel

Le genre *Polysiphonia* est un groupe très divers comprenant plus de 900 taxons répertoriés dont près de 200 sont actuellement reconnus comme valides (Guiry et Guiry 2012). La systématique des Rhodomelaceae est un champ de recherche dans lequel il reste encore beaucoup à faire pour obtenir une classification stable. Par exemple, Kim et Lee (2006) ont mis en évidence un nouveau genre, *Neosiphonia*, morphologiquement proche des *Polysiphonia*, caractérisé par leurs structures végétatives et reproductives (Encadré 1). Trente et une espèces de *Polysiphonia* ont été renommées sous le genre *Neosiphonia* comptant maintenant 33 espèces (Guiry and Guiry 2012). Le nombre précis d'espèces de *Polysiphonia* et de *Neosiphonia* reste cependant difficile à estimer sur la base de caractères anatomorphologiques en raison de la forte plasticité phénotypique rencontrée dans ces groupes (Kim et al. 2000) et d'un manque de caractères diagnostiques rendant l'identification difficile voire impossible (Kim et Yang 2006). Le long des côtes Bretonnes, Feldmann (1954), dans l'inventaire de la Flore marine de Roscoff, répertoriait 21 espèces de *Polysiphonia* ainsi que 3 variétés (Tableau 1). Depuis, les nombreuses études de taxonomie moléculaire ont remis en cause la systématique de ce groupe (e.g. Choi et al. 2001, McIvor et al. 2001, Kim et Yang 2005). Ainsi lorsque l'on compare cette liste à la base de références AlgaeBase (Guiry et Guiry 2012), le nombre d'espèces reconnues taxonomiquement n'est plus que de 19 (Tableau 1), un nombre identique au nombre d'espèces de *Polysiphonia* (et *Neosiphonia*) proposées par Maggs et Hommersand (1993). Parmi celles-ci, 14 espèces appartiennent au genre *Polysiphonia* et 5 espèces ont changé récemment de genre (2 *Boergeseniella*, 2 *Neosiphonia* et 1 *Vertebrata*).

Polysiphonia elongata est une algue cartilagineuse, cylindrique, brun-roux pouvant mesurer jusqu'à 30 cm. Elle est ramifiée avec une base discoïde. Les rameaux sont alternes et dichotomes, dense au printemps (Feldmann 1954). L'axe central est entouré par 4 cellules péricentrales, puis 4 autres alternées avec les



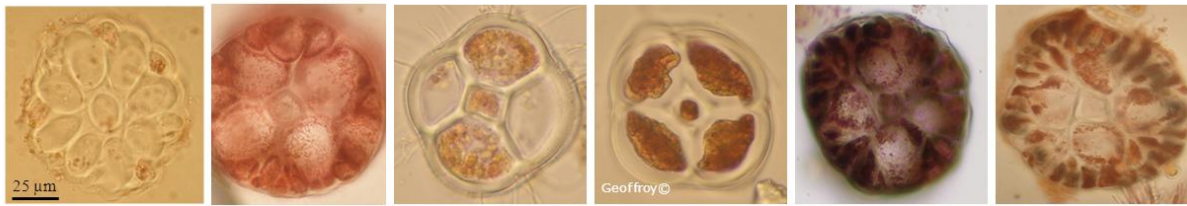
Tableau 1 : Liste des espèces de *Polysiphonia* répertoriées à Roscoff par Feldmann (1954), la base de données AlgaeBase et la caractérisation génétique par les marqueurs cox1, rbcL et 28S de cette étude. En gris, les espèces réellement répertoriées par Feldmann après comparaison avec AlgaeBase. S, signifie que le nom proposé par Feldmann est synonyme du nom d'une autre espèce et C signifie que le nom proposé par Feldmann est taxonomiquement reconnu.

Espèces répertoriées par Feldmann (1954)		Nomenclature d'après Guiry and Guiry (2012)	Caractérisation génétique
<i>Polysiphonia urceolata</i> (Dillwyn) Greville var. <i>urceolata</i>	S	<i>Polysiphonia stricta</i> (Dillwyn) Greville	X
<i>Polysiphonia urceolata</i> (Dillwyn) Greville f. <i>roseola</i> (C.Agardh) J.Agardh	S	<i>Polysiphonia stricta</i> (Dillwyn) Greville	
<i>Polysiphonia urceolata</i> (Dillwyn) Greville f. <i>patens</i> (Dillwyn) J.Agardh	C	<i>Polysiphonia urceolata</i> f. <i>patens</i> (Dillwyn) J.Agardh	
<i>Polysiphonia urceolata</i> (Dillwyn) Greville f. <i>comosa</i> (C.Agardh) J.Agardh	S	<i>Polysiphonia stricta</i> (Dillwyn) Greville	
<i>Polysiphonia fibrata</i> (Dillwyn) Harvey	C	<i>Polysiphonia fibrata</i> (Dillwyn) Harvey	X
<i>Polysiphonia insidiosa</i> Crouan	S	<i>Neosiphonia harveyi</i> (J.W.Bailey) M.-S.Kim, H.-G.Choi, Guiry & G.W.Saunders	X
<i>Polysiphonia macrocarpa</i> Harvey	S	<i>Polysiphonia atlantica</i> Kapraun & J.N.Norris	
<i>Polysiphonia subulata</i> (Dillwyn) J.Agardh	C	<i>Polysiphonia subulata</i> (Ducluzeau) Kützing	
<i>Polysiphonia violacea</i> (Roth) Greville	S	<i>Polysiphonia fibrillosa</i> (Dillwyn) Sprengel	X
<i>Polysiphonia fibrillosa</i> (Dillwyn) Greville	C	<i>Polysiphonia fibrillosa</i> (Dillwyn) Sprengel	
<i>Polysiphonia spinulosa</i> Greville	S	<i>Polysiphonia fibrillosa</i> (Dillwyn) Sprengel	
<i>Polysiphonia elongata</i> (Hudson) Harvey	C	<i>Polysiphonia elongata</i> (Hudson) Sprengel	X
<i>Polysiphonia elongella</i> Harvey	S	<i>Neosiphonia elongella</i> (Harvey) M.S.Kim & I.K.Lee	
<i>Polysiphonia denudata</i> (Dillwyn) Kützing	C	<i>Polysiphonia denudata</i> (Dillwyn) Greville ex Harvey	X
<i>Polysiphonia brodiaei</i> (Dillwyn) Greville	C	<i>Polysiphonia brodiei</i> (Dillwyn) Sprengel	X
<i>Polysiphonia nigra</i> (Hudson) Batters	C	<i>Polysiphonia nigra</i> (Hudson) Batters	
<i>Polysiphonia subulifera</i> (C.Agardh) Harvey	C	<i>Polysiphonia subulifera</i> (C.Agardh) Harvey	
<i>Polysiphonia simulans</i> Harvey	C	<i>Polysiphonia simulans</i> Harvey	
<i>Polysiphonia nigrescens</i> (Dillwyn) Greville	S	<i>Polysiphonia fucooides</i> (Hudson) Greville	X
<i>Polysiphonia affinis</i> Moore	S	<i>Polysiphonia fucooides</i> (Hudson) Greville	
<i>Polysiphonia lanosa</i> (Linné) Tandy	S	<i>Vertebrata lanosa</i> (Linnaeus) T.A.Christensen	
<i>Polysiphonia furcellata</i> (C.Agardh) Harvey	C	<i>Polysiphonia furcellata</i> (C.Agardh) Harvey	
<i>Polysiphonia fruticulosa</i> (Wulfen) Sprengel	S	<i>Boergeseniella fruticulosa</i> (Wulfen) Kylin	
<i>Polysiphonia thuyoides</i> Harvey	S	<i>Boergeseniella thuyoides</i> (Harvey) Kylin	

Encadré 1 : La détermination morphologique chez les *Polysiphonia* (*Neosiphonia*)

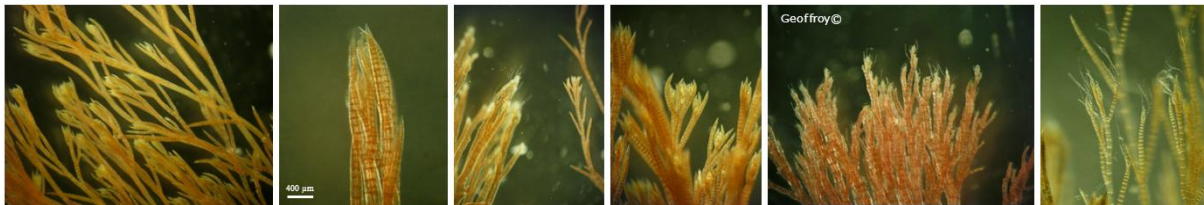
Le genre *Polysiphonia* est cosmopolite et très divers (près de 200 noms taxonomiquement reconnus). On rencontre des formes variées et la classification est principalement basée sur des caractères morphologiques. En comparant les caractères morphologiques et moléculaires, Stuercke et Freshwater (2008) ont montré que seulement quelques caractères pouvaient être discriminants. Les principaux caractères utilisés sont :

- Le nombre de cellules péricentrales et la présence ou non de cortication



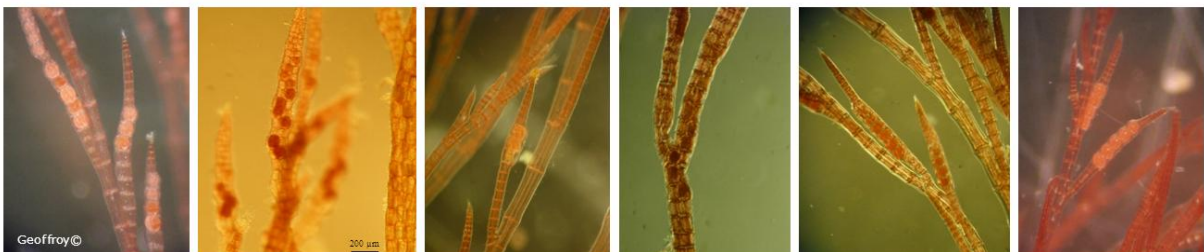
Exemple de coupe transversale d'axe principal, de différentes espèces de *Polysiphonia*, nécessaire pour dénombrer les cellules péricentrales et détecter la présence ou non de cortication (cellules entourant des cellules péricentrales).

- La forme des apex, la présence ou non de trichoblastes



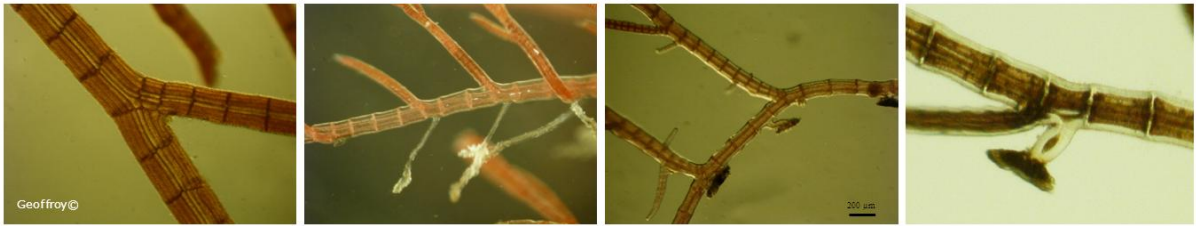
Exemple de formes d'apex plus ou moins pointus avec ou non des trichoblastes (cellules stériles en forme de poil, pouvant supporter les spermatocystes).

- Les tétraspoires



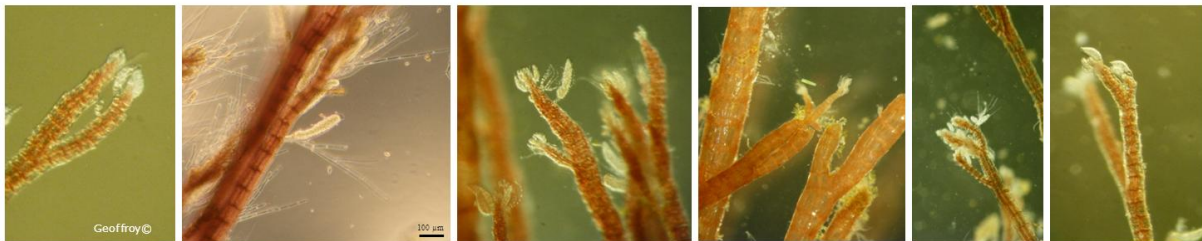
Elles peuvent être en série droite, en zigzag, sur de nouveaux rameaux.

- La taille des cellules et le type de rhizoïdes



Les rhizoïdes peuvent être en connexion ouverte avec la cellule péricentrale ou bien séparés par une paroi.

- Les organes reproducteurs mâles



Les spermatocystes sont difficilement observables car éphémères et de petites tailles. Les critères de distinctions sont basés sur leur distribution, leur place par rapport aux trichoblastes ou s'ils les remplacent.

- Les organes reproducteurs femelles



On observe souvent les cystocarpes déjà formés car il est très difficile de voir le trichogyne. La distinction entre les différentes espèces se fait suivant la forme du cystocarpe et son emplacement. Les *Polysiphonia* auraient des cystocarpes plutôt en urnes alors que ceux des *Neosiphonia* seraient plutôt ronds. La différence entre les deux genres se situe également au niveau du branchement du carpogone qui serait composé de 4 cellules chez *Polysiphonia* et seulement 3 chez *Neosiphonia*.

premières, les axes matures sont cortiqués. On peut trouver de grands individus fertiles toute l'année. Son cycle de reproduction est de type « haplo-diplontique » isomorphe (Figure 2) avec alternance d'individus haploïdes (les gamétophytes) et diploïdes (les tétrasporophytes) de même taille et de même forme. Les gamétophytes sont dioïques (pieds mâles et pieds femelles séparés) et sont reconnaissables à maturité par la présence d'organes de reproduction. Les tétrasporophytes matures présentent de longues séries de tétraspores en spirale (Figure 2). Cette espèce est fréquente dans la région Bretonne (Feldmann 1954), elle est trouvée dans des stations abritées, sur les rochers, les fonds sableux (parfois profondément enfoncées dans le sable (Feldmann 1954) et sur les coquilles vides. C'est une espèce pérenne, bien développée au printemps et qui perd la plupart de ces ramules en été (Loiseaux-de Goër et Noailles 2008). Sa distribution géographique est vaste, Atlantique Nord, Bassin méditerranéen, Atlantique sud et Sud-Ouest asiatique (Guiry et Guiry 2012).

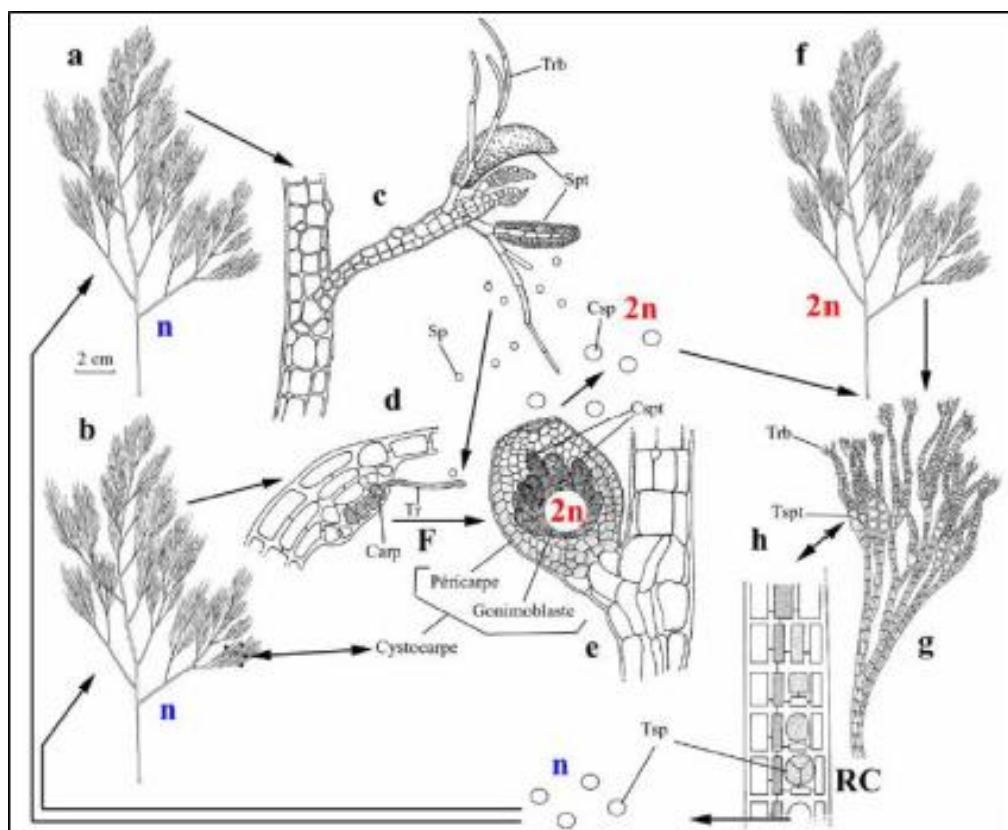


Figure 2 : Cycle de vie des *Polysiphonia*.

2. Algues brunes

2. a. *Bifurcaria bifurcata* R.Ross

Le genre *Bifurcaria* comprend deux espèces reconnues au niveau mondial dont une, est présente en Bretagne. L'origine du nom de genre vient de « bifurqué » qui souligne la ramification dichotome des rameaux (ou cordons) cylindriques (Loiseaux- de Goër et Noailles 2008). L'espèce présente le long des côtes Bretonnes, *Bifurcaria bifurcata*, est une espèce pérenne, fertile au printemps.



Les cordons sont larges de 3 à 4 mm pour une longueur d'environ 40 cm. Le cycle de reproduction ne met en jeu qu'une seule génération, son cycle est diplontique. Cette génération est diploïde et monoïque (bisexuée) et à maturité les cordons sont terminés par des réceptacles cylindriques hermaphrodites qui contiennent des conceptacles piriformes avec les oosphères dans le fond du conceptacle et les mâles (anthérozoïdes) vers l'ouverture de ce conceptacle. Après libération des gamètes par l'ostiole, le zygote donne un nouveau thalle diploïde. L'algue est présente sur les rochers émergents aux basses mers de vive-eau et dans les cuvettes à différentes hauteurs. Elle forme un réseau d'axes prostrés formant comme un enchevêtrement de « rhizomes » sur les rochers ce qui rend difficile l'identification des individus. Sa distribution se limite à l'Ouest de l'Europe et l'Afrique de l'Ouest (Guiry et Guiry 2012).

2. b. *Pylaiella littoralis* (Linnaeus) Kjellman

Ectocarpales de la famille des Acinetosporaceae, cosmopolite (Müller et Stache 1989), *Pylaiella littoralis* est une espèce très répandue dans les hauts niveaux intertidaux et souvent épiphyte sur les *Fucus* (e.g. Råberg et al 2005, Longtin et al. 2009) ou épilithes. Elle a l'aspect d'un écheveau de filaments très fins formant parfois des torsades (Kylin 1937).



Sa taille peut atteindre une quarantaine de centimètres Elle est à l'origine de marées brunes (Wilce et al. 1982, Lotze et al. 1999). Sa morphologie qui peut varier considérablement en fonction des variations écologiques du milieu (ex : ramification, taille, Knight 1923). En raison de cette plasticité morphologique, la systématique des *Pylaiella* a fait l'objet de nombreux débats (pour revue voir Siemer et Pedersen 1995). Les plastes discoïdes bruns dorés et les zoïdocystes uniloculaires en chapelet sont caractéristiques de cette espèce (Figure 3). Cardinal (1964) observe des organes pluriloculaires de mars à décembre et les sporocystes uniloculaires toute l'année.



Figure 3 : Plastes discoïdes bruns dorés caractéristiques de *Pylaiella*.

3. Algue verte

Cladophora rupestris (Linnaeus) Kützting

Cladophora est un genre d'algue verte diversifié qui croît aussi bien dans des habitats marins qu'en eau douce. Les thalles ont une architecture simple et sont composés de filaments unisériés de cellules multinucléées. La taxonomie du genre est problématique et résulte en partie de la variabilité morphologique intra-spécifique.



Cladophora rupestris est une espèce considérée comme une commune et cosmopolite (Guiry et Guiry 2012). Elle est reconnaissable à sa couleur vert foncé et elle forme des touffes de 5 à 10 cm de longueur, très ramifiées (3 à 5 ramifications par nœud, formant un angle étroit avec l'axe, d'où l'aspect en faisceaux). Les parois peuvent devenir épaisses, ce qui confère au thalle une certaine rigidité. Elle est abondante par endroits dans les stations calmes, sur les rochers ensablés (mi- marée). Elle est généralement recouverte de diatomées épiphytes qui lui donnent une couleur brune (Feldmann 1954).

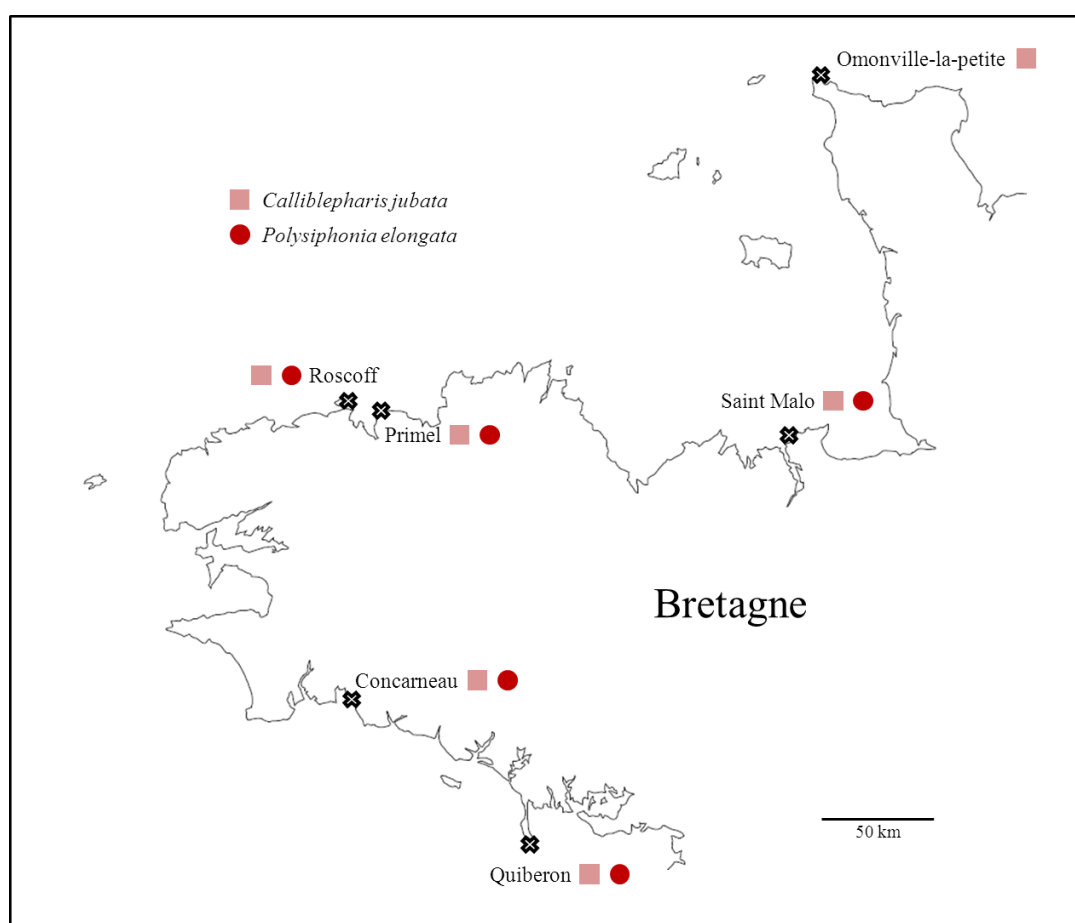


Figure 4 : Carte d'échantillonnage des deux espèces de Rhodophyta *Calliblepharis jubata* et *Polysiphonia elongata* le long des côtes Bretonnes.

B. L'échantillonnage

Les spécimens utilisés dans ce projet proviennent d'échantillonnages différents. D'une part, nous avons travaillé à partir d'échantillons fournis par les industriels et correspondants à des

récoltes de spécimens provenant de Saint Malo et de Roscoff. En effet, afin de sélectionner les espèces cultivables d'intérêt économique en cosmétique, les industriels ont récolté les différentes espèces cibles dans les populations naturelles à proximité des futurs sites potentiels de culture (Encadré 2). D'autre part, nous avons complété cet échantillonnage par des collectes d'individus réalisées le long des côtes Bretonnes afin de maximiser la diversité génétique intra-spécifique (Figure 4 et 5). Enfin, pour *Bifurcaria bifurcata* et *Calliblepharis jubata*, la collection a été enrichie par des spécimens venant du Portugal et d'Espagne étant la limite d'aire sud de *Bifurcaria bifurcata*.

Pour chaque échantillonnage, un fragment de thalle de chaque individu a été préservé dans du silicagel pour analyse moléculaire ultérieure et 3 planches d'alguiers ont été réalisées pour chaque population échantillonnée pour analyses morphologique et anatomique éventuelle.

Afin de préciser la position systématique de *Polysiphonia elongata*, et de faire l'inventaire des espèces de *Polysiphonia* potentiellement cultivables en Bretagne, un échantillonnage des espèces de *Polysiphonia* les plus communes, a été réalisé en Bretagne (Figure 4).

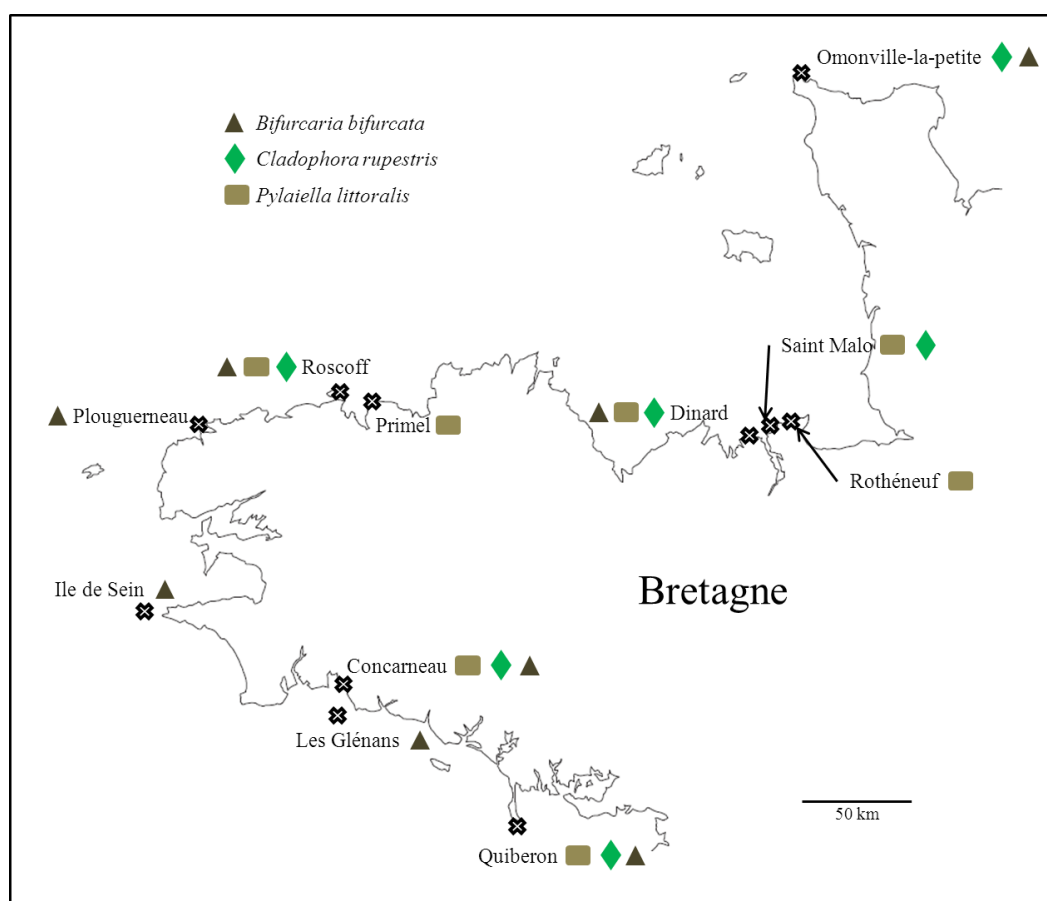


Figure 5 : Carte d'échantillonnage des 2 espèces de Phaeophyceae *Bifurcaria bifurcata* et *Pylaiella littoralis* et de l'algue verte *Cladophora rupestris* en Bretagne.

Encadré 2 : Techniques de culture de macroalgues en pleine eau (offshore)

La culture en pleine eau - ou technique de "longue-ligne" permet une immersion permanente des algues. Cette technique est utilisée pour la culture des grandes algues brunes appartenant aux Laminaires, mais aussi pour l'algue rouge *Asparagopsis armata* ou encore pour l'algue verte *Codium* sp. (Barrington et al. 2009). Avant d'être déployées en mer, les lignes doivent êtreensemencées. Deux techniques d'ensemencement sont utilisées:

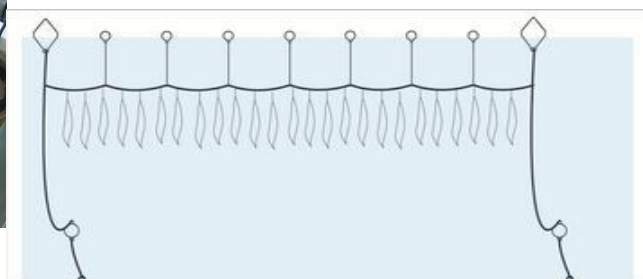
Le bouturage (ex. *Asparagopsis armata*) : des algues issues de la récolte précédente ou récoltées dans le milieu sont fractionnées. Les fragments sont insérés dans les torons de la corde qui sera mise en mer.

La production de plantules en éclosérie (ex. *Undaria pinnatifida*) : cette technique a permis l'essor de l'algoculture. Elle est plus ou moins longue et complexe selon l'espèce d'algue considérée. Il s'agit *in fine* de maîtriser la libération des éléments reproducteurs des algues mûres par le contrôle des paramètres de température, lumière et photopériode.

Les éléments reproducteurs viennent alors se fixer sur une cordelette (collecteurs) qui sera par la suite posée sur la corde. Quand les plantules ont atteint une taille suffisamment grande, la phase de grossissement en mer peut démarrer. Le type d'installation dépend des caractéristiques de chaque site (courant, vent, houle). On distingue deux grands types de structure : les dispositifs horizontaux et les dispositifs verticaux.



Exemple de collecteurs (C-Weed Aquaculture©)



Dispositif horizontal de culture (D'après www.ceva.fr)

C. L'approche moléculaire

Entre 5 et 10 mg de tissu lyophilisé de l'algue ont servis pour l'extraction d'ADN, réalisée selon le protocole du kit d'extraction NucleoSpin® 96 Plant II (Macherey-Nagel). L'ADN ainsi obtenu (ADN Stock) a été dilué au 1/25^{ème} dans de l'eau ultra pure (ADN servant pour les PCR). L'analyse génétique par une approche barcode multilocus a été menée sur les différents compartiments ADN (mitochondrial, chloroplastique et nucléaire). Les marqueurs utilisés ont été choisis en fonction d'études antérieures (listés en tableau 2). Parmi les différents marqueurs mis au point pour délimiter et identifier les espèces le choix s'est porté sur le gène mitochondrial codant pour la sous unité 1 du cytochrome c oxydase (*cox1*), le marqueur emblématique du barcode (Hebert et Gregory 2005, Robba et al. 2006). Pour l'ADN chloroplastique, nous avons choisi le gène codant pour la grande sous unité ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (*rbcL*), souvent utilisé dans les études de phylogénie et de délimitation d'espèces (e.g. Saunders 2005, Evans et al. 2007, Verbruggen et al. 2009, Le Gall et Saunders 2010, Macaya and Zuccarello 2010). Enfin pour le compartiment nucléaire, nous avons choisi d'utiliser les ITS (espaces inter géniques, Tai et al. 2001) ainsi que pour certaines espèces des parties variables de la grande sous-unité ribosomique du cistron (LSU; Saunders et Lehmkuhl 2005).

Tableau 2 : Liste des marqueurs utilisés pour la caractérisation génétique des espèces nouvellement cultivées.

Marqueurs	Nom amorces	<i>Polysiphonia elongata</i>	<i>Bifurcaria bifurcata</i>	<i>Calliblepharis jubata</i>	Source
<i>cox1</i>	GHalF	X		X	Saunders 2005
	GazR1	X		X	
	GazF2		X		Silberfeld et al. 2010
	GazR2		X		
<i>rbcL</i>	RBCLF	X		X	Guillemin et al. 2008
	RBCLR	X		X	
	<i>rbcL</i> -68F		X		Draisma et al. 2001
	<i>rbcL</i> -708R		X		Bittner et al. 2008
	<i>rbcL</i> -543F		X		
	<i>rbcL</i> -1381R		X		Burrowes et al. 2003
28S	T16N	X		X	Saunders, unpublished
	T24	X		X	
Spacer <i>rbcL-rbcS</i>	RBCLSPF	X		X	Destombe et al. 1991
	RBCLSPR	X		X	
Spacer <i>cox2-3</i>	COX2LB	X		X	Le Gall, unpublished
	COX3RB	X		X	

Pour *Cladophora rupestris*, d'autres marqueurs complémentaires ont été testés (Tableau 3). Pour la totalité des individus échantillonnés, l'ADN a été extrait, l'amplification par PCR des différents marqueurs a été menée et les produits PCR séquencés lorsque l'amplification était de bonne qualité. Toutes les séquences ont été corrigées, alignées et comparées à l'aide du logiciel Codoncode Aligner v. 3.7 (www.codoncode.com). Les séquences obtenues ont été comparées aux bases de données disponibles, GenBank et BOLD.

Table 3: Liste des marqueurs testés pour la caractérisation génétique de *Cladophora rupestris*.

Marqueurs	Amorces	Source
<i>rbcL</i>	7F 1391R	Saunders et Kucera 2010
<i>rbcL</i>	712F 791R	
<i>tufA</i>	1F 142F F R	Verbruggen et al. 2009
ITS	ITS1 ITS2	
	ITS3 ITS4	Saunders et Kucera 2010
ITS1	ITSu1 ITSu3	
ITS2	ITSu2 ITSu4	Verbruggen et al. 2009
<i>atpB</i>	147F 242F 1162R 1396R	
18S	JO2 H1R	Saunders et Kucera 2010
16S	F16SA R16SE	

RFLP

La méthode des RFLP est une méthode rapide qui permet de faire la discrimination entre espèces. Cette méthode a été utilisée chez les algues rouges pour séparer des espèces proches (Guillemin et al. 2008). L'approche consiste à utiliser des enzymes de restriction pour couper l'ADN de façon spécifique. La comparaison des séquences obtenues permet de mettre en évidence les sites nucléotidiques divergents entre espèces. Ces sites vont servir à identifier les enzymes de restriction permettant de couper ou non le fragment d'ADN amplifié. On obtient ainsi des profils multibandes de type RFLP caractéristiques des espèces étudiées. Il est ainsi possible de séparer et d'identifier les espèces par simple migration sur gel des produits de la digestion.

III. Résultats

Polysiphonia

L'étude moléculaire des différentes espèces de *Polysiphonia* par BLAST sur GenBank a permis de mettre en évidence la présence de 9 espèces différentes sur les côtes Bretonnes dont 8 étaient déjà identifiées génétiquement et une présentant des séquences non associées à un nom d'espèce (Tableau 4). En effet, les trois marqueurs utilisés (*cox1*, *rbcL* et le 28S) permettent de distinguer sans ambiguïté 8 espèces différentes de *Polysiphonia*, parmi celle-ci, nous avons identifié une espèce introduite *Polysiphonia morrowii* supposément originaire du nord-est asiatique et à ce jour, non encore détectée en Atlantique Nord (confer Chapitre 3). L'analyse des séquences nous a également permis de montrer la présence de 3 espèces de *Neosiphonia* dont *Neosiphonia harveyi* et nous avons identifiés deux autres espèces dans ce genre, *Neosiphonia sp.* et *Neosiphonia flavimarina*.

Polysiphonia elongata a été caractérisée génétiquement avec succès par l'utilisation des trois marqueurs (Tableau 5). Notons pour la petite histoire, que cette espèce était considérée avant cette étude par les exploitants d'algues comme *Polysiphonia nigra* (Hudson) Batters. L'analyse des séquences mitochondriales (*cox1* 690 bp) révèle un nombre d'haplotypes plus grand (Tableau 6) que pour la séquence chloroplastique (*rbcL*, 1290 bp) ou que pour les ribotypes (28S, 890 bp). Le chlorotype majoritaire est observé dans toutes les localités, en revanche le chlorotype qui diffère de 1 bp, est seulement détecté à Roscoff pour 2 spécimens. On observe la même chose pour le 28S, représenté par deux ribotypes où le second ribotype

Tableau 4 : Liste des espèces de *Polysiphonia* / *Neosiphonia* caractérisées génétiquement et présentes en Bretagne.

Espèce	Déjà répertoriée	Répertoriée au cours de cette thèse
<i>Polysiphonia brodiaei</i>	X	
<i>Polysiphonia denudata</i>	X	
<i>Polysiphonia elongata</i>	X	
<i>Polysiphonia fibrillosa</i>	X	
<i>Polysiphonia fibrata</i>	X	
<i>Polysiphonia fucoides</i>	X	
<i>Polysiphonia morrowii</i>		X
<i>Polysiphonia sp.</i>		X
<i>Polysiphonia stricta</i>	X	
<i>Neosiphonia harveyi</i>	X	
<i>Neosiphonia flavimarina</i>		X
<i>Neosiphonia sp.</i>		X

est identifié seulement sur deux individus, l'un à Roscoff et l'autre à Primel. Six mitotypes ont été identifiés pour *cox1*, les diversités les plus importantes ont été observées à Roscoff (avec 4 mitotypes), puis Quiberon (avec 2 mitotypes) et Saint-Malo (avec 2 mitotypes), enfin toutes les autres populations ne présentaient qu'un seul mitotype. A noter que seul le mitotype majoritaire (158 spécimens) est identifié dans toutes les localités excepté Primel où seulement deux individus ont été échantillonnés. Les 5 autres mitotypes sont représentés par un seul individu à chaque fois. Les six mitotypes ont une divergence variant entre 0.15% et 0.43% (5 sites polymorphes). Au vue de la diversité et de la répartition géographique des haplotypes, les populations le long des côtes Bretonnes présentent un même cytotype majoritaire. Deux autres marqueurs, le spacer *rbcL* (344 bp) et le spacer *cox2-3* (357 bp), réputés plus variables avec une taille plus petite (Destombe et al. 1991, Zuccarello et al. 1999), ont été testés. La diversité génétique observée s'est révélée équivalente à celle observée avec les deux marqueurs *rbcL* et *cox1* (données non montrées).

Tableau 5 : Nombre d'haplotypes observés pour chaque espèce et chaque marqueur.

	Nb spécimens échantillonnés	Plaste <i>rbcL</i>	Mitochondrie <i>cox1</i>	Nucléaire 28S
<i>Polysiphonia elongata</i>	170	2	6	2
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	748	1	4	/
<i>Calliblepharis jubata</i>	440	2	7	

Tableau 6 : Nombre d'haplotypes observés pour chaque espèce et chaque marqueur en fonction des localités.

	<i>Polysiphonia elongata</i>				<i>Bifurcaria bifurcata</i>			<i>Calliblepharis jubata</i>			
	Nb	<i>rbcL</i>	<i>cox1</i>	28S	Nb	<i>rbcL</i>	<i>cox1</i>	Nb	<i>rbcL</i>	<i>cox1</i>	28S
Omonville la petite	/	/	/	/	62	1	2	43	1	2	2
Saint-Malo	52	1	2	1	/	/	/	16	1	2	1
Dinard	/	/	/	/	32	1	1	/	/	/	/
Primel	2	1	1	1	/	/	/	44	1	2	1
Roscoff	23	2	4	2	86	1	2	61	1	4	1
Plouguerneau	/	/	/	/	46	1	1	/	/	/	/
Ile de Sein	/	/	/	/	25	1	1	/	/	/	/
Les Glénans	/	/	/	/	29	1	1	/	/	/	/
Concarneau	61	1	1	1	95	1	1	49	1	2	2
Quiberon	25	1	2	1	141	1	1	75	2	3	1
Espagne	/	/	/	/	101	1	2	4	1	1	1
Portugal	/	/	/	/	103	1	1	/	/	/	/
Nb Total	/	2	6	2	/	1	4	/	2	7	2

RFLP

La méthode des RFLP a été développée à titre d'exemple, sur les différentes espèces de *Polysiphonia* et de *Neosiphonia* séquencées lors de cette étude. Cette méthode rapide d'identification basée sur le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) a été appliquée en utilisant les séquences du *cox1*. En effet c'est le marqueur qui présente le plus de variabilité entre espèces donc celui où nous pouvons détecter le plus de sites polymorphes. Les résultats montrent clairement la possibilité de discriminer différentes espèces à l'aide de cette approche. Par exemple, l'utilisation de l'enzyme BfaI (Figure 6) permet ici de séparer les cinq espèces *P. elongata*, *P. fibrillosa*, *P. fucoïdes*, *P. morrowii* et *P. denudata*.

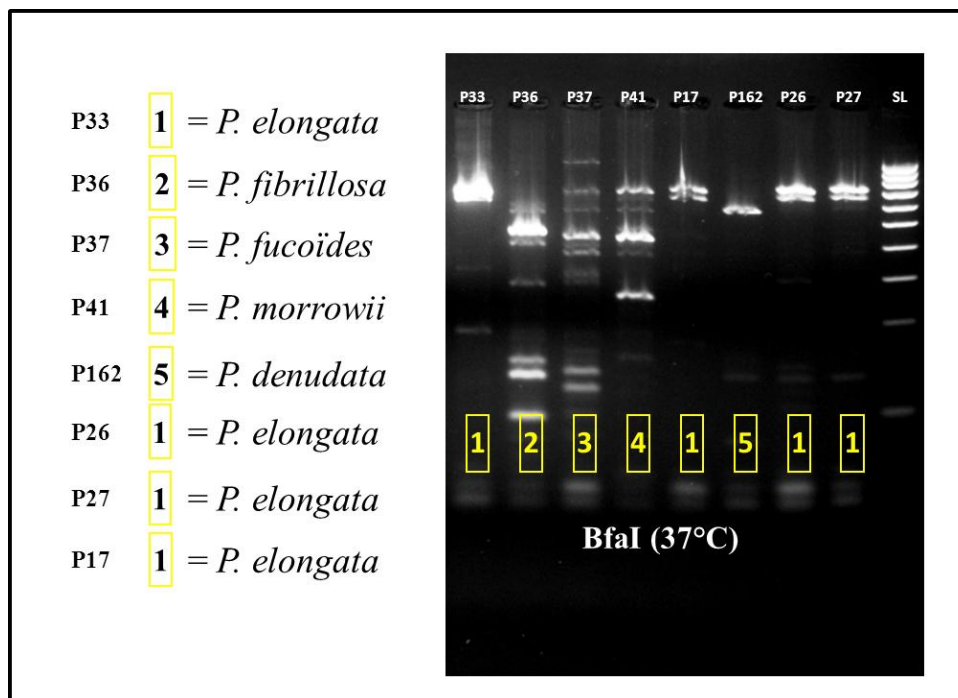


Figure 6 : Utilisation de l'enzyme BfaI sur le marqueur *cox1* sur cinq espèces de *Polysiphonia*. A droite le gel de migration des produits PCR après digestion. Les numéros correspondent au type de profil observé. SL, correspond au marqueur de taille utilisé.

Calliblepharis jubata

Calliblepharis jubata est l'espèce présentant la plus grande diversité mitochondriale (*cox1* 690 bp). En effet, 7 mitotypes caractérisés par 7 sites polymorphes et des divergences comprises entre 0.15% et 0.43% ont été mis en évidence. On retrouve un mitotype majoritaire M1 (227 spécimens sur 292 échantillonnés) présent dans toutes les localités (Figure 7).

Saint-Malo et Concarneau présentent les deux même haplotypes (M1 et M2) tandis que Roscoff, Primel et Quiberon partagent les deux mitotypes (M1 et M4). L'haplotype M3 n'est trouvé qu'à Omonville-la-petite et M5 qu'à Quiberon. Enfin les haplotypes M6 et M7 ne sont trouvés qu'à Roscoff.

Le marqueur chloroplastique (*rbcL*, 1240 bp) présente 2 chlorotypes dont un identifié seulement à Quiberon et toujours associé au mitotype M1. Un patron similaire est observé pour le marqueur nucléaire (28S, 874 bp) avec un ribotype majoritaire identifié dans toutes les localités et un ribotype seulement observé à Concarneau et Omonville la petite. Les deux autres marqueurs, le spacer *rbcL* (333 bp) et le spacer *cox2-3* (350 bp), ont été testés mais n'ont pas révélé une diversité génétique plus élevée (données non montrées).

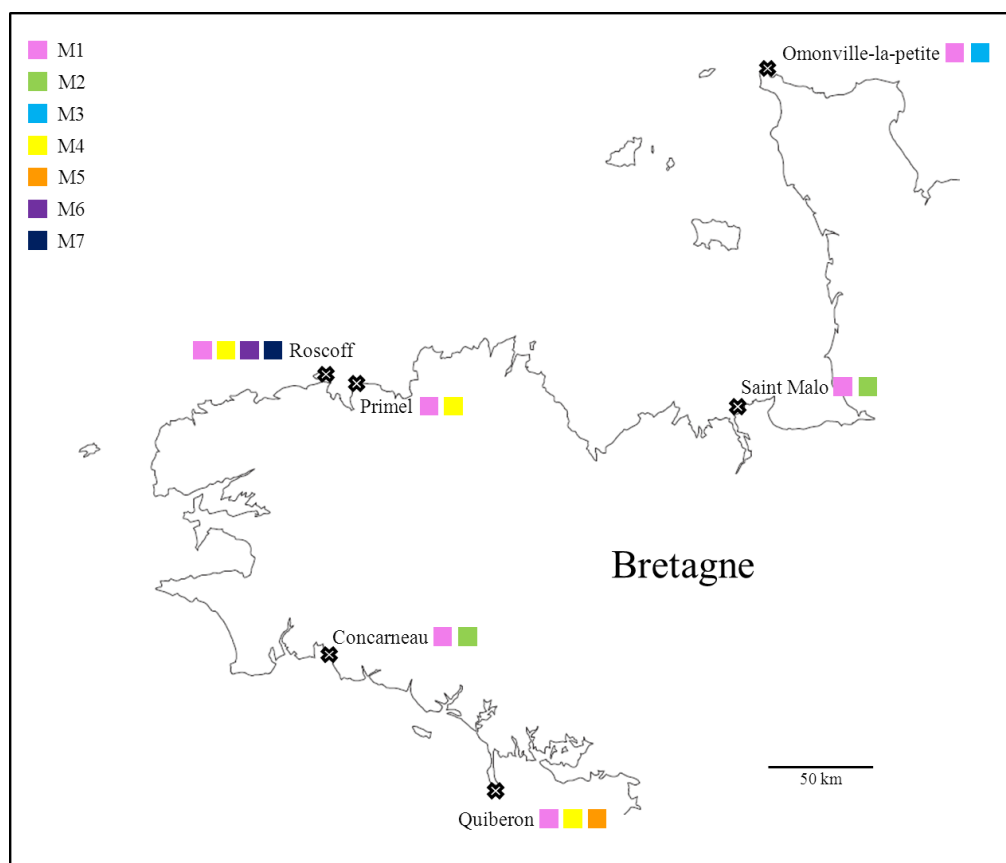


Figure 7 : Répartition des différents mitotypes (M1 à M8) identifiés chez *Calliblepharis jubata*.

Bifurcaria bifurcata

La caractérisation génétique de *Bifurcaria bifurcata* a été réalisée à l'aide de deux marqueurs de l'ADN cytoplasmique (Tableau 5). En effet le séquençage des espaces intergéniques (ITS) s'est révélé infructueux. L'étude du marqueur chloroplastique (*rbcL* 1322 bp) montre l'existence d'un chlorotype unique pour l'ensemble de l'échantillonnage. Quatre mitotypes sont identifiés pour le *cox1* (680 bp), dont un majoritaire M1 (715 spécimens sur 725 échantillonnés) est présent dans toutes les localités. Trois localités présentent un mitotype unique, en Espagne en Corogne (1 spécimen avec le mitotype M2), Omonville-la-petite (2 spécimens avec le mitotype M3) et Roscoff (2 spécimens avec le mitotype M4). La divergence entre haplotypes est comprise entre 0,15% et 0.30% (1-2 bp).

Pylaiella littoralis

Les résultats sont détaillés dans le chapitre 2 où une approche intégrative a été menée.

Cladophora rupestris

Dans le cas de cette espèce, aucun des marqueurs testés n'a pu être séquencé. En effet, soit l'amplification n'était pas de bonne qualité (Figure 8, plusieurs bandes apparaissant sur le gel d'électrophorèse) soit, dans les cas des marqueurs ITS, le séquençage ne permettait pas d'obtenir une séquence lisible.

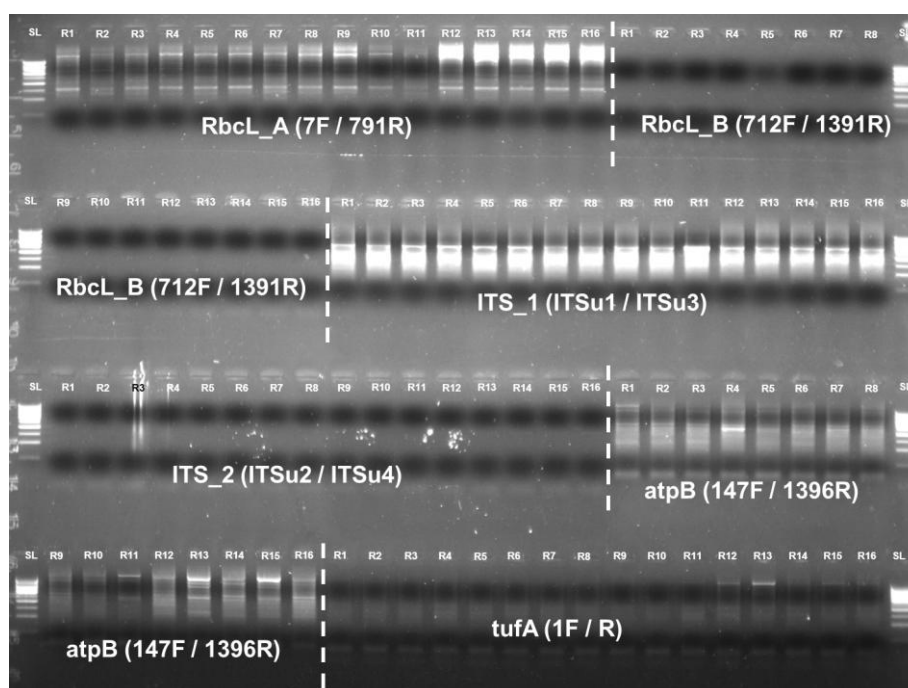


Figure 8 : Exemples de mauvaises amplifications ou de non amplification avec plusieurs marqueurs testés sur *Cladophora rupestris*.

IV. Discussion

L'approche de type barcode multilocus a permis d'authentifier génétiquement la quasi-totalité des espèces cibles du projet. Toutes les nouvelles séquences obtenues dans ce travail ont été ou seront déposées dans la base de données publique internationale GenBank du Centre National pour l'Information Biotechnologique (NCBI) et constitueront la base de la « certification d'espèce algale ». Cette base de données contenant les « signatures ADN » permettra de garantir l'identification des espèces cultivées dans le cadre du projet (Annexe 2). De plus ces signatures ADN serviront pour la traçabilité du matériel biologique lors des étapes de transformation des algues, de la culture à l'extraction des produits actifs quel que soit la forme du produit (jeunes plantules, algues séchées, algues en poudre). La collection de spécimens (plus de 1500 individus conservés sec dans le silicagel et de 100 planches d'herbier) qui est stocké à la Station Biologique de Roscoff pourra servir de base de référence de biodiversité pour des études ultérieures.

En 2001, une réglementation sur l'étiquetage des produits de la pêche et de l'aquaculture est entrée en vigueur dans l'Union européenne, ce qui a nécessité l'identification du nom commercial officiel et scientifique, ainsi que l'origine et la méthode de production (sauvage ou de culture). Ce règlement vise à fournir aux consommateurs un minimum d'informations sur les caractéristiques des produits (Moretti et al. 2003). L'identification rapide par méthode RFLP apparaît comme un moyen efficace dans l'identification des espèces dans un contexte industriel. Par exemple, Joubert et al. (2009) ont montré l'intérêt de ce type d'approche par RFLP pour identifier *Gracilaria verrucosa* (*G. gracilis* (Stackhouse) M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham), seule agarophyte autorisée en Europe comme « légume » de mer, parmi d'autres espèces de *Gracilariopsis*.

Dans le cadre du projet AQUACTIFS, les travaux réalisés par les partenaires industriels ont permis d'identifier de nouveaux produits actifs à partir des nouvelles espèces cultivables et de développer des processus pour extraire ces produits. L'originalité de la démarche employée dans cette étude a été d'associer aux différents processus d'extraction et de culture les signatures ADN. En général, les brevets sont déposés sur un nom d'espèce reconnu taxonomiquement au moment du dépôt. L'avancée des méthodes de délimitations d'espèces (cf. introduction) remet souvent en cause la phylogénie et par la même occasion entraîne des changements de nomenclature. Par exemple de nombreux brevets ont été déposés sur le genre

Porphyra (Arnaud-Haond et al. 2011) et pourtant une étude récente (Sutherland et al. 2011) remet en cause la classification de ce genre. Les brevets déposés sans séquences ADN et seulement sur la base d'un nom, sont-ils toujours valables ? L'intérêt majeur est que la séquence ADN sera reconnue même en cas de nouvelle dénomination de l'espèce. Ainsi chaque brevet pourra être associé à une espèce caractérisée à l'aide de plusieurs séquences ADN (plusieurs gènes et variabilité intra espèce) afin de garantir son identification. Aujourd'hui, 90% des brevets, déposés et associés à une séquence ADN d'espèce marine, sont détenus par seulement 10 pays. La France ne se classe que 4^{ème} loin derrière les Etats Unis, l'Allemagne et le Japon (Arnaud-Haond et al. 2011).

Par ailleurs, les analyses génétiques ont permis d'une part d'estimer la biodiversité de la ressource des espèces cultivables et d'autre part de mettre en évidence sur les côtes Bretonnes l'existence d'une nouvelle espèce introduite, *Polysiphonia morrowii*, originaire du Pacifique Nord-ouest (cf. Chapitre 3). Nous avons également caractérisé l'espèce *Neosiphonia harveyi* et identifié une nouvelle espèce dans ce genre, *Neosiphonia flavimarina* qui pour le moment n'est répertoriée qu'en Corée (Lee et Kang 2001) suggérant que cette espèce est une nouvelle introduction en Bretagne.

Une première estimation de la variabilité génétique intraspécifique a été faite le long des côtes bretonnes (du golfe Normano-Breton au sud Bretagne) pour les différentes espèces cibles. En effet les conditions environnementales sont différentes en fonction des localités et l'on peut supposer que certains génotypes puissent être acclimatés aux conditions d'une localité. Une finalité pour les industriels consistait à cultiver les espèces en pleine mers sur des sites se trouvant à Saint-Malo et Roscoff (Encadré 2). Finalement les résultats ont montré que chaque espèce était caractérisée par un génotype majoritaire. La culture entre les sites de Saint-Malo et Roscoff ne pose a priori pas de problème car pour les trois espèces, le génotype majoritaire est présent dans les deux localités. Les résultats montrent également qu'on ne détecte pas de différence entre la France et l'Espagne (pour *Calliblepharis jubata* et *Bifurcaria bifurcata*) ou le Portugal (pour *Bifurcaria bifurcata*), mis à part un individu de *Bifurcaria bifurcata* qui présente un mitotype unique en Espagne. Les marqueurs choisis ne présentent pas une variabilité suffisante pour distinguer les individus provenant de ces trois pays. On rencontre tout de même un nombre important de mitotypes chez *Calliblepharis jubata*.

Enfin, les différents marqueurs que nous avons testés sur l'espèce *Cladophora rupestris* n'ont pas permis de caractériser cette espèce génétiquement. Le gène *cox1* n'a pas été utilisé car l'amplification n'est pas possible dans la plupart des taxons (Moniz et Kaczmarska 2009). En effet dans ce groupe, ce gène peut contenir plusieurs introns (par exemple, cinq chez *Chaetosphaeridium*, Turmel et al. 2002), bien que la position et le nombre d'introns dans le gène ne soient pas connus pour la plupart des espèces. Les problèmes rencontrés pourraient provenir du protocole d'extraction d'ADN mais cette hypothèse est rejetée du fait que l'on observe tout de même des amplifications mais de mauvaises qualités. Le problème pourrait peut-être être expliqué par un manque de spécificité des amorces utilisées entraînant une amplification multi bandes ou aucune amplification ; ou encore à la présence d'introns empêchant le séquençage (Turmel et al. 2002). Il serait alors nécessaire de redéfinir des amorces à partir des amplifications obtenues (Figure 8). Par exemple, il est possible de découper directement sur gel une bande de produit PCR, de la purifier puis de séquencer ce fragment. Ensuite des amorces peuvent être redéfinies à partir de cette séquence. Tout cela implique des difficultés techniques et il serait intéressant de choisir un marqueur pouvant être utilisé sur des espèces proches afin de pouvoir délimiter *Cladophora rupestris* par rapport aux espèces proches. Nos résultats sont congruents avec ceux de Saunders et Kucera (2010) qui ont rencontré les mêmes difficultés et qui concluent que « l'identification d'un premier marqueur (pour les Cladophorales) peut s'avérer un défi considérable ».

Chapitre 2

Chapitre 2. Mise en évidence d'espèces cryptiques chez *Pylaiella littoralis*

I. Contexte de l'étude et principaux résultats.

La majorité de descriptions d'espèces est encore aujourd'hui basée sur le concept morphologique ou typologique de l'espèce (Mayden, 1997) car le concept biologique proposé par Mayr (1942) n'est apparu que très tardivement et que celui-ci n'a été adopté par la communauté des biologistes qu'encore plus récemment. Par conséquent, on peut considérer que, comme la spéciation ne s'accompagne pas nécessairement de changement morphologique, le nombre d'espèces existantes est sous-estimé par rapport aux espèces inventoriées et décrites d'après leur morphologie. Ce phénomène qui se traduit par des erreurs d'identification peut entraîner de lourdes conséquences en particulier pour les espèces d'intérêts économiques, utilisés dans l'alimentation et/ou dans les secteurs médicaux ou paramédicaux.

On appelle espèces cryptiques, des espèces distinctes qui ont été classifiées par erreur sous un seul nom d'espèce car elles étaient impossibles à séparer d'après leur morphologie. Par exemple, Saunders et Lehmkuhl (2005) mettent en évidence 4 espèces cryptiques en Europe du nord, répertoriées sous le nom de *Plocamium cartilagineum*. Dans certains cas, ces espèces cryptiques sont phylogénétiquement proches et correspondent donc à un phénomène de différenciation récent, on parle alors d'espèces jumelles (Sáez et Lozano 2005). L'absence de différence morphologique entre espèces pourrait s'expliquer par des effets de sélection entraînant une stase morphologiques (Bickford et al. 2007).

L'utilisation des techniques moléculaires et principalement l'obtention de séquences nucléotidiques a profondément modifié la façon d'identifier et de décrire les espèces. En effet, les données moléculaires, constituant un nombre important de caractères (plus ou moins neutres suivant les séquences étudiées), sont de plus en plus utilisées en taxonomie. Ces données peuvent être combinées à d'autres critères (morphologiques) assurant ainsi une meilleure efficacité pour discriminer deux espèces. Après l'identification spécifique, la délimitation d'espèces est donc le second objectif du barcoding (Herbert et al. 2004). Chez les algues l'utilisation d'approches moléculaires a révélé l'existence d'une diversité non décelable par une approche morphologique (pour exemple McIvor et al. 2001, Zuccarello et

al. 2003, Guillemin et al. 2008, Tellier et al. 2009). En effet malgré leur morphologie relativement simple, l'incapacité à distinguer les traits diagnostiques de la plasticité phénotypique a souvent contribué à des erreurs dans la délimitation d'espèce (Tronholm et al. 2010). Enfin, l'utilisation des méthodes moléculaires (barcoding multilocus et /ou microsatellites) a permis de souligner l'absence de croisement entre espèces cryptiques ou jumelles (Tellier et al. 2009, 2011) ou au contraire de mettre en évidence des phénomènes d'introgession ou d'hybridation entre espèces (Billard et al. 2005, Engel et al. 2005, Destombe et al. 2010).

Dans le cas des algues brunes du genre *Pylaiella*, la taxonomie a longtemps été débattue sans pour autant parvenir à un consensus général. Dans ce chapitre nous nous intéresserons à l'espèce, *Pylaiella littoralis*, fréquente sur les côtes Bretonnes. Cette espèce a, de plus, été largement utilisée comme modèle pour étudier les premières étapes du développement (e.g. Mejjad et al. 1992) et a fait l'objet de nombreuses études en biologie moléculaire (Dalmon et Loiseaux 1981, Fontaine et al. 1995, Fontaine et al. 1997, Loiseaux-De Goër et al. 1988). Dans notre étude, en utilisant des marqueurs mitochondriaux, chloroplastiques et nucléaires, couplés à une analyse de marqueurs hypervariables (microsatellites), nous avons mis en évidence la présence de deux entités génétiques distinctes dans les mêmes habitats mais occupant des niches écologiques différentes, décalées dans le temps. Il est intéressant de noter que cette saisonnalité avait déjà été observée par les exploitants directement dans les populations naturelles mais également sur les filins de culture. Le premier pic de biomasse maximale était observé au printemps et le second à la fin de l'été.

Cette étude met en évidence la présence de deux espèces cryptiques sous le nom de *Pylaiella littoralis*. Cette observation peut avoir des répercussions importantes sur le développement de l'aquaculture. En effet, leurs conditions optimales de croissance sont probablement différentes nécessitant un ajustement des pratiques culturales. De même, il serait important d'étudier séparément la qualité et la quantité des substances actives entre les deux espèces. Enfin, il est essentiel de traiter indépendamment les processus d'extraction de substances sur ces deux espèces en les associant à leurs séquences ADN.

II. Article 1: « Unraveling sibling species within *Pylaiella littoralis* (Ectocarpales, Pheophyceae) using phylogenetic, ecological and biological evidences»

Alexandre Geoffroy, Stéphane Mauger, Christophe Destombe and Line Le Gall – en preparation pour Molecular Ecology

Unraveling sibling species within *Pylaiella littoralis* (Ectocarpales, Pheophyceae) using phylogenetic, ecological and biological evidences

Alexandre Geoffroy^{1, 2}, Stéphane Mauger^{1, 2}, Line Le Gall³ and Christophe Destombe^{1, 2}

¹ **UPMC Univ Paris 06**, UMR 7144, Équipe ‘‘BEDIM’’, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, F-29682 Roscoff Cedex, France.

² **CNRS**, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Équipe ‘‘BEDIM’’, Station Biologique de Roscoff, **29682 Roscoff, France**.

³ **Muséum National d’Histoire Naturelle (MNHN)**, UMR 7138, Systématique, Adaptation et Evolution, 57 rue Cuvier, CP 39, 75231 Paris Cedex 05, France.

Contact: geoffroy@sb-roscoff.fr

Keywords: *Pylaiella littoralis*, multilocus barcode, cryptic species, Brittany, microsatellites, Ochrophyta.

Abstract

The wide phenotypic variability and the lack of diagnostic characters in the genus *Pylaiella* render the systematic study of this genus problematic. During the last century, many authors described a multitude of species, varieties or forms according to their morphology, their life history and their ecology, nevertheless no clear consensus was reached. In the present study, we investigated the diversity of *Pylaiella littoralis* along the Brittany coast using a DNA barcoding multilocus approach with nuclear, mitochondria and chloroplast markers associated with population genetics approach to study the reproductive systems using microsatellite markers. Moreover, spatio-temporal sampling was conducted to detect genetic variations among populations as well as possible phenological difference between populations. We sampled 180 individuals from 8 sites located between Saint-Malo and Quiberon (450km) from March to October. Our results highlighted the occurrence of two genetic entities based on mitochondrial sequences (*cox1*) showing a minimum of 2.2% divergence between them. Instead the analysis of chloroplast (*rbcL*) and nuclear (ITS2) sequences revealed only one group (haplotypic divergence ranging from 0 to 0.7% and 0 to 0.47% respectively) may reflect ancestral genotypes corresponding to a recent differentiation of the two entities. Analyze of the geographical clustering pattern based on microsatellites revealed a high genetic differentiation between two entities and also between populations of each entity. These two species were found in the same environment; however their growths were shifted in time. This phenological shift might have therefore impeded genetic connectivity between the different populations. We can hypothesis that barriers to gene flow could evolve between populations of *Pylaiella* as a result of ecologically-based divergent selection between environments.

INTRODUCTION

Most species descriptions in algal groups follow the morphological species concept (Mayden 1997). Species are generally recognized by discontinuities in morphological characters. In raison of phenotypical plasticity and the lack of differential character in some groups, species delimitations are however often problematic. The absence of understanding of the variability of morphological characters has led to an erroneous taxonomy (Tronholm et al. 2010). DNA molecular data have become the best proxy of evolutionary processes and are commonly used to infer genetic relationships. Different tools and applications focusing on different levels of organization were employed to assess biological relationships. For example, phylogenic approach (including barcoding) deals with evolutionary relationship between taxa whereas population genetics investigate the variation within and among population of a single species. The development of DNA barcoding has proven an effective tool for delineating species (Sites and Marshall 2003, Wiens 2007) whereas the approach of population genetic has been used to detect gene flows among related taxa and to point out hybridization or introgression events.

The genus of the brown algae *Pylaiella* is composed of uniseriate filamentous species showing various branching patterns. Species of *Pylaiella* show great phenotypic plasticity and the lack of diagnostic characters in this taxa render the species delimitation problematic and some species are consequently often misidentified (Fritch 1952). More than 90 specific and infraspecific names have been reported in this genus, of which only seven are currently accepted taxonomically (Guiry and Guiry 2012). *Pylaiella littoralis* (Linnaeus) Kjellman is the most common accepted species and was reported worldwide in the littoral zones of cold temperate coasts of both hemispheres (Müller and Stache 1989). More than 15 forms or varieties were described in this species on the basis of morphology and also on life history traits, habit and seasonal distribution characteristics (Newton 1931, Russell 1963). A

complete life history with an alternation between diploid sporophytes and haploid gametophytes were observed by Knight (1923) in *P. littoralis*. However, according to their reproductive organs, Kylin (1933) distinguished two different forms of *P. littoralis* the first one with an alternation of sporophytes and gametophytes and the other one (*P. littoralis* f. *rupincola*) with sporophytes only. Knight (1929) suggested that in this last form, the spores produced by the unilocular sporangium acted as gametes whereas Kylin (1933) hypothesized that spores produced new sporophyte without fertilization. West (1967) confirmed that some culture of *Pylaiella* reproduced only via unilocular sporangia without any plurilocular gametangia. However, many authors reported that these various forms and varieties could be attributed to phenotypic plasticity (i.e. Knight 1923, Newton, 1931, Russell 1963, 1967, and Bolton 1979) and no clear consensus was adopted on this taxonomy (Siemer and Pedersen 1995). Species identification within the genus *Pylaiella* would benefit greatly from the application of molecular tools.

The aims of this study are therefore to define species limits and relationships in *Pylaiella* populations from Brittany coast. Toward this goal we applied DNA barcoding, using the subunit 1 of the cytochrome c oxydase (*cox1*) gene from the mitochondrial genome. We also compared the resolution of this marker with the nuclear internal transcribed spacer (ITS) and the large subunit of the ribulose-bisphosphate carboxylase gene (*rbcL*). Moreover, we used a population genetics approach to study the reproductive systems in this group using microsatellite markers. Spatio-temporal sampling was conducted to detect genetic variation among populations as well as possible ecological difference between populations.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

One hundred and seventy-eighty specimens of *Pylaiella littoralis* were sampled at eight different localities (1–67 specimens per site) along the coast of Brittany, France from Dinard to Quiberon (about 450 km apart). Sampling was conducted from March to October (Table 1). In the laboratory, a fragment of tissue from each individual was preserved in silica gel for molecular analysis. Moreover, at least one specimen from each site was pressed and mounted on a herbarium sheet to preserve anatomical features.

To complete the sampling, two strains of reference (1330/1 and 1330/2) of *Pylaiella littoralis* from the CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) isolated respectively at Roscoff in 1970 and 2002, were included in the analysis. Additionally, in order to compare interspecific divergences in other related Ectocarpales species, referenced strains of three species of *Ectocarpus* (*Ectocarpus siliculosus* (N = 6), *Ectocarpus crouaniorum* (N = 4) and *Ectocarpus fasciculatus* (N = 3)) from cultures collection of the Roscoff Biological Station (A. Peters) were studied.

DNA extraction, amplification and sequencing

DNA was extracted from 5-10 mg of dry algal tissue using the Nucleospin® Multi-96 plant kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. Sequences of four mitochondrial genes *cox1* (680 nt), *nad1* (800 nt), *nad4* (760 nt) and *atp9* (200 nt), and of the two plastid genes *rbcL* (1300 nt) and *atpB* (630 nt) were amplified and sequenced. Primers and PCR reactions were performed according to Silberfeld et al. (2010). *Cox1* and *rbcL* genes were sequenced for all specimens (i.e. 178 individuals of *Pylaiella littoralis* and two CCAP strains). For others mitochondrial and chloroplast genes (*nad1*, *nad4*, *atp9* and *atpB*) a subsample of 45 individuals of *P. littoralis* was used to confirm result with other genes.

Location	N _T	Rename population	Sampling date	N	nh <i>cox1</i>	nh <i>rbcL</i>	nh <i>rbcL</i> share	N _a	H _e	H _o	<i>F_{is}</i>
Rothéneuf	4	ROT_SP1	April 2010	3	3	0	3	3.3	—	—	—
		ROT_SP2	April 2010	1	1	0	3	1.6	—	—	—
Saint Malo	41	ST_SP1	October 2008; June 2009	37	4	4	3	16.9	0.720	0.492	0.329
		<i>ST_SP1A</i>	<i>October 2008</i>	32	4	4	—	14	0.672	0.495	0.278
		<i>ST_SP1B</i>	<i>June 2009</i>	5	2	2	—	4.8	—	—	—
		ST_SP2	June 2009	4	3	2	3	3.9	—	—	—
Dinard	16	DI_SP1	April 2010	12	2	0	6	6.7	0.694	0.614	0.157
		DI_SP2	April 2010	4	2	3	6	3.6	—	—	—
Primel	2	PR_SP1	October 2010	2	2	0	2	2.4	—	—	—
		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Roscoff	65	RO_SP1	October 2008; March 2009; May 2009-2010	34	3	4	4	15.7	0.751	0.565	0.260
		<i>RO_SP1A</i>	<i>October 2008</i>	18	2	1	—	9.6	0.658	0.554	0.186
		<i>RO_SP1B</i>	<i>March 2009</i>	2	1	1	—	1.9	—	—	—
		<i>RO_SP1C</i>	<i>May 2009</i>	1	1	1	—	1.6	—	—	—
		<i>RO_SP1D</i>	<i>May 2010</i>	12	3	4	—	8.5	0.741	0.608	0.221
		<i>RO_SP1E</i>	<i>CCAP strain 1970</i>	1	1	1	—	1.2	—	—	—
		RO_SP2	April 2009; May 2010	33	7	7	3	12.8	0.658	0.57	0.148
		<i>RO_SP2A</i>	<i>April 2009</i>	26	6	10	—	9.6	0.608	0.584	0.058
		<i>RO_SP2B</i>	<i>May 2010</i>	6	3	1	—	4.4	—	—	—
		<i>RO_SP2C</i>	<i>CCAP strain 2002</i>	1	1	1	—	1.2	—	—	—
Térénez	1	TZ_SP1	June 2009	1	1	0	1	1.7	—	—	—
		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Concarneau	21	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CO_SP2	April 2011	21	2	2	1	9.6	0.617	0.524	0.174
Quiberon	28	QI_SP1	March 2009	21	7	1	4	10	0.607	0.489	0.218
		QI_SP2	March 2009	7	4	1	4	4.3	—	—	—

Table 1. Characteristics of *Pylaiella littoralis* samples ; N_T, total sample size, N, number of individuals recognized as SP1 or SP2 according to *cox1*, nh *cox1* and nh *rbcL*, number of haplotype specific to SP1 or SP2; nh *rbcL* share, number of haplotype shared by SP1 and SP2; N_a, mean number of allele per locus; H_e: multilocus non-biased expected heterozygosity; H_o, observed heterozygosity; F_{IS}, multi-locus inbreeding coefficient; Bold *F_{is}* values indicates that Hardy-Weinberg equilibrium was rejected at the 5% level after correction for multiple tests. NA, no data.

One nuclear sequence (ITS2) was amplified and analyzed according to Lane et al. (2006) for one hundred specimens. PCR products were purified and sequenced by LGC genomics (Berlin, Germany). The obtained sequences were edited and aligned using Codoncode Aligner v. 3.7 (www.codoncode.com).

Phylogenetic approach

Phylogenetic relationships among *mtDNA* and *cpDNA* haplotypes were reconstructed using median-joining networks with Network version 4.2.0.1 (Bandelt et al. 1999). Mismatch distribution analyses were done for *cox1* and *rbcL* genes. Pairwise comparisons were calculated for each gene to determine the threshold between intraspecific and interspecific divergences (Puillandre et al. 2011).

Population genetic approach

Microsatellite markers developed for *Ectocarpus siliculosus* (Cock et al. 2010) were transferred to *Pylaiella littoralis*. Over sixty microsatellites analyzed, thirty showed a repeatable positive amplification but only ten showed reading signal after sequencing (Table 2).

Table 2. List and characteristics of microsatellites makers used for population analysis. N_a , number of alleles detected for each locus.

Marker name	Gene Location	Length	Left primer	Right primer	T _m (°C)	Product Size	N _a
M-168	No Gene	76	AAACTACACCAACGAAATCAA	AACCAACCTCCTCCAATC	50	279	37
M-239-3	No Gene	66	ATAAGACTCAGCAAGAGGCAG	CATTGAACGACAAATCCC	50	241	51
M-383-1	Intron	76	GGGTGAGACAGTAGTAGCAGG	CTCGGAACAGGAAGGTTT	50	240	53
M-392	Intron	137	CTTGTGTGCGTGCTGTTG	GACTTAGATTTCCGTGTCCTC	54	304	24
M-199-3	No Gene	42	GCAGTAGTAGCAGTAGTCGG	TTCATTGTGTTCTTCTTCGTC	50	227	20
M-231	Exon	91	CGGTGACAGATAGACAGACAG	CCCTCAGTTGTTCTCAAGT	50	193	40
M-028-1	Intron	126	ATTACAGCAAGGACAAATGG	TAAGAAGGACTGGTGGAGG	54	262	18
M-105-1	Intron	106	CTACTCTCCGCAATAAAGACA	AGGTATGAACACGACGACAG	50	298	49
M-138	No Gene	69	TGTCTGAATGTTGATGTGTGT	AGGGTAGGCAAAGAATGG	50	271	37
M-194	Intron	91	GTCGGATGACGAGGACTT	AATGTTTATTTAGGCTTTGCT	50	296	57

These ten markers were used for the population analysis for the 180 specimens of *Pylaiella littoralis* according to the following method. Reaction mixture containing 0.5× PCR buffer (Abgene), 125 mM each dNTP, 1 pmol each primer, 1.5 mM MgCl₂, 1 U Taq polymerase (Abgene) and 3 µl of DNA (1:25 dilution); PCR cycling included an initial denaturing step at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 30 s, 50 or 54 °C for 30 s and, 72 °C for 30 s with a final elongation step of 72 °C for 10 min. Amplification products were separated by electrophoresis on an ABI 3130xl DNA sequencer (Applied BiosystemsTM) and alleles were scored using GeneMapper[®] v. 4.0 (Applied BiosystemsTM).

Standard measures of genetic diversity were estimated using GenAlEx version 6.41 (Peakall and Smouse 2006): mean number of alleles per locus (N_a) was calculated in 13 populations (seven populations of *P. littoralis* SP1 and six populations of *P. littoralis* SP2). Observed heterozygosity (H_o), and multi-locus inbreeding coefficient (F_{IS}) have been estimated in six populations (four populations of *P. littoralis* SP1 and two populations of *P. littoralis* SP2). Moreover, all pairs of loci across sites were tested for linkage disequilibrium using a Markov chain approximation of an exact test as implemented in GENEPOP web version 4.0.10 (Raymond and Rousset 1995) and the genetic structure between sampled populations was computed by calculating an estimate of F_{ST} (Weir & Cockerham 1984). For each population, allele frequencies were calculated at all 10 loci, and a correspondence analysis (CA) based on these data was performed using the AFC procedure implemented in the GENETIX software (Belkhir 2003). As recommended by Jombart et al. (2009), we excluded alleles with frequencies lower than 5%. CA was thus performed with 61 of the 386 alleles identified.

In a separate analysis, the most likely number of genetic clusters was inferred using STRUCTURE version 2.2 (Pritchard et al. 2000) on the 13 populations. This program was

run under the admixture and independent allele frequency model using a Markov chain Monte Carlo length of 250000 steps after a burn-in of 50000. The number of clusters (K) was determined by estimating the probability of the data [$\log \Pr (X|K)$] for runs with K= 2-12, averaged over 20 independent runs. The value of K that most likely captured the major structure in the data was determined as the smallest K at which average $\log \Pr (X|K)$ estimates leveled out. For the selected K, results from replicate runs were averaged with CLUMPP version 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007) and displayed graphically using DISTRUCT version 1.1 (Rosenberg 2004).

RESULTS

Haplotypic diversity

Sequences comparisons of the 5' end of the *cox1* gene (682 bp) obtained for 180 specimens revealed a total of 37 polymorphic sites (5.4 %) corresponding to 27 mitotypes (Figure 1). These mitotypes were clearly separated in two distinct clusters, named respectively SP1 and SP2, including respectively 13 and 14 mitotypes. Analysis of mismatch distributions of the *cox1* sequence, considering all the analyzed individuals was represented in Figure 1. This bimodal distribution showing two peaks (2 and 19 differences) confirmed the existence of barcode gap between SP1 and SP2 groups. A minimum of 15 nucleotide divergence was observed between mitotypes of these two groups. Group SP1 was mainly represented by three mitotypes (M1a, M2a and M3a), four mitotypes were represented by unique individual (M10a, M11a, M12a and M13a). In SP1, the intragroup haplotypic divergence ranged from 0 to 0.7 %. Group SP2 was mostly represented by 4 mitotypes (M1b, M2b, M3b and M4b), two mitotypes were represented by unique individual (M13b and M14b) and the intragroup haplotypic divergence ranged from 0 to 0.9 %. Similar results are obtained for other

sequenced genes *nad1*, *nad4* and *atp9* with respectively 24, 27 and four polymorphic sites. For these three genes, the minimum of divergence between SP1 and SP2 reached 1.5% (Table 3). The sequence of the CCAP strain of *P. littoralis* (1330/1) corresponds to the haplotype M1a of the SP1 group whereas the sequence of the strain 1330/2 corresponds to the haplotype M5b of the SP2 group.

Table 3. Percentage of divergence for different genes sequencing in this study between Ectocarpales species. NA, no data.

Comparison	Mitochondria				Chloroplast			Nuclear
	<i>cox1</i>	<i>nad1</i>	<i>nad4</i>	<i>atp9</i>	<i>rbcL</i>	<i>atpB</i>	<i>cox1/rbcL</i>	ITS2
<i>Pylaiella littoralis</i> SP1 - SP2	2.2 - 3.4	1.8 - 2.3	2.8 - 3.3	1.5 - 2	0 - 0.7	0 - 0.2	3.1	0 - 0.47
<i>Ectocarpus siliculosus</i> - <i>E. fasciculatus</i>	6.8 - 6.9	6.5 - 6.8	NA	3.4	2.3 - 2.4	3 - 3.6	2.8	NA
<i>Ectocarpus siliculosus</i> - <i>E. crouaniorum</i>	5.1 - 5.4	7.3 - 7.5	NA	0.9	0.8 - 0.9	1.6 - 2	5.6	NA
<i>Ectocarpus fasciculatus</i> - <i>E. crouaniorum</i>	8.1 - 8.7	7.5 - 7.6	NA	2.9	2.4 - 2.5	3.3 - 3.9	3.3	NA

Analysis of *rbcL* sequences (1321 bp) showed high chlorotypes diversity (23) with 12 polymorphic sites (0.9 %); nevertheless these chlorotypes did not cluster in conspicuous groups (Figure 2). The two groups SP1 and SP2, resulting from *cox1* clustering, shared 37.5 % of chlorotypes (seven over 16 haplotypes present in at least two copies) whereas seven were unique for SP1 group (CL3, CL4, CL10, CL11, CL15, CL18 and CL20) and ten were unique for SP2 group (CL8, CL9, CL13, CL14, CL16, CL17, CL19, CL21, CL22 and CL23). Group SP1 was mostly represented by three chlorotypes (CL2, CL3 and CL4) while the Group SP2 was represented mostly by a single haplotype (CL1). Mismatch distribution did not revealed a clearly bimodal pattern (Figure 2) however the distribution showed two peaks at about two and five differences.

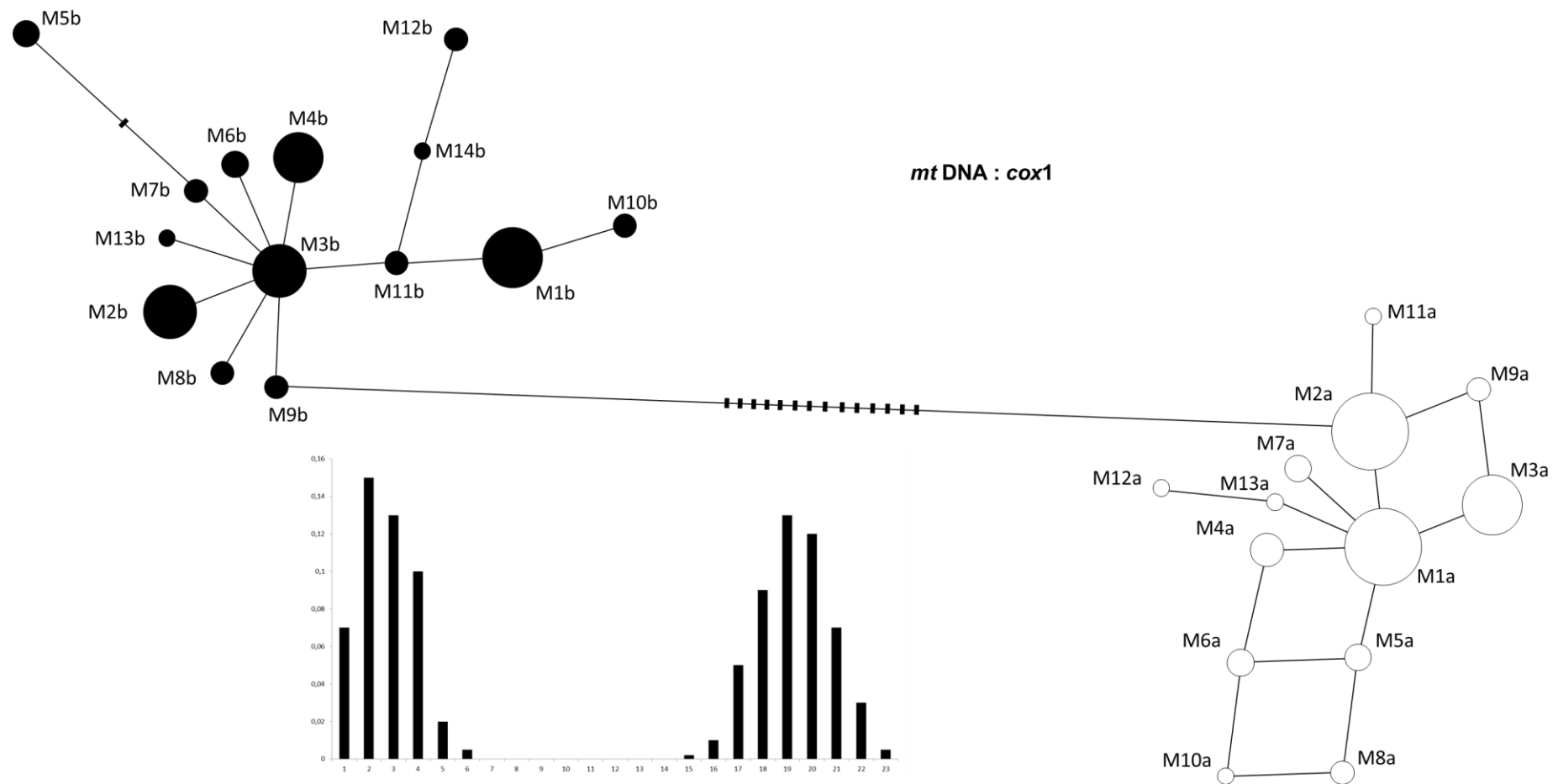


Figure 1. MJ network analysis of the relationships among haplotypes of *cox1* coding sequence from 180 individuals of *Pylaiella littoralis*. Circle area is proportional to haplotype frequency. Lines drawn between haplotypes represent mutation events. White circle is defined like SP1 and black circle like SP2. Bar corresponds to supplementary mutation. Below, mismatch distribution histogram for *mtDNA* haplotypes, indicating observed numbers of pairwise differences frequency between *Pylaiella littoralis* individuals.

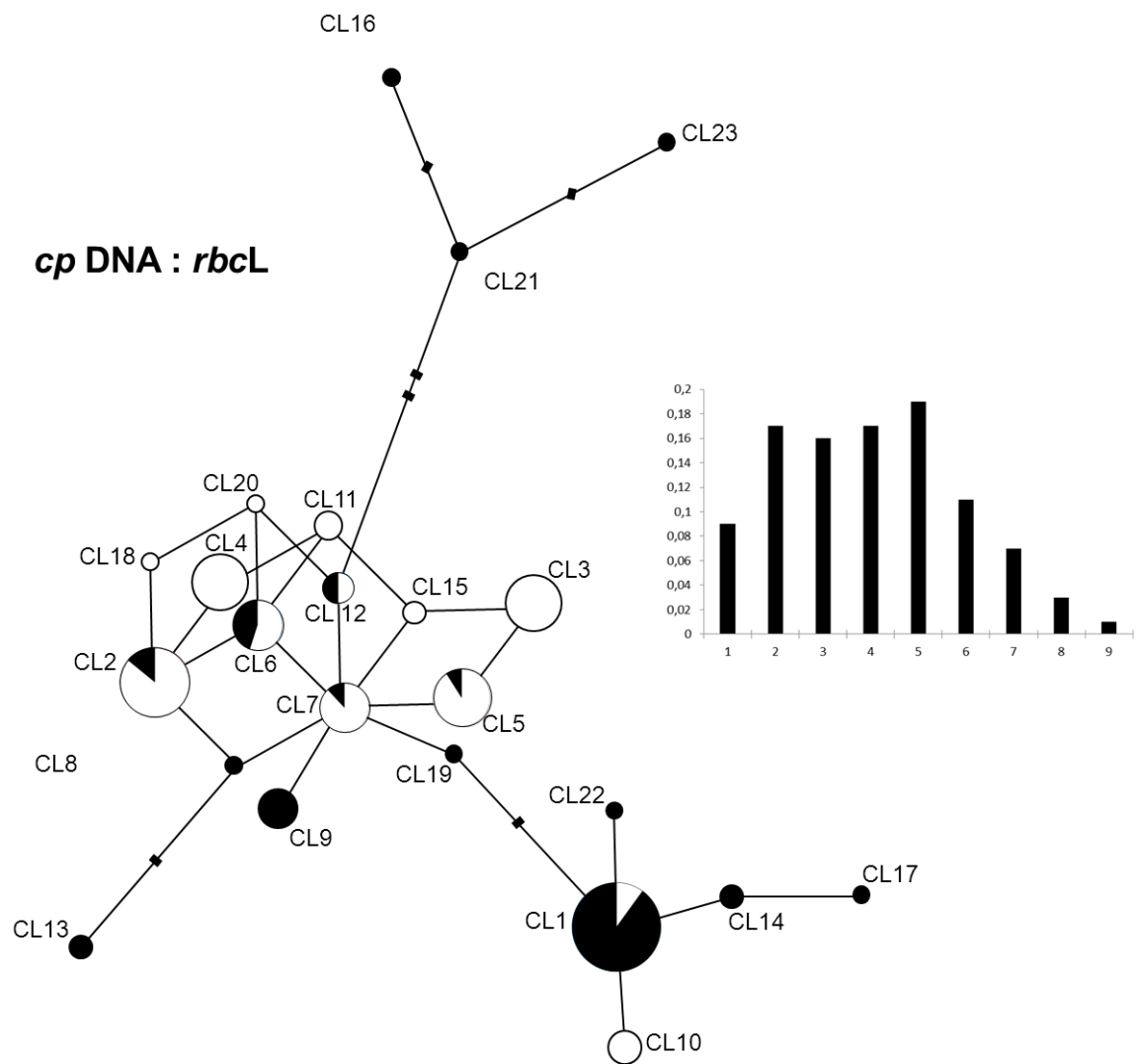


Figure 2. MJ network analysis of the relationships among haplotypes of *rbcL* coding sequence from 180 individuals of *Pylaiella littoralis*. Circle area is proportional to haplotype frequency. Lines drawn between haplotypes represent mutation events. The haplotypes in white and in black correspond respectively to the individual having SP1 and SP2 mitotypes. Bar corresponds to supplementary mutation. Below, mismatch distribution histogram for *cpDNA* haplotypes, indicating observed numbers of pairwise differences frequency between *Pylaiella littoralis* individuals.

Results for the *atpB* gene were congruent with those of *rbcL* showing only one polymorphic site (divergence of 0.2%) and two haplotypes shared by SP1 and SP2 (Table 3). Analysis of ITS2 sequences (423 bp) showed three ribotypes with a divergence range from 0.23% to 0.47% (Table 3). One ribotype was shared by SP1 (N = 51) and SP2 (N = 17) and two others ribotypes were specific to SP2. One was represented by a unique individual from Roscoff and the other by 32 specimens belonging to SP2 group.

The interspecific *cox1* gene divergence between the three species of *Ectocarpus* ranged from 5.1% to 8.7%. Similar results were obtained for *nad1* gene with a divergence of 6.5% to 7.6%. Lower divergence was observed for the *atp9* gene (0.9% to 3.4%). Sequencing of the gene *nad4* was not achieved for *Ectocarpus* species due to poor amplification. Analyses of the chloroplast genes showed lower divergence between species ranging from 0.8% to 2.5% for the *rbcL* gene and from 1.6% to 3.9% for the *atpB* gene (Table 3). Haplotype divergence between *E. siliculosus* and *E. croaniorum* was lower than between *E. siliculosus* / *E. fasciculatus* and *E. fasciculatus* / *E. croaniorum*.

Ecological approach

The histogram presented in Figure 3 display the frequency of distribution of SP1 or SP2 sampled in the field through time. While the two groups were found together in the field, a seasonal shift was observed in their frequencies. The maximum frequency of SP1 individuals was found in October whereas the maximum frequency of SP2 was observed in April.

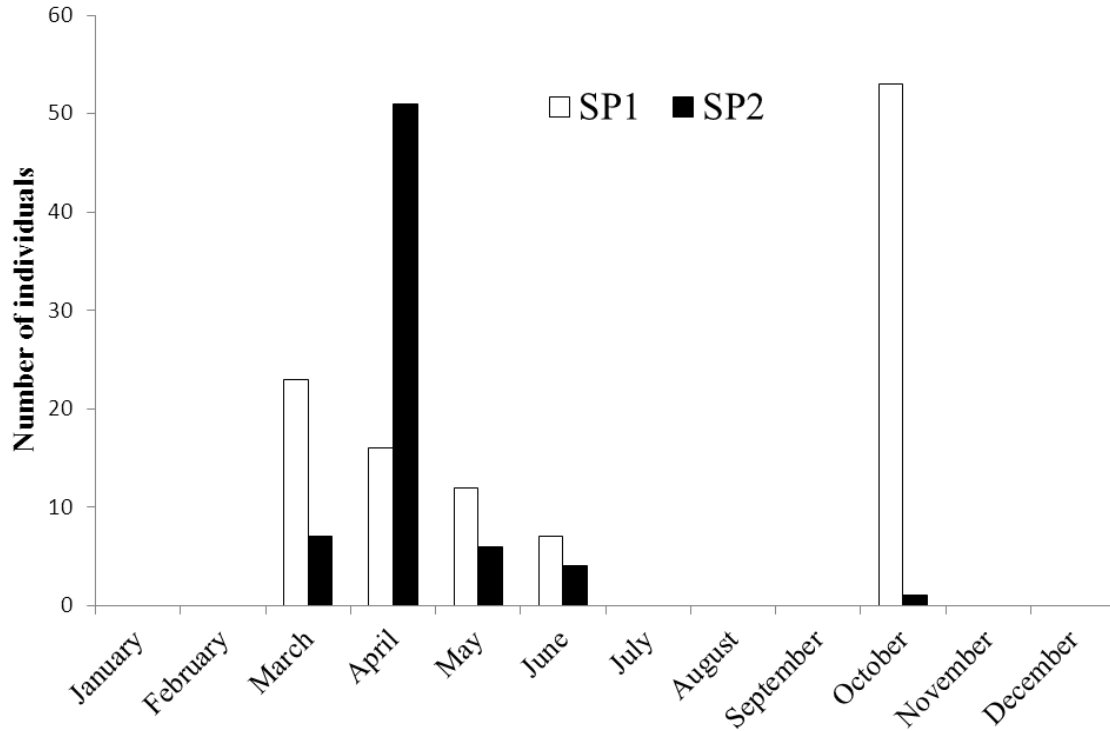


Figure 3. Number of individuals showing SP1 (white) and SP2 (black) mitotypes according to the season in Brittany. Month without data correspond to month no sampled.

Structure of populations

All the genotypes observed in this study were heterozygote for at least on microsatellite locus. In light of mitochondrial clusters, individuals were assigned to the two groups SP1 and SP2 (Table 1). The total number of alleles observed over all samples ranged from 18 to 57 for the least to the most polymorphic locus (M028-1 and M194 respectively, Table 1). For localities with more than ten samples, the mean number of alleles per locus (N_a) ranged from 6.7 to 16.9 (Table 1). Over a total of 386 alleles, 167 (43 %) were found only in one population (i.e. private alleles) with frequencies oscillating between 0.014 and 0.208. Gene diversity (H_e) ranged from 0.607 to 0.741. No repeat multilocus genotype and no monomorphic genotype at all loci were detected. Estimation of the inbreeding coefficient (F_{is}) was relatively stable among populations for both species (0.157 -0.278) (Table 3). F_{is}

values were significantly different from zero. There was no evidence of linkage disequilibrium between pair of loci (data not shown) excepted for one pairs of loci (M105-1/M194) which remained significant after sequential Bonferroni correction.

The correspondence analysis (CA) shown in Figure 4. Three groups of individuals were identified by CA. The CA showed clear differentiation along the first axis between CO2011 and ST2008 presented respectively a mitotype SP2 and SP1. We observed the same result for RO2008 and RO2009. In addition, for RO2010 and DI2010 with individuals with both types of mitochondria, SP2 individuals group with the other SP2 but SP1 individuals appear intermediate. For Quiberon population, the second axis separate clearly SP1 and SP2 individuals. SP1 individuals of QI2009 appear as a third group different from the other two. Pairwise comparisons revealed significant differences (Table 4). We observed greater F_{ST} value between populations SP1 and SP2.

Table 4. Pairwise population genetic differentiation (pairwise F_{ST} estimates). All F_{ST} values were significant (P-value < 0.001).

RO2010 SP2	CO2011 SP2	ST2008 SP1	RO2008 SP1	RO2009 SP1	DI2010 SP1	QI2009 SP1	
0	0,16	0,30	0,23	0,29	0,23	0,29	RO2010 SP2
	0	0,30	0,22	0,31	0,23	0,32	CO2011 SP2
		0	0,13	0,10	0,16	0,26	ST2008 SP1
			0	0,10	0,11	0,20	RO2008 SP1
				0	0,15	0,25	RO2009 SP1
					0	0,21	DI2010 SP1
						0	QI2009 SP1

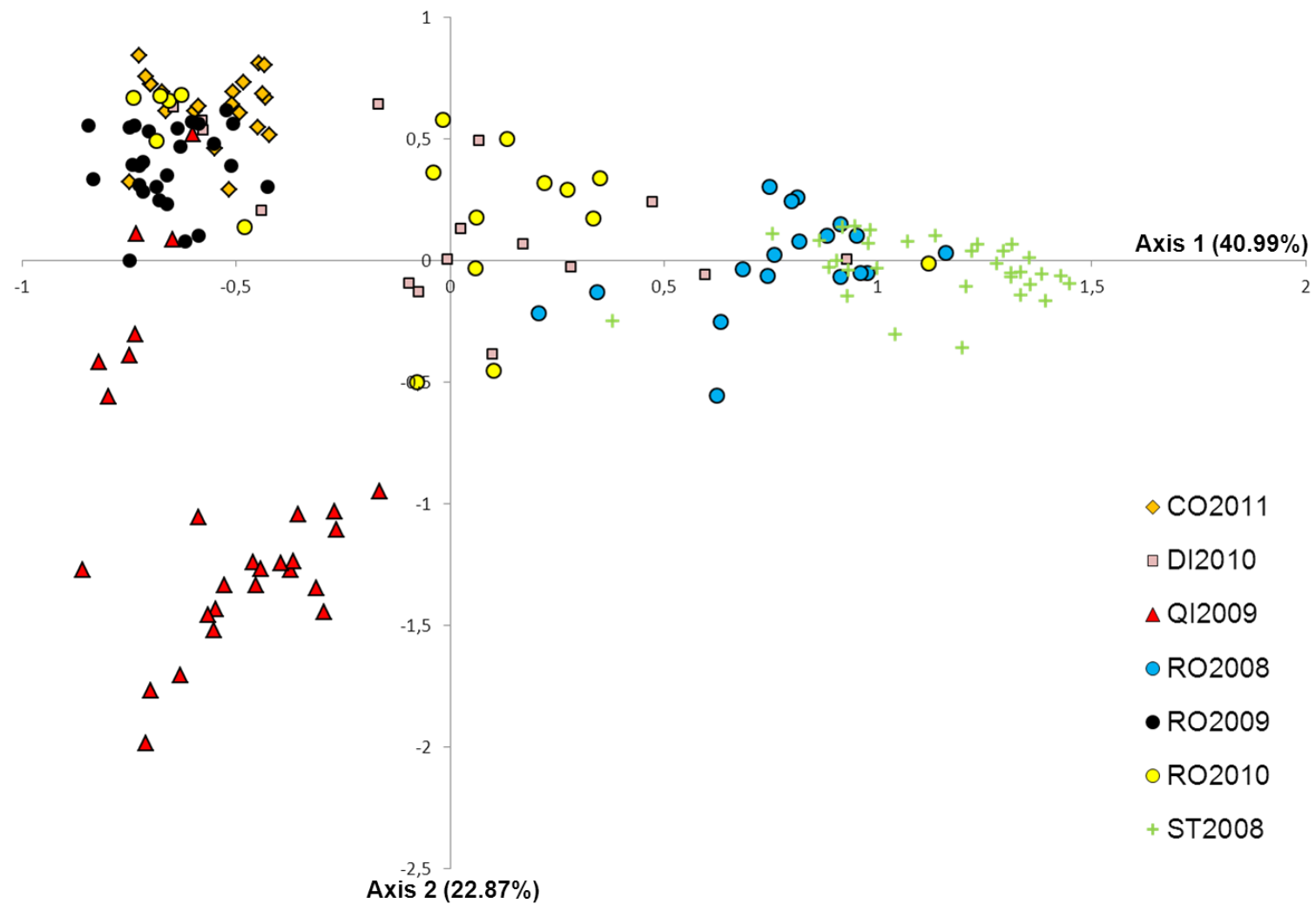


Figure 4. Factorial correspondence analysis conducted with 10 microsatellite markers for seven populations in Brittany. Each population was represented by one figured. For Roscoff population, each sampling date was represented by one color. Plot of individuals. Inertia of each axis is given in parentheses. For correspondence of population name see Table 1.

Average values of $[\log \Pr (X|K)]$ from STRUCTURE runs reached a maximum at $K= 10$. Since a higher number of clusters did not change the geographical clustering pattern but increased considerably standard deviations, we chose $K= 6$ as the number of genetic groups best capturing the structure of our data (Figure 5). The results clearly showed that the two groups SP1 and SP2 were separated within each locality. The lineage SP1 was represented by four clusters (purple, dark blue, blue and light blue) and SP2 lineage by only two clusters (burgundy and pink). Within both species, the populations were well genetically differentiated.

For SP1 group, populations of Dinard (DI), Quiberon (QI), Roscoff (RO) and St Malo (ST) were well separated and were mainly represented by four different clusters. Genetic admixture was mainly observed in Roscoff and Saint Malo populations. Individuals of Roscoff were partially assigned to four different clusters and in Saint Malo population three individuals were assigned to Roscoff and two individuals to Quiberon. For SP2 group, Concarneau and Saint Malo populations were well separated and were represented by two different clusters. The individuals of Roscoff were assigned to Concarneau and to Saint Malo populations. Admixture between SP1 and SP2 were observed in Dinard and Quiberon where two individuals in each with SP2 mitotypes were assigned to SP1 nuclear genotypes.

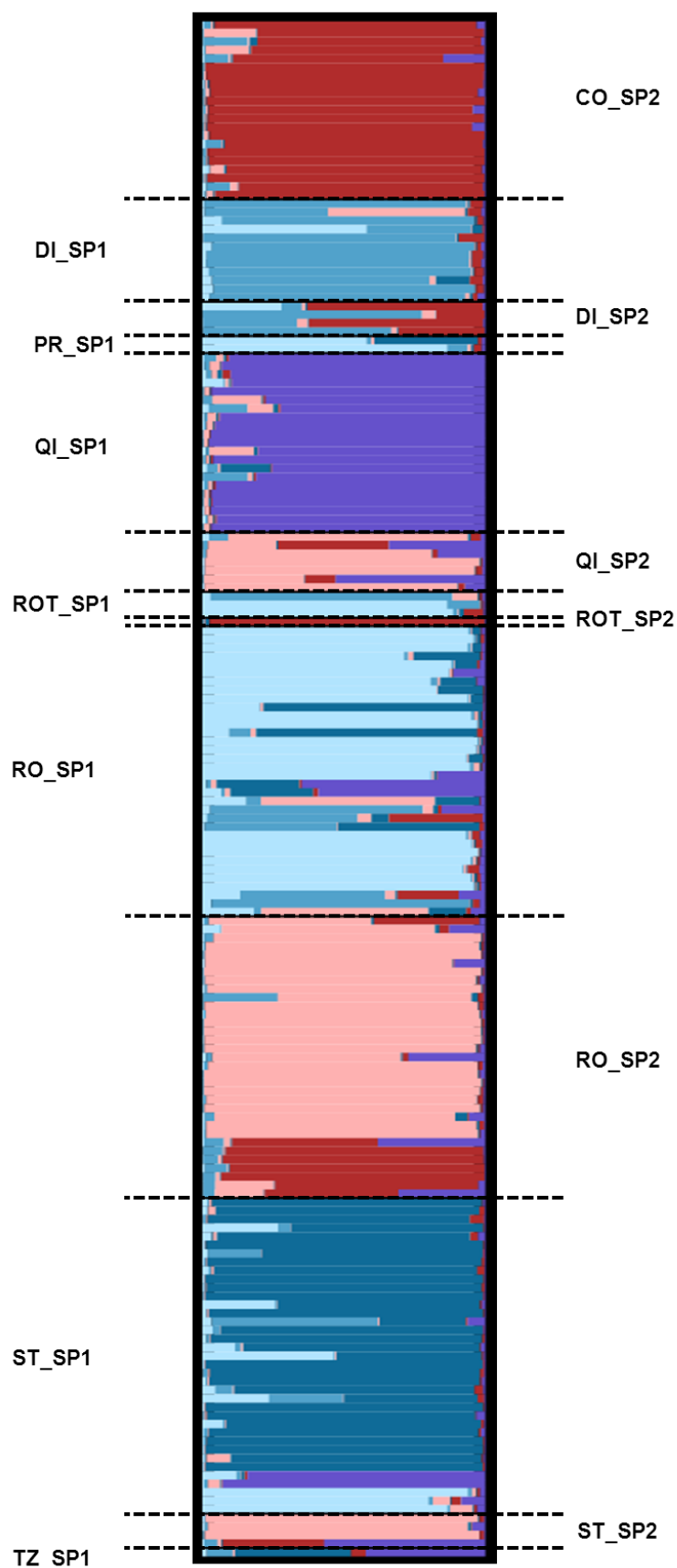


Figure 5. STRUCTURE bar plot for K= 6 averaged over 20 independent runs; each vertical segment represents one single individual and colors indicate the relative contribution of each one of the 6 identified clusters to its genetic make-up. Each population was delimited by dotted lines.

DISCUSSION

Both phylogenetic inferences and population genetic studies highlighted the existence of two sibling species under the name of *Pylaiella littoralis*. The divergence of mitochondria cytoplasmic markers between both clades suggests that these genetic entities have evolved separately. The level of *cox1* divergence observed between these two groups (SP1 and SP2) of *P. littoralis* (2.2 %–3.4%), was substantially greater than values detected within clades (0.0%–0.9%). Our results are in accordance with a recent study of *cox1* variation in 29 species of brown seaweeds that reported genetic distances ranging from 0.00% to 0.46% within species and 3.04 to 10.8% between species (McDevit and Saunders 2009). Lane et al. (2007) obtained similar results among members of the genus *Alaria* (2.2%–4.7%). The divergence found between the two well defined morphological species of *Laminaria digitata* and *L. hyperborea* was in the same range (2.9%–3.2%) (McDevit and Saunders 2010). Interestingly, Fraser et al. (2009) described the same level of divergence between the two forms of *Durvillaea antarctica* (Chamisso) Hariot (3.0% and 3.8%) revealing cryptic species. In our study, the divergences detected among the three species of the genus *Ectocarpus* were relatively greater than values detected between SP1 and SP2 of *P. littoralis* (Table 3) The low morphological difference associated to the low genetic divergence between these two groups of *P. littoralis* suggests that these two close relative species should be regarded as sibling species (Bickford et al. 2007).

SP1 and SP2 shared together common chlorotypes and ribotypes. The shared chlorotypes (Figure 2) may reflect ancestral genotypes corresponding to a recent differentiation of the two entities. This observation confirms the fact that plastid genes in brown algae are highly conserved (Presting 2006). Chloroplast markers are generally described as more conserved than ITSs, as showed for the kelp *Undaria* (Yoon and Boo, 1999), *Lessonia* (Tellier et al. 2009) and in other species of Phaeophyceae (Harvey and Goff, 2006).

The divergence between groups was low compared to *cox1* (up to 0.7% for the *rbcL* and up to 0.5% for the ITS). The divergence found between the three species of *Ectocarpus* with *rbcL* and ITS was also lower than the divergence found with *cox1*. These results are in agreement with a previous study of diatoms (Evans et al. 2007) and *Sargassum* (Mattoo and Payri 2010) showing that *cox1* had a higher degree of variability than *rbcL*. Many studies on Phaeophyceae have shown that *cox1* barcoding is a powerful tool for pin pointing potential species complex (Kucera and Saunders 2008, McDevit and Saunders 2009, Macaya and Zuccarello 2010, McDevit and Saunders, 2010) however only few studies compare the effectiveness of several genes. In *Sargassum*, Mattio and Payri (2010) demonstrated the inadequacy of the ITS-2 and *rbcL* markers compared to the *cox1*. Fraser et al. 2009, in their study on *Durvillea antarctica*, hypothesized that the difference of resolution found between mitochondrial marker (*cox1*) and plastid and nuclear markers (*rbcL* and 18S) could be due to the difference of effective population size (Palumbi et al. 2001). Indeed, Fraser et al. (2009) suggested that, while mitochondrion is maternally inherited (but see Hoarau et al. 2009 in *Fucus* species), plastid might be biparentally inherited, as it has been shown in the isogamous brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Lyngbye) Link and *Ectocarpus* sp. (Kato et al. 2006, Peters et al. 2004). Although *P. littoralis* is phylogenetically related to *Scytosiphon* and *Ectocarpus*, the reproductive life cycle remains a poorly known and controversial topic, and no information is available on chloroplast inheritance.

Pylaiella littoralis exhibits a haploid-diploid life cycle with an alternation of two types of individuals, the individuals bearing unilocular sporangia (diploid sporophyte) and the ones bearing plurilocular gametangia (haploid gametophytes) (Fritsch 1952). Moreover, each type of individual is able to reproduce asexually by direct germination of swarmer generated by a plurilocular sporangium (Knight 1923 and Chapman 1941). In the field, haploid gametophytes have been reported as very rare and smaller than diploids sporophytes (Knight 1929, Fritsch

1952). These observations suggest that the haploid phase could be considerably shortened (cf. *P. littoralis* f. *rupicola* Knight 1929). Kylin (1933) and Markey and Wilce (1975) hypothesized that gametes were probably produced directly by diploid individuals in the unilocular structure. Our results, using microsatellite markers, demonstrated that, whatever the season sampled, all the sampled individuals were diploid (i.e. heterozygous for at least on locus). This observation supports the hypothesis of a shortened life-cycle in *P. littoralis* advanced by different authors (see for review Fritsch 1952) suggesting that haploid phase is considerably reduced or absent in some populations. In addition; the measure of diversity within populations, such as heterozygosity (H_e) detected in our study (0.607 - 0.741) as well as the absence of repeated multilocus microsatellite genotype suggest that *P. littoralis* reproduce mainly by sexual reproduction. The level of heterozygosity observed in our study is of the same order of magnitude as the ones estimated for different kelp species showing the heteromorphic life cycle as *Lessonia nigrescens* Bory de Saint-Vincent (0.612-0.846; Tellier et al. 2011), *Laminaria digitata* (Hudson) J.V.Lamouroux (0.475-0.696; Billot et al. 2003) and *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C.Agardh (0.740- 0.795; Alberto et al. 2010) (see for review Valero et al. 2011). These values reflect possibly the large effective population size in both SP1 and SP2. Additionally, the high multilocus inbreeding coefficient F_{is} values (corresponding to the departure from Hardy-Weinberg equilibrium) estimated in our study suggested either inbreeding or could alternatively be explained by the incidence of putative null alleles at some loci (Alberto et al. 2010).

The correspondence analysis (Figure 4) and analyze of the geographical clustering pattern (Figure 5) based on microsatellites revealed a high genetic differentiation between SP1 and SP2. Moreover, clustering approach showed also high genetic differentiation between populations of each entity (Figure 5), confirmed by F_{ST} values observed between populations (Table 4). The sharp discontinuities do agree with the clear *mtDNA* results and suggest a

quasi-absence of gene flow between these two entities. Only few individuals from Dinard and Quiberon considered as SP2 by the mitochondrial markers were partly assigned to SP1 nuclear genotypes and from Roscoff considered as SP1 by the mitochondrial markers were partly assigned to SP2 nuclear genotypes (Figure 5). Same result was observed for the CA with intermediate individuals from Roscoff, Dinard and Quiberon (Figure 4). This incongruence found in some individual could result from hybridization events between SP1 and SP2. The ITS markers support this hypothesis, since two ribotypes are specific to SP2, whereas the ribotype found with associated with SP1 mitochondria was also found associated with SP2 mitochondria. Inter-specific gene flow is well documented within the genus *Fucus* (Wallace et al. 2004; Billard et al. 2005, 2010; Engel et al. 2005; Coyer et al. 2006, 2011) resulting from hybridization and introgression. For example, Engel et al. (2005), using microsatellite markers, identified about 13% of hybrids in sympatric natural population of *F. spiralis* and *F. vesiculosus* and Coyer et al. (2007) demonstrated the existence of an asymmetric introgression between *F. evanescens* and *F. serratus*. In a recent study, Coyer et al. (2011) suggested that despite introgression, the maintenance of species integrity of *F. spiralis*, *F. guiryi* and *F. vesiculosus* was due to a combination of the reproductive system, limited dispersal capacities and temporal variation in the timing of gamete release as well as to ecological factors reinforcing the divergence between species. In our study, while the two entities SP1 and SP2 were found in the same location, analysis of their phenology occurrences suggests different ecological characteristics such as seasonal variation. SP1 has a maximum abundance in autumn whereas SP2 was found mainly in spring. Data in the literature also support the existence of two different peaks of *P. littoralis* in the field. A seasonal alternation between diploid spring individuals and haploid autumnal one has been observed by Johnson and York (1915). More recently, Longtin et al. (2009) on the Atlantic coast of Nova Scotia, Canada, have noted that the reproduction in *Pylaiella* was highest in the spring and decreased

toward early summer; thalli disappeared between August and October and reappeared in late autumn. Similarly Kiirikki and Lehvo (1997) have observed (in the Northern Baltic Proper) that the algae began to grow in February to reach a peak in May before degeneration at the end of May and June. These authors have observed a second period of growth from September to October. In our study, the difference in phenology implies that both species SP1 and SP2 are facing different abiotic parameters (e.g. temperature, day length, irradiance) during their peak of abundance. Lotze et al. (1999) have observed that the seasonal recruitment window of *Pylaiella* was opened by rising temperature and light intensity. In the present study, although SP1 and SP2 were present all along the year (but not at same frequency), temporal divergence of the reproductive period (Lotze 2000) could directly lead to reproductive isolation between populations. Such differences would not need to be genetically based but could be due to purely environmental effects (Coyne & Orr 2004, Keller and Seehausen 2012). Difference of phenology might have contributed to maintain their genetic integrity.

Genetic structure shows clear differentiation among populations suggesting limited dispersal. Our results are in accordance with previous study which suggested a low dispersal in many brown algal species (e.g. Billot et al. 2003, Alberto et al. 2010 and Neiva et al. 2012). In more details, SP1 appears much more structured in space and time than SP2, involving four different clusters in SP1 whereas only two were found in SP2. In general, each locality corresponds to one main cluster excepted in Roscoff where two clusters were observed for SP2 (Figure 5) corresponding to two different samples collected at different periods in two sites separated each other by 500m. This strong differentiation within a locality suggests a strong spatio-temporal dispersal, probably related to the reproductive system.

Using multilocus barcoding and population genetics approaches, we identified two sibling species previously known as *Pylaiella littoralis*. Mitochondrial genes appeared to be effective

in the delimitation of species and microsatellite marker pointed out restricted gene flow between these two entities. Although these two species were found in the same environment, their growths were shifted in time. In turn, this phenological shift might cause individuals from different taxa to avoid mating with one another. We can hypothesis that barriers to gene flow could evolve between populations of *Pylaiella* as a result of ecologically-based divergent selection between environments as suggested by the 'ecological speciation' hypothesis (Rundle and Nosil 2005, Schluter 2009).

Acknowledgments

This study was partially supported by grants from the French Ministry for the Economy, Industry and Employment and the Brittany Regional Council through the project AQUACTIFS "Convention de soutien de l'état à des actions de recherche et d'innovation par voie de subvention – Fonds de compétitivité des entreprises". Warm thanks to Akira Peters for providing strains of *Ectocarpus* and to CCAP for providing strains of *Pylaiella littoralis*.

References

- Agapow, P.M., Bininda-Emonds, O.R.P., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C., Purvis, A., 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *The quarterly review of biology* 79, 161-179.
- Alberto, F., Raimondi, P.T., Reed, D.C., Coelho, N.C., Leblois, R., Whitmer, A., Serrao, E.A., 2010. Habitat continuity and geographic distance predict population genetic differentiation in giant kelp. *Ecology* 91, 49-56.
- Asensi, A.O., Küpper, F.C., 2012. Seasonal periodicity and reproduction of brown algae (Phaeophyceae) at Puerto Deseado (Patagonia). *Botanica Marina* 55, 217 - 228.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48.
- Barrett, C.F., Freudenstein, J.V., 2011. An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Molecular Ecology* 20, 2771-2786.
- Belkhir, K., 2003. GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Belsher, T., 1986. Etude bibliographique de quelques espèces planctoniques et benthiques de la Manche. Rapport Ifremer.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 148-155.
- Billard, E., Daguin, C., Pearson, G., Serrao, E., Engel, C., Valero, M., 2005. Genetic isolation between three closely related taxa: *Fucus vesiculosus*, *F. spiralis*, and *F. ceranoïdes* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 41, 900-905.
- Billard, E., Serrão, E., Pearson, G., Destombe, C., Valero, M., 2010. *Fucus vesiculosus* and *spiralis* species complex: a nested model of local adaptation at the shore level. *Marine Ecology Progress Series* 405, 163-174.
- Billot, C., Engel, C.R., Rousvoal, S., Kloareg, B., Valero, M., 2003. Current patterns, habitat discontinuities and population genetic structure: the case of the kelp *Laminaria digitata* in the English Channel. *Marine Ecology Progress Series* 253, 21.
- Bolton, J.J., 1979. Estuarine adaptation in populations of *Pilayella littoralis* (L.) Kjellm. (Phaeophyta, Ectocarpales). *Estuarine and Coastal Marine Science* 9, 273-280.
- Bothwell, J.H., Marie, D., Peters, A.F., Cock, J.M., Coelho, S.M., 2010. Role of endoreduplication and apomeiosis during parthenogenetic reproduction in the model brown alga *Ectocarpus*. *New Phytologist* 188, 111-121.
- Cardinal, A., 1964. Etudes sur les Ectocarpacées de la Manche. Thèse.

- Chapman, V.J., 1941, An introduction to the study of algae. New York: the Macmillan compagny.
- Chesters, D., Wang, Y., Yu, F., Bai, M., Zhang, T.X., Hu, H.Y., Zhu, C.D., Zhang, Y.Z., 2012. The Integrative Taxonomic Approach Reveals Host Specific Species in an Encyrtid Parasitoid Species Complex. PloS one 7, e37655.
- Cock, J.M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet, D., Allen, A.E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artiguenave, F., Aury, J.M., Badger, J.H., 2010. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. Nature 465, 617-621.
- Coyer, J.A., Hoarau, G., Costa, J.F., Hogerdijk, B., Serrão, E.A., Billard, E., Valero, M., Pearson, G.A., Olsen, J.L., 2011. Evolution and diversification within the intertidal brown macroalgae *Fucus spiralis* / *F. vesiculosus* species complex in the North Atlantic. Molecular Phylogenetics and Evolution 58, 283-296.
- Coyer, J.A., Hoarau, G., Pearson, G.A., Serrao, E.A., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2006. Convergent adaptation to a marginal habitat by homoploid hybrids and polyploid ecads in the seaweed genus *Fucus*. Biology Letters 2, 405-408.
- Coyer, J.A., Hoarau, G., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2007. Hybridization and introgression in a mixed population of the intertidal seaweeds *Fucus evanescens* and *F. serratus*. Journal of evolutionary biology 20, 2322-2333.
- de Queiroz, K., 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation.
- De Reviers, B., Rousseau, F., Draisma, S.G.A., 2007. Classification of the Phaeophyceae from past to present and current challenges. Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics 75, 267.
- Dowling, D.K., Friberg, U., Lindell, J., 2008. Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. Trends in Ecology & Evolution 23, 546-554.
- Engel, C.R., Daguin, C., Serrao, E.A., 2005. Genetic entities and mating system in hermaphroditic *Fucus spiralis* and its close dioecious relative *F. vesiculosus* (Fucaceae, Phaeophyceae). Molecular ecology 14, 2033-2046.
- Evans, K.M., Wortley, A.H., Mann, D.G., 2007. An Assessment of Potential Diatom "Barcode" Genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their Effectiveness in Determining Relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). Protist 158, 349-364.
- Fraser, C.I., Hay, C.H., Spencer, H.G., Waters, J.M., 2009. Genetic and morphological analyses of the southern bull kelp *Durvillaea antarctica* (Phaeophyceae: Durvillaeales) in New Zealand reveal cryptic species. Journal of Phycology 45, 436-443.
- Fritch, F.E., 1952, The structure and reproduction of the algae, vol. 2. Cambridge University Press, 939 pp.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2012. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.

- Harvey, J.B.J., Goff, L.J., 2006. A reassessment of species boundaries in *Cystoseira* and *Halidrys* (Phaeophyceae, Fucales) along the North American west coast. *Journal of phycology* 42, 707-720.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801-1806.
- Johnson, D.S., York, H.H., 1915, The relation of plants to tide-levels: a study of factors affecting the distribution of marine plants. Carnegie Institution of Washington.
- Jombart, T., Pontier, D., Dufour, A.B., 2009. Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity* 102, 330–341.
- Kato, Y., Kogame, K., Nagasato, C., Motomura, T., 2006. Inheritance of mitochondrial and chloroplast genomes in the isogamous brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Phycological Research* 54, 65-71.
- Keller, I., Seehausen, O., 2012. Thermal adaptation and ecological speciation. *Molecular Ecology* 21, 782-799.
- Kiirikki, M., Lehvo, A., 1997. Life strategies of filamentous algae in the northern Baltic Proper. *Sarsia* 82, 259-267.
- Kim, K.M., Boo, S.M., 2012. Phylogenetic relationships and distribution of *Gelidium crinale* and *G. pusillum* (Gelidiales, Rhodophyta) using *cox1* and *rbcL* sequences. *Algae* 27, 83-94.
- Knight, M., 1923. Studies in the Ectocarpaceae I. The life-history and cytology of *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 53, 353 - 361.
- Kornmann, P., 1990. *Pilayella macrocarpa* Foslie (Ectocarpales, Phaeophyceae) in Helgoland and the rejection of *Pilayella varia* Kjellman. *Botanica marina* 33, 257-260.
- Kucera, H., Saunders, G.W., 2008. Assigning morphological variants of *Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) in Canadian waters to recognized species using DNA barcoding. *Botany* 86, 1065-1079.
- Lane, C.E., Lindstrom, S.C., Saunders, G.W., 2007. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. *Molecular phylogenetics and evolution* 44, 634-648.
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D., Saunders, G.W., 2006. A multi-gene molecular investigation of the Kelps (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42, 493-512.
- Le Gall, L., Saunders, G.W., 2007. A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: establishing the new red algal subclass Corallinophycidae. *Molecular phylogenetics and evolution* 43, 1118-1130.
- Loiseaux, S., Rozier, C., 1978. Culture axénique de *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm.(Phéophycées). *Rev. Algol.* NS 13, 333-340.

- Longtin, C.M., Scrosati, R.A., Whalen, G.B., Garbary, D.J., 2009. Distribution of algal epiphytes across environmental gradients at different scales: intertidal elevation, host canopies, and host fronds. *Journal of Phycology* 45, 820-827.
- Lotze, H.K., Schramm, W., Schories, D., Worm, B., 1999. Control of macroalgal blooms at early developmental stages: *Pilayella littoralis* versus *Enteromorpha* spp. *Oecologia* 119, 46-54.
- Lotze, H.K., Worm, B., Sommer, U., 2000. Propagule banks, herbivory and nutrient supply control population development and dominance patterns in macroalgal blooms. *Oikos* 89, 46-58.
- Macaya, E.C., Zuccarello, G.C., 2010. DNA barcoding and genetic divergence in the giant Kelp *Macrocystis* (Laminariales). *Journal of Phycology* 46, 736-742.
- Mallet, J., 2001. Species, concepts of. *Encyclopedia of biodiversity* 5, 427-440.
- Markey, D.R., Wilce, R.T., 1975. The ultrastructure of reproduction in the brown alga *Pylaiella littoralis*. I. Mitosis and cytokinesis in the plurilocular gametangia. *Protoplasma* 85, 219.
- Mattio, L., Payri, C., 2010. Assessment of five markers as potential barcodes for identifying *Sargassum* subgenus *Sargassum* species (Phaeophyceae, Fucales). *Cryptogamie. Algologie* 31, 467-485.
- Mayden, R.L., 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. *Species the units of biodiversity* 54, 381-424.
- McDevit, D.C., Saunders, G.W., 2009. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol. *Phycological Research* 57, 131-141.
- McDevit, D.C., Saunders, G.W., 2010. A DNA barcode examination of the Laminariaceae (Phaeophyceae) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights. *Phycologia* 49, 235-248.
- Mejjad, M., Loiseaux-de-Goër, S., Ducreux, G., 1992. Protoplast isolation, development, and regeneration in different strains of *Pilayella littoralis* (L.) Kjellm.(Phaeophyceae). *Protoplasma* 169, 42-48.
- Meyer, C.P., Paulay, G., 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology* 3, e422.
- Müller, D.G., Stache, B., 1989. Life history studies on *Pilayella littoralis*(L.) Kjellman(Phaeophyceae, Ectocarpales) of different geographical origin. *Botanica marina* 32, 71-78.
- Neiva, J., Pearson, G.A., Valero, M., Serrão, E.A., 2012. Drifting fronds and drifting alleles: range dynamics, local dispersal and habitat isolation shape the population structure of the estuarine seaweed *Fucus ceranoides*. *Journal of Biogeography* 39, 1167-1178.
- Newton, L., 1931. A handbook of the British seaweeds. London: British Museum (Natural History). 478 pp.

- Oudot-Le Secq, M.P., Fontaine, J.M., Rousvoal, S., Kloareg, B., Loiseaux-de Goër, S., 2001. The Complete Sequence of a Brown Algal Mitochondrial Genome, the Ectocarpale *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *Journal of Molecular Evolution* 53, 80-88.
- Palumbi, S.R., Cipriano, F., Hare, M.P., 2001. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data : the three-times rule. *Evolution* 55, 859-868.
- Peakall, R.O.D., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- Peters, A.F., Marie, D., Scornet, D., Kloareg, B., Mark Cock, J., 2004. Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics. *Journal of Phycology* 40, 1079-1088.
- Presting, G.G., 2006. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. *Canadian Journal of Botany* 84, 1434-1443.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G., 2011. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21, 1864 - 1877.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity* 86, 248-249.
- Reed, R.H., Barron, J.A., 1983. Physiological adaptation to salinity change in *Pilayella littoralis* from marine and estuarine sites. *Botanica marina* 26, 409-416.
- Robba, L., Russell, S.J., Barker, G.L., Brodie, J., 2006. Assessing the use of the mitochondrial cox1 marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American journal of botany* 93, 1101-1108.
- Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2007. Population structure and species boundary delimitation of cryptic *Dioryctria* moths: an integrative approach. *Molecular Ecology* 16, 3617-3633.
- Rosenberg, N.A., 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4, 137-138.
- Rundle, H.D., Nosil, P., 2005. Ecological speciation. *Ecology letters* 8, 336-352.
- Russell, G., 1961. The autecology and life-history of *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellman. *Reports of the Challenger Society* 3, 13.
- Russell, G., 1963. A study in populations of *Pylaiella littoralis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 43, 469-483.
- Russell, G., 1967. The ecology of some free-living Ectocarpaceae. *Helgoland Marine Research* 15, 155-162.
- Schluter, D., 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science* 323, 737-741.

- Siemer, B.L., Pedersen, P.M., 1995. The taxonomic status of *Pilayella littoralis*, *P. varia* and *P. macrocarpa* (Pilayellaceae, Fucophyceae). *Phycologia* 34, 257-266.
- Silberfeld, T., Leigh, J.W., Verbruggen, H., Cruaud, C., De Reviers, B., Rousseau, F., 2010. A multi-locus time-calibrated phylogeny of the brown algae (Heterokonta, Ochrophyta, Phaeophyceae): Investigating the evolutionary nature of the "brown algal crown radiation". *Molecular phylogenetics and evolution* 56, 659-674.
- Sites Jr, J.W., Marshall, J.C., 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35, 199-227.
- Sites, J.W., Marshall, J.C., 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 462-470.
- Tellier, F., Meynard, A.P., Correa, J.A., Faugeron, S., Valero, M., 2009. Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: Vicariance or parapatry? *Molecular phylogenetics and evolution* 53, 679-693.
- Tellier, F., Tapia, J., Faugeron, S., Destombe, C., Valero, M., 2011. The *Lessonia nigrescens* species complex (Laminariales, Phaeophyceae) shows strict parapatry and complete reproductive isolation in a secondary contact zone. *Journal of Phycology* 47, 894-903.
- Tronholm, A., Steen, F., Tyberghein, L., Leliaert, F., Verbruggen, H., Antonia Ribera Siguan, M., De Clerck, O., 2010. Species Delimitation, Taxonomy, and Biogeography of *Dictyota* in Europe (Dictyotales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 46, 1301-1321.
- Valero, M., Destombe, C., Mauger, S., Ribout, C., Engel, C.R., Daguin-Thiebaut, C., Tellier, F., 2011. Using genetic tools for sustainable management of kelps: a literature review and the example of *Laminaria digitata*. *CBM-Cahiers de Biologie Marine* 52, 467.
- Wallace, A.L., Klein, A.S., Mathieson, A.C., 2004. Determining the affinities of salt marsh fucoids using microsatellite markers evidence of hybridization and introgression between two species of *Fucus* (Phaeophyta) in a marine estuary. *Journal of Phycology* 40, 1013-1027.
- Weir, B., Cockerham, C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.
- West, J.A., 1967. *Pilayella littoralis* f. *rupicola* from Washington: the life history in culture. *Journal of Phycology* 3, 150-153.
- Wiens, J.J., 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology* 56, 875-878.
- Winker, K., Rocque, D.A., Braile, T.M., Pruett, C.L., 2007. Vainly beating the air: species-concept debates need not impede progress in science or conservation. *Ornithological Monographs*, 30-44.
- Yoon, H.S., Boo, S.M., 1999. Phylogeny of Alariaceae (Phaeophyta) with special reference to *Undaria* based on sequences of the RuBisCo spacer region. *Hydrobiologia* 398, 47-55.

- Zardi, G.I., Nicastro, K.R., Canovas, F., Costa, J.F., Serrao, E.A., Pearson, G.A., 2011. Adaptive traits are maintained on steep selective gradients despite gene flow and hybridization in the intertidal zone. *PloS one* 6, e19402.
- Zuccarello, G.C., Burger, G., West, J.A., King, R.J., 1999. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8, 1443-1447.

Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence une forte diversité génétique au sein de l'espèce *Pylaiella littoralis* le long des côtes Bretonnes. Les résultats montrent clairement l'existence de plusieurs entités génétiques distinctes. L'analyse du gène mitochondrial *cox1* révèle l'existence de deux groupes de mitotypes, SP1 et SP2. Les divergences intergroupes sont environ 3 fois plus importantes que les divergences intragroupes. En revanche, l'analyse des séquences chloroplastiques (*rbcL*) ou nucléaire (ITS2) ne permettent pas de différencier ces deux groupes. Ceci semble indiquer que la différenciation génétique entre groupes est relativement récente et/ou que ces deux entités sont encore capables d'inter-croisement. Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons utilisé des marqueurs nucléaires hypervariables (les microsatellites). L'analyse de 10 marqueurs nucléaires microsatellites confirme l'existence de deux groupes génétiques correspondant aux populations composées soit d'individus présentant des mitochondries de type SP1 soit d'individus présentant des mitochondries de type SP2. On observe cependant que, lorsque les individus SP1 et SP2 sont trouvés en mélange dans les populations, leur génotype nucléaire est intermédiaire suggérant fortement des phénomènes d'hybridation entre ces deux groupes. Tous les individus « hybrides » sont trouvés associés à un mitotype SP1 ce qui semble indiquer qu'il existe une certaine dissymétrie dans les croisements. De plus, la période où ces individus hybrides ont été échantillonnés correspond à la période où les deux groupes SP1 et SP2 sont présents en même temps (Avril-Mai). De plus, l'analyse des marqueurs microsatellite révèle l'existence d'un troisième groupe correspondant aux individus de Quiberon de type SP1. En effet les différentes méthodes que nous avons employées (Fst, Clustering) montrent que cette population se distingue clairement des populations SP2 mais également des autres populations SP1. Cette population pourrait être le résultat d'un phénomène d'introgession entre espèces (capture d'un cytoplasme de type SP1) par une autre espèce. Afin de préciser cette observation, il est important de compléter cette étude en échantillonnage plus largement et en étendant celui-ci à différentes régions du globe. Les premiers résultats obtenus à partir des souches de la collection du CCAP, de la RCC et de Norvège révèlent que les deux types mitochondriaux SP1 et SP2 sont trouvés au Chili, en Allemagne et en Norvège.

Par ailleurs, l'analyse de type « clustering » des génotypes nucléaires révèle une forte structure intra groupe SP1 et SP2 suggérant des flux de gènes réduits entre les différentes populations bretonnes.

Cette diversité génétique est particulièrement intéressante à prendre en compte dans le cadre de l'exploitation de ces espèces. En effet, au vu des résultats obtenus, on peut supposer une forte différenciation génétique entre groupes et entre populations pouvant conduire à des phénomènes d'adaptation locale. Cette variabilité pourrait être exploitée dans le cadre de sélection de souches d'intérêt économique.

Enfin, paradoxalement, bien que notre étude ne révèle pas la présence de gamétophytes dans les populations naturelles, elle suggère que ces espèces se reproduisent essentiellement de façon sexuée. Il semble donc important de compléter cette étude afin de rechercher les gamétophytes sur le terrain. En effet, ces gamétophytes, pourraient être microscopiques et/ou pousser en épiphyte sur des hôtes spécifiques que nous n'avons pas prospectés.

Chapitre 3

Les descriptions les plus exactes et accompagnées des figures les plus parfaites, laissent encore quelque chose à désirer à celui qui veut connaître complètement un être naturel. Ce quelque chose, que rien ne peut suppléer, ne s'obtient que par l'autopsie ou la vue de l'objet lui-même.

(Decandolle, *Théorie élémentaire de Botanique*).



Polysiphonia morrowii, Roscoff

Chapitre 3. Mise en évidence d'une introduction cryptique, le cas de *Polysiphonia morrowii*

I. Contexte de l'étude et principaux résultats.

La présence d'espèces introduites a été signalée dans 84% des écorégions marines (Fig. 1 ; Molnar *et al.* 2008). Parmi les 329 espèces invasives étudiées par Molnar *et al.* (2008), les algues se classent à la troisième place des espèces invasives ayant un impact écologique majeur (Fig. 2). Lowe *et al.* (2000) répertorie plus de 30 espèces marines parmi les 100 espèces invasives les plus menaçantes au monde. Dans ces deux études les espèces étudiées sont choisies en fonction de leur impact connu sur la biodiversité et/ou les activités humaines.

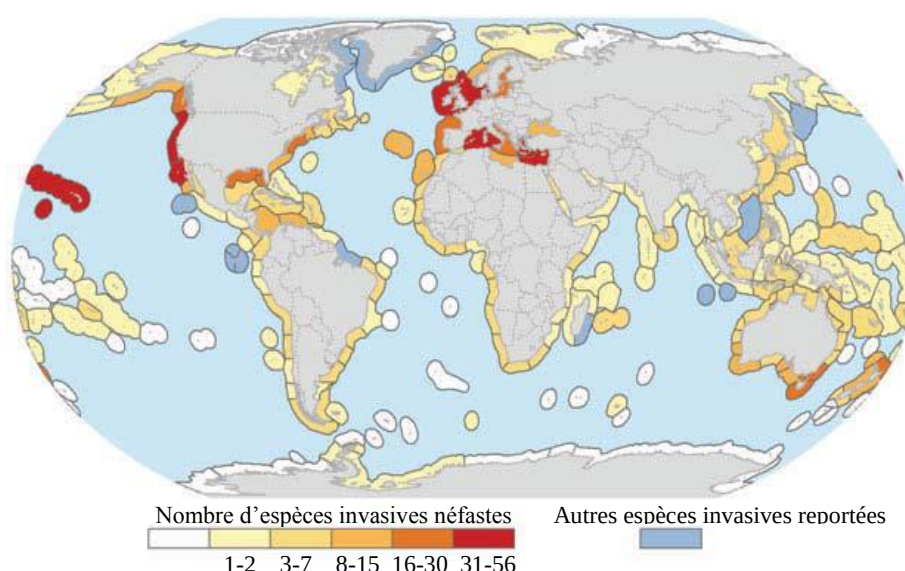


Fig. 1 Distribution des espèces invasives à l'origine d'impacts écologiques dans 232 éco-régions marines analysées. Un impact sur la biodiversité a été montré pour 329 espèces invasives marines. Figure tirée de Molnar *et al.* (2008).

En Europe, on dénombre 987 espèces introduites (invasive ou non), dont plus de 500 espèces en Méditerranée (Boudouresque 2008). A l'échelle de la Bretagne, 97 espèces introduites ont été répertoriées (source: Observatoire de la biodiversité et du patrimoine naturel en Bretagne), dont 74 espèces animales et 23 d'algues (Fig. 3). Il est difficile de connaître le nombre réel de ces introductions mais une importante accélération du nombre d'espèces introduites a été notée au cours du 20ème siècle. En milieu marin, ces introductions se sont intensifiées en

particulier depuis les années 1960 (Goulletquer et al. 2002). Cette évolution temporelle est fortement associée à l'augmentation des activités humaines à l'échelle mondiale, avec notamment le développement de l'aquaculture et du commerce maritime (Fig. 4 ; Goulletquer et Le Moine 2002, Boudouresque 2008).

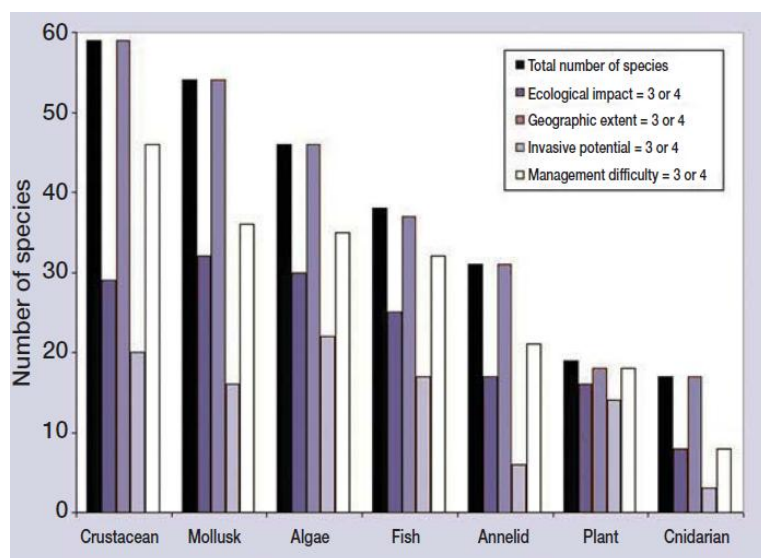


Fig. 2 Répartition des 329 espèces invasives répertoriées par Molnar *et al.* (2008) au sein des sept phylums étudiés dans cette étude. Les histogrammes présentent le nombre total d'espèces invasives (noir) avec le nombre d'espèces à l'origine des plus forts impacts écologiques (violet foncé) ou dont l'étendue géographique (violet clair), le potentiel d'invasion (violet pâle) ou la difficulté de gestion (blanc) sont importantes. La notion de « fort impact » (valeur 3-4) est mesurée sur une échelle de 0 à 4, selon la classification détaillée dans Molnar *et al.* (2008). Figure issue de Molnar *et al.* (2008)

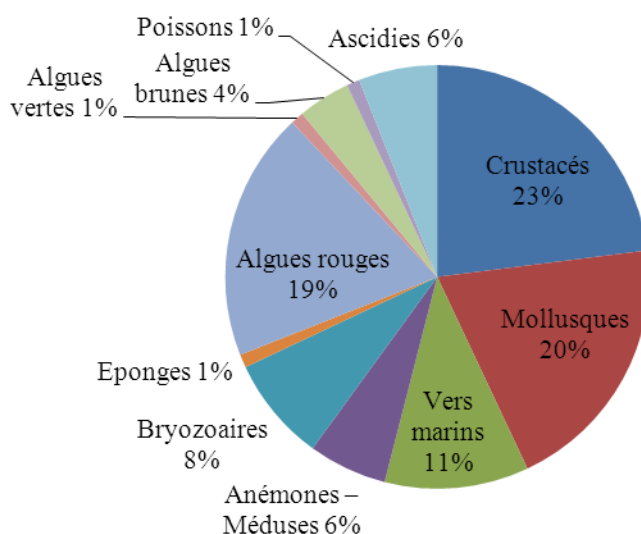


Fig. 3 Proportion d'espèces introduites par phylum, dénombrée en Bretagne et basée sur 97 espèces introduites. Source des données : GIP Bretagne Environnement

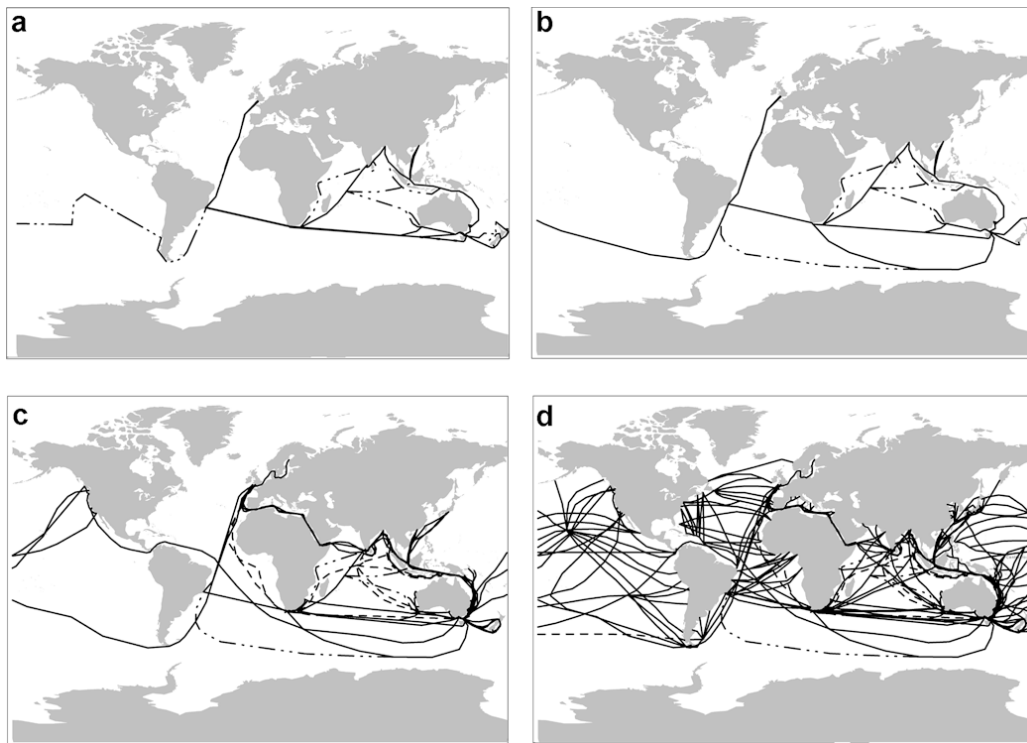


Fig. 4 Accroissement du trafic maritime au cours des derniers siècles : (a) avant 1839, le trafic maritime était essentiellement lié à l'exploration et de colonisation, (b) entre 1839 et 1851, le trafic maritime était essentiellement lié à l'immigration, puis entre 1852 – 1860, à la ruée vers l'Or, (c) entre 1861-1920 et (d) de 1921 jusqu'à aujourd'hui, les échanges commerciaux sont ensuite allées croissants. Les lignes continues représentent les itinéraires communément utilisés, celles en pointillés les itinéraires rares. Figure issue de Hewitt *et al.* (2004).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à une espèce de *Polysiphonia* proliférant sur les côtes Bretonnes et formant des « patches » denses au printemps en milieu intertidal. Par une approche barcode basé sur la *rbcL* nous avons identifié cette algue comme *Polysiphonia morrowii*. Cette espèce originaire de l'océan Pacifique Nord-Ouest a déjà été signalée comme introduite dans de nombreuses régions du monde soit sur la base de séquences moléculaires ou bien sur la base de caractères morphologiques (Fig. 5). Parmi les 105 individus de *P. morrowii* que nous avons échantillonnés le long des côtes Bretonnes, trois chlorotypes différents ont été identifiés suggérant plusieurs événements d'introduction. Cette introduction est passée inaperçue jusqu'à ce jour en raison de sa similitude morphologique de *P. morrowii* avec les espèces natives. En effet les caractères morphologiques (Fig. 6) utilisés chez les *Polysiphonia* ne permettent pas de délimiter assurément *P. morrowii* de *P. stricta* ou *P. atlantica*.

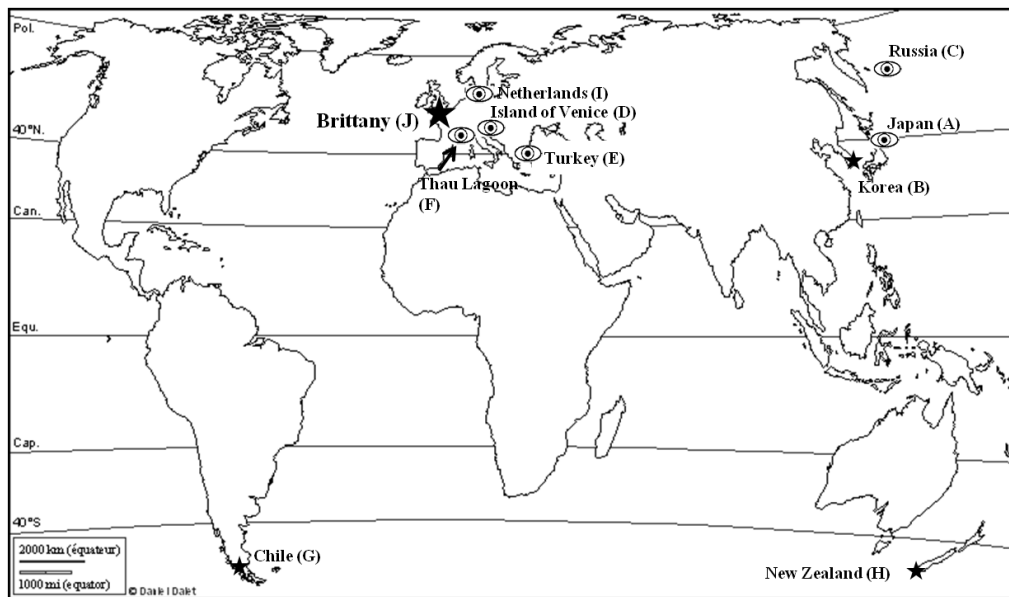


Fig. 5 Carte indiquant les différentes observations de *Polysiphonia morrowii* (comme reporté par Guiry et Guiry 2011) ○: Identification morphologique. ★: Identification moléculaire. (A): Harvey (1857); Kudo and Masuda (1981); Lee and Lee (1991); Masuda et al. (1995); Yoshida (1998); Yoshida et al. (1990). (B): Choi et al. (2001); Kim et al. (1994); Kim et al. (2004); Lee (2008); Lee and Kang (2001). (C): Kozhenkova (2009); Perestrenko (1994); Selivanova and Zhigadlova (1997). (D): Curiel et al. (2002). (E): Erduğan et al. (2009). (F): Verlaque (2001). (G): Kim et al. (2004). (H): Mamoozadeh et al. (2012); Nelson and Maggs (1996). (I): Maggs and Stegenga (1999). (J): Geoffroy et al. (2012).

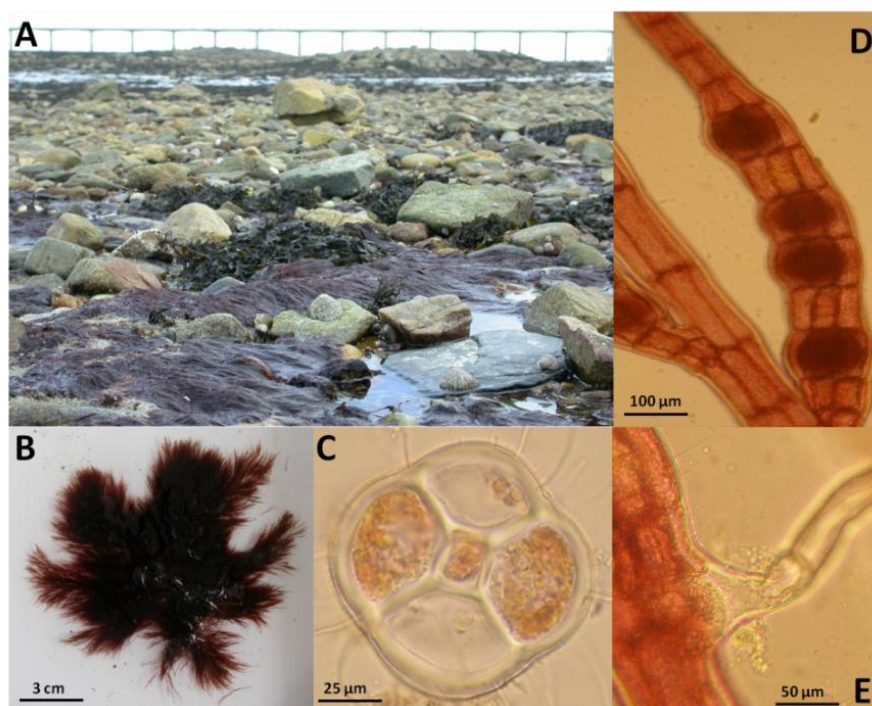


Fig. 6 Observation de *Polysiphonia morrowii* en Bretagne (A) Patch de *P. morrowii* sur un substrat rocheux sableux, Roscoff, France, 18 Avril 2010 avec l'estacade dans le fond. On remarque les cailloux complètement recouverts par l'algue. (B) Thalle dense et touffu. (C) Coupe de l'axe principal montrant 4 cellules péricentrales sans cortication. (D) Série droite de tétraspores. (E) Rhizoïde connecté à la cellule péricentrale sans paroi de séparation.

II. Article 2: « Cryptic introduction of the red alga *Polysiphonia morrowii* Harvey (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in the North Atlantic Ocean highlighted by a DNA barcoding approach »

Alexandre Geoffroy, Line Le Gall and Christophe Destombe

Publié dans Aquatic Botany



Short communication

Cryptic introduction of the red alga *Polysiphonia morrowii* Harvey (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in the North Atlantic Ocean highlighted by a DNA barcoding approach

Alexandre Geoffroy^{a,b,*}, Line Le Gall^c, Christophe Destombe^{a,b}

^a UPMC Univ Paris 06, UMR 7144, Équipe "BEDIM", Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France

^b CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Équipe "BEDIM", Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France

^c Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), UMR 7138, Systématique, Adaptation et Evolution, 57 rue Cuvier, CP 39, 75231 Paris Cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2011

Received in revised form 29 February 2012

Accepted 8 March 2012

Available online 16 March 2012

Keywords:

Alien species

Barcoding

Brittany

Cryptic introduction

Haplotype

rbcl

ABSTRACT

Macroalgae are prone to be introduced outside of their autochthonous area; however, the difficulty to unequivocally identify them based on morpho-anatomical features, mainly due to the lack of diagnostic characters, often hampered the rapid detection of exogenous species. In the present study, we document that the *Polysiphonia* species that dominates, during spring, the high intertidal level in Brittany is *Polysiphonia morrowii*. We demonstrated the presence of this alien species in the North Eastern Atlantic in light of molecular sequences. This species originally from the Northwest Pacific Ocean has already been reported as introduced in Chile and New Zealand on a molecular ground and has been suspected in North Sea and Mediterranean Sea based on morpho-anatomical ground. Among the 105 individuals of *P. morrowii* collected along the coast of Brittany, three haplotypes were found suggesting several introduction events. In our opinion, the progression of this exogenous species, which has been so far undetected due to its morphological similarities with native species, should be further monitored.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Interoceanic shipping and human activities (aquaculture, fishing) form an interconnected network between seas and oceans, favoring species dispersal and increasing the risk of introduction into coastal marine ecosystems (Carlton and Geller, 1993). In the marine realm, more than 300 introduced species have been recently listed, being most of them introduced accidentally via shipping and aquaculture activities (Molnar et al., 2008). Moreover, it has been suggested that the number of alien species may be underestimated due to the lack of conspicuous characters to distinguish between sibling species (Knowlton, 1993).

The genus *Polysiphonia* is cosmopolitan and phylogenetically very diverse (ca. 200 taxa currently recognized; Guiry and Guiry, 2011, www.algaebase.org). Many *Polysiphonia* species are prone to phenotypic plasticity (Kim et al., 2000); therefore most of the taxonomic characters used to identify species within the genus are not diagnostic and frequently render accurate species identification problematic, or nearly impossible (Kim and Yang, 2006).

Molecular tools, including the barcode, have become, during the last two decades, the most frequently used alternative to morpho-anatomical studies for accurate identification as well as species delineation (e.g. Saunders and Le Gall, 2010). For instance, McIvor et al. (2001) demonstrated that the introduced species *Neosiphonia harveyi* (Harvey) M.S. Kim & I.K. Lee (as *Polysiphonia harveyi*) actually involved two cryptic species introduced into the northern Atlantic Ocean from Japan based on molecular investigations of the *rbcl* gene. This study also showed that *N. harveyi* is present in New Zealand, thereby revealing an invasion that had gone undetected due to its morphological similarity with the native species *P. strictissima* J.D. Hooker & Harvey. Likewise, *Polysiphonia morrowii* has recently been reported as an alien species in the Southern Pacific Ocean (Chile and New Zealand) based on *rbcl* sequences (Kim et al., 2004; Mamoozadeh and Freshwater, 2011). According to the literature, this species is native to the Northwest Pacific Ocean and has been recorded in South Korea (Kim et al., 1994), Japan (Kudo and Masuda, 1992), China (Segi, 1951) and Far East Russia (Perestenko, 1980). Moreover, its presence outside its native range has been suspected on morpho anatomical ground during the last decade in New Zealand (Nelson and Maggs, 1996), the Mediterranean Sea (Curiel et al., 2002; Erduğan et al., 2009; Verlaque, 2001) and putatively in the North Sea as *P. senticulosa* Harvey (Maggs and Stegenga, 1999). During a survey of the genus *Polysiphonia* in Brittany, we have uncovered, in the upper intertidal zone, conspicuous and

* Corresponding author at: UPMC Univ Paris 06, UMR 7144, Équipe "BEDIM", Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France. Tel.: +33 298 292 323; fax: +33 298 292 324.

E-mail address: geoffroy@sb-roscoff.fr (A. Geoffroy).

extensive patches of *Polysiphonia* which morpho-anatomical characters are congruent with the description of *P. morrowii* and *P. stricta*. In the present study, we sampled 110 specimens and used a DNA-barcoding approach for their identification at the species level.

2. Materials and methods

2.1. Samples

One hundred and ten specimens of *Polysiphonia* were sampled in four different localities (7–74 specimens per site) along the coast of Brittany, France from Saint Malo to Quiberon (about 450 km apart). Three of these sites were located in the intertidal rocky shore (Saint Malo, Roscoff and Quiberon), while the remaining one occurred on a floating pontoon in the marina of Perros-Guirec. In the laboratory, fresh specimens were observed under a dissecting microscope (Olympus® CKX41) before and after being hand sectioned to study their morphological characteristics: number of pericentral cells, presence of cortication, tetrasporangia as well as male or female reproductive structures, types of connection of the rhizoids and shape of vegetative tips. A fragment of tissue from each individual was preserved in silica gel for molecular analysis. Moreover, at least one specimen from each site was pressed and mounted on a herbarium sheet.

2.2. Molecular analyses

DNA was extracted from 5 to 10 mg of dry algal tissue using the Nucleospin® Multi-96 plant kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol and the *rbcL* gene was amplified on an Eppendorf thermocycler following Guillemin et al. (2008). Briefly, reaction mixture contained 0.5× PCR buffer (Abgene), 125 μM each dNTP, 1 pmol each primer, 2.5 mM MgCl₂, 1 U Taq polymerase (Abgene) and 3 μl of DNA (1:25 dilution); PCR cycling included an initial denaturing step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 45 s, 50°C for 60 s and, 72°C for 90 s with a final elongation step of 72°C for 7 min. Finally, PCR products were purified and sequenced by LGC genomics (Berlin, Germany). The obtained sequences were corrected and aligned using Codoncode Aligner v. 3.7 (www.codoncode.com).

Species identification was attempted by searching the National Center for Biotechnology Information (NCBI) reference database using the basic local alignment search tool (BLAST). To complete the BLAST, a tree-based approach (Ross et al., 2008) was used with sequences downloaded from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) including 19 specimens belonging to the genera *Polysiphonia*, *Neosiphonia* and *Vertebrata*; one out-group species (*Laurencia natalensis*) and a selection of sequences of *P. morrowii* generated in the present study in order to include all the haplotypes obtained for each of the four localities sampled in Brittany (Table 1). All sequences were truncated to 1225 sites at the 5' and/or 3' end because the sequences downloaded from GenBank were incomplete. Models of nucleotide evolution were determined using Modeltest (Posada and Crandall, 1998). Tree-based methods were performed using Phylogeny.fr (www.phylogeny.fr/version2.cgi/index.cgi, Dereeper et al., 2008). Maximum-likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) analyses used a GTR+I+G model of sequence evolution and the following parameters derived from Modeltest: Base composition=(A: 0.3097, G: 0.2197, C: 0.1411, T: 0.3295), rate matrix=(2.7880, 6.2016, 5.7235, 0.9990, 27.6721), gamma shape =2.69, proportion of invariable sites =0.552.

3. Results

Specimens collected in the higher intertidal on rocky to sandy substrates formed extensive, dense and conspicuous patches in spring while plants disappeared almost completely in summer. Individuals formed tufts and were highly branched. Plants ranged from 15 to 30 cm in length. The morphological observations revealed a structural organization of four pericentral cells without cortication, sharply pointed vegetative tips, straight series of tetrasporangia and rhizoids not separated from the central axis by any cross walls. Only tetrasporophyte and vegetative individuals were observed.

A total of 110 *rbcL* sequences were generated (Table 1) and the alignment covered 1225 bp with 430 variable sites (35.4%). Two distinct groups were revealed: one with five identical sequences (4.5%) obtained from samples of Saint Malo and perfectly matched (100% similarity) a GenBank sequence of *Polysiphonia stricta* and the second group was composed of 105 sequences that closely matched (99–100% similarity) *P. morrowii* sequences in the database. Three different haplotypes were found in Brittany. The nucleotide sequence identity between pairs of haplotypes ranged from 99.76% for H2/H3 to 99.92% for H1/H3. The haplotype H1 was found in all selected location in Brittany, whereas H2 and H3 were only observed in Roscoff and Quiberon (Fig. 1). Phylogenetic relationships were inferred using *rbcL* gene by ML and BI analyses. Both reconstruction methods showed similar topology (Fig. 1). The sequences generated in the present study were resolved in the lineage containing the *P. morrowii* sequences from GenBank. This lineage was supported by relatively strong support values (79% for the ML tree and 99% for the BI tree). *P. stricta* joined *P. pacifica* and were resolved as a sister group of *P. morrowii*. These three species and *P. atlantica* were resolved as a sister group to the remaining *Polysiphonia* species included in the present analysis.

4. Discussion

Our results based on molecular sequences demonstrated unequivocally the presence of the alien species *P. morrowii* in the North East Atlantic. These non-native species display morphological similarities with the native European species *P. stricta*. Maggs and Stegenga (1999) pointed out that *P. morrowii* could be distinguished from *P. stricta* by its sharply pointed vegetative tips. Nevertheless, this feature was not included among consistent characters for *Polysiphonia* species identification (Stuercke and Freshwater, 2008). Furthermore, we observed a few specimens without pointed vegetative tips which turned to be *P. morrowii* in light of our molecular results. The morphological similarity among both species, together with the fact that they share the same habitats, makes species identification feasible only for well-trained phycologists. In contrast, a molecular approach, such as the one employed in the present study, offers a rapid and accurate alternative (e.g. Destombe et al., 2010).

The observation of *P. morrowii* individuals in the marina of Perros-Guirec and close to the largest aquaculture areas in Brittany (i.e. Roscoff, Saint-Malo, Quiberon) suggests that *P. morrowii* was introduced via vessels and oyster transport (Boudouresque et al., 2011) which is in agreement with the fact that most alien seaweed in Europe have been introduced over the last four decades via aquaculture activities—primarily those involving the Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Farnham, 1980; Mineur et al., 2009). Although few sequences are available from the putative area of origin (South Korea with *rbcL* haplotypes H1, H3 and H4), the presence of different haplotypes in Brittany (H1, H2 and H3) suggests multiple introduction events. Intraspecific *rbcL* divergence within

Table 1

Collection information, sample number/source, and GenBank accession numbers for Rhodomelaceae investigated in this study. Accession number in bold indicate sequences submitted to GenBank in the present study. Sample number in bold corresponds to the specimens for which sequences were deposited in GenBank.

Species	Haplotype	Source/sample number	Collection site	GenBank accession number
<i>Laurencia natalensis</i> Kylin	N/A	Fujii et al. (2006)	South Africa, Palm Beach, S. Kwa Zulu-Natal	AF465816
<i>Neosiphonia harveyi</i> (J.W. Bailey)	N/A	Stuercke and Freshwater (2008)	Banks Channel, New Hanover Co., NC, USA 34° 11.785'N, 77° 48.515'W	EU492909
<i>Neosiphonia japonica</i> (Harvey) M.S. Kim & I.K. Lee	N/A	Mclvor et al. (2001)	Shimoda, Honshu, Japan	AF342903
<i>Polysiphonia atlantica</i> Kapraun & J.N. Norris	N/A	Stuercke and Freshwater (2008)	CORMP Site OB-27, Onslow Bay, NC, USA 33° 59.646'N, 77° 21.144'W	EU492910
<i>Polysiphonia brodiei</i> (Dillwyn) Sprengel	N/A	Mclvor et al. (2001)	Portaferry, Down, N. Ireland	AF342916
<i>Polysiphonia denudata</i> (Dillwyn) Greville ex Harvey	N/A	Mclvor et al. (2001)	Plymouth, Devon, England	AF342914
<i>Polysiphonia elongata</i> (Hudson) Sprengel	N/A	Mclvor et al. (2001)	Fanad, N. Donegal, Ireland	AF342911
<i>Polysiphonia elongella</i> Harvey	N/A	Mclvor et al. (2001)	Pwllheli, Cardigan, Wales	AF342913
<i>Polysiphonia fibrata</i> (Dillwyn) Harvey	N/A	Mclvor et al. (2001)	Marble Hill, N. Donegal, Ireland	AF342915
<i>Polysiphonia fibrillosa</i> (Dillwyn) Sprengel	N/A	Mclvor et al. (2001)	Marble Hill, N. Donegal, Ireland	AF342912
<i>Polysiphonia fucoides</i> (Hudson) Greville	N/A	Stuercke and Freshwater (2008)	South Masonboro Inlet Jetty, New Hanover Co., NC, USA 34° 10.800'N, 77° 49.355'W	EU492913
<i>Polysiphonia morrowii</i> Harvey	H1	Kim et al. (2004)	Korea: Tongyeong: Mireukdo	AY396027
	H1	Kim et al. (2004)	Chile: Punta Arenas: Fuerte Bulnes	AY396029
	H1	Mamoozadeh and Freshwater (2011)	New Zealand: South Island, Curio Bay	HM573579
	H3	Kim et al. (2004)	Korea: Namhaedo: Namhaegyo	AY396031
	H4	Kim et al. (2004)	Korea: Jindo: Hoidong	AY396033
	H1	P317, P42, P297, P327	Biological Station, Roscoff, France 48° 43.658'N, 3° 59.260'W	JF706219
	H1	P361, P356, P357, P359–P361, P363, P364	Port, Perros-Guirec, France 48° 48.264'N, 3° 26.500'W	JF706221
	H1	P407, P408	Pointe du Conguel, Quiberon, France 47° 28.078'N, 3° 4.702'W	JF706222
	H1	P459, P427–P432, P436–P439, P441–P448, P450–P456, P458, P460–P466, P468, P470–P472, P474–P485, P488–P491, P493–P500, P502–P510, P513–P515	Saint Malo, France 48° 38.912'N, 2° 1.819'W	JF706224
	H2	P322, P40, P41, P43, P47, P48, P296, P301, P320, P323, P325, P332	Biological Station, Roscoff, France 48° 43.658'N, 3° 59.260'W	JF706220
	H2	P413, P415, P416	Pointe du Conguel, Quiberon, France 47° 28.078'N, 3° 4.702'W	JF706223
	H3	P329	Biological Station, Roscoff, France 48° 43.658'N, 3° 59.260'W	JF097796
	H3	P406, P414	Pointe du Conguel, Quiberon, France 47° 28.078'N, 3° 4.702'W	JQ679026
<i>Polysiphonia pacifica</i> Hollenberg	N/A	Kim et al. (2004)	Seal Rock, Oregon, USA	AY396036
<i>Polysiphonia stricta</i> (Dillwyn) Greville	N/A	Kim and Yang (2005), P433–P435, P440, P449	Flamborough, Yorkshire, England	AY958167
<i>Polysiphonia subtilissima</i> Montagne	N/A	Stuercke and Freshwater (2008)	Reed's Bay, Hilo, Hawai'i, Hawaiian Islands	EU492919
<i>Vertebrata lanosa</i> (Linnaeus) T.A. Christensen	N/A	Stuercke and Freshwater (2008)	Pt. Lepreau, New Brunswick, Canada	EU492914

P. morrowii for specimens from Chile, South Korea and France differed by up to 4 bp (0–0.32% of divergence).

In its native range, *P. morrowii* has been reported as an intertidal species and it has been found on a large variety of substrata including rocks, wooden piles, ropes, mussels, crabs, and shells, as well as other large algae, such as *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Kim et al., 1994; Kudo and Masuda, 1992). In Chile and the Mediterranean Sea, where *P. morrowii* has been reported as introduced, it was observed in the same variety of habitats than in its native area (Curiel et al., 2002; Kim et al., 2004). Both gametophytes and tetrasporophytes have been described in natural populations of South Korea, with a predominance of the tetrasporophytic stage (Kim et al., 1994). However, in our study we only found tetrasporophyte individuals, suggesting that sexual reproduction is rare or even absent in Brittany and that *P. morrowii* reproduces mainly by fragmentation. Anomalous life cycles, such as individuals showing several different life

history phases and monoecious individuals have been reported for this species outside its native range, in Mediterranean populations (Curiel et al., 2002). Interestingly, in all cases, these anomalies entail a considerable reduction in the duration of the life cycle. Moreover, vegetative propagation has been reported for various introduced species of Rhodomelaceae: *Womersleyella setacea* in the Mediterranean Sea (Airoldi, 1998) and in *P. fucoides* and *P. fibrillosa* in the Baltic Sea (Eriksson and Johansson, 2005). According to Kim et al. (2004), *P. morrowii* features a number of biological traits such as the ability to colonize a variety of substrata, rapid growth, vegetative propagation and a short life cycle, which give *P. morrowii* certain advantages over native algae. This introduction has probably gone unnoticed in Brittany, until now, due to its morphological similarity with the two native species *P. stricta* and *P. atlantica* (Kim and Lee, 1996). In light of these results, *P. morrowii* is likely to be a cosmopolitan invasive species and should be further monitored.

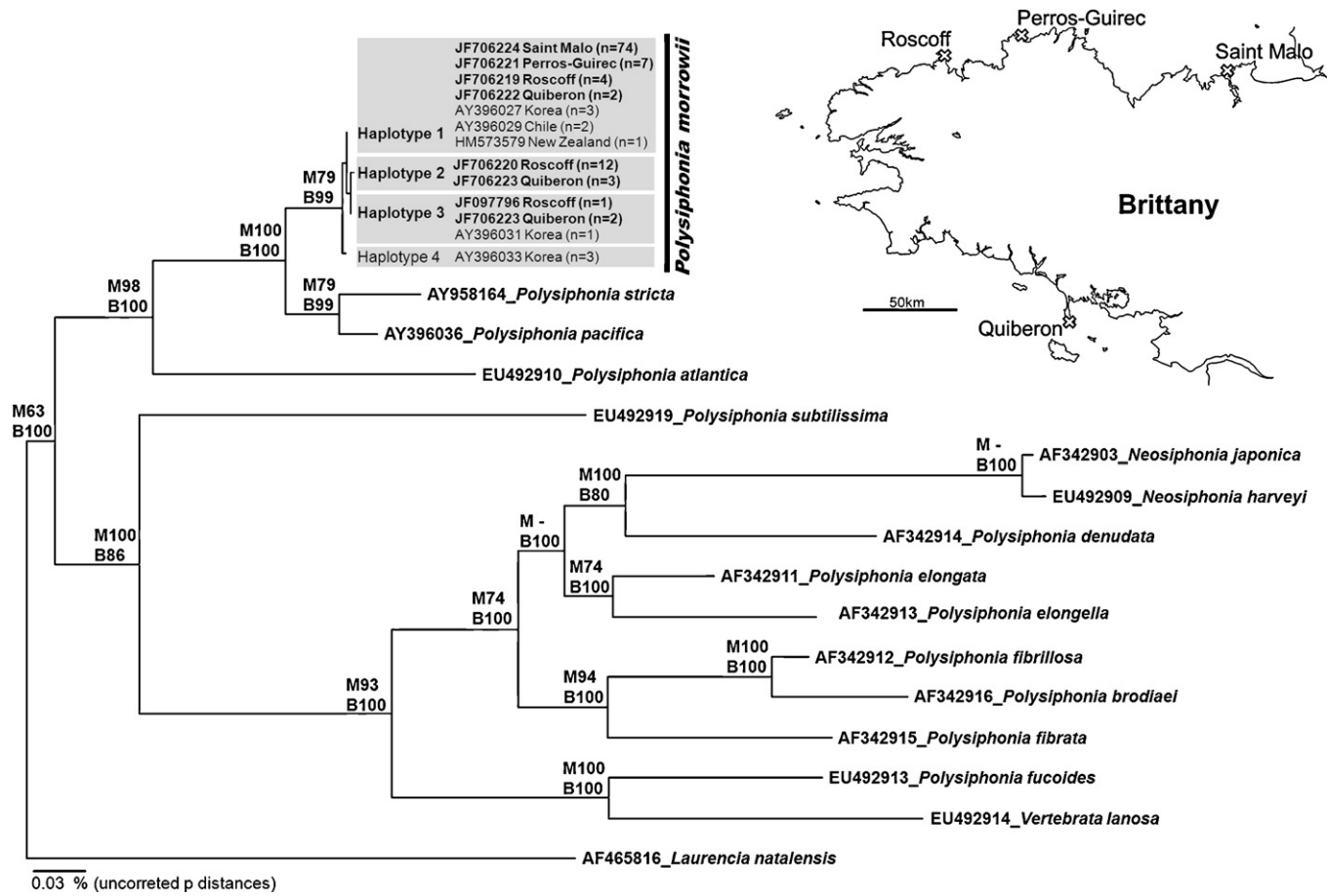


Fig. 1. Maximum likelihood tree based on *rbcL* sequence data from 27 *Polysiphonia*/*Neosiphonia*/*Vertebrata* specimens and one outgroup specimen (outgroup: *Laurencia nataliensis*, Rhodomelaceae, Ceramiales) and locations of the sampling stations in Brittany. Bootstrap support values for maximum likelihood (M) and posterior probabilities from the Bayesian phylogenetic analysis (B) are shown for each branch. (–) indicates branches with values of bootstraps or posterior probabilities below 45.

Acknowledgements

This study was partially supported by grants from the French Ministry for the Economy, Industry and Employment and the Brittany Regional Council through the project AQUACTIFS “Convention de soutien de l’état à des actions de recherche et d’innovation par voie de subvention – Fonds de compétitivité des entreprises”. Warm thanks to Frederique Viard and Lucia Couceiro for their comments on earlier versions of the manuscript, and to Mathieu Camusa for providing samples from the Perros-Guirec marina.

References

- Airolidi, L., 1998. Roles of disturbance, sediment stress, and substratum retention on spatial dominance in algal turf. *Ecology* 79, 2759–2770.
- Boudouresque, C.F., Klein, J., Ruitton, S., Verlaque, M., 2011. Biological invasion: the Thau lagoon, a Japanese biological island in the Mediterranean Sea. In: *Global Change: Mankind–Marine Environment Interactions*. Springer, Netherlands, pp. 151–156.
- Carlton, J.T., Geller, J.B., 1993. Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms. *Science* 261, 78–82.
- Curiel, D., Bellemo, G., Rocca, B.L., Scattolin, M., Marzocchi, M., 2002. First report of *Polysiphonia morrowii* Harvey (Ceramiales, Rhodophyta) in the Mediterranean sea. *Bot. Mar.* 45, 66–70.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469.
- Destombe, C., Valero, M., Guillemin, M.L., 2010. Delineation of two sibling red algal species, *Gracilaria gracilis* and *Gracilaria dura* (Gracilariaceae, Rhodophyta), using multiple DNA markers: resurrection of the species *G. dura* previously described in the northern Atlantic 200 years ago. *J. Phycol.* 46, 720–727.
- Erdoğan, H., Aki, C., Acar, O., Dural, B., Aysel, V., 2009. New record for the east Mediterranean, Dardanelles (Turkey) and its distribution: *Polysiphonia morrowii* Harvey (Ceramiales, Rhodophyta). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 9, 231–232.
- Eriksson, B.K., Johansson, G., 2005. Effects of sedimentation on macroalgae: species-specific responses are related to reproductive traits. *Oecologia* 143, 438–448.
- Farnham, W.F., 1980. Studies on aliens in the marine flora of southern England. In: Price, J.H., Irvine, D.E.G., Farnham, W.F. (Eds.), *The Shore Environment*, volume 2: Ecosystems. Academic Press, London, pp. 875–914 (Systematics Association Special Volume, No. 17B).
- Fujii, M.T., Guimarães, S.M.P.B., Gurgel, C.F.D., Fredericq, S., 2006. Characterization and phylogenetic affinities of the red alga *Chondrophycus flagelliferus* (Rhodomelaceae, Ceramiales) from Brazil on the basis of morphological and molecular evidence. *Phycologia* 45, 432–441.
- Guillemin, M.L., Akki, S.A., Givernaud, T., Mouradi, A., Valero, M., Destombe, C., 2008. Molecular characterisation and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquat. Bot.* 89, 324–330.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2011. AlgaeBase. World-wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway (27 February 2011) <http://www.algaebase.org>.
- Kim, M.S., Lee, I.K., 1996. Morphology and reproduction of *Polysiphonia atlantica* Kapraun et J. Norris (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *J. Plant Biol.* 39, 23–29.
- Kim, M.S., Lee, I.K., Boo, S.M., 1994. Morphological studies of the red alga *Polysiphonia morrowii* Harvey on the Korean coast. *Korean J. Phycol.* 9, 185–192.
- Kim, M.S., Maggs, C., McIvor, L., Guiry, M., 2000. Reappraisal of the type species of *Polysiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* 35, 83–92.
- Kim, M.S., Yang, E.C., 2005. Taxonomic note of *Polysiphonia pacifica* (Ceramiales, Rhodophyta) complex with focus on Pacific isolates. *Algae* 20, 15–23.
- Kim, M.S., Yang, E.C., 2006. Taxonomy and phylogeny of *Neosiphonia japonica* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) based on *rbcL* and *cpeA/B* gene sequences. *Algae* 21, 287–294.
- Kim, M.S., Yang, E.C., Mansilla, A., Boo, S.M., 2004. Recent introduction of *Polysiphonia morrowii* (Ceramiales, Rhodophyta) to Punta Arenas, Chile. *Bot. Mar.* 47, 389–394.
- Knowlton, N., 1993. Sibling species in the sea. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24, 189–216.
- Kudo, T., Masuda, M., 1992. Taxonomic features of *Polysiphonia morrowii* Harvey (Ceramiales, Rhodophyta). *Korean J. Phycol.* 7, 13–26.

- Maggs, C.A., Stegenga, H., 1999. Red algal exotics on North Sea coasts. *Helgolander Meeresun.* 52, 243–258.
- Mamoozadeh, N.R., Freshwater, D.W., 2011. Taxonomic notes on Caribbean *Neosiphonia* and *Polysiphonia* (Ceramiales, Florideophyceae): five species from Florida, USA and Mexico. *Bot. Mar.* 54, 269–292.
- McIvor, L., Maggs, C.A., Provan, J., Stanhope, M.J., 2001. *rbcL* sequences reveal multiple cryptic introductions of the Japanese red alga *Polysiphonia harveyi*. *Mol. Ecol.* 10, 911–919.
- Mineur, F., De Clerck, O., Le Roux, A., Maggs, C.A., Verlaque, M., 2009. *Polyopes lancifolius* (Halymeniales, Rhodophyta), a new component of the Japanese marine flora introduced to Europe. *Phycologia* 49, 86–96.
- Molnar, J.L., Gamboa, R.L., Revenga, C., Spalding, M.D., 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Front. Ecol. Environ.* 6, 485–492.
- Nelson, W.A., Maggs, C.A., 1996. Records of adventive marine algae in New Zealand: *Antithamnionella ternifolia*, *Polysiphonia senticulosa* (Ceramiales, Rhodophyta), and *Striaria attenuata* (Dictyosiphonales, Phaeophyta). *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 30, 449–453.
- Perestenko, L.P., 1980. Algae of Peter the Great Bay. Nauka, Leningrad, pp. 232–239.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817.
- Ross, H.A., Murugan, S., Sibon Li, W.L., 2008. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Syst. Biol.* 57, 216.
- Saunders, G.W., Le Gall, L., 2010. Editorial. *Cryptogam. Algol.* 31, 373–375.
- Segi, T., 1951. Systematic study of the genus *Polysiphonia* from Japan and its vicinity. *J. Fac. Fish. Prefect. Univ. Mie* 1, 169–272.
- Stuercke, B., Freshwater, D.W., 2008. Consistency of morphological characters used to delimit *Polysiphonia* sensu lato species (Ceramiales, Florideophyceae): analyses of North Carolina, USA specimens. *Phycologia* 47, 541–559.
- Verlaque, M., 2001. Checklist of the macroalgae of Thau lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanol. Acta* 24, 29–49.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence pour la première fois en Atlantique Nord, la présence de l'espèce *Polysiphonia morrowii* Harvey par une approche de type barcoding (*rbcL*). Cette espèce, originaire des côtes du Pacifique Nord-Ouest (Japon, Corée), est morphologiquement proche de deux espèces autochtones *P. stricta* et *P. atlantica*, ce qui explique qu'elle soit jusqu'alors passée inaperçue. Nos résultats montrent que cette espèce est présente sur toute la côte Bretonne de St-Malo à Quiberon (450km) principalement à proximité des zones aquacoles. Elle forme des groupes d'individus fixés à la roche dans la zone de balancement des marées. L'approche moléculaire s'est révélée efficace dans l'identification et la délimitation des espèces du genre *Polysiphonia*, en fournissant de nouveaux caractères discriminants là où l'approche morphologique ne suffisait pas.

On peut alors se demander quel est l'impact de cette introduction sur la diversité locale. En effet peu d'individus de *Polysiphonia stricta* ont été observés dans cette étude, alors que cette espèce native des côtes Bretonnes représente le type du genre *Polysiphonia*. L'introduction de *P. morrowii* aurait-elle remplacé *P. stricta* ? Ce phénomène serait-il passé inaperçu en raison du caractère cryptique de cette introduction ? Geller (1999) a montré que l'invasion cryptique de la moule bleue européenne, *Mytilus galloprovincialis*, en Californie avait masqué le déclin de l'espèce native *Mytilus trossulus*. En est-il de même pour *P. stricta* et *P. morrowii* ?

Par ailleurs, cette introduction pour également avoir des répercussions dans le domaine économique car cette espèce pourrait à terme entrer en compétition avec l'espèce cultivée *P. elongata*. Enfin, comme beaucoup d'autres algues rouges, l'espèce *P. morrowii* a été décrite comme ayant des propriétés antioxydantes et antivirales (Je et al. 2009, Kim et al. 2011 et Piao et al. 2012). Elle pourrait donc être exploitée à ce titre en la prélevant directement dans le milieu naturel. Peut-on cultiver une espèce introduite sans connaître son impact possible sur le milieu naturel ? Ne risque-t-on pas de favoriser sa dispersion en la cultivant à grande échelle ?

En juillet 2012, un rapport (<http://agriculture.gouv.fr/>) sur 'Expertise du projet de filière d'algoculture alimentaire en Bretagne' préconisait que : « *Les espèces cultivables doivent également répondre à la réglementation en vigueur en matière d'espèces allochtones, dont le caractère non invasif doit être démontré. Le Règlement CE N° 708/2007 du Conseil qui encadre spécifiquement l'utilisation en aquaculture des espèces exotiques et des espèces*

localement absentes, définit en particulier de manière très stricte l'utilisation de telles espèces, y compris à des fins expérimentales. » Toutes ces interrogations nécessitent donc de mieux connaître la biologie de cette algue afin de mieux cerner les risques potentiels liés à son éventuelle exploitation.

Chapitre 4



Polysiphonia morrowii, *Sargassum muticum* et *Ulva*, Roscoff (©Geoffroy)

Chapitre 4. Utilisation de marqueurs moléculaires pour inférer un scénario d'introduction

I. Contexte de l'étude et principaux résultats.

De nombreuses espèces introduites sont à l'origine de modifications majeures et durables de la biodiversité (Sakai *et al.* 2001, Grosholz 2002). Certaines n'auront pas de conséquences visibles sur les autres espèces et/ou sur l'écosystème envahi, mais une fois établies, elles participent au fonctionnement et à l'évolution des peuplements et écosystèmes dans lesquelles elles ont été introduites (*e.g.* nouvelles proies, nouveaux prédateurs, hybridation avec des espèces autochtones). Afin de pouvoir contrôler ou limiter ces espèces introduites, il est important de connaître les processus d'introductions. Plusieurs étapes ont été schématisées de la façon suivante (Williamson et Fitter 1996): (1) les individus sont transportés de leur aire d'origine dans un nouvel environnement et doivent rencontrer des conditions favorables à leur survie et reproduction pour fonder une population durable (étape d'introduction et d'installation), puis (2) la taille de la population introduite augmente et s'étend hors du point d'introduction (étape d'expansion) et enfin (3) l'espèce exotique se maintient sur le long terme dans sa nouvelle aire de distribution et établit de nouveaux liens écologiques avec les espèces natives ou introduites déjà installées (étape d'établissement). Une variété de définitions (Table 1) complique de plus la comparaison des patrons d'invasion et donc la compréhension des processus impliqués lors d'introductions biologiques (Blackburn *et al.* 2011).

De nombreux vecteurs ont été identifiés pour les introductions d'espèces marines (Figure 1) mais deux vecteurs sont majoritaires : le trafic maritime et l'aquaculture. Le trafic maritime est responsable d'introduction accidentelle par deux mécanismes : le transport dans les eaux de ballast utilisées pour lester les navires, et le transport sur la coque du bateau. L'aquaculture est à l'origine d'introduction délibérée d'espèces dans un nouvel environnement. Par exemple, entre 1971 et 1975, plus de 500 tonnes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* ont été volontairement introduites du Canada en France, et plus de 10 000 tonnes de naissains du Japon au Canada afin de dynamiser les élevages conchylicoles français suite à des épisodes récurrents de mortalité des huîtres d'élevage (Grizel et Héral 1991). Ces introductions

délibérées sont également accompagnées d'introductions accidentelles. En effet, de nombreuses espèces ont été introduites avec *C. gigas* comme par exemple, le wakamé *Undaria pinatifida* (Voisin et al. 2005).



Figure 1 Les principaux vecteurs d'introductions utilisés par 329 espèces exotiques en milieu marin sont représentés en pourcentage. La somme de ces derniers est supérieure à 100, car certaines espèces sont introduites par plusieurs vecteurs. (Viard et Comtet 2009 d'après Molnar et al. 2008).

L'utilisation d'outils moléculaires pour étudier les phénomènes d'introduction se révèle utile notamment 1) dans la détection précoce de nouvelles introductions et/ou d'introduction cryptiques (cf. chapitre 3), 2) dans l'identification des voies d'introduction et des vecteurs, 3) dans la compréhension du succès des invasions et 4) l'évaluation de la taille effective des populations au cours de la mise en place de nouvelles populations (Figure 2, Blanchet et al. 2012).

Dans ce contexte nous avons utilisé une approche de type barcode multilocus (*rbcL* et *cox1*) afin d'identifier les potentielles populations sources (Corée du Sud) de deux aires d'introduction : la France et l'Argentine. La comparaison de diversité des cytotypes observés indique que les deux aires d'introduction ne présentent pas de réduction de diversité génétique mais au contraire une diversité relativement élevée par rapport à la zone d'origine supposée suggérant plusieurs événements d'introductions. Par ailleurs, les populations de Corée du Sud fortement structurées n'apparaissent pas comme la source principale de ces introductions.

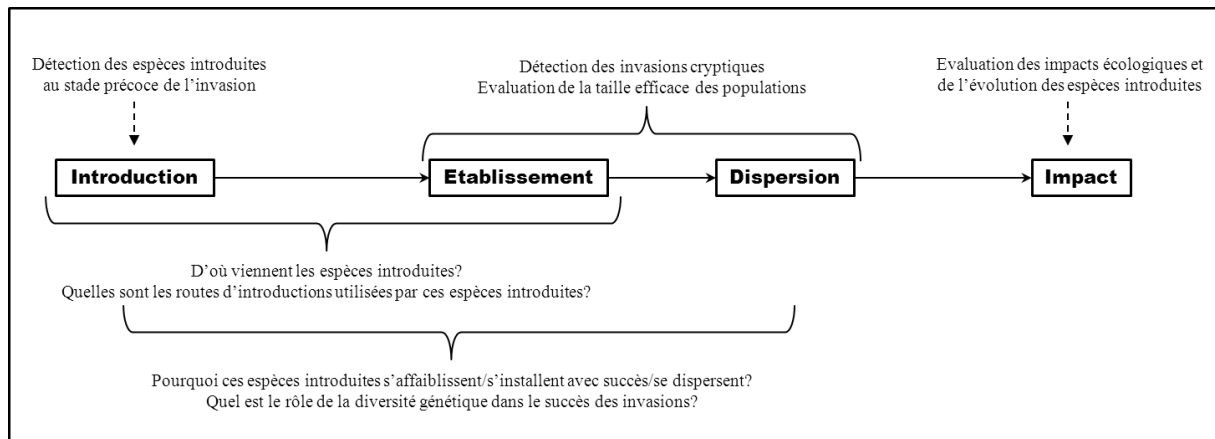


Figure 2 Diagramme montrant les diverses questions liées aux invasions biologiques auxquelles on peut répondre à l'aide d'outils moléculaires, permettant l'étude des invasions biologiques de l'introduction d'espèces à travers la mise en place et l'impact (Blanchet 2012).

Table 1 Illustration de la variété de terminologies et de définitions utilisées entre deux études portant sur les introductions biologiques, celle de Richardson et al. (2000) et Boudouresque (2008). D'après Boudouresque (2008).

Définition	Richardson <i>et al.</i> (2000)	Boudouresque (2008)
L'organisme, ou ses propagules, a franchi, grâce à l'homme, une barrière géographique	espèce introduite synonymes: non native, non-indigène, alien, exotique	espèce non-indigène synonymes: non native, alien, exotique
L'organisme se reproduit dans sa nouvelle région géographique, mais ne peut se maintenir à long terme	espèce occasionnelle synonymes: espèce "errante", persistante après culture, échappée, "adventive"	adventice synonyme: occasionnelle
L'organisme se reproduit régulièrement dans sa nouvelle aire géographique, sans l'aide de l'homme et se maintient sur le long terme	espèce naturalisée synonyme: espèce établie	espèce introduite synonyme: espèce naturalisée
Espèce naturalisée dont l'aire s'étend plus ou moins rapidement, y compris dans des habitats naturels (non perturbés)	espèce invasive	
Espèce naturalisée qui a un impact fort sur la diversité spécifique, sur le fonctionnement des écosystèmes indigènes, ou qui a un impact économique négatif	"weed" (<i>i.e.</i> "mauvaise herbe")	espèce invasive
Espèce naturalisée qui bouleverse le fonctionnement des écosystèmes indigènes, éventuellement qui détermine la constitution d'un nouvel écosystème	transformateur	transformateur

II. Article 3: « Genetic diversity of the cryptic introduced species *Polysiphonia morrowii* (Ceramiales, Rhodophyta): evidence for multiple introductions »

Alexandre Geoffroy, Stéphane Mauger, Line Le Gall, María Paula Raffo, Myung Sook Kim and Christophe Destombe – en preparation pour Marine Biology

Genetic diversity of the cryptic introduced species *Polysiphonia morrowii* (Ceramiales, Rhodophyta): evidence for multiple introductions

Alexandre Geoffroy^{1,2}, Stéphane Mauger^{1,2}, Line Le Gall³, María Paula Raffo⁴, Myung Sook Kim⁵ and Christophe Destombe^{1,2}

¹ UPMC Univ Paris 06, UMR 7144, Équipe “BEDIM”, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, F-29682 Roscoff Cedex, France.

² CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Équipe “BEDIM”, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France.

³ Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), UMR 7138, Systématique, Adaptation et Evolution, 57 rue Cuvier, CP 39, 75231 Paris Cedex 05, France.

⁴ Grupo de Ecología en Ambientes Costeros, Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET), Bvd. Brown 2915, Puerto Madryn (U9120ACF)– Chubut, Argentina.

⁵ Department of Biology, Jeju National University, 66 Jejudaehakno, Jeju-si, Jeju-do, 690-756, Korea

Contact: geoffroy@sb-roscoff.fr

Keywords: introduction pathways, cryptic species, Brittany, Argentina, Korea, barcode, *rbcL*, *cox1*, red alga.

Abstract

The rate of introduction of exotic marine species dramatically increased during the 19th and 20th centuries. Exemplifying this trend, the marine alga *Polysiphonia morrowii*, originating from Northeast Asia, has been reported recently in the Mediterranean Sea, the North Sea, in the South Pacific Ocean in Chile and New Zealand, in the North Atlantic Ocean in France and in the South Atlantic Ocean in Argentina. To determine the origin of the French and Argentine populations of this introduced species, we compared samples from these two areas with samples collected in South Korea. Analyses of mitochondrial and chloroplast DNA revealed that the French and Argentine populations are closely related and substantially differentiated from the Korean populations. The genetic structure of the Korean populations and the relatively high level of haplotype diversity found in Argentina and in France compared to South Korea suggest the occurrence of different events of introduction from areas other than South Korea. Finally, although similar, the French and Argentine populations were not identical. Thus, the genetic structure of these two introduced areas may have been modified by cryptic and recurrent introduction events directly from Asia or from other introduced areas that act as introduction relays. Our results suggest that the most likely scenario is that the source population(s) of the French and Argentine populations were not located only in South Korea.

INTRODUCTION

Interoceanic shipping and human activities (aquaculture, fishing) have helped form an interconnected network between seas and oceans, favoring species dispersal and increasing the risk of introduction into coastal marine ecosystems (Carlton and Geller 1993). In fact, coastal invasions are often considered one of the major factors behind the erosion of marine biodiversity (Molnar et al. 2008). The term ‘invasive species’ typically refers to alien species that have a negative impact on the environment or on human activities. Even though only a small proportion of introduced species actually become invasive (Williamson and Fitter 1996), introduced species current frequency is considerable. In the marine realm, more than 300 invasive species have been inventoried recently, most of them being introduced accidentally via shipping and aquaculture activities (Molnar et al. 2008). Moreover, it has been suggested that the number of alien/invasive species may have been underestimated due to the lack of conspicuous characters to distinguish between sibling species (Knowlton 1993). Interestingly, a large percentage of the recorded invasive marine species (14%; Molnar et al. 2008) are seaweeds (for a review of algal introduction, see Williams and Smith 2007), a group of organisms that are often difficult to identify solely on the basis of morphological characters, due to, for the most part, either phenotypic plasticity or morphological convergence, heteromorphic life cycles and lack of clear diagnostic morphological characters (e.g. Andreakis et al. 2004; McIvor et al. 2001). Identification of invasive species in some genera of Rhodophyta using morphological characters can be particularly difficult and may not even be conclusive (e.g. Gurgel and Fredericq 2004, Thomsen et al. 2005), particularly when native and non-native species are indistinguishable from one another despite clear genetic differences. This inconspicuousness is referred as cryptic introduction.

Molecular genetic approaches have proven to be powerful tools for identifying cryptic species, and may compensate for the lack of diagnostic morphological characters. Given that

cryptic exotic species are typically unrecognized or are mistaken for native species, knowledge of phylogeography and population genetic structure are of particular interest when trying to reconstruct the history of invasion (Saltonstall 2002). In marine organisms, genetic studies have been successfully used to reconstruct biological invasions and to infer the evolutionary scenarios following invasion (Hänfling et al. 2002; Andreakis et al. 2007; See and Feist 2010, Krug et al. 2012). In particular, intra- and interpopulation structure of invasive species can be used to infer the number of introduction events and to date the period of the introduction. Evidence of population bottlenecks and founder events, characterized by low genetic diversity, can be detected in using population genetic approaches (Lee 2002, Miura 2007). For example, the study of the green alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* revealed four haplotypes in the native range (Japan) but only one or two in introduced populations around the world (Provan et al. 2005). Some macroalgal invasions have been shown to have started from a single or a few founder individuals (Voisin et al. 2005), but in other cases the patterns are more complex, with populations being composed of multiple genetic lineages resulting from multiple and recurrent founder events (Andreakis et al. 2009). The genus *Polysiphonia* is cosmopolitan and phylogenetically very diverse with almost 200 currently recognized species worldwide (Guiry and Guiry 2012, www.algaebase.org). In this genus, two species are considered invasive (*P. breviarticulata*; Kapraun and Searles 1990 and *P. brodiei*; Adams 1991, Lewis 1999). Recently, the presence of *Polysiphonia morrowii* was reported outside of its putative native range (Northeast Asia). This species was initially described by Harvey in 1853 based on individuals collected in the China Sea at Hakodadi (Hakodate, Hokkaido Prefecture, Japan) and has been reported in Japan (Kudo and Masuda 1992), in South Korea (Kim et al. 1994), in China (Segi 1951) and in Far East Russia (Perestenko 1980). Introduction of this species was recorded in the Mediterranean Sea (Curiel et al. 2002; Erduğan et al. 2009; Verlaque 2001), in the South Pacific Ocean in Chile (Kim et

al. 2004) and in New Zealand (Mamoozadeh and Freshwater 2012), in the North Sea (Maggs and Stegenga 1999), in the North Atlantic Ocean in France (Geoffroy et al. 2012) and in the South Atlantic in Argentina (Raffo et al. unpublished data).

P. morrowii's wide-reaching distribution covering different overlapping biogeographic provinces can be partly explained by a rapid worldwide introduction like the two well-known invasive seaweed species, *Caulerpa taxifolia* and *Undaria pinnatifida*. *P. morrowii* introduction in Europe was reported as a cryptic introduction (Geoffroy et al. 2012), with this species being morphologically indistinguishable from some other native species such as *Polysiphonia stricta* or *Polysiphonia atlantica* (Kim and Lee 1996). Using a DNA barcode approach to detect cryptic introductions of *P. morrowii* in Brittany, France, three haplotypes were identified, suggesting multiple introduction events (Geoffroy et al. 2012).

The purpose of the present study was to test the hypothesis of several introductions by examining the genetic diversity (Blanchet 2012) of *P. morrowii* from Northeast Asia, its putative native range, and compare it with introduced individuals from France and Argentina. To do so, we used population genetic diversity approaches using mitochondrial and chloroplast markers on native populations collected in Southern Korea and introduced populations collected in western France and southern Argentina. Moreover, we tested hypotheses linking genetic variation with recent introductions (i.e. the bottleneck hypothesis). Finally, because it is generally admitted that biological traits of species may favor introduction success in Rhodophyta (Maggs and Stegenga 1999) we studied the phenology of *P. morrowii* to estimate the importance of sexual reproduction versus vegetative propagation in introduced area.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Specimens and collection details are listed in Table S1. More than 300 individuals of *P. morrowii* were sampled in three different regions: South Korea (89), Argentina (56) and France (192). In addition, 105 specimens sampled in France for a previous study (Geoffroy et al. 2012) were also included in the analyses. Ten localities separated by 10 to 80km apart were sampled in South Korea (5–10 specimens per site) around the Jeju Island (in the Korea Strait) and two (separated by 200km apart) along the Sea of Japan (east) coast. The more distant populations were separated by about 400km apart. Three localities distant from 5 to 30 km apart were sampled in Argentina (11–29 specimens per site) in Nuevo Gulf, Patagonia. Eight localities were sampled in France, seven sites distant from 2 to 450 km apart along the Brittany coast (7–131 specimens per site) and one locality from the Mediterranean Sea (Gulf of Lion) (4 specimens). All sites in Brittany were located in the intertidal zone on rocky shores, and one was located in a marina (Perros–Guirec). A fragment of tissue from each individual was preserved in silica gel for molecular analysis. Moreover, at least one specimen per site was pressed and mounted on a herbarium sheet and conserved at the Roscoff Marine Station / French National Museum of Natural History.

A phenological population survey was conducted for 5 months from November 2011 to June 2012 in two patches of individuals separated by 5 m at a site in Roscoff (Geoffroy et al. 2012). Once a month, whenever possible, up to 25 individuals were sampled. Each individual was observed under a dissecting microscope (Olympus® CKX41) to determine its reproductive stage (tetrasporangia, male or female gametangia). The tetrasporophyte individuals were recognized by the presence of tetrasporangia. The male gametangial individuals were identified by the occurrence of spermatangial branches. The female gametangial plants were identified by the presence of cystocarps, which are products of

Chlorotype	Voucher number / source	Collection site	GenBank accession number
C1	Geoffroy et al. 2012; P313, P526, P592, P593, P632, P644, P647, P649, P651, P652, P705, P707, P941, P943, P944, P654, P658, P1063, P1073, P1076–P1080, P1085, P1100, P1108	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	JF706219
C1	Geoffroy et al. 2012	Port, Perros–Guirec, France 48°48.264'N, 3°26.500'W	JF706221
C1	Geoffroy et al. 2012; P391–P394, P396, P400, P409, P410, P417, P594–P597, P600–P604, P606–P618	Pointe du Conguel, Quiberon, France 47°28.078'N, 3°4.702'W	JF706222
C1	Geoffroy et al. 2012; P486	Saint Malo, France 48°38.912'N, 2°1.819'W	JF706224
C1	P427 –P432, P436–P439, P441–P448, P450–P456	Dinard, France 48°38.475'N, 2°7.080'W	XXXXXX
C1	P488 –P491, P493–P510, P513–P515	Rothéneuf, France 48°40.665'N, 1°59.262'W	XXXXXX
C1	P653 , P654, P656, P658, P660–P662, P666–P673, P675–P676, P679–P680, P682, P684, P686–P692, P694	Biological Station, Concarneau, France 47° 52.102'N, 3° 55.075'W	XXXXXX
C1	P715	Port la Nouvelle, Méditerranée, France 43°1.068'N, 3°3.226'E	XXXXXX
C1	P716	Port Leucate, Etang de Salses, Méditerranée, France 42°51.558'N, 3°0.087'E	XXXXXX
C1	P717 –P718	Etang de Thau, Méditerranée, France 43°23.872'N, 3°35.902'E	XXXXXX
C1	P619 –P624, P626, P629, P631	Casino, Golfo Nuevo, Argentina 42°37.525'S, 64°56.103'W	XXXXXX
C1	P720 , P724–P726, P728, P732, P734–P737, P740, P743, P744, P747	Ameghino, Golfo Nuevo, Argentina 42°37.060'S, 64°52.234'W	XXXXXX
C1	P748 , P749, P751, P752, P754–P758, P760, P761, P763, P765–P777	Las Charas, Golfo Nuevo, Argentina 42°30.351'S, 64°38.808'W	XXXXXX
C1	P963 –P969	Deoksan, Gangwondo, Korea 37°22.730'N, 129°14.453'E	XXXXXX
C2	Geoffroy et al. 2012; P300, P302, P309, P310, P312, P314–P316, P318, P319, P568–P581, P583–P587, P590, P642, P643, P645, P648, P901, P942, P945, P946, P948, P949, P951–P953, P955, P956, P959, P960, P1062, P1064–P1067, P1075, P1082–P1084, P1086–P1099, P1101–P1104, P1107, P1110–P1113, P1115	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	JF706220
C2	Geoffroy et al. 2012; P395, P397, P399, P420, P423–P425	Pointe du Conguel, Quiberon, France 47°28.078'N, 3°4.702'W	JF706223
C2	P655 , P657	Biological Station, Concarneau, France 47° 52.102'N, 3° 55.075'W	XXXXXX
C3	Geoffroy et al. 2012; P1074	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	JF097796

Chlorotype	Voucher number / source	Collection site	GenBank accession number
C3	Geoffroy et al. 2012; P412, P418, P419	Pointe du Conguel, Quiberon, France 47°28.078'N, 3°4.702'W	JQ679026
C3	P1010–P1016	Gosung, Gyeongsangnamdo, Korea 34°57.596'N, 128°18.383'E	XXXXXXX
C4	P633	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	XXXXXXX
C4	P980–P989	Ongpo, Jeju, Korea 33°24.027'N, 126°15.313'E	XXXXXXX
C4	P990–P999	Gimnyeong, Jeju, Korea 33°32.185'N, 126°44.727'E	XXXXXXX
C4	P1000–P1009	Hamdeok, Jeju, Korea 33°31.845'N, 126° 36.220'E	XXXXXXX
C4	P1017–P1026	Sungsan, Jeju, Korea 33°28.138'N, 126°55.994'E	XXXXXXX
C4	P1027–P1036	Geumneung, Jeju, Korea 33°21.481'N, 126°14.652'E	XXXXXXX
C4	P1037–P1046	Sehwa, Jeju, Korea 33°30.730'N, 126°50.671'E	XXXXXXX
C4	P1047–P1051	Seogeondo, Jeju, Korea 33°15.110'N, 126°33.552'E	XXXXXXX
C4	P1052–P1061	Sagye, Jeju, Korea 33°14.185'N, 126°18.116'E	XXXXXXX
C5	P625, P630	Casino, Golfo Nuevo, Argentina 42°37.525'S, 64°56.103'W	XXXXXXX
C5	P762, P764	Las Charas, Golfo Nuevo, Argentina 42°30.351'S, 64°38.808"W	XXXXXXX
C6	P730	Ameghino, Golfo Nuevo, Argentina 42°37.060'S, 64°52.234'W	XXXXXXX
C6	P750	Las Charas, Golfo Nuevo, Argentina 42°30.351'S, 64°38.808"W	XXXXXXX
C7	P727	Ameghino, Golfo Nuevo, Argentina 42°37.060'S, 64°52.234'W	XXXXXXX
C8	P753	Las Charas, Golfo Nuevo, Argentina 42°30.351'S, 64°38.808"W	XXXXXXX
C9	P1068–P1072	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	XXXXXXX

Mitotype	Voucher number / source	Collection site	GenBank accession number
M1	P297 , P317, P327	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	XXXXXX
M2	P40 , P41, P43, P47, P296, P300–P302, P309, P310, P312, P314–P316, P318–P320, P322, P323, P325, P329, P332, P568–P572, P575, P577, P578, P584–P587, P643, P645, P648, P942, P945, P946, P948, P949, P951–P953, P955, P956, P959, P960, P1062–P1071, P1072, P1074, P1075, P1082–P1084, P1086–P1099, P1101–P1104, P1107, P1109–P1113, P1115	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	XXXXXX
M2	P655 , P657	Biological Station, Concarneau, France 47° 52.102'N, 3° 55.075'W	XXXXXX
M2	P395 , P397–P399, P413–P416, P420, P423	Pointe du Conguel, Quiberon, France 47°28.078'N, 3°4.702'W	XXXXXX
M2	P1010 –P1016	Gosung, Gyeongsangnamdo, Korea 34°57.596'N, 128°18.383'E	XXXXXX
M3	P488 –P491, P493–P510, P513–P515	Rothéneuf, France 48°40.665'N, 1°59.262'W	XXXXXX
M3	P458 –P466, P468, P470–P472, P474–P486	Saint Malo, France 48°38.912'N, 2°1.819'W	XXXXXX
M3	P356 , P357, P359–P361, P363, P364	Port, Perros–Guirec, France 48°48.264'N, 3°26.500'W	XXXXXX
M3	P592 , P593, P651, P652, P941, P943, P944, P1073, P1100, P1106	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	XXXXXX
M3	P653 , P654, P658, P660–P662, P666–P673, P675–P676, P679–P680, P682, P684, P686–P692, P694	Biological Station, Concarneau, France 47° 52.102'N, 3° 55.075'W	XXXXXX
M3	P391 –P394, P400, P406–P410, P417–P419, P424, P425, P594–P597, P600–P604, P606–P615	Pointe du Conguel, Quiberon, France 47°28.078'N, 3°4.702'W	XXXXXX
M3	P715	Port la Nouvelle, Méditerranée, France 43°1.068''N, 3°3.226'E	XXXXXX
M3	P716	Port Leucate, Etang de Salses, Méditerranée, France 42°51.558'N, 3°0.087'E	XXXXXX
M3	P717 –P718	Etang de Thau, Méditerranée, France 43°23.872'N, 3°35.902'E	XXXXXX
M3	P621 –P623	Casino, Golfo Nuevo, Argentina 42°37.525'S, 64°56.103'W	XXXXXX
M3	P963 –P968	Deoksan, Gangwondo, Korea 37°22.730'N, 129°14.453'E	XXXXXX
M4	P427 –P432, P436–P439, P441–P448, P450–P456	Dinard, France 48°38.475'N, 2°7.080'W	XXXXXX

Mitotype	Voucher number / source	Collection site	GenBank accession number
M4	P42 , P48, P313, P649, P954, P1076–P1080, P1085, P1108	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	XXXXXX
M4	P656	Biological Station, Concarneau, France 47° 52.102'N, 3° 55.075'W	XXXXXX
M4	P396 , P616–P618	Pointe du Conguel, Quiberon, France 47°28.078'N, 3°4.702'W	XXXXXX
M4	P619 , P620, P624–P626, P629–P631	Casino, Golfo Nuevo, Argentina 42°37.525'S, 64°56.103'W	XXXXXX
M4	P720 , P724–P727, P728, P730, P732, P734–P737, P740, P743, P744, P747	Ameghino, Golfo Nuevo, Argentina 42°37.060'S, 64°52.234'W	XXXXXX
M4	P748 , P749, P751, P752, P754–P758, P760, P761–P764, P750, P753, P765–P777	Las Charas, Golfo Nuevo, Argentina 42°30.351'S, 64°38.808'W	XXXXXX
M4	P969	Deoksan, Gangwondo, Korea 37°22.730'N, 129°14.453'E	XXXXXX
M5	P580	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	XXXXXX
M6	P633	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	XXXXXX
M6	P980 –P989	Ongpo, Jeju, Korea 33°24.027'N, 126°15.313'E	XXXXXX
M6	P990 –P999	Gimnyeong, Jeju, Korea 33°32.185'N, 126°44.727'E	XXXXXX
M6	P1000 –P1009	Hamdeok, Jeju, Korea 33°31.845'N, 126° 36.220'E	XXXXXX
M6	P1017 –P1026	Sungsan, Jeju, Korea 33°28.138'N, 126°55.994'E	XXXXXX
M6	P1027 –P1036	Geumneung, Jeju, Korea 33°21.481'N, 126°14.652'E	XXXXXX
M6	P1037 –P1046	Sehwa, Jeju, Korea 33°30.730'N, 126°50.671'E	XXXXXX
M6	P1047 –P1051	Seogeondo, Jeju, Korea 33°15.110'N, 126°33.552'E	XXXXXX
M6	P1052 –P1061	Sagye, Jeju, Korea 33°14.185'N, 126°18.116'E	XXXXXX
M7	P901	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	XXXXXX
M8	P958	Biological Station, Roscoff, France 48°43.658'N, 3°59.260'W	XXXXXX

Table S1. Collection information, sample number/source, and GenBank accession numbers for *Polysiphonia morrowii* investigated in this study. Accession numbers in bold indicate sequences from this study that were deposited in GenBank. Voucher numbers in bold correspond to specimens for which sequences were deposited in GenBank.

fertilization. The frequency of reproductive individuals, as well as the proportions of tetrasporophytes and male and female gametophytes were calculated with regard to the number of individuals sampled in a population.

Molecular analyses

DNA was extracted from 5–10 mg of dry algal tissue using the Nucleospin® Multi–96 plant kit (Macherey–Nagel) according to the manufacturer’s protocol. The *rbcL* gene and the *cox1* gene were amplified on an Eppendorf thermocycler following the protocols described in Guillemin et al. (2008) and Saunders et al. (2005), respectively. Reaction mixtures contained 0.5X PCR buffer (Abgene), 125 µM each dNTP, 1 pmol each primer, 2.5 mM MgCl₂, 1 U Taq polymerase (Abgene) and 3 µL of DNA (1:25 dilution); PCR cycling included an initial denaturing step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 45 s, 50°C for 60 s and, 72°C for 90 s with a final elongation step of 72°C for 7 min. Finally, PCR products were purified and sequenced by LGC genomics (Berlin, Germany). The sequences were edited and aligned using Codoncode Aligner v. 3.7 (www.codoncode.com).

Diversity

Molecular diversity indices, i.e. haplotypic diversity (H , the probability that two randomly chosen chlorotypes / mitotypes are different) and nucleotide diversity (π , the probability that two randomly chosen homologous nucleotide sites are different), were calculated for each sampled location and for each region using Arlequin v 3.11 (Excoffier et al., 2005). To compare haplotypic richness (nh) across regions, rarefaction was used to correct for unequal sample sizes using FSTAT 2.9.3 software (Goudet 1995), with $N = 56$ for the chloroplastic and mitochondrial data. Each region was thus considered as a set of 56 individuals. Haplotypic richness was recalculated on the individual populations in each region and significance was computed using a non-parametric permutation test with 2,000 permutations.

Similar analyses were performed to infer the diversity in France based on N = 25, excluding two locations for which sample size was too small (Perros–Guirec (N = 7) and Mediterranean Sea (N=4)), in Argentina with N = 11, and in South Korea with N = 7 excluding one location, Seogeondo (N = 5).

Phylogenetic relationships among *mtDNA* and *cpDNA* haplotypes were reconstructed using median–joining networks with Network version 4.2.0.1 (Bandelt et al. 1999).

To test for the occurrence of genetic divergence among three regions, populations were grouped according to their geographic location. A hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) was implemented in Arlequin v 3.11 (Excoffier et al., 2005) to analyze the partition of genetic variance among and within these geographic regions. The Φ statistics were calculated as pairwise differences among locations and their significance was evaluated using a non–parametric permutation test with 10,000 permutations.

RESULTS

Chloroplastic diversity

Comparisons of the sequences from the 1225 bp *rbcL* fragment in 442 individuals revealed eight polymorphic sites (0.65%) defining nine chlorotypes (Figure 1). The DNA sequences of each of these nine haplotypes are available in GenBank under accession numbers XXXX–XXXX. The *rbcL* network revealed three dominant chlorotypes: C1, the most frequent and central chlorotype, in 217 individuals, C2 in 110 individuals and C4 in 76 individuals as well as six infrequent haplotypes (C3:14, C5:4, C6:2, C7:1 C8:1 and C9:5) one or few base changes away from C1. Five chlorotypes (55%) were unique to a single region: four in Argentina (C5, C6, C7 and C8) and one in France (C9). These two regions (France and Argentina) showed five different chlorotypes whereas only three chlorotypes were found in South Korea. France and Korea shared three chlorotypes, whereas Argentina shared only one

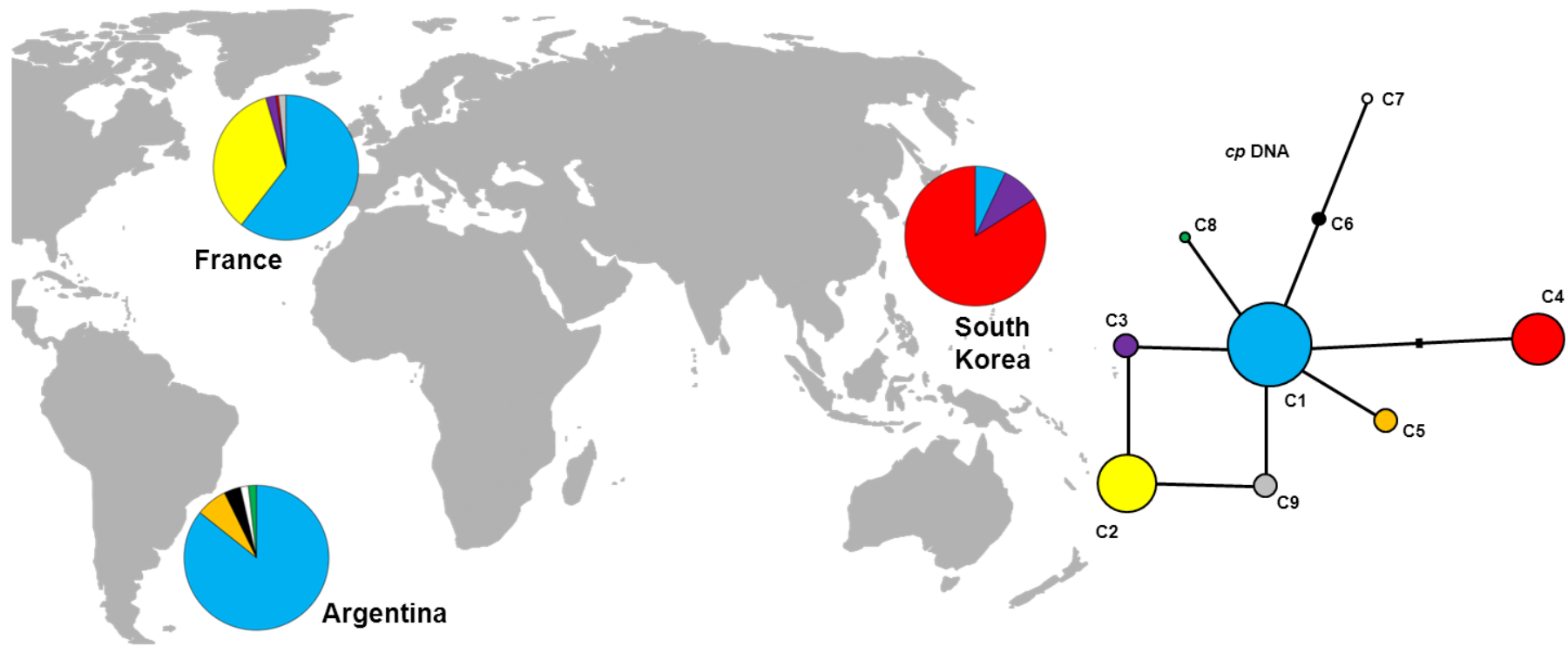


Figure 1. Diversity of *Polysiphonia morrowii* collected in France (N= 297), Argentina (N= 56) and South Korea (N= 89) and the *cpDNA* haplotype distribution. The different colors in the pie charts represent distinct chlorotypes. Right, median-joining network analysis of relationships among of *rbcL* sequences of *cpDNA* from 442 individuals. Circle surface area is proportional to chlorotype frequency. Lines drawn between chlorotypes represent single mutational steps and small bars represent additional mutational steps.

chlorotype (C1) with both of these regions. Chlorotype C1 was the most abundant in France and Argentina despite its rarity in South Korea. Chlorotype C2 was also abundant in France albeit absent in the two other regions. In South Korea, the most frequent chlorotype was C4, absent in Argentina and found only once in France. Chloroplastic richness is given Table 1; 5 chlorotypes were estimated in Argentina, 4.2 in France and 3 in South Korea. Recalculated on the populations of each region, chloroplastic richness was not different between regions (p-value = 0.087).

Mitochondrial diversity

Sequence comparisons of the 559 bp *cox1* fragment from 430 individuals (sequencing failed despite positive PCR for 12 individuals) revealed 9 polymorphic sites (1.6%), defining eight mitotypes (Figure 2). The *mtDNA* sequences of each of these haplotypes are available in GenBank under accession numbers XXXX-XXXX. The *cox1* network revealed four dominant mitotypes: M2, at the center of the network, in 121 individuals; M3 in 155 individuals; M6 in 76 individuals; and M4 in 72 individuals. Four mitotypes M1, M5, M7 and M8 were infrequent and were characterized by one or few base changes away from the more frequent haplotypes. Two mitotypes (M3 and M4) were found in all three regions. All eight mitotypes were present in France whereas South Korea was represented by only four mitotypes and Argentina by only two mitotypes. Four mitotypes (50%) were unique to France (M1, M5, M7 and M8). South Korea and France shared four mitotypes including three (M2, M3 and M4) abundant in France and one (M6) abundant in South Korea.

The sequence divergences estimated by haplotypic diversity (H) and nucleotide diversity (π) were congruent between the two markers (Table 1). The mitochondrial richness was higher in France (3.5) than in South Korea (2.2) and Argentina (2) when each region was considered as

Table 1. Sampling locations and diversity measures for chloroplastic and mitochondrial genes in *Polysiphonia morrowii*. N, number of individuals per sampling location; nh, number of identified haplotypes; rh, haplotypic richness; H, haplotypic diversity (SD, standard deviation), π nucleotidic diversity (SD, standard deviation).

Location	N	<i>cpDNA / rbcL</i>				<i>mtDNA / cox1</i>			
		nh	rh	H (SD)	$\pi \times 10^3$ (SD)	nh	rh	H (SD)	$\pi \times 10^3$ (SD)
Argentina	56	5	5	0.281 (0.306)	0.230 (0.278)	2	2	0.576 (0.479)	1.031 (0.955)
Casino	11	2	2	0.327 (0.354)	0.267 (0.327)	2	2	1.400 (0.934)	2.504 (1.891)
Ameghino	16	3	2.8	0.358 (0.366)	0.293 (0.335)	1	1	0	0
Las Charas	29	4	3	0.208 (0.262)	0.171 (0.238)	1	1	0	0
South Korea	89	3	3	0.677 (0.522)	0.553 (0.473)	4	2.2	0.696 (0.532)	1.245 (1.055)
Deoksan, Gangwondo	7	1	1	0	0	2	1.8	0.857 (0.681)	1.533 (1.398)
Gosung, Gyeongsangnamdo	7	1	1	0	0	1	1	0	0
Ongpo, Jeju	10	1	1	0	0	1	1	0	0
Gimnyeong, Jeju	10	1	1	0	0	1	1	0	0
Hamdeok, Jeju	10	1	1	0	0	1	1	0	0
Sungsan, Jeju	10	1	1	0	0	1	1	0	0
Geumneung, Jeju	10	1	1	0	0	1	1	0	0
Sehwa, Jeju	10	1	1	0	0	1	1	0	0
Seogeondo, Jeju	5	1	1	0	0	1	1	0	0
Sagye, Jeju	10	1	1	0	0	1	1	0	0
France	297	5	4.2	0.947 (0.651)	0.773 (0.588)	8	3.5	1.019 (0.685)	1.824 (1.357)
Rothéneuf	25	1	1	0	0	1	1	0	0
Saint Malo	26	1	1	0	0	1	1	0	0
Dinard	25	1	1	0	0	1	1	0	0
Perros–Guirec	7	1	/	0	0	1	/	0	0
Roscoff	131	5	3.8	0.834 (0.599)	0.681 (0.542)	8	5	0.676 (0.521)	1.210 (1.032)
Concarneau	31	2	2	0.284 (0.313)	0.233 (0.285)	3	3	0.268 (0.300)	0.480 (0.597)
Quiberon	48	3	3	0.560 (0.473)	0.457 (0.430)	3	3	0.690 (0.532)	1.236 (1.058)
Mediterranean	4	1	/	0	0	1	/	0	0

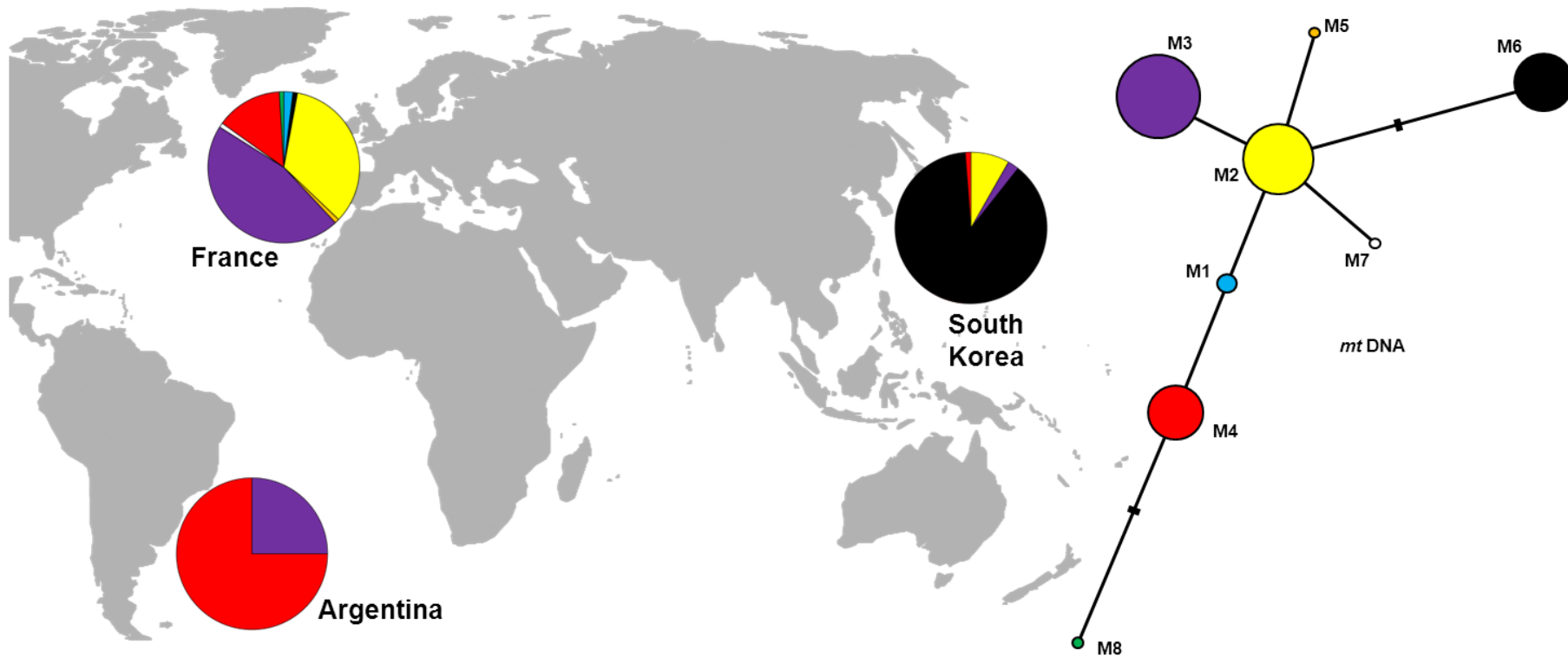


Figure 2. Diversity of *Polysiphonia morrowii* collected in France (N= 285), Argentina (N= 56) and South Korea (N= 89) and the *mtDNA* haplotype distribution. The different colors in the pie charts represent distinct mitotypes. Right, median-joining network analysis of relationships among of *cox1* sequence of *mtDNA* from 442 individuals of *P. morrowii*. Circle surface area is proportional to mitotype frequency. Lines drawn between mitotypes represent single mutational steps and small bars represent additional mutational steps.

a single “group”. However, based on populations in each region, mitochondrial richness was significantly different between regions (p -value = 0.043) and higher in Argentina (1.2).

Cytotype diversity

The association between chlorotypes and mitotypes is given Table 2. The cytotype C1–M3 (149 specimens) was the most frequent and found in the all three sampled regions (Argentina, France and South Korea), whereas the next most frequent cytotype C2–M2 (105 specimens) was only observed in France.

Table 2. Association between chloroplast and mitochondrial sequences in *Polysiphonia morrowii* from South Korea, Argentina and France. The number given for each genetic combination corresponds to the number of individuals bearing this cytotype.

<i>rbcL</i> (<i>cpDNA</i>)	<i>cox1</i> (<i>mtDNA</i>)							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
C1	3	1	149	63				1
C2		105	2	1	1		1	
C3		10	4					
C4						76		
C5				4				
C6				2				
C7				1				
C8				1				
C9		5						

Eight populations around Jeju Island in South Korea were composed of the same cytotype C4–M6. The east coast population from Gosung showed cytotype C3–M2. Only one population had two cytotypes: Deoksan, where C1–M3 and C1–M4 were found together. Three populations from Argentina displayed higher genetic diversity with at least three different cytotypes, whereas populations from Ameghino and Las Charas had unique cytotype C7–M4 and C8–M4, respectively.

In France, population diversity was contrasted among sampled localities. Roscoff, Concarneau and Quiberon showed greater diversity (H ranged from 0.284 to 0.834) of haplotypes (rh ranged from 2 to 5) than the other sites ($H = 0$). We identified the same unique

cytotype C1–M3 in Rothéneuf, Saint–Malo, Perros–Guirec and the Mediterranean Sea. The Dinard population also showed only one cytotype, C1–M4. With 12 cytotypes, Roscoff showed the highest number of cytotypes of all populations.

Population structure

AMOVA performed on pairs of regions revealed that genetic diversity between France and Argentina was not significantly different (Table 3). The majority of variation was significantly partitioned among and within populations. Analyses between South Korea and the two Atlantic regions showed that most of the genetic variation (mitochondrial and chloroplast) was explained by the differentiation between regions.

Ecological approach

The phenological survey of the populations of *P. morrowii* at Roscoff revealed that the first erect frond was visible in the field in October. In addition, the number of individuals increased throughout winter and then disappeared in June (Figure 3). The density of individuals was maximal between October and January. The proportion of reproductive individuals increased with time and reached a maximum in April (94%). Tetrasporophytes appeared as early as November. Among the reproductive individuals observed, only three were female gametophytes (2% of the reproductive individuals observed in February, March and April) all the others were tetrasporophytes. No reproductive male individuals were observed.

DISCUSSION

In the present study, analyses of mitochondrial and chloroplast DNA revealed that the French and Argentine populations are closely related but differentiated from the South Korea populations. These results suggested that South Korea populations were not the unique source of introduction, and some other populations serve as bridging populations.

Table 3. Hierarchical analysis of molecular variance for each gene in pairwise comparison of regions.
*Significance is based on 10,000 permutations: <0.001.

South Korea / France						
Locus	Source of variation	df	Sum of squares	Variance component	% variance	Φ -statistics
<i>rbcL</i>	Among regions	1	102.604	0.75495	59.65	$\Phi_{CT} = 0.596^*$
	Among populations within regions	16	84.864	0.32571	25.74	$\Phi_{SC} = 0.637^*$
	Within populations	368	56.754	0.18487	14.61	$\Phi_{ST} = 0.853^*$
	Total	385	244.222	1.26553		
<i>cox1</i>	Among regions	1	106.078	0.73861	57.52	$\Phi_{CT} = 0.575^*$
	Among populations within regions	16	109.625	0.37207	28.97	$\Phi_{SC} = 0.682^*$
	Within populations	356	59.499	0.17347	13.51	$\Phi_{ST} = 0.864^*$
	Total	373	275.202	1.28415		
South Korea / Argentina						
Locus	Source of variation	df	Sum of squares	Variance component	% variance	Φ -statistics
<i>rbcL</i>	Among regions	1	48.389	0.66092	67.84	$\Phi_{CT} = 0.678^*$
	Among populations within regions	11	28.902	0.25710	26.39	$\Phi_{SC} = 0.820^*$
	Within populations	132	7.145	0.05626	5.77	$\Phi_{ST} = 0.942^*$
	Total	144	84.436	0.97428		
<i>cox1</i>	Among regions	1	65.603	1.39546	77.64	$\Phi_{CT} = 0.776^*$
	Among populations within regions	11	31.700	0.34139	18.99	$\Phi_{SC} = 0.849^*$
	Within populations	132	6.300	0.06058	3.37	$\Phi_{ST} = 0.966^*$
	Total	144	103.603	1.79743		
France / Argentina						
Locus	Source of variation	df	Sum of squares	Variance component	% variance	Φ -statistics
<i>rbcL</i>	Among regions	1	12.226	0.04849	9.05	$\Phi_{CT} = 0.090$
	Among populations within regions	9	56.871	0.26212	48.94	$\Phi_{SC} = 0.538^*$
	Within populations	342	63.899	0.22500	42.01	$\Phi_{ST} = 0.579^*$
	Total	352	132.997	0.53561		
<i>cox1</i>	Among regions	1	34.322	0.50950	46.64	$\Phi_{CT} = 0.466$
	Among populations within regions	9	81.463	0.358837	32.8	$\Phi_{SC} = 0.614^*$
	Within populations	330	65.799	0.22457	20.56	$\Phi_{ST} = 0.794^*$
	Total	340	181.584	1.09245		

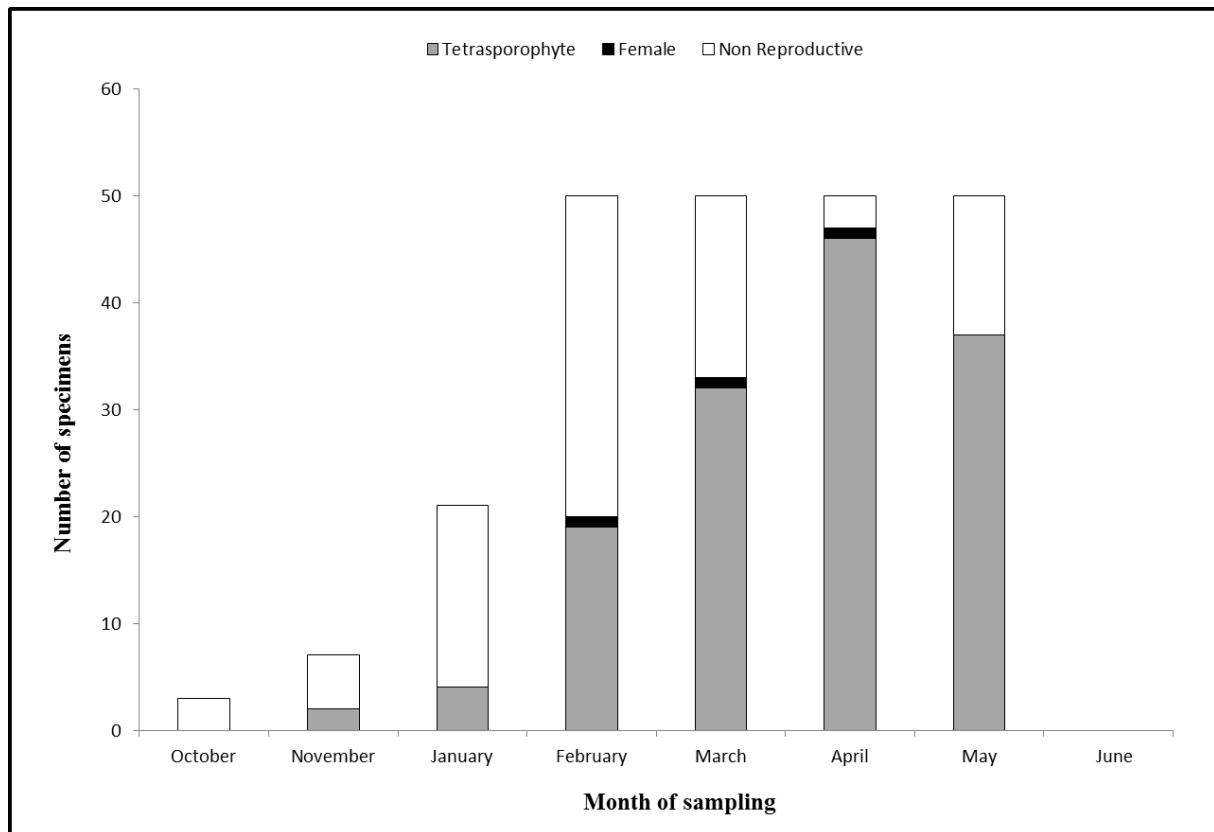


Figure 3. Phenology of *Polysiphonia morrowii* collected from October 2011 to May 2012. Reproductive stage represented in grey for tetrasporophyte stage and in black for female. Non reproductive stage represented in white. Maximum abundance observed between February and May once disappeared in June.

Indeed, our study showed that the two genes, *rbcL* and *cox1*, revealed respectively 9 chlorotypes and 8 mitotypes, distributed both among and within populations. The sequence divergences were congruent between the two markers, but only mitochondrial richness was significantly different between regions. Surprisingly, the putative native range, South Korea, was characterized by the lowest haplotype diversity and by the highest population genetic structure, with low genetic diversity within populations (only one population showed more than one mitotype). Moreover, populations from Jeju Island and from the Sea of Japan coast did not share any haplotypes. These results clearly indicate that Korea is not the only source of introduction. Single-source introductions from this area would have generated even lower genetic diversity in introduced areas, even with large effective numbers of founders.

It is generally recognized that population bottlenecks are a common characteristic of colonization events, leading to reduced genetic diversity in introduced populations compared to the source populations (Tsutsui et al. 2000; Dlugosch and Parker 2008). However, a large number of founders or a high number of successive founder events will reduce bottleneck effects. Genetic patterns observed in the introduction area will depend on the reproductive mode and whether there are single or multiple events of introduction (Roman and Darling 2007). In our study, no bottleneck effect was detected, and the two introduced Atlantic regions were characterized by relatively high diversity compared to the native North Pacific region. The haplotypic similarity observed between Argentina and France suggests that populations from France and Argentina likely have similar origins, which is probably not South Korea. They showed specific chlorotypes that were not found in South Korea (C2, C5, C6, C7, C8 and C9) and, conversely, chlorotype C4 was encountered only in South Korea. Finally, two chlorotypes C2 and C9 were found only in France. Two cytotypes, C1–M3 and C1–M4, were present in all three regions, and abundant in France and Argentina, but rare in South Korea. Only multiple independent introduction events from distinct source populations can explain the high genetic diversity observed within Argentine and French populations. Nevertheless, the low diversity observed in South Korea compared to the relative high diversity observed in France and Argentina suggests other sources of introduction indicating that the native range of *P. morrowii* is likely to be wide in East Asia. However, some studies of seaweed introductions (e.g. *Caulerpa taxifolia* (Meusnier et al. 2004) and *Neosiphonia harveyi* (McIvor et al. 2001)) have suggested that many widespread invasions may have originated from a particularly successful invasive population (corresponding to a restricted number of genotypes) rather than from genotypes representative of the native range (Lombaert et al. 2010). For example, it has been suggested that the first introduction of

U. pinnatifida in the Atlantic coasts originated from a population already established in the Thau lagoon (Mediterranean Sea), where it was accidentally introduced (Voisin et al. 2005).

One possible scenario for the introduction of *P. morrowii* into Europe and South America thus involves the establishment of intermediate invasive populations elsewhere and this population has become a source population. This can explain the high diversity observed in some populations in France and Argentina. Only five populations in France showed unique chlorotypes and mitotypes, and a similar pattern was observed in *U. pinnatifida* (Voisin et al. 2005). This pattern contrasts with *Sargassum muticum* which has moderate diversity in its native range (Japan) whereas the worldwide invaders share a unique haplotype (Viard personal communication).

In France, the observation of *P. morrowii* populations in proximity to mollusk farming areas in Brittany (i.e. Roscoff, Saint-Malo, Concarneau, Quiberon) suggests that *P. morrowii* was probably introduced during the deliberate import of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Oyster transport has been shown to be a major vector of seaweed introduction in Europe (Sjotun et al. 2008, Boudouresque et al. 2011, Farnham 1980; Mineur et al. 2009). Recently, Manghisi et al. (2010) demonstrated that the red alga *Agardhiella subulata*, endemic to the Atlantic coast of North America, was introduced to Sicily from the Netherlands as a plantlet growing on a *C. gigas* shell. *P. morrowii* has been reported as an intertidal species and it has been found on a large variety of substrata including rocks, wooden piles, ropes, mussels, crabs, and shells, as well as other large algae, such as *S. muticum* and *U. pinnatifida* (Kim et al. 1994; Kudo and Masuda 1992). Therefore, multiple introduction events are likely to be the result of repeated import of mollusks and seaweeds; however, others vectors such as ship fouling or ballast water cannot be excluded.

P. morrowii at Roscoff showed similar phenology (Figure 3) as that observed in Korea (Kim et al. 2004). In Roscoff, erect thalli appeared in October and disappeared in June. After June,

the basal parts of individual are buried in the sand and form a tangle of interfolded thalli (data not shown). These typical forms may play an important role in the survival and vegetative propagation of the species. Multicellular propagules contribute greatly to the propagation of alien species in Rhodophyta (Cecere et al. 2011). As in Korea and in Venice lagoon populations (Curiel et al. 2002), our results show that the tetrasporophyte stage predominates over the gametophyte stages. In our study, three fertilized female gametophytes in the Roscoff population were observed, suggesting that sexual reproduction occurred although no male individuals were detected. The biased sex ratios observed in our study have also been reported in many other studies of *P. morrowii* (Kudo and Masuda 1992, Curiel et al. 2002, Kim et al. 2004) and are likely due to the fact that male reproductive organs are ephemeral compared to cystocarps. The presence of different reproductive types (gametophyte and tetrasporophyte) suggests that the population of Roscoff was maintained by sexual reproduction.

Cryptic introductions are a poorly known type of invasion that leads to the underestimation of the total numbers and impact of invaders due to the difficulty in detecting them (Saltonstall 2004). The relatively high genetic diversity as well as the genetic structure observed in France and Argentina, suggests recurrent introduction events through human activities. However, because the introduction is cryptic, it is difficult to estimate when this species was introduced. To address this question, historical herbarium specimens and modern samples of *P. morrowii* from the same region need to be compared to determine the presence of *P. morrowii* before 1970.

Acknowledgements

This study was partially supported by grants from the French Ministry for the Economy, Industry and Employment and the Brittany Regional Council through the project AQUACTIFS “Convention de soutien de l’état à des actions de recherche et d’innovation par voie de subvention – Fonds de compétitivité des entreprises”. Warm thanks to Julie Moreau for her help in sampling and to Ignacio Barbara and Marc Verlaque for providing samples from the Mediterranean Sea.

References

- Adams, N.M., 1991. The New Zealand species of *Polysiphonia* Greville (Rhodophyta). *New Zealand Journal of Botany* 29, 411–427.
- Andreakis, N., Kooistra, W.H.C.F., Procaccini, G., 2009. High genetic diversity and connectivity in the polyploid invasive seaweed *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniales) in the Mediterranean, explored with microsatellite alleles and multilocus genotypes. *Molecular Ecology* 18, 212–226.
- Andreakis, N., Procaccini, G., Kooistra, W.H.C.F., 2004. *Asparagopsis taxiformis* and *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): genetic and morphological identification of Mediterranean populations. *European Journal of Phycology* 39, 273–283.
- Andreakis, N., Procaccini, G., Maggs, C., Kooistra, W.H.C.F., 2007. Phylogeography of the invasive seaweed *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) reveals cryptic diversity. *Molecular Ecology* 16, 2285–2299.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37–48.
- Blanchet, S., 2012. The use of molecular tools in invasion biology: an emphasis on freshwater ecosystems. *Fisheries Management and Ecology* 19, 120–132.
- Boudouresque, C.F., Klein, J., Ruitton, S., Verlaque, M., 2011. Biological invasion: the Thau lagoon, a Japanese biological island in the Mediterranean sea. In: *Global Change: Mankind–Marine Environment Interactions*. Springer Netherlands, pp. 151–156.
- Carlton, J.T., Geller, J.B., 1993. Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms. *Science* 261, 78–82.
- Cecere, E., Petrocelli, A., Verlaque, M., 2011. Vegetative reproduction by multicellular propagules in Rhodophyta: an overview. *Marine Ecology* 32, 419–437.
- Curiel, D., Belleme, G., Rocca, B.L., Scattolin, M., Marzocchi, M., 2002. First report of *Polysiphonia morrowii* Harvey (Ceramiales, Rhodophyta) in the Mediterranean sea. *Botanica Marina* 45, 66–70.
- Davies, N., Villablanca, F.X., Roderick, G.K., 1999. Bioinvasions of the medfly *Ceratitis capitata*: source estimation using DNA sequences at multiple intron loci. *Genetics* 153, 351–360.

- Dlugosch, K.M., Parker, I.M., 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17, 431–449.
- Erdügan, H., Akı, C., Acar, O., Dural, B., Aysel, V., 2009. New record for the east Mediterranean, Dardanelles (Turkey) and its distribution: *Polysiphonia morrowii* Harvey (Ceramiales, Rhodophyta). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 9, 231–232.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online* 1, 47.
- Farnham, W.F., 1980. Studies on aliens in the marine flora of southern England. *Systematics Association Special Volume* 17.
- Geoffroy, A., Le Gall, L., Destombe, C., 2012. Cryptic introduction of the red alga *Polysiphonia morrowii* Harvey (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in the North Atlantic Ocean highlighted by a DNA barcoding approach. *Aquatic Botany* 100, 67–71.
- Goudet, J., 1995. FSTAT A program for IBM PC compatibles to calculate Weir and Cockerham's (1984) estimators of F-statistics (version 1.2). *Journal of Heredity* 86, 485–486.
- Guillemin, M.L., Akki, S.A., Givernaud, T., Mouradi, A., Valero, M., Destombe, C., 2008. Molecular characterisation and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquatic Botany* 89, 324–330.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2012. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.
- Gurgel, C.F.D., Fredericq, S., 2004. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a critical assessment based on *rbcL* sequence analysis. *Journal of Phycology* 40, 138–159.
- Hänfling, B., Carvalho, G.R., Brandl, R., 2002. *mt*-DNA sequences and possible invasion pathways of the Chinese mitten crab. *Marine Ecology Progress Series* 238, 307–310.
- Kapraun, D.F., Searles, R.B., 1990. Planktonic bloom of an introduced species of *Polysiphonia* (Ceramiales, Rhodophyta) along the coast of North Carolina, USA. *Hydrobiologia* 204, 269–274.
- Kim, M.S., Lee, I.K., Boo, S.M., 1994. Morphological studies of the red alga *Polysiphonia morrowii* Harvey on the Korean Coast. *Korean Journal of Phycology* 9, 185–192.
- Kim, M.S., Lee, I.K., 1996. Morphology and reproduction of *Polysiphonia atlantica* Kapraun et J. Norris (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Journal of Plant Biology (Korea Republic)* 39, 23–29.
- Kim, M.S., Yang, E.C., Mansilla, A., Boo, S.M., 2004. Recent introduction of *Polysiphonia morrowii* (Ceramiales, Rhodophyta) to Punta Arenas, Chile. *Botanica Marina* 47, 389–394.
- Knowlton, N., 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24, 189–216.
- Krug, P.J., Asif, J.H., Baeza, I., Morley, M.S., Blom, W.M., Gosliner, T.M., 2012. Molecular identification of two species of the carnivorous sea slug *Philine*, invaders of the US west coast. *Biological Invasions*, 1–13.
- Kudo, T., Masuda, M., 1992. Taxonomic features of *Polysiphonia morrowii* Harvey (Ceramiales, Rhodophyta). *Korean J. Phycol.* 7, 13–26.

- Lee, C.E., 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 386–391.
- Lewis, J.A., 1999. A review of the occurrence of exotic macroalgae in Southern Australia, with emphasis on Port Phillip Bay, Victoria. IN: Marine biological invasions of Port Phillip Bay, Victoria. Centre for Research on Introduced Marine Pests, (Hewitt, C.L., Campbell, M.L., Thresher, R.E., Martin, R.B. eds) CRIMP Technical Report 20, CSIRO Marine Research, Hobart, Australia, 61–87.
- Lombaert, E., Guillemaud, T., Cornuet, J.M., Malausa, T., Facon, B., Estoup, A., 2010. Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. *PLoS One* 5, e9743.
- Maggs, C.A., Stegenga, H., 1999. Red algal exotics on North Sea coasts. *Helgoland Marine Research* 52, 243–258.
- Mamoozadeh, N.R., Freshwater, D.W., 2012. *Polysiphonia* sensu lato (Ceramiales, Florideophyceae) species of Caribbean Panama including *Polysiphonia lobophoralis* sp. nov. and *Polysiphonia nuda* sp. nov. *Botanica Marina* 55, 317–347.
- Manghisi, A., Morabito, M., Bertuccio, C., Le Gall, L., Couloux, A., Cruaud, C., Genovese, G., 2010. Is routine DNA barcoding an efficient tool to reveal introductions of alien macroalgae? A case study of *Agardhiella subulata* (Solieriaceae, Rhodophyta) in Cape Peloro lagoon (Sicily, Italy). *Cryptogamie Algologie* 31, 423–433.
- McIvor, L., Maggs, C.A., Provan, J., Stanhope, M.J., 2001. *rbcL* sequences reveal multiple cryptic introductions of the Japanese red alga *Polysiphonia harveyi*. *Molecular Ecology* 10, 911–919.
- Meusnier, I., Valero, M., Olsen, J.L., Stam, W.T., 2004. Analysis of rDNA ITS1 indels in *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) supports a derived, incipient species status for the invasive strain. *European Journal of Phycology* 39, 83–92.
- Mineur, F., De Clerck, O., Le Roux, A., Maggs, C.A., Verlaque, M., 2009. *Polyopes lancifolius* (Halymeniales, Rhodophyta), a new component of the Japanese marine flora introduced to Europe. *Phycologia* 49, 86–96.
- Miura, O., 2007. Molecular genetic approaches to elucidate the ecological and evolutionary issues associated with biological invasions. *Ecological research* 22, 876–883.
- Molnar, J.L., Gamboa, R.L., Revenga, C., Spalding, M.D., 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6, 485–492.
- Perestenko, L.P., 1980. Algae of Peter the Great Bay. Nauka, Leningrad, pp. 232.
- Provan, J.I.M., Murphy, S., Maggs, C.A., 2005. Tracking the invasive history of the green alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*. *Molecular Ecology* 14, 189–194.
- Saltonstall, K., 2002. Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis* into North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2445–2449.
- Saunders, G.W., 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360, 1879.

- See, K.E., Feist, B.E., 2010. Reconstructing the range expansion and subsequent invasion of introduced European green crab along the west coast of the United States. *Biological Invasions* 12, 1305–1318.
- Segi, T., 1951, Systematic study of the genus *Polysiphonia* from Japan and its vicinity. Prefectural University of Mie, Faculty of Fisheries.
- Sjötun, K., Husa, V., Peña, V., 2008. Present distribution and possible vectors of introductions of the alga *Heterosiphonia japonica* (Ceramiales, Rhodophyta) in Europe. *Aquatic Invasions* 3, 377–394.
- Thomsen, M.S., Gurgel, C.F.D., Fredericq, S., McGlathery, K.J., 2005. *Gracilaria Vermiculophylla* (Rhodophyta, Gracilariales) in Hog Island Bay, Virginia: a Cryptic Alien and Invasive Macroalga and Taxonomic Correction. *Journal of Phycology* 42, 139–141.
- Tsutsui, N.D., Suarez, A.V., Holway, D.A., Case, T.J., 2000. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 5948.
- Verlaque, M., 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29–49.
- Voisin, M., Engel, C.R., Viard, F., 2005. Differential shuffling of native genetic diversity across introduced regions in a brown alga: aquaculture vs. maritime traffic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5432.
- Williams, S.L., Smith, J.E., 2007. A global review of the distribution, taxonomy, and impacts of introduced seaweeds. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 38, 327–359.
- Williamson, M., Fitter, A., 1996. The varying success of invaders. *Ecology* 77, 1661–1666.

Conclusion

Cette étude avait pour objectif de comparer les diversités génétiques de l'aire d'introduction et de l'aire native de *Polysiphonia morrowii* afin d'inférer un scénario d'introduction. Les résultats obtenus révèlent une forte diversité haplotypique pour les gènes mitochondrial (*cox1*) et chloroplastique (*rbcL*) dans les deux régions d'introductions étudiées la France et l'Argentine. Contrairement aux attendus, nos résultats ne nous mettent pas en évidence d'effet de fondation. Ils suggèrent plutôt des événements d'introductions multiples. En effet, la diversité observée en France et en Argentine est plus élevée que celle de Corée du sud, aire native supposée de l'espèce. Il semble donc que les populations échantillonnées en Corée du sud ne sont pas l'unique source d'introduction de cette espèce. Les populations échantillonnées dans l'aire d'origine ne couvrent pas l'ensemble de l'aire native supposée et n'incluent pas en particulier la localité type de *P. morrowii* qui se trouve au Japon. Pour mieux comprendre ces phénomènes d'introduction, il serait nécessaire de compléter l'échantillonnage dans l'aire native en incluant des populations du Japon. Cependant, la diversité que nous observons dans la zone d'introduction peut également être le résultat d'événements d'introduction à partir de populations relais. Dans ce cas, un échantillonnage dans d'autres aires d'introductions, comme le Chili ou la Nouvelle Zélande, pourrait permettre de mieux appréhender les scénarios d'introduction.

En France, en raison du caractère cryptique de cette introduction, il est difficile de dater précisément son apparition. En effet, il est très probable que cette espèce ait été confondue avec une espèce locale et donc mal identifiée et mal répertoriée. L'approche moléculaire de type barcoding devrait permettre de démasquer ces erreurs en travaillant sur les échantillons d'herbiers, en comparant herbiers historiques et herbiers contemporains. Ce type d'approche devrait permettre de dater l'apparition de cette espèce dans la flore algale Bretonne.

Enfin il serait intéressant d'identifier les vecteurs de cette introduction. L'habitat *P. morrowii* est très diversifié et on la rencontre sur de nombreux types de substrat comme les cailloux, les algues ou les coquillages. En Bretagne, cette espèce est retrouvée principalement dans les zones rocheuses, mais également sur des pontons flottants comme à Perros-Guirec (Geoffroy et al. 2012). Au Chili, elle pousse en épiphyte sur l'algue introduite *Undaria pinnatifida*, ce qui laisse supposer que ces deux algues ont été introduites en même temps (Kim et al. 2004). Plusieurs vecteurs d'introduction sont donc possibles comme espèce accompagnatrice en aquaculture, ou comme espèce introduite sur les coques des bateaux (Fouling ou eaux de ballaste). Il serait donc nécessaire de vérifier la présence de cette espèce sur les coques des

bateaux ou encore dans les naissains d'huitres importés. En effet l'approche moléculaire permet de travailler sur des individus de petites tailles et difficilement identifiable morphologiquement.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans le cadre de cette thèse nous avons choisi d'utiliser une approche de type « barcode » dans le but d'identifier des espèces nouvellement exploitées, de caractériser leur diversité génétique et de détecter de potentielles espèces cryptiques. Dans la suite du document nous discuterons de l'efficacité de cette approche dans les différentes études menées, ainsi que les limites possibles et les perspectives d'études.

La méthode de type « barcode » s'est révélée efficace dans les différentes études que nous avons abordées durant cette thèse. Dans le chapitre 1, les espèces récemment sélectionnées en vue de leur exploitation commerciale ont été caractérisées génétiquement (excepté pour l'algue verte). La comparaison des séquences obtenues avec les séquences répertoriées dans la base de données GenBank a permis d'une part de certifier le nom d'espèce assigné d'après les caractères morphologiques et d'autre part de corriger dans certain cas les erreurs d'identifications.

Cette étude fournit une librairie génétique qui vient compléter les données déjà existantes. En effet, chaque taxon ne jouit pas de la même représentation au sein des bases de données et certain biais peuvent être observés pour certains marqueurs génétiques (Radulovici et al. 2010). Par exemple, dans le cas du genre *Polysiphonia*, la base de données GenBank montre un déficit d'information concernant le marqueur mitochondrial *cox1* par rapport au *rbcL*. En effet, seules 136 séquences de *rbcL* contre 70 *cox1* sont référencées et représentent 52 espèces dont 13 restent encore non identifiées morphologiquement. Connaissant le nombre important d'espèces dans ce groupe (près de 200 taxons, Guiry et Guiry 2012), on comprend aisément le manque de données évident et la difficulté que l'on rencontre dans l'assignation d'un nom d'espèce morphologique. Une assignation efficace est finalement assurée si la base de données de référence inclue plusieurs séquences identiques ou proches (ne différant que de quelques paires de bases) de la séquence que l'on cherche à assigner (Koski et Golding 2001, Ross et al. 2008). Par ailleurs, selon le Code International de Nomenclature Botanique, les espèces types sont porte-nom, c'est-à-dire qu'un nom se réfère à un ou quelques spécimens. Un spécimen est défini ainsi: « exemplaire d'un spécimen, d'un fossile ou d'une partie de ceux-ci ». Il serait ainsi souhaitable d'inclure dans les bases de données la séquence issue d'un spécimen type ou a défaut la séquence d'un spécimen en provenance de la localité type.

L'approche barcode a également permis d'estimer la variabilité haplotypique (diversité génétique) rencontrée le long des côtes Bretonnes. Les différents marqueurs (mitochondriaux, chloroplastiques et nucléaires) utilisés ont montré des résolutions similaires pour séparer les différentes espèces de *Polysiphonia* / *Neosiphonia* rencontrées en Bretagne. Cependant, la comparaison de la diversité haplotypique observée entre marqueurs pour *Polysiphonia elongata*, *Calliblepharis jubata* et *Pylaiella littoralis*, montre une variation plus importante pour le marqueur mitochondrial (*cox1*) que pour les deux autres marqueurs (chloroplastique et nucléaire). Ce résultat est en accord avec l'observation qu'un gène mitochondrial a un taux d'évolution quatre fois supérieur à un gène nucléaire (Birky 2008). De récentes études, ayant une approche multilocus, montrent également l'incongruence de divergence des marqueurs entre espèces proches. Par exemple, Freshwater et al. (2010) sur des espèces de Gelidiales et Mattio et Payri (2010) sur des espèces du genre *Sargassum* montrent entre espèces proches, une diversité haplotypique plus importante pour les gènes mitochondriaux que pour les gènes nucléaires ou chloroplastiques. Ils en concluent que les gènes mitochondriaux constituent de meilleurs marqueurs pour délimiter les espèces.

Par ailleurs, l'utilisation de plusieurs types de marqueurs peut conduire à des résultats présentant, à première vue, des incongruences dues à une histoire évolutive récente ou complexe. En effet, peu de temps après l'évènement de spéciation, les deux nouvelles espèces sœurs auront des caractères génétiques en communs, soit en raison de flux de gènes encore présent (ou possible) ou en raison d'une ascendance commune récente (polymorphisme ancestral). Dans ces cas-là, un seul marqueur peut être insuffisant pour assigner les individus sans équivoque à un groupe particulier (Tautz et al. 2003). C'est ce que nous avons observé pour l'étude sur *Pylaiella littoralis* où seuls les marqueurs mitochondriaux permettent une mise en évidence claire de deux entités génétiques distinctes cryptiques. L'approche barcode couplée à une étude populationnelle (marqueurs microsatellites) et à un échantillonnage spatio-temporel nous a permis de confirmer la différenciation entre ces deux entités en montrant une quasi-absence de flux de gènes et une phénologie décalée suggérant une probable différence de niche écologique. Finalement, les approches intégratives comme celle menée sur *Pylaiella littoralis* apparaissent une solution efficace pour s'affranchir des problèmes d'incongruences de signal des différents marqueurs. De plus cet exemple illustre parfaitement les problèmes de choix de concepts d'espèces illustrés par de

Quiroz (2005) (Figure 1). Tous les critères ne donnent pas la même information, cependant, pris dans leur ensemble, ils permettent de mettre en évidence un évènement de spéciation en cours. La variabilité doit être abordée en considérant à la fois l'intra et l'inter spécifique pour délimiter de façon adéquate les espèces par une approche intégrée. On comprend aisément dans la figure 1 que les critères situés dans la zone de désaccord et ne présentant pas de différence entre la variabilité intra et inter spécifique, vont tendre avec le temps vers une séparation claire de cette variabilité. A terme, quel que soit le critère utilisé, on aboutira à la mise en évidence claire de deux entités génétiques distinctes.

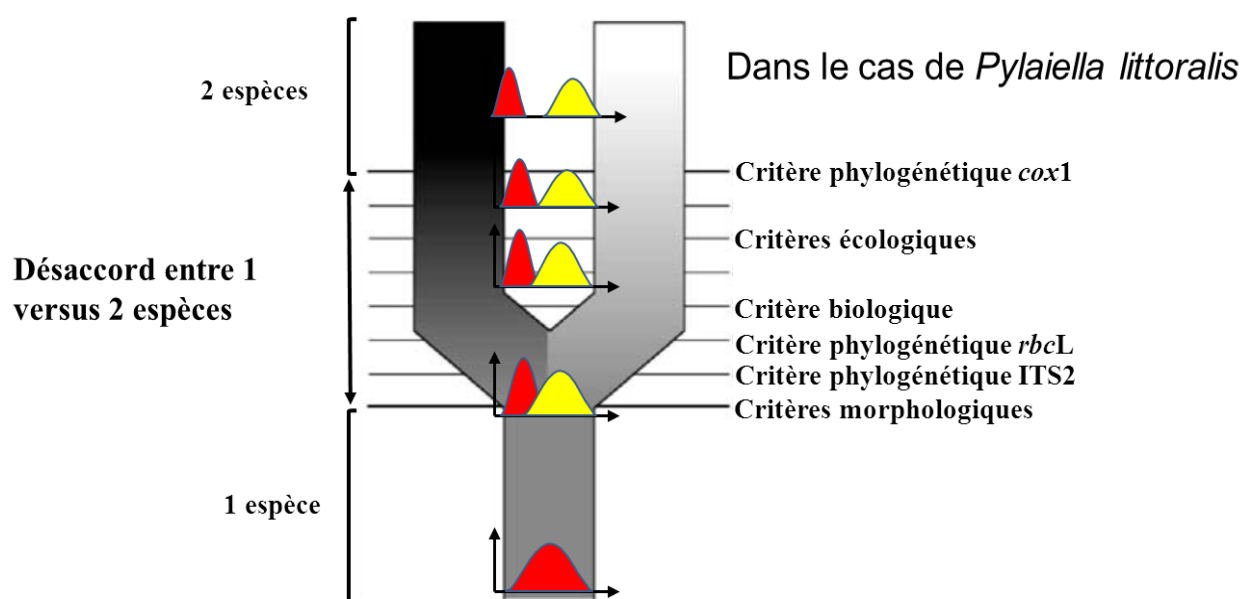


Figure 1 : Représentation des différents critères utilisés dans le cas de *Pylaiella littoralis* (Chapitre 2) et de la variabilité intra et inter spécifique associée d'après le schéma modifié de Quiroz (2005).

La mise en évidence de l'introduction cryptique de *Polysiphonia morrowii* sur les côtes Bretonnes et en Argentine illustre également l'efficacité d'une approche barcode multilocus dans la délimitation d'espèces cryptiques. Dans ce cas, l'approche moléculaire s'est avérée nécessaire pour confirmer la présence d'une espèce exogène présentant des similarités anatomorphologiques avec les espèces locales. L'identification moléculaire est indispensable en l'absence de caractères morphologiques diagnostiques ou bien lorsque les échantillons ne permettent pas une analyse morphologique (plantules, fragments...) (Ficetola et al. 2008, Jerde et al. 2010). Ainsi Manghisi et al. (2010) qui ont mis en évidence l'introduction de l'algue rouge *Agardhiella subulata* dans une lagune côtière en Sicile, ont pu retracer l'origine

de cette introduction et démontrer par une approche de barcode que de très jeunes plantules d'*Agardhiella* se trouvaient à la surface des coquilles d'huîtres importées des Pays Bas.

De la même façon, l'analyse par une approche barcode multilocus de notre échantillonnage de *Polysiphonia morrowii* qui s'est focalisée sur deux régions d'introductions (la Bretagne et l'Argentine) ainsi que sur son aire d'origine, a mis en évidence que les populations de France et d'Argentine étaient le résultat d'évènements d'introductions multiples. De plus, la comparaison des patterns de diversité suggère que les populations de Corée du Sud ne sont pas les populations sources principales. En raison de ses similarités avec les flores locales de Bretagne et d'Argentine, les premières étapes d'introduction de *Polysiphonia morrowii* sont passées inaperçues et il est donc, dans l'état actuel des choses, impossible de dater précisément son arrivée contrairement à d'autres espèces de grandes tailles et présentant une morphologie très différente de la flore native, comme *Undaria pinnatifida* (Pérez et al. 1981) ou *Sargassum muticum* (Deysher et Norton 1981). Il serait cependant intéressant d'effectuer une prospection dans les alguiers afin d'essayer de dater cette introduction. La difficulté de cette démarche réside dans l'amplification de l'ADN des échantillons anciens. Cependant, une étude récente sur des échantillons d'herbier d'algues rouges a permis de montrer un succès d'amplification supérieur à 90 % pour trois marqueurs (COIms, ITS2r et UPA) sur des spécimens de moins de 10 ans. Ils montrent cependant que le succès d'amplification diminue rapidement avec l'âge des échantillons (spécimens de 45–180 ans) (Saunders et McDevitt 2012). L'application des méthodes développées dans le cadre de l'étude de l'ADN ancien aux ADN des herbiers devraient pouvoir améliorer ces résultats dans un avenir proche.

L'approche barcode multilocus s'avère donc un outil performant pour l'étude de la biodiversité marine spécifique et des assemblages d'espèces. Ce type d'approche peut être utilisé pour caractériser et délimiter les espèces, et ainsi mettre en évidence les espèces cryptiques et détecter les introductions.

La caractérisation génétique des espèces cibles par plusieurs marqueurs a permis de créer une bibliothèque de séquences qui pourra être utilisée pour les futures révisions taxonomiques et qui servira de référence dans la démarche de traçabilité aux niveaux industriels. En effet, ces séquences permettent un accès à un grand nombre de caractères constituant une véritable signature ADN. Les éventuels brevets commerciaux pourront être associés à cette signature ADN et assurer ainsi l'identification spécifique. A partir de cette base de données, des méthodes d'identification rapide de type RFLP (cf. chapitre 1) ont été développées. La

traçabilité du matériel biologique devrait pouvoir être étudié tout au long du processus de transformation des algues, qu'elles soient fraîches, séchées, en poudre, etc. (Radulovici et al. 2010). Bien qu'il soit possible d'obtenir des séquences à partir des échantillons séchés ou en poudre, l'extraction d'ADN à partir des extraits de produits actifs (après traitement industriels) s'est révélée plus délicate. Les processus d'extraction pour obtenir les composés actifs sont probablement à l'origine de ces difficultés. Il est nécessaire de mettre au point des techniques appropriées pour extraire l'ADN de ces extraits ainsi que de redéfinir des marqueurs plus facilement amplifiables (plus petites tailles).

Enfin, la diversité intra-spécifique révélée au cours de notre étude le long des côtes bretonnes permet d'envisager la sélection de génotypes particuliers pour l'aquaculture. Dans le cas de l'espèce morphologique *Pylaiella littoralis* qui présente une forte diversité génétique entre populations et entre taxons (SP1 et SP2), les spécificités de chaque population et de chaque taxon devraient être considérées pour la mise en place de cultures industrielles. Cependant, la sélection de souches particulières et leur mise en culture dans le milieu naturelle ne peut se faire qu'après s'être assuré de l'innocuité d'une telle démarche sur l'environnement. En effet, la mise en culture de nouveau génotype performant à grande échelle pose des problèmes éthiques en particulier sur les risques majeurs sur l'environnement et les risques d'échappements de culture dans le milieu naturel. La compétition intra-spécifique avec les génotypes locaux pourrait entraîner une diminution de la diversité. Par conséquent, la culture en pleine mer ne pourra se faire qu'après un inventaire de la ressource génétique et estimation des risques et des conséquences sur les populations naturelles (impacts biologique, environnemental et génétique). Il est donc nécessaire aujourd'hui d'appréhender la diversité génétique des populations et d'étudier les flux de gènes entre populations cultivées et sauvages afin de mieux évaluer les risques potentiels.

Bibliographie

(Hors articles)

A

- Abe, M., Kobayashi, M., Fujiyoshi, E., Tamaki, M., Kikuchi, N., Murase, N., 2012. Use of PCR-RFLP for the discrimination of Japanese *Porphyra* and *Pyropia* species (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 1-8.
- Agapow, P.M., Bininda-Emonds, O.R.P., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C., Purvis, A., 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *The quarterly review of biology* 79, 161-179.
- Andersen, R.A., 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation* 1, 267-292.
- Antoine, E., Fleurence, J., 2003. Species identification of red and brown seaweeds using ITS ribosomal DNA amplification and RFLP patterns. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 709-713.
- Arnaud-Haond, S., Arrieta, J.M., Duarte, C.M., 2011. Marine biodiversity and gene patents. *Science* 331, 1521-1522.

B

- Barrett, C.F., Freudenstein, J.V., 2011. An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Molecular Ecology* 20, 2771-2786.
- Barrington, K., Chopin, T., Robinson, S., 2009. Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. *Integrated mariculture: a global review*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 529, 7-46.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 148-155.
- Billard, E., Daguin, C., Pearson, G., Serrao, E., Engel, C., Valero, M., 2005. Genetic isolation between three closely related taxa: *Fucus vesiculosus*, *F. spiralis*, and *F. ceranoïdes* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 41, 900-905.
- Birky Jr, C.W., 2008. Uniparental inheritance of organelle genes. *Current biology: CB* 18, R692.
- Bittner, L., Payri, C.E., Couloux, A., Cruaud, C., De Reviers, B., Rousseau, F., 2008. Molecular phylogeny of the Dictyotales and their position within the Phaeophyceae, based on nuclear, plastid and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular phylogenetics and evolution* 49, 211-226.
- Blanchet, S., 2012. The use of molecular tools in invasion biology: an emphasis on freshwater ecosystems. *Fisheries Management and Ecology* 19, 120-132.
- Boudouresque, C.F., 2008. Les espèces introduites et invasives en milieu marin. Troisième édition. GIS Posidonie publ., Marseilles : 201 p.
- Buck, B.H., Krause, G., Michler-Cieluch, T., Brenner, M., Buchholz, C.M., Busch, J.A., Fisch, R., Geisen, M., Zielinski, O., 2008. Meeting the quest for spatial efficiency: progress and prospects of extensive aquaculture within offshore wind farms. *Helgoland Marine Research* 62, 269-281.

- Burrowes, R., Rousseau, F., Müller, D.G., De Reviers, B., 2003. Taxonomic placement of *Microzonia* (Phaeophyceae) in the Syringodermatales based on the *rbcL* and 28S nrDNA sequences. *Cryptogamie. Algologie* 24, 63-73.
- Burton, T., Lyons, H., Lerat, Y., Stanley, M., Rasmussen, M.B., 2009. A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland. Dublin: Sustainable Energy Ireland-SEI.

C

- Cardinal, A., 1964. Etudes sur les Ectocarpacées de la Manche. Thèse.
- Chesters, D., Wang, Y., Yu, F., Bai, M., Zhang, T.X., Hu, H.Y., Zhu, C.D., Zhang, Y.Z., 2012. The Integrative Taxonomic Approach Reveals Host Specific Species in an Encyrtid Parasitoid Species Complex. *PloS one* 7, e37655.
- Choi, H.G., Kim, M.S., Guiry, M.D., Saunders, G.W., 2001. Phylogenetic relationships of *Polysiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and its relatives based on anatomical and nuclear small-subunit rDNA sequence data. *Botany* 79, 1465-1476.
- Clarkston, B.E., Saunders, G.W., 2010. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. *Botany* 88, 119-131.
- Craigie, J.S., 2011. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology* 23, 371-393.
- Cronquist, A., 1978, Once again, what is a species ? In: In L.V. Knutson (Ed.), B.i.A. (Ed.). Montclair, New Jersey, U.S.A: Allenheld Osmin, pp. 3-20.
- Curiel, D., Bellema, G., Rocca, B.L., Scattolin, M., Marzocchi, M., 2002. First report of *Polysiphonia morrowii* Harvey (Ceramiales, Rhodophyta) in the Mediterranean sea. *Botanica Marina* 45, 66-70.

D

- Dalmon, J., Loiseaux, S., 1981. The deoxyribonucleic acids of two brown algae: *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. and *Sphacellaria* sp. *Plant Science Letters* 21, 241-251.
- Darwin, C., 1859. On the origin of species by means of natural selection. From *So Simple a Beginning: The Four Great Books of Charles Darwin*.
- de Queiroz, K., 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation.
- de Queiroz, K., 2005. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 56, 196-215.
- de Queiroz, K., 2007. Toward an integrated system of clade names. *Systematic biology* 56, 956-974.
- Denis, C., Morangais, M., Li, M., Deniaud, E., Gaudin, P., Wielgosz-Collin, G., Barnathan, G., Jaouen, P., Fleurence, J., 2010. Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). *Food chemistry* 119, 913-917.

- Destombe, C., Douglas, S.E., 1991. Rubisco spacer sequence divergence in the rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species. *Current genetics* 19, 395-398.
- Destombe, C., Valero, M., Guillemin, M.L., 2010. Delineation of two sibling red algal species, *Gracilaria gracilis* and *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta), using multiple DNA markers: resurrection of the species *G. dura* previously described in the northern Atlantic 200 years ago. *Journal of Phycology* 46, 720-727.
- Deysher, L., Norton, T.A., 1981. Dispersal and colonization in *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 56, 179-195.
- Diana, J.S., 2009. Aquaculture production and biodiversity conservation. *BioScience* 59, 27-38.
- Donoghue, M.J., 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist*, 172-181.
- Draisma, S.G.A., Prud'Homme van Reine, W.F., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2001. A reassessment of phylogenetic relationships within the Phaeophyceae based on RUBISCO large subunit and ribosomal DNA sequences. *Journal of Phycology* 37, 586-603.

E

- Engel, C.R., Daguin, C., Serrao, E.A., 2005. Genetic entities and mating system in hermaphroditic *Fucus spiralis* and its close dioecious relative *F. vesiculosus* (Fucaceae, Phaeophyceae). *Molecular ecology* 14, 2033-2046.
- Erdügan, H., Akı, C., Acar, O., Dural, B., Aysel, V., 2009. New record for the east Mediterranean, Dardanelles (Turkey) and its distribution: *Polysiphonia morrowii* Harvey (Ceramiales, Rhodophyta). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 9, 231-232.
- Evans, K.M., Wortley, A.H., Mann, D.G., 2007. An Assessment of Potential Diatom "Barcode" Genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their Effectiveness in Determining Relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist* 158, 349-364.
- FAO, 2012. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2012. Site Internet: www.fao.org/icatalog/inter-e.htm.

F

- Feldmann, J., 1954. Inventaire de la flore marine de Roscoff: algues, champignons, lichens et spermatophytes. *Travaux de la Station Biologique de Roscoff, Nouvelle Série Supplément* 6, 111-116.
- Feldmann, J., 1963. Les algues. In: *Précis de Botanique*. 1.Végétaux inférieurs (des Abbayes H., Chadeaud M., Ferré Y. de, Feldmann J., Gaussen H., Grassé P.-P., Leredde M.C., Ozenda P. and Prévot A.R.). *Précis de Sciences Biologiques publiés sous la direction du Pr. Pierre-P. Grassé*. Paris, Masson et Cie, pp. 83-249.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4, 423-425.

- Fleurence, J., 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology* 10, 25-28.
- Fleurence, J., Morançais, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., Garcia-Bueno, N., Jaouen, P., 2012. What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? *Trends in Food Science & Technology* 27, 57-61.
- Fontaine, J.M., Goux, D., Kloareg, B., Loiseaux-de Goër, S., 1997. The reverse-transcriptase-like proteins encoded by group II introns in the mitochondrial genome of the brown alga *Pylaiella littoralis* belong to two different lineages which apparently coevolved with the group II ribosyme lineages. *Journal of molecular evolution* 44, 33-42.
- Fontaine, J.M., Rousvoal, S., Delaroque, N., Loiseaux-de Goër, S., 1995. Characterization of the *cox3*, *nad7* and *atp6* genes from the mitochondrial genome of the brown alga *Pylaiella littoralis*. *Plant physiology and biochemistry* 33, 605-609.
- Freshwater, D.W., Tudor, K., O'Shaughnessy, K., Wysor, B., 2010. DNA barcoding in the red algal order Gelidiales: Comparison of COI with *rbcL* and verification of the "barcoding gap". *Cryptogam. Algol.* 31, 435.
- Frézal, L., Leblois, R., 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* 8, 727-736.

G

- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G.D.D., 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18, 4541-4550.
- Geoffroy, A., Le Gall, L., Destombe, C., 2012. Cryptic introduction of the red alga *Polysiphonia morrowii* Harvey (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in the North Atlantic Ocean highlighted by a DNA barcoding approach. *Aquatic Botany* 100, 67-71.
- Gouilletquer, P., Bachelet, G., Sauriau, P.G., Noel, P., 2002. Open Atlantic coast of Europe-a century of introduced species into French waters. *Invasive Aquatic Species Of Europe Distribution Impacts And Management*, 276-290.
- Gouilletquer, P., Le Moine, O., 2002. Shellfish farming and coastal zone management (CZM) development in the Marennes-Oléron Bay and Charentais Sounds (Charente Maritime, France): a review of recent developments. *Aquaculture International* 10, 507-525.
- Grizel, H., Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil: ICES Journal of Marine Science* 47, 399.
- Grosholz, E., 2002. Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 22-27.
- Guillemin, M.L., Akki, S.A., Givernaud, T., Mouradi, A., Valero, M., Destombe, C., 2008. Molecular characterisation and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquatic Botany* 89, 324-330.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2012. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.

H

- Hampl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G.B., Roger, A.J., 2009. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 3859-3864.
- Harvey, W.H., 1857. Algae. In: *Account of the Botanical specimens. (Gray, A., ed) Narrative of the expedition of an American squadron to the China Seas and Japan, performed in the years 1852, 1853 and 1854, under the command of Commodore M.C. Perry, United States Navy. Volume II - with illustrations. (Anon. Eds). pp. 331-332.*
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Gregory, T.R., 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology* 54, 852-859.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fuligator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14812-14817.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M., 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology* 2, e312.
- Hewitt, C.L., Campbell, M.L., Thresher, R.E., Martin, R.B., Boyd, S., Cohen, B.F., Currie, D.R., Gomon, M.F., Keough, M.J., Lewis, J.A., 2004. Introduced and cryptogenic species in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *Marine Biology* 144, 183-202.

J

- Je, J.Y., Ahn, C.B., Oh, M.J., Kang, S.Y., 2009. Antioxidant Activity of a Red Seaweed *Polysiphonia morrowii* Extract. *Food Science and Biotechnology* 18, 124-129.
- Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., 2010. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4, 150-157.
- Joubert, Y., Abdeladhim, L.B., Ksouri, J., Fleurence, J., 2009. Development of a molecular method for the rapid discrimination of red seaweeds used for agar production. *Food Chemistry* 113, 1384-1386.

K

- Kain, J.M., Dawes, C.P., 1987. Useful European seaweeds: past hopes and present cultivation. *Hydrobiologia* 151, 173-181.
- Kemppainen, P., Panova, M., Hollander, J., Johannesson, K., 2009. Complete lack of mitochondrial divergence between two species of NE Atlantic marine intertidal gastropods. *Journal of evolutionary biology* 22, 2000-2011.

- Kerswell, A.P., 2006. Global biodiversity patterns of benthic marine algae. *Ecology* 87, 2479-2488.
- Kim, M.S., Lee, I.K., 2006. *Neosiphonia flavimarina* gen. et sp. nov. with a taxonomic reassessment of the genus *Polysiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Phycological Research* 47, 271-281.
- Kim, M.S., Lee, I.K., Boo, S.M., 1994. Morphological studies of the red alga *Polysiphonia morrowii* Harvey on the Korean Coast. *Korean Journal of Phycology* 9, 185-192.
- Kim, M.S., Maggs, C., McIvor, L., Guiry, M., 2000. Reappraisal of the type species of *Polysiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *European Journal of Phycology* 35, 83-92.
- Kim, M.S., Yang, E.C., 2005. Taxonomic note of *Polysiphonia pacifica* (Ceramiales, Rhodophyta) complex with focus on Pacific isolates. *Algae* 20, 15-23.
- Kim, M.S., Yang, E.C., 2006. Taxonomy and phylogeny of *Neosiphonia japonica* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) based on *rbcL* and *cpeA/B* gene sequences. *Algae* 21, 287-294.
- Kim, M.S., Yang, E.C., Mansilla, A., Boo, S.M., 2004. Recent introduction of *Polysiphonia morrowii* (Ceramiales, Rhodophyta) to Punta Arenas, Chile. *Botanica Marina* 47, 389-394.
- Kim, S.K., 2011, *Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects*. CRC Press.
- Knight, M., 1923. Studies in the Ectocarpaceae I. The life-history and cytology of *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 53, 353 - 361.
- Knowles, L.L., Carstens, B.C., Keat, M.L., 2007. Coupling genetic and ecological-niche models to examine how past population distributions contribute to divergence. *Current Biology* 17, 940-946.
- Koski, L.B., Golding, G.B., 2001. The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor. *Journal of Molecular Evolution* 52, 540-542.
- Kozhenkova, S.I., 2009. Retrospective analysis of the marine flora of Vostok Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology* 35, 263-278.
- Kucera, H., Saunders, G.W., 2008. Assigning morphological variants of *Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) in Canadian waters to recognized species using DNA barcoding. *Botany* 86, 1065-1079.
- Kucera, H., Saunders, G.W., 2012. A survey of Bangiales (Rhodophyta) based on multiple molecular markers reveals cryptic diversity. *Journal of Phycology* 48, 869-882.
- Kudo, T., Masuda, M., 1981. A taxonomic study of *Polysiphonia morrowii* Harvey (Rhodophyta, Ceramiales). *Japanese Journal of Phycology* 29, 263-272.
- Kylin, H., 1937, *Bemerkungen über die Entwicklungsgeschichte einiger Phaeophyceen*. GWK Gleerup.

L

- Lane, C.E., Lindstrom, S.C., Saunders, G.W., 2007. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. *Molecular phylogenetics and evolution* 44, 634-648.
- Le Gall, L., Payri, C., Bittner, L., Saunders, G.W., 2009. Multigene phylogenetic analyses support recognition of the Sporolithales ord. nov. *Molecular phylogenetics and evolution* 54, 302-305.

- Le Gall, L., Saunders, G.W., 2010. DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *Journal of Phycology* 46, 374-389.
- Lee, W.J., Lee, I.K., 1991. Mixed phases reproduction of *Polysiphonia morrowii* Harvey (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in culture. *Japanese Journal of Phycology* 39, 115-121.
- Lee, Y., 2008. Marine algae of Jeju. Academy Publications, 1-177.
- Lee, Y., Kang, S.Y., 2001. A catalogue of the seaweeds in Korea. Cheju National University Press, Jeju.
- Loiseaux-de Goër, S., Markowicz, Y., Dalmon, J., Audren, H., 1988. Physical maps of the two circular plastid DNA molecules of the brown alga *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *Current genetics* 14, 155-162.
- Loiseaux-de Goër, S., Noailles, M.C., 2008. Algues de Roscoff. Editions de la Station Biologique de Roscoff: Roscoff.
- Longtin, C.M., Scrosati, R.A., Whalen, G.B., Garbary, D.J., 2009. Distribution of algal epiphytes across environmental gradients at different scales: intertidal elevation, host canopies, and host fronds. *Journal of Phycology* 45, 820-827.
- López-Mosquera, M.E., Fernández-Lema, E., Villares, R., Corral, R., Alonso, B., Blanco, C., 2011. Composting fish waste and seaweed to produce a fertilizer for use in organic agriculture. *Procedia Environmental Sciences* 9, 113-117.
- Lotze, H.K., Schramm, W., Schories, D., Worm, B., 1999. Control of macroalgal blooms at early developmental stages: *Pilayella littoralis* versus *Enteromorpha* spp. *Oecologia* 119, 46-54.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M., 2000. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Invasive Species Specialist Group Auckland, New Zealand.
- Lüning, K., Pang, S., 2003. Mass cultivation of seaweeds: current aspects and approaches. *Journal of applied phycology* 15, 115-119.

M

- Macaya, E.C., Zuccarello, G.C., 2010. DNA barcoding and genetic divergence in the giant Kelp *Macrocystis* (Laminariales). *Journal of Phycology* 46, 736-742.
- Maggs, C.A., Hommersand, M.H., 1993. Seaweeds of the British Isles, Volume 1. Rhodophyta, Part 3A Ceramiales. Seaweeds of the British Isles, Volume 1. Rhodophyta, Part 3A Ceramiales.
- Maggs, C.A., Stegenga, H., 1999. Red algal exotics on North Sea coasts. *Helgoland Marine Research* 52, 243-258.
- Mallet, J., 1995. A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology & Evolution* 10, 294-299.
- Mamoozadeh, N.R., Freshwater, D.W., 2012. *Polysiphonia* sensu lato (Ceramiales, Florideophyceae) species of Caribbean Panama including *Polysiphonia lobophoralis* sp. nov. and *Polysiphonia nuda* sp. nov. *Botanica Marina* 55, 317-347.

- Manghisi, A., Morabito, M., Bertuccio, C., Le Gall, L., Couloux, A., Cruaud, C., Genovese, G., 2010. Is routine DNA barcoding an efficient tool to reveal introductions of alien macroalgae? A case study of *Agardhiella subulata* (Solieriaceae, Rhodophyta) in Cape Peloro lagoon (Sicily, Italy). *Cryptogamie. Algologie* 31, 423-433.
- Marko, P.B., Lee, S.C., Rice, A.M., Gramling, J.M., Fitzhenry, T.M., McAlister, J.S., Harper, G.R., Moran, A.L., 2004. Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. *Nature* 430, 309-310.
- Masuda, M., Kudo, T., Kawaguchi, S., Guiry, M.D., 1995. Lectotypification of some marine red algae described by W. H. Harvey from Japan. *Phycological Research* 43, 191-202.
- Mattio, L., Payri, C., 2010. Assessment of five markers as potential barcodes for identifying *Sargassum* subgenus *Sargassum* species (Phaeophyceae, Fucales). *Cryptogamie. Algologie* 31, 467-485.
- Mayden, R.L., 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. *Species the units of biodiversity* 54, 381-424.
- Mayr, E., 1942, Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist. Harvard University Press.
- McDevit, D.C., Saunders, G.W., 2009. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol. *Phycological Research* 57, 131-141.
- McDevit, D.C., Saunders, G.W., 2010. A DNA barcode examination of the Laminariaceae (Phaeophyceae) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights. *Phycologia* 49, 235-248.
- McIvor, L., Maggs, C.A., Provan, J., Stanhope, M.J., 2001. *rbcL* sequences reveal multiple cryptic introductions of the Japanese red alga *Polysiphonia harveyi*. *Molecular Ecology* 10, 911-919.
- Mejjad, M., Loiseaux-de-Goër, S., Ducreux, G., 1992. Protoplast isolation, development, and regeneration in different strains of *Pilayella littoralis* (L.) Kjellm.(Phaeophyceae). *Protoplasma* 169, 42-48.
- Meyer, C.P., Paulay, G., 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology* 3, e422.
- Mitchell, A., 2008. DNA barcoding demystified. *Australian Journal of Entomology* 47, 169-173.
- Molnar, J.L., Gamboa, R.L., Revenga, C., Spalding, M.D., 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6, 485-492.
- Moniz, M.B.J., Kaczmarska, I., 2009. Barcoding diatoms: Is there a good marker? *Molecular Ecology Resources* 9, 65-74.
- Moretti, V.M., Turchini, G.M., Bellagamba, F., Caprino, F., 2003. Traceability issues in fishery and aquaculture products. *Veterinary research communications* 27, 497-505.
- Müller, D.G., Stache, B., 1989. Life history studies on *Pilayella littoralis*(L.) Kjellman(Phaeophyceae, Ectocarpales) of different geographical origin. *Botanica marina* 32, 71-78.

N

- Neiva, J., Pearson, G.A., Valero, M., Serrao, E.A., 2012. Drifting fronds and drifting alleles: range dynamics, local dispersal and habitat isolation shape the population structure of the estuarine seaweed *Fucus ceranoides*. *Journal of Biogeography* 39, 1167-1178.
- Nelson, W.A., Maggs, C.A., 1996. Records of adventive marine algae in New Zealand: *Antithamnionella ternifolia*, *Polysiphonia senticulosa* (Ceramiales, Rhodophyta), and *Striaria attenuata* (Dictyosiphonales, Phaeophyta). *New Zealand journal of marine and freshwater research* 30, 449-453.
- Noor, M.A.F., 2002. Is the biological species concept showing its age? *Trends in Ecology & Evolution* 17, 153-154.

P

- Perestrenko, L.P., 1994, *Krasnye vodorosli dal'nevostochnykh morei Rossii*: Red algae of the Far-Eastern seas of Russia. St. Petersburg: Rossiiskaia Akademiia Nauk, Botanichesk Institut im. V.L. Komarova [Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences].
- Pérez, R., Lee, J.Y., Juge, C., 1981. Observations sur la biologie de l'algue japonaise *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar introduite accidentellement dans l'Etang de Thau. *Science et pêche* 315, 1-12.
- Phang, S.M., 2010. Potential Products from Tropical Algae and Seaweeds, especially with Reference to Malaysia. *Malaysian Journal of Science* 29, 160-166.
- Piao, M.J., Kang, H.K., Yoo, E.S., Koh, Y.S., Kim, D.S., Lee, N.H., Hyun, J.W., 2012. Photo-protective effect of *Polysiphonia morrowii* Harvey against ultraviolet B radiation-induced keratinocyte damage. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 55, 149-158.
- Pombert, J.F., Beauchamp, P., Otis, C., Lemieux, C., Turmel, M., 2006. The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Oltmannsiellopsis viridis*: evolutionary trends of the mitochondrial genome in the Ulvophyceae. *Current genetics* 50, 137-147.

Q

- Qin, S., Jiang, P., Tseng, C.K., 2004. Molecular biotechnology of marine algae in China. *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges* 512, 21-26.

R

- Råberg, S., Berger-Jönsson, R., Björn, A., Granéli, E., Kautsky, L., 2005. Effects of *Pilayella littoralis* on *Fucus vesiculosus* recruitment: implications for community composition. *Marine Ecology Progress Series* 289, 131-139.

- Radulovici, A.E., Archambault, P., Dufresne, F., 2010. DNA Barcodes for Marine Biodiversity: Moving Fast Forward? *Diversity* 2, 450-472.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7, 355-364.
- Reviers, B.d., 2003, *Biologie et phylogénie des algues*. Belin édition.
- Richardson, D.M., Pysek, P., Rejmanek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.D., West, C.J., 2001. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and distributions* 6, 93-107.
- Robba, L., Russell, S.J., Barker, G.L., Brodie, J., 2006. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany* 93, 1101-1108.
- Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2007. Population structure and species boundary delimitation of cryptic *Dioryctria* moths: an integrative approach. *Molecular Ecology* 16, 3617-3633.
- Ross, H.A., Murugan, S., Sibon Li, W.L., 2008. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Systematic Biology* 57, 216.
- Rouxel, C., Daniel, A., Jérôme, M., Etienne, M., Fleurence, J., 2001. Species identification by SDS-PAGE of red algae used as seafood or a food ingredient. *Food chemistry* 74, 349-353.

S

- Sáez, A.G., Lozano, E., 2005. Body doubles. *Nature* 433, 111-111.
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., Baughman, S., Cabin, R.J., Cohen, J.E., Ellstrand, N.C., McCauley, D.E., O'Neil, P., Parker, I.M., Thompson, J.N., Weller, S.G., 2001. The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst* 32, 305-332.
- Saunders, G.W., 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360, 1879.
- Saunders, G.W., Kucera, H., 2010. An evaluation of *rbcL*, *tufA*, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamie. Algologie* 31, 487-528.
- Saunders, G.W., Lehmkuhl, K.V., 2005. Molecular divergence and morphological diversity among four cryptic species of *Plocamium* (Plocamiales, Florideophyceae) in northern Europe. *European Journal of Phycology* 40, 293-312.
- Saunders, G.W., McDevit, D.C., 2012. Acquiring DNA sequence data from dried archival red algae (Florideophyceae) for the purpose of applying available names to contemporary genetic species: a critical assessment. *Botany* 90, 191-203.
- Schindel, D., Miller, S.E., 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* 435, 17.
- Seeley, R.H., Schlesinger, W.H., 2012. Sustainable seaweed cutting? The rockweed (*Ascophyllum nodosum*) industry of Maine and the Maritime Provinces. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1249, 84-103.

- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G., 1997. Marine Algae of the Commander Islands Preliminary Remarks on the Revision of the Flora. III. Rhodophyta. *Botanica marina* 40, 15-24.
- Sherwood, A.R., Vis, M.L., Entwisle, T.J., Necchi Jr, O., Presting, G.G., 2008. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the Batrachospermales (Rhodophyta): Insights from a DNA barcoding approach. *Phycological research* 56, 269-279.
- Siemer, B.L., Pedersen, P.M., 1995. The taxonomic status of *Pilayella littoralis*, *P. varia* and *P. macrocarpa* (Pilayellaceae, Fucophyceae). *Phycologia* 34, 257-266.
- Silberfeld, T., Leigh, J.W., Verbruggen, H., Cruaud, C., De Reviers, B., Rousseau, F., 2010. A multi-locus time-calibrated phylogeny of the brown algae (Heterokonta, Ochrophyta, Phaeophyceae): Investigating the evolutionary nature of the "brown algal crown radiation". *Molecular phylogenetics and evolution* 56, 659-674.
- Sites Jr, J.W., Marshall, J.C., 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35, 199-227.
- Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F., Crandall, K.A., 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 13486-13491.
- Stuercke, B., Freshwater, D.W., 2008. Consistency of morphological characters used to delimit *Polysiphonia* sensu lato species (Ceramiales, Florideophyceae): analyses of North Carolina, USA specimens. *Phycologia* 47, 541-559.
- Sutherland, J.E., Lindstrom, S.C., Nelson, W.A., Brodie, J., Lynch, M.D.J., Hwang, M.S., Choi, H.G., Miyata, M., Kikuchi, N., Oliveira, M.C., 2011. A new look at an ancient order : generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 47, 1131-1151.

T

- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H., Vogler, A.P., 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 70-74.
- Tellier, F., Meynard, A.P., Correa, J.A., Faugeron, S., Valero, M., 2009. Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens* : Vicariance or parapatry? *Molecular phylogenetics and evolution* 53, 679-693.
- Tellier, F., Tapia, J., Faugeron, S., Destombe, C., Valero, M., 2011. The *Lessonia nigrescens* species complex (Laminariales, Phaeophyceae) shows strict parapatry and complete reproductive isolation in a secondary contact zone. *Journal of Phycology* 47, 894-903.
- Tronholm, A., Steen, F., Tyberghein, L., Leliaert, F., Verbruggen, H., Antonia Ribera Siguan, M., De Clerck, O., 2010. Species Delimitation, Taxonomy, and Biogeography of *Dictyota* in Europe (Dictyotales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 46, 1301-1321.
- Turmel, M., Otis, C., Lemieux, C., 2002. The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaetosphaeridium globosum*: insights into the timing of the events that restructured organelle DNAs within the green algal lineage that led to land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 11275-11280.

V

- Van Valen, L., 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*, 233-239.
- Verbruggen, H., Ashworth, M., LoDuca, S.T., Vlaeminck, C., Cocquyt, E., Sauvage, T., Zechman, F.W., Littler, D.S., Littler, M.M., Leliaert, F., 2009. A multi-locus time-calibrated phylogeny of the siphonous green algae. *Molecular phylogenetics and evolution* 50, 642-653.
- Verlaque, M., 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29-49.
- Viard, F., Comtet, T., 2009. Déferlantes d'invasions dans les milieux marins. Dossier n°65 © POUR LA SCIENCE.
- Voisin, M., Daguin, C., Engel, C., Grulois, D., Javanaud, C., Viard, F., 2007. Processus et dynamique d'installation des espèces introduites en milieu marin: une illustration avec l'algue brune asiatique *Undaria pinnatifida*. *Journal de la Société de Biologie* 201, 259-266.

W

- Wattier, R., Maggs, C.A., 2001. Intraspecific variation in seaweeds: the application of new tools and approaches. *Advances in Botanical Research* 35, 171-212.
- Wijesinghe, W.A.J.P., Jeon, Y.J., 2011. Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review. *Phytochemistry Reviews* 10, 431-443.
- Wilce, R.T., Schneider, C.W., Quinlan, A.V., Bosch, K., 1982. The life history and morphology of free-living *Pilayella littoralis* (L.) Kjellm.(Ectocarpaceae, Ectocarpales) in Nahant Bay, Massachusetts. *Phycologia* 21, 336-354.
- Williamson, M., Fitter, A., 1996. The varying success of invaders. *Ecology* 77, 1661-1666.
- Winberg, P., 2011. Scaling up for New Opportunities in the Practical Use of Algae (Applied Phycology).
- Winker, K., Rocque, D.A., Braile, T.M., Pruett, C.L., 2007. Vainly beating the air: species-concept debates need not impede progress in science or conservation. *Ornithological Monographs*, 30-44.

Y

- Yoshida, T., 1998. Marine algae of Japan. Tokyo: Uchida Rokakuho Publishing Co., Ltd.. pp. [1-2], 1-25, 21-1222.
- Yoshida, T., Nakajima, Y., Nakata, Y., 1990. Check-list of marine algae of Japan. *Japanese Journal of Phycology* 38, 269-320.

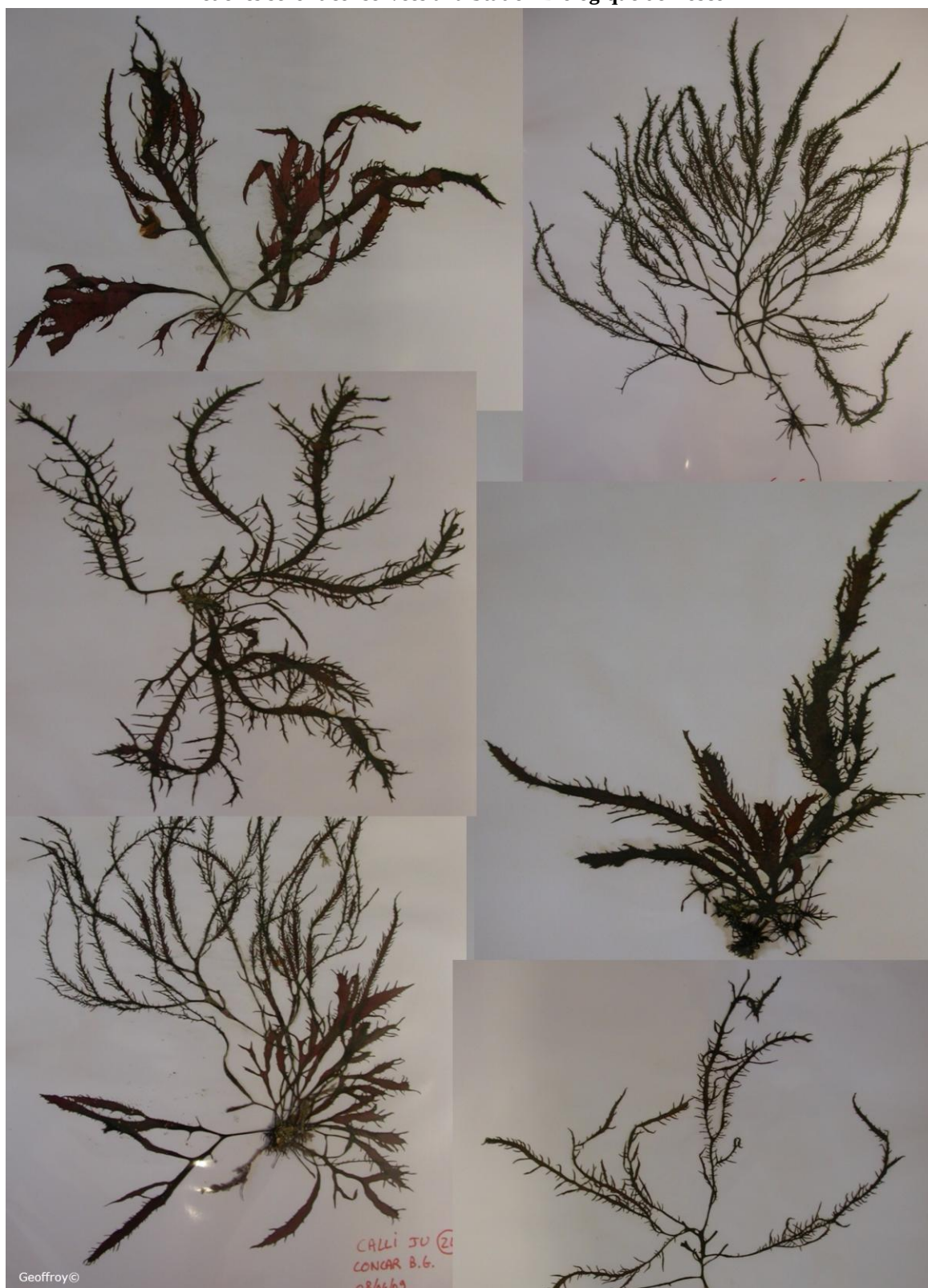
Z

- Zemke-White, L.W., Ohno, M., 1999. World seaweed utilisation: An end-of-century summary. *Journal of Applied Phycology* 11, 369-376.
- Zuccarello, G.C., Burger, G., West, J.A., King, R.J., 1999. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8, 1443-1447.
- Zuccarello, G.C., West, J.A., 2003. Multiple cryptic species: molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia radicans*/*B. moritziana* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on North American isolates. *Journal of Phycology* 39, 948-959.
- Zuccarello, J., 2011. What are you eating ? It may be Nori, but it is probably not *Porphyra* anymore ! *Journal of Phycology* 47, 967-968.

Annexes

ANNEXE 1

Exemple de variations morphologiques rencontrées chez *Calliblepharis jubata* dans les différentes localités échantillonnées. Les photos correspondent à une partie des planches d'herbiers réalisées lors des échantillonnages et elles seront conservées à la Station Biologique de Roscoff



ANNEXE 2

Exemple de certifications d'espèces pouvant être délivrées aux acteurs de la filière. Ils comprennent une planche d'herbier, une photo dans le milieu et les séquences ADN associées



Certificat d'espèce



Embranchement: Ochrophytes
Classe: Phéophycées
Ordre: Fucales
Famille: Sargassacées
Genre: *Bifurcaria*
Espèce: *bifurcata* Ross



Bifurcaria bifurcata

Quiberon
09/04/2009
Geoffroy

Barcode : Certification moléculaire
Séquences nucléotidiques*

Plaste : *rbcL* n°PB238_1

Mitochondrie : *cox1* n°MB238_1

*à déposer dans la base de données moléculaires GenBank



CNRS UPMC INSU
Station Biologique
Roscoff

Certificat d'espèce



Embranchement: Rhodophytes
Classe: Rhodophycées
Sous-classe: Florideophycées
Ordre: Gigartinales
Famille: Cystocloniacées
Genre: *Calliblepharis*
Espèce: *jubata* Kützting

Calliblepharis jubata

Pointe de Primel
10/03/2009
Geoffroy

Barcode : Certification moléculaire
Séquences nucléotidiques*

Plaste : *rbcL* n°CJ93_1

Mitochondrie : *cox1* n°MJ93_1

Nucléaire : 28S n°NJ93_1

*à déposer dans la base de données moléculaires GenBank

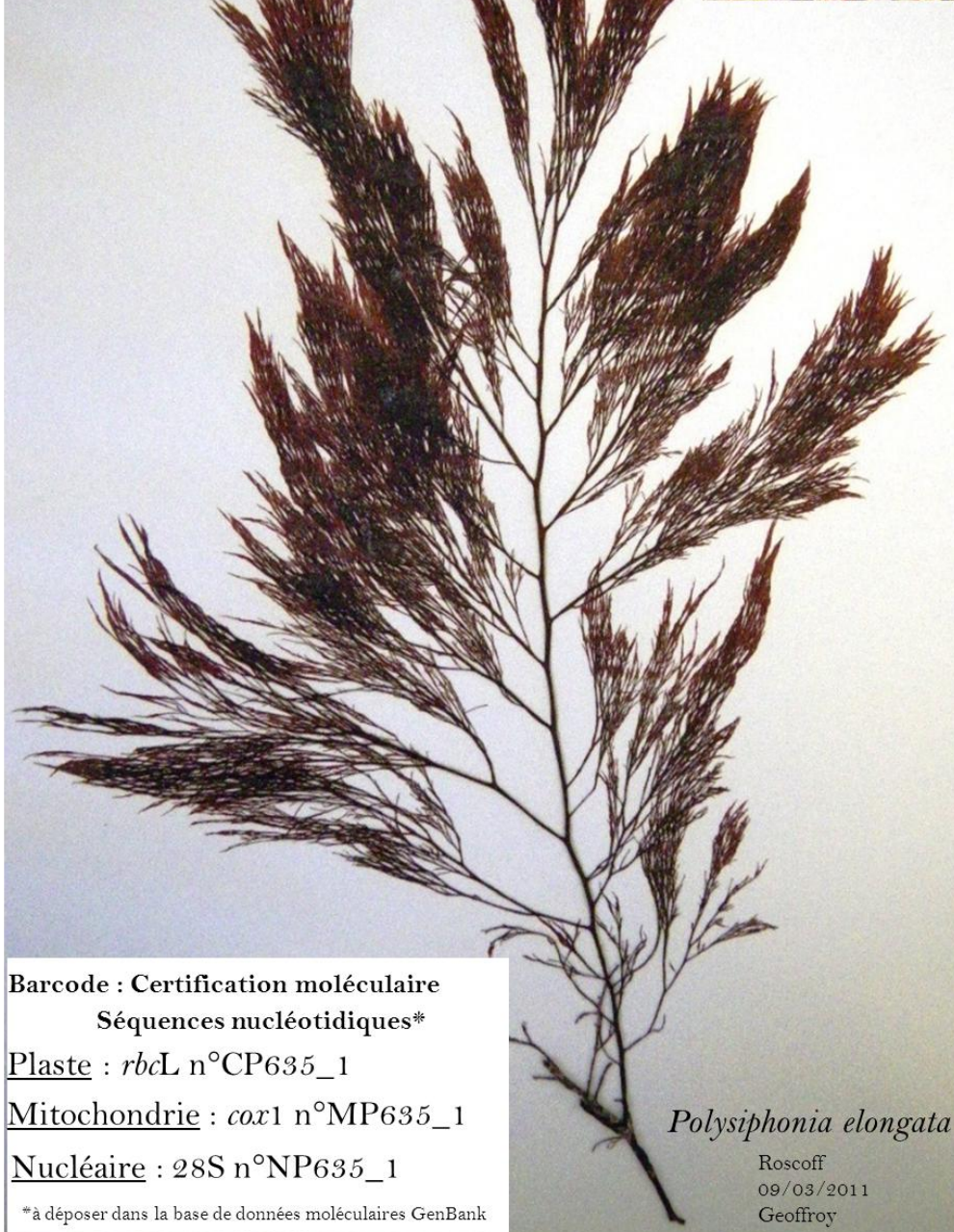


CNRS UPMC INSU
Station Biologique
Roscoff

Certificat d'espèce



Embranchement: Rhodophytes
Classe: Rhodophycées
Sous-classe: Florideophycées
Ordre: Cérariales
Famille: Rhodomélacées
Genre: *Polysiphonia*
Espèce: *elongata* Sprengel



Barcode : Certification moléculaire
Séquences nucléotidiques*

Plaste : *rbcL* n°CP635_1

Mitochondrie : *cox1* n°MP635_1

Nucléaire : 28S n°NP635_1

*à déposer dans la base de données moléculaires GenBank

Polysiphonia elongata

Roscoff
09/03/2011
Geoffroy

Certificat d'espèce



Embranchement: Ochrophytes
 Classe: Phéophycées
 Ordre: Ectocarpales
 Famille: Acinetosporaceae
 Genre: *Pylaiella*
 Espèce: *littoralis* (Linnaeus) Kjellman



Barcode : Certification moléculaire
Séquences nucléotidiques*

Plaste : *rbcL* n°CL263_1

Mitochondrie : *cox1* n°ML263_1

Pylaiella littoralis

Roscoff
 26/10/2011
 Geoffroy

*à déposer dans la base de données moléculaires GenBank

Résumé de la thèse

L'identification de certaines espèces d'algues d'après leurs caractéristiques morphologiques reste encore aujourd'hui problématique en raison notamment d'une forte plasticité phénotypique ou de phénomènes de convergence. Jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle, la classification a été basée essentiellement sur des caractères morphologiques ou anatomiques et c'est seulement au cours de ces dernières décades que le développement d'outils moléculaires a favorisé une avancée rapide dans ce domaine. En effet, l'accès aux séquences nucléotidiques a permis d'une part d'augmenter considérablement le nombre de caractères informatifs et d'autre part d'estimer les flux géniques entre taxons pour mieux appréhender la délimitation des espèces.

C'est dans ce contexte que je me suis intéressé à l'utilisation de différents marqueurs moléculaires dans un but taxonomique. L'objectif était plus précisément de caractériser et d'étudier la diversité génétique de plusieurs espèces d'algues marines cultivables d'intérêts économiques.

Dans une première partie, j'ai utilisé une approche de type barcoding multilocus afin de trouver les caractères génétiques spécifiques indispensables pour assurer la traçabilité des produits dans l'industrie des algues par une approche RFLP.

La seconde partie a été consacrée à étudier la délimitation d'espèces au sein d'un genre d'algues brunes *Pylaiella* en utilisant ces mêmes outils de barcoding multilocus. Dans ce taxon, l'espèce *Pylaiella littoralis* (Linnaeus) Kjellman, se caractérise par une grande variabilité phénotypique. Notre étude, le long des côtes Bretonnes, montre la présence de deux espèces cryptiques. Ce résultat est confirmé par l'utilisation de 10 marqueurs de type microsatellite révélant des flux de gènes limités entre ces deux entités. Enfin, nos résultats montrent que ces espèces cryptiques se caractérisent par un décalage saisonnier suggérant une spéciation par sélection divergente à des facteurs écologiques.

Dans une troisième partie j'ai étudié une algue rouge du genre *Polysiphonia*. Ce genre est extrêmement divers et compte plus de 200 espèces. La taxonomie de ce genre reste cependant encore très difficile en raison de l'absence de caractères morphologiques diagnostiques. Notre étude basée sur l'analyse des séquences *cox1* et *rbcL* a permis, pour la première fois en Atlantique Nord, de mettre en évidence la présence de l'algue introduite *Polysiphonia morrowii* Harvey. Cette introduction serait passée inaperçue en Bretagne en raison de son caractère cryptique avec des espèces autochtones.

Enfin, la comparaison de la diversité haplotypique entre son aire d'origine supposée et ses deux aires d'introduction en France et en Argentine révèle une diversité génétique relativement élevée dans les zones d'introduction suggérant de multiples événements d'introduction.

Ces différents résultats soulignent l'importance d'approches moléculaires et intégratives pour l'identification et la délimitation d'espèces, notamment dans un contexte de traçabilité dans le milieu industriel des algues.

Mots-clés: Algues, délimitation d'espèces, espèces cryptiques, barcode multilocus, introduction biologique, identification, aquaculture.

Abstract

The wide phenotypic variability of some algal species and the lack of diagnostic characters render the systematic study of this group problematic. Some species are consequently often misidentified. In the past three decades, molecular techniques have been used to resolve many taxonomic problems and to re-assess the global diversity of seaweeds. DNA nucleotide sequence analyses of different DNA regions have been used to infer phylogenetic relationships at the species level. Meanwhile, population genetic markers have been used to estimate gene flow between populations. These different approaches have inferred a better understanding of species delineation and taxonomic identification.

The aims of the present study was first to clarify the taxonomic identities of seaweed species of commercial interest in aquaculture along the coast of Brittany. A multilocus barcoding approach was applied to develop easy and rapid molecular tools using RFPL, as DNA barcode to identify these species.

Secondly, the study focused on the species delineation within the brown algae genus of *Pylaiella*. In this taxon, *Pylaiella littoralis* (Linnaeus) Kjellman, which is characterized by a large phenotypic variability, has been described as a cosmopolitan species. The study of this species along the coast of Brittany, using multilocus barcoding approach showed the presence of two cryptic species under the name of *P. littoralis*. This result was confirmed by a population genetics approach (based on 10 microsatellite markers) which demonstrated the almost complete absence of gene flow between these two genetic entities. In addition, the phenological monitoring revealed a seasonal shift between species. This shift suggested that the speciation event is most likely linked to divergent selection by environmental factors.

Thirdly, we studied the red alga *Polysiphonia*. This genus is extremely diverse; with nearly 200 species. However, the taxonomy of this group remains ambiguous due to the lack of morphological character diagnostic. Based on *cox1* and *rbcL* sequence analyses, we highlighted for the first time the presence of the introduced alga *Polysiphonia morrowii* Harvey in the Northern Atlantic. Without these sequence analyses, its introduction on Brittany coast may have been further unnoticed due to similar cryptic characters with the native species. Finally, the comparison of haplotype diversity between the probable native area and the two introduced areas in France and Argentina revealed a relatively high genetic diversity within introduced areas. This can be attributed to multiple events of introductions.

These results emphasized the importance of molecular and integrative approaches in species identification and delineation, especially in the context of algae aquaculture industry.

Keywords: Algae, species delineation, cryptic species, multilocus barcode, biological introduction, identification, aquaculture.