



Connectivité et endémisme d'espèces marines dans le sud-ouest de l'océan Indien : le cas des Aglaopheniidae

Bautisse Postaire

► To cite this version:

Bautisse Postaire. Connectivité et endémisme d'espèces marines dans le sud-ouest de l'océan Indien : le cas des Aglaopheniidae. Systématique, phylogénie et taxonomie. Université de la Réunion, 2015. Français. NNT : 2015LARE0006 . tel-01326904v2

HAL Id: tel-01326904

<https://theses.hal.science/tel-01326904v2>

Submitted on 16 Jun 2016

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.



Université de La Réunion
Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé E.D. N°542
UMR IRD 450 - Université de La Réunion - UMR CNRS 9220

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Réunion

Discipline : Biologie marine

**Connectivité et endémisme d'espèces marines dans le Sud-Ouest de l'océan
Indien : le cas des Aglaopheniidae**

Présenté par

Bautisse POSTAIRE

Soutenue le 29 mai 2015 devant le jury composé de :

J.H. BRUGGEMANN	<i>Professeur, Université de La Réunion</i>	Directeur de thèse
C.A.F. BOURMAUD	<i>Maître de conférences, Université de La Réunion</i>	Co-directrice de thèse
H. MAGALON	<i>Maître de conférences, Université de La Réunion</i>	Co-encadrante de thèse
F. BONHOMME	<i>Directeur de recherche, CNRS</i>	Rapporteur
S. SAMADI	<i>Professeur, MNHN</i>	Rapporteur
A. CHENUIL	<i>Chargé de recherches, CNRS</i>	Examineur
N. GRAVIER-BONNET	<i>Docteur</i>	Membre invité

Résumé

La conservation et la gestion sur le long terme de la biodiversité nécessitent une connaissance de la répartition des taxons, mais également une estimation précise de leur diversité spécifique ainsi que des processus de spéciation ayant permis leur formation. Cependant, la mesure de la richesse phylétique peut être biaisée par l'utilisation de caractères taxinomiques ne permettant pas de délimiter les espèces de manière appropriée.

Ce travail de thèse propose d'explorer la diversité phylétique à plusieurs niveaux taxinomiques (générique, spécifique et intra-spécifique) des Aglaopheniidae, une famille d'hydrozoaires, notamment présente dans le Sud-Ouest de l'océan Indien. Dans un premier temps, en utilisant des phylogénies basées sur plusieurs marqueurs (mitochondriaux et nucléaires), ce travail démontre que la diversité phylétique de cette famille est, au minimum, sous-estimée de moitié: tous les genres de la famille sont polyphylétiques ou présentent un statut monophylétique restant à confirmer. Dans un deuxième temps, l'utilisation de méthodes de délimitation d'espèces basées sur des données moléculaires met en évidence la diversité cryptique très élevée des morpho-espèces étudiées, révélant l'intérêt potentiel des protocoles de taxinomie intégrative chez les organismes morphologiquement simples. Enfin, l'étude de génétique des populations d'une espèce incubatrice d'Aglaopheniidae révèle l'importance de la structuration des populations et de l'isolement par la distance chez cette espèce à plusieurs échelles géographiques (de quelques kilomètres à plusieurs milliers), impliquant une potentielle diversité cryptique extrêmement élevée chez cette famille.

L'ensemble des connaissances acquises lors de ce travail de thèse fournit un nouveau regard sur la diversité de la famille des Aglaopheniidae, soulignant le potentiel impact du cycle de reproduction sur la diversité phylétique et les processus de spéciation des hydrozoaires incubateurs. Cette thèse met en évidence la pertinence de l'utilisation de plusieurs procédures complémentaires de délimitation d'espèces pour étudier la diversité des organismes morphologiquement simples.

Mots clés : hydrozoaires, Aglaopheniidae, phylogénie, GMYC, connectivité, microsatellite, *Lytocarpia brevirostris*, endémisme, spéciation, traits d'histoire de vie

Abstract

Designing biodiversity conservation plans requires knowledge on the biogeographic distribution of taxa but also accurate estimates of species richness and diversification processes. However, measuring the phyletic richness can be biased by the use of inappropriate taxonomical characters, leading to erroneous species delimitation and diversity estimates.

This work explores the phyletic richness at several taxonomic levels (generic, specific and intraspecific) of the hydrozoan family Aglaopheniidae (Marktanner-Turneretscher, 1890), with a particular focus on the South-Western Indian Ocean. Firstly, using several newly constructed phylogenies based on mitochondrial and nuclear markers, this study reveals that the phyletic diversity of this family is underestimated by at least 50%: all studied genera are polyphyletic or with doubtful monophyletic status. Then, using several species delimitation methods based on molecular markers, it sheds light on the richness of cryptic diversity of this family, enlightening the potential of using an integrative taxonomic approach on these morphologically simple organisms. Finally, the population genetics of an Aglaopheniidae brooding species shows a high populations structuring with pervasive pattern of isolation by distance at several geographic scales (several to thousands of kilometres), implying a potentially high cryptic diversity existing in this family.

The results of this work provide new insights on Aglaopheniidae diversity, underlining the potential influence of reproductive mode on the phyletic diversity and diversification processes of brooding hydrozoan brooders. This thesis further highlights the relevance of using several complementary species delimitation procedures to study the diversity of morphologically simple organisms.

Keywords: Hydrozoa, Aglaopheniidae, phylogeny, GMYC, connectivity, microsatellites, *Lytocarpia brevirostris*, endemism, speciation, life history traits

Remerciements

Avant tout je tiens à remercier les membres du jury, François Bonhomme, rencontré lors d'une formation à Sète, Sarah Samadi et Anne Chenuil pour avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche.

Matthieu Lecorre, directeur du laboratoire, pour son accueil chaleureux et son oreille attentive.

Henrich Bruggemann, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et m'avoir accompagné pendant presque six ans, depuis mon premier stage de master jusqu'au bout de cette thèse. Les discussions passionnantes et tes conseils avisés ont été d'une grande aide tout au long de ces années. Je te remercie également d'être parvenu à passer la débroussailleuse dans mes réflexions et rédactions souvent buissonnantes. Je retiendrai une chose particulièrement : « Quelle est l'histoire ? ».

Hélène Magalon, sans qui cette thèse ne se serait très certainement pas faite ou du moins pas terminée. Tu m'as accompagné dans les moments difficiles, mais je retiendrai surtout les autres. Merci de m'avoir appris à plonger, m'organiser (avec plus ou moins de succès), travailler en laboratoire, analyser des données, rédiger efficacement et j'en passe. Merci pour m'avoir aidé à participer à des congrès et formations. Merci pour tes remarques toujours précises et justes, j'espère un jour atteindre au quotidien la qualité de ton travail. Merci d'être restée calme (presque tout le temps) et d'avoir supporté mes boulettes, coquilles et bévues, tout en cherchant le côté positif dans toutes les situations. J'attends la première plongée profonde ensemble avec impatience.

Chloé Bourmaud pour m'avoir donné l'occasion de réaliser cette thèse et pour avoir mené des campagnes d'échantillonnage d'hydrozoaires dans le Sud-Ouest de l'océan Indien depuis de nombreuses années.

Nicole Gravier-Bonnet, pour nos longues conversations sur la taxinomie des Aglaopheniidae. Ton savoir encyclopédique, ton expertise et ta mémoire m'impressionneront toujours. Je retiendrai notre première rencontre lors d'un échantillonnage, où tu as enchaîné

les nuits blanches pour identifier le plus rapidement possible tous les échantillons dont tu disposais, montrant là une passion incroyable pour ce modèle biologique.

Baptiste Faure, avec qui nous avons publié mon premier article. Cette publication fut difficile à produire mais grâce à toi, j'en suis très fier. Mon stage de master 2 fut également riche en enseignements, parmi lesquels le plus marquant (au sens littéral) fut : il faut absolument avoir du matériel de terrain adapté. J'ai compris grâce à toi que les tongs ne faisaient pas partie de cette catégorie.

Lucie Penin et Gaël Potin, mes collègues de bureau lors de la fin de cette thèse. Merci d'avoir répondu à toutes mes questions, parfois (généralement) farfelues et souvent sans contexte, et d'avoir su me changer les idées quand le cerveau surchauffait. Sans vous, la fin aurait été beaucoup plus difficile.

Didier Aurelle, pour nous avoir aidés et épaulés dans une partie de cette thèse grâce à ton expérience dans le développement de marqueurs microsatellites.

Tous les collègues d'ENTROPIE et de l'université en général pour les discussions sans rapport évident avec cette thèse mais qui ont certainement aidé à un moment ou à un autre; très certainement l'autre en y réfléchissant.

Sophie Bureau et Lionel Bigot, pour votre aide dans l'échantillonnage.

Damien, Aurore, Ben et Julien, les membres du club de plongée Aquabulle avec qui j'ai pu apprendre à plonger et qui m'ont toujours changé les idées après les longues semaines de travail. Séb également, nos plongées resteront gravées dans les annales.

Tous mes amis et collègues thésards avec qui j'ai passé, et je passe encore, de bons moments. Alexis, ta bonne humeur permanente et communicative a toujours été d'un grand soutien. Grâce à nous, nous avons la confirmation qu'échantillonner des hydrozoaires en apnée est théoriquement possible, mais vraiment pas pratique. Pauline, pour avoir réussi à comprendre mes grognements pré-café du matin, pour avoir souvent posé des questions me lançant des abîmes de réflexion, et surtout pour essayer de me faire découvrir de la « musique de sauvages ». Clément qui, maintenant, sait à quoi sert cette thèse ou du moins

j'ose l'espérer, car je ne suis pas encore totalement sûr qu'il la lise. Agathe qui, après avoir vécu pendant six mois avec un ecomariote et son fou de chat, est revenue dans ce laboratoire pour se lancer dans l'aventure. Marine, pour ton naturel pendant ton stage, tu m'auras fait beaucoup rire tout en réalisant un travail de haute volée. Alice, pour ton soutien, ton humour communicatif et surtout pour avoir suivi mes aventures de chasse aux gastéropodes et aux hydrozoaires. Enfin, et je m'excuse par avance pour ceux que j'ai pu oublier : Vincent, Ti'Jem, Alexis, Louise, Morjane, Maël, tous les autres collègues du M2 BEST, Damien, Tiffany, Margaux, Pierre (et les sudistes en général), Florence, Héloïse...

La machine à café, l'amie de tous les thésards. Tu as su me comprendre et me tenir éveillé pendant ces nombreuses années. Ton café n'était pas toujours bon, mais je ne t'en tiendrai pas rigueur, car sans toi rien n'est possible. Et puis mon chat aussi tiens, lui aussi je dois lui dire merci, il n'y a pas de raisons.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma famille pour m'avoir soutenu et aidé pendant cette thèse, mais pas seulement. Mes parents, Didier et Ariel, pour votre soutien inconditionnel, même à 11000 km de distance. Grâce ce travail vous avez découvert qu'il existe « des plumes sous-marines qui pondent des méduses », mais vous êtes surtout tombés amoureux de la plongée sous-marine. Mon grand frère Maxence, qui après avoir vu cette thèse n'a pas peur de se lancer dans un doctorat. Ma petite sœur Orane, qui commence ses études de biologie et se demande encore « Pourquoi faire une chose pareille ? ».

J'oublie probablement beaucoup de personnes m'ayant énormément apporté pendant cette thèse et je m'en excuse. Ce n'est pas parce que je ne vous remercie pas que je ne vous dois rien, bien au contraire.

Table des matières

Préambule	3
1. Introduction	6
1.1. Biodiversité et Conservation.....	6
1.1.1. Répartition de la biodiversité.....	6
1.1.2. Points chauds de biodiversité terrestre	6
1.1.3. Points chauds de biodiversité marine.....	7
1.1.4. Conservation des récifs coralliens tropicaux.....	7
1.2. Concepts d'espèce et taxinomie	8
1.2.1. Evolution et spéciation.....	8
1.2.2. Importance du concept d'espèce.....	9
1.2.3. Choix du concept d'espèce.....	10
1.2.4. Taxinomie.....	11
1.2.4.1. Rôle historique et critiques	11
1.2.4.2. Taxinomie intégrative.....	12
1.3. Barcoding et taxinomie	13
1.3.1. Concept et fonction.....	13
1.3.2. Limites et critiques.....	14
1.4. Phylogénie et études de biodiversité.....	14
1.4.1. Paramètres préliminaires importants	15
1.4.2. Méthodes de reconstruction phylogénétique.....	17
1.5. Délimitation d'espèces et données génétiques.....	19
1.5.1. Des méthodes en développement.....	20
1.5.2. GMYC et données de barcoding	21
1.5.3. Limites des méthodes de délimitation.....	21
1.6. Génétique des populations d'espèces marines.....	23
1.6.1. Diversité génétique et génétique des populations.....	23
1.6.2. Mesures de différenciation génétique.....	24
1.6.3. Modélisation des flux de gènes.....	25
1.6.4. Génétiques des populations marines dans le Sud-Ouest de l'océan Indien	26
1.6.4.1. Connectivité historique des populations.....	27
1.6.4.2. Connectivité actuelle des populations.....	28
1.7. Modèles d'étude : les hydrozoaires de la famille des Aglaopheniidae.....	20
1.8. Problématique.....	30
2. Phylogenetic relationships within Aglaopheniidae (Cnidaria, Hydrozoa) reveal unexpected generic diversity	35
3. Extensive lineage and cryptic diversity in Aglaopheniidae (Hydrozoa) species revealed by GMYC models and microsatellite data.....	51
4. The importance of isolation by distance in <i>Lytocarpia brevirostris</i> , a widely distributed tropical hydrozoan.....	74
5. Discussion générale et conclusions.....	86
5.1. Une diversité sans lien direct avec la morphologie.....	88
5.1.1. Conservatisme phénotypique ou convergence évolutive ?.....	89
5.1.2. Importance des données écologiques	91
5.2. Une diversité cryptique importante en lien avec le cycle de vie	93
5.3. Conclusions	96
6. Références bibliographiques	97
7. Liste des Annexes.....	129

Préambule

Les études de la diversité cryptique des hydrozoaires basées sur des données moléculaires sont, en comparaison à d'autres groupes de cnidaires comme les scléactiniaires, encore très rares. De plus, malgré des cycles de reproduction qui laisserait parfois supposer des capacités de dispersion limitées, les espèces de cette classe ont souvent des aires de répartition géographique comprenant plusieurs bassins océaniques. L'objectif de cette thèse est d'étudier la diversité phylétique des hydrozoaires de la famille des Aglaopheniidae, particulièrement dans la zone Sud-Ouest de l'océan Indien. Les espèces de cette famille, pour la majorité, incubent leurs larves, ce qui ne semble pas avoir d'implication directe sur les aires de répartition de ces espèces.

Plus précisément, il s'agit, dans un premier temps, de reconstruire une phylogénie de cette famille d'hydrozoaire en intégrant les morpho-espèces échantillonnées dans le Sud-Ouest de l'océan Indien, en Nouvelle-Calédonie et à Moorea (chapitre 2). Puis, dans un deuxième temps, il s'agira d'estimer la diversité cryptique des morpho-espèces échantillonnées à l'aide de plusieurs méthodes de délimitation d'espèces utilisant le modèle GMYC et des données microsatellites (chapitre 3). Enfin, dans un troisième temps, estimer l'importance de l'isolement par la distance entre les populations d'une espèce type d'Aglaopheniidae, *Lytocarpia brevirostris*, et les implications de cet isolement sur le critère morphologique utilisé pour délimiter les espèces de cette famille (chapitre 4). Les analyses phylogénétiques combinées aux méthodes de délimitation d'espèces, ainsi qu'aux données de génétique des populations, permettent de mesurer la diversité génétique au sein des taxons, d'estimer l'importance de la diversité cryptique des morpho-espèces, mais également d'étudier les mécanismes de diversification sous-jacents sur plusieurs échelles temporelles (chapitre 5).

Le premier chapitre propose une introduction générale, rappelant l'importance des études de biodiversité, mais également la nécessité de connaître les processus évolutifs, passés ou présents, dans la mise en place des projets de conservation de la biodiversité. Il rappelle que les mesures de richesse spécifique nécessitent l'utilisation de méthodes de délimitation d'espèces, parfois à l'aide de données phylogénétiques, à même de représenter

la diversité phylétique des taxons étudiés. En outre, il rappelle également que les mesures de connectivité des populations sont nécessaires pour estimer l'isolement des populations, donnée indispensable à tout projet de conservation, mais qu'elles permettent également d'étudier l'impact du mode de reproduction sur la connectivité, et donc d'étudier les processus évolutifs en cours.

Le deuxième chapitre porte sur une reconstruction de la phylogénie générale de la famille des Aglaopheniidae à l'aide d'un marqueur mitochondrial, ainsi que sur la reconstruction de phylogénies des espèces échantillonnées lors de cette thèse à l'aide d'un marqueur mitochondrial et de deux marqueurs nucléaires. Ces différentes reconstructions phylogénétiques ont pour but d'estimer la diversité générique de cette famille (au sens taxinomique du terme), la congruence entre des marqueurs ayant des histoires évolutives différentes, ainsi que de fournir des éléments de réponse sur la pertinence des critères de classification utilisés chez les Aglaopheniidae.

Le troisième chapitre de cette thèse se penche sur l'estimation de la diversité cryptique des Aglaopheniidae à l'aide de méthodes de délimitation d'espèces, utilisant différentes implémentations du modèle GMYC. Le modèle GMYC délimite des espèces hypothétiques sous la forme de métapopulations indépendantes en cherchant une limite entre processus de spéciation et coalescence sur un arbre phylogénétique. Les résultats de ce modèle sont comparés à des données microsatellites chez deux espèces, *Lytocarpia brevirostris* et *Macrorhynchia phoenicea*, afin d'observer la congruence entre les différents types de marqueurs moléculaires. Ce chapitre a pour but de montrer le potentiel des nouvelles méthodes de délimitation d'espèces chez les hydrozoaires et de mettre en évidence la diversité cryptique très élevée des Aglaopheniidae.

Le quatrième chapitre se focalise sur la génétique des populations de *Lytocarpia brevirostris* à l'échelle de l'Indo-Pacifique et sur l'estimation de l'isolement par la distance chez cette espèce à plusieurs échelles géographiques. En utilisant des marqueurs microsatellites développés lors de cette thèse, nous tentons d'estimer les flux de gènes entre populations de plusieurs provinces biogéographiques (archipel des Mascareignes, canal du Mozambique, Nouvelle-Calédonie) et l'influence du mode de reproduction sur ceux-ci, avec les potentielles implications taxinomiques de cet isolement.

Le dernier chapitre dresse le bilan des connaissances acquises lors de cette thèse sur la diversité phylétique des Aglaopheniidae, notamment dans la région Sud-Ouest de l'océan Indien, avec ses potentielles implications taxinomiques.

Le plan de cette thèse commence par la diversité générale de la famille, continue sur la diversité cryptique des morpho-espèces et finit sur la diversité génétique des populations d'une morpho-espèce. En reprenant l'idée d'un agrandissement progressif sur l'arbre évolutif de cette famille, les chapitres s'enchaînent naturellement. Toutefois, ils ont été rédigés de manière à pouvoir être lus indépendamment. Les figures et tableaux suivent une numérotation unique à chaque chapitre. Les références bibliographiques se situent à la fin du texte principal. Les annexes sont à la suite du document principal.

Les chapitres 2 à 4 sont rédigés en anglais sous forme d'articles scientifiques. Le chapitre 2 est en révision pour publication dans Zoologica Scripta. Les chapitres 3 et 4 correspondent à des articles en préparation. Les annexes comportent également des articles scientifiques publiés, correspondant à des travaux ayant été réalisés au cours de cette thèse, ou antérieurement. L'annexe 1, portant sur le développement d'une banque microsatellite chez Lytocarpia brevirostris, a été acceptée pour publication dans Conservation Genetics Ressources. L'annexe 2, portant sur le développement d'une banque microsatellite chez Macrorhynchia phoenicea, est soumis pour publication dans Biochemical Systematics and Ecology. L'annexe 3, portant sur les mécanismes de diversification ayant favorisé l'apparition d'espèces endémiques chez les gastéropodes du genre Nerita dans le Sud-Ouest de l'océan Indien, a été publiée dans PloS One.

Ce travail de recherche a été mené au sein du laboratoire ECOMAR, devenu en 2015 membre de ENTROPIE, UMR IRD 450 - Université de La Réunion - UMR CNRS 9220.

Chapitre 1

Introduction

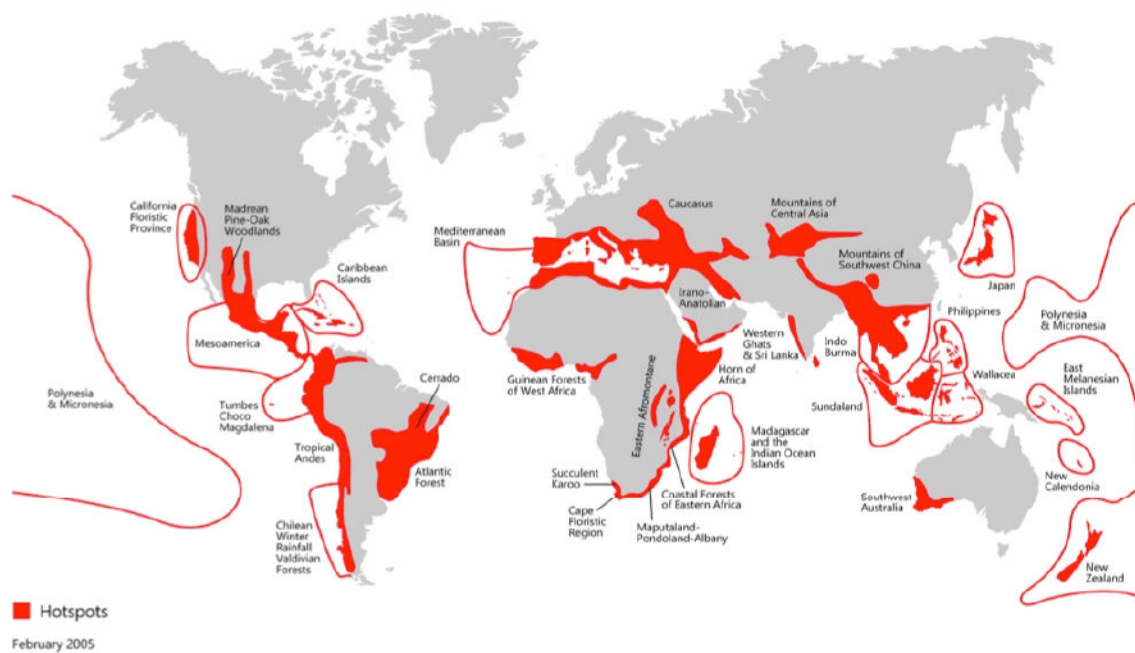


Figure 1. Répartition des points chauds de biodiversité terrestre. Extrait de (Myers et al. 2000).

1. Introduction

1.1. Biodiversité et Conservation

1.1.1. Répartition de la biodiversité

La biodiversité, c'est-à-dire la diversité des organismes, des écosystèmes, ainsi que la diversité génétique au sein des espèces, se mesure en considérant ses variations dans le temps et dans l'espace (U.S. Congress Office of Technology Assessment). C'est ainsi qu'il a été possible d'identifier des gradients latitudinaux et altitudinaux de biodiversité (Willig et al. 2003). Pouvoir estimer, mesurer et étudier la répartition de la biodiversité ainsi que sa richesse à différentes échelles géographiques et temporelles est une nécessité dans le contexte actuel de perte généralisée de biodiversité à travers le monde. En effet, sous l'effet des activités humaines accrues (Pimm et al. 1995; Myers et al. 2000), la Terre traverse sa sixième extinction massive (Barnosky et al. 2011). Sans connaissances approfondies sur l'évolution, la répartition des organismes et le fonctionnement des écosystèmes, il est difficile, voire impossible, d'établir des plans de conservation efficaces sur le long terme (Margules et Pressey 2000; Hughes et al. 2002; Briggs 2005).

1.1.2. Points chauds de biodiversité terrestre

C'est en observant la répartition de la biodiversité terrestre qu'a été révélée l'existence de régions présentant une importante accumulation d'espèces remarquables par rapport aux régions avoisinantes, ce que l'on nomme désormais des « points chauds de biodiversité » (Myers 1988; Reid 1998). On en dénombre actuellement 34, majoritairement concentrés dans la bande intertropicale (Myers et al. 2000) (Figure 1). Bien qu'il n'existe pas de définition précise faisant l'unanimité, ces régions sont décrites de manière générale comme possédant une exceptionnelle concentration d'espèces, notamment endémiques, menacées par la réduction de leur habitat à court terme (Myers et al. 2000). Le concept a été utile dans le développement d'outils de conservation et de sensibilisation (Wilson et al. 2006). Du fait de leur remarquable richesse spécifique, ces régions sont prioritaires en termes de conservation des espèces et des écosystèmes. Cependant, elles constituent également des énigmes en termes de mécanismes d'évolution : comment expliquer une telle concentration de biodiversité ? Comment ces régions se forment-elles et se maintiennent-elles dans le temps ? Les espèces qui les composent présentent-elles des origines anciennes ou récentes ?

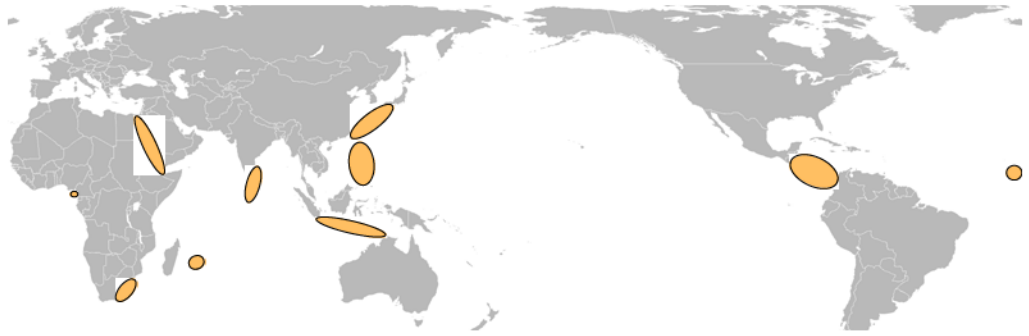


Figure 2. Répartition des 10 points chauds de biodiversité marine (Roberts et al. 2002).

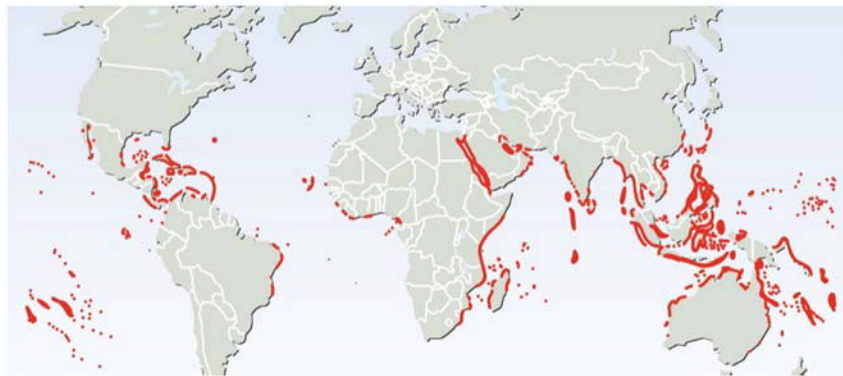


Figure 3. Répartition mondiale des récifs coralliens tropicaux (Andréfouët et al. 2006).

Tous les taxons présentent-ils une diversité plus forte dans ces régions ? De nombreuses études montrent l'origine multifactorielle de cette biodiversité remarquable, alliant des données géologiques, climatiques et phylogénétiques (Hughes et al. 2002; Barber et Bellwood 2005; Renema et al. 2008; Lohman et al. 2011; Condamine et al. 2012; Postaire et al. 2014).

1.1.3. Points chauds de biodiversité marine

En suivant un protocole similaire à Reid (1998), Roberts et al. (2002) ont mis en évidence l'existence de l'équivalent marin des points chauds de biodiversité terrestre. Au nombre de 10, ils se situent tous dans la bande intertropicale et hébergent des récifs coralliens (Figure 2). Bien que certaines régions correspondent à la définition générale des points chauds de biodiversité, l'existence de la plupart des écosystèmes coralliens est menacée à plus ou moins long terme. En effet, ces écosystèmes extrêmement riches, représentant 1/6^{ème} des côtes mondiales (Spalding et al. 2001) (Figure 3), sont menacés de disparition par les activités anthropiques directes comme la surexploitation de leurs ressources ou les apports terrigènes liés notamment à l'agriculture (Roberts et al. 2002; Hughes et al. 2003; Worm et al. 2006) et indirectement *via* les phénomènes liés à l'augmentation de concentration de CO₂ dans l'atmosphère (Hoegh-Guldberg 1999; Nyström et al. 2000; Goreau et al. 2000). En outre, une partie non négligeable de la population humaine mondiale dépend des services écosystémiques fournis par les récifs coralliens pour subvenir à leurs besoins primaires, mais également comme source de revenus *via* les activités touristiques et la pêche (Cinner et McClanahan 2006; Cinner et al. 2009). Il est donc extrêmement important de protéger et de comprendre les fonctions de ces écosystèmes car, sans plans de protection efficaces, près de 60% de récifs coralliens auront disparu d'ici 2050 (Wilkinson 2008).

1.1.4. Conservation des récifs coralliens tropicaux

Mieux comprendre le fonctionnement, l'histoire et les relations entre les espèces de ces écosystèmes sont des priorités en vue d'optimiser leur gestion et leur protection sur le long terme, car on ne peut protéger que ce que l'on connaît.

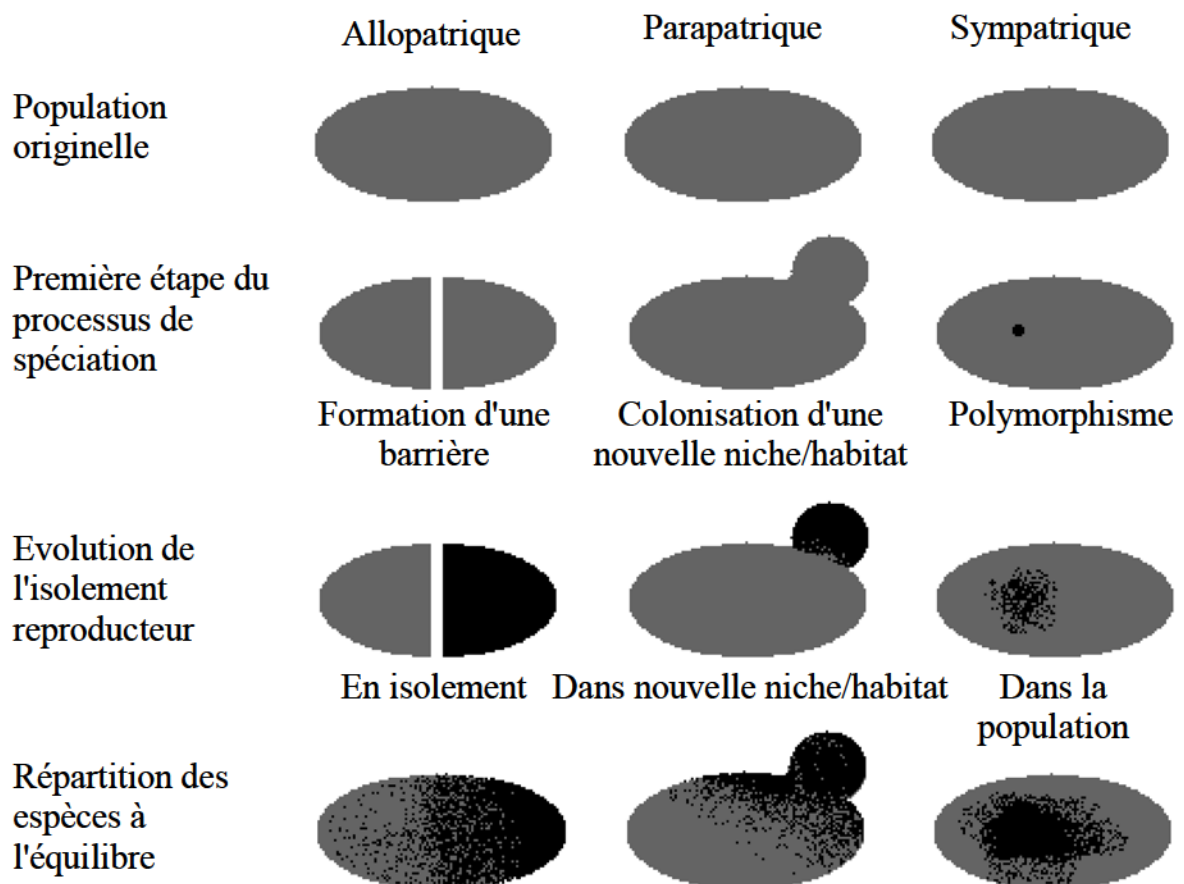


Figure 4. Représentation graphique des trois principaux modes de spéciation. Extrait et modifié de www.wikipedia.org

L'observation de la répartition des points chauds de biodiversité terrestre et marine révèle une caractéristique importante : 8 des 10 points chauds de biodiversité marine coïncident avec un point chaud de biodiversité terrestre (Roberts et al. 2002). L'intérêt de recherches et de plans de protection intégrant les deux milieux, qui sont intrinsèquement liés, n'est donc plus à démontrer. Il est alors nécessaire d'étudier une large gamme d'organismes (présentant par conséquent des écologies différentes), notamment en faisant le lien entre les milieux terrestre et marin, afin d'obtenir une image représentative des mécanismes évolutifs à l'œuvre dans ces régions. Il est important, dès à présent, d'étudier l'évolution de la biodiversité, car une partie des points chauds de biodiversité terrestre est également menacée de disparition par les effets du réchauffement climatique (Bellard et al. 2013; Courchamp et al. 2014). L'urgence de la situation s'explique par le fait qu'il est relativement facile de déterminer les causes de la disparition d'une espèce mais qu'il est beaucoup plus compliqué de comprendre sa formation et son maintien dans le temps et l'espace.

1.2. Concepts d'espèce et taxinomie

1.2.1. *Evolution et spéciation*

De manière générale, tout phénomène de spéciation est dû à la perte de la capacité de se reproduire de deux populations auparavant interfécondes, perte due à l'accumulation de mutations génomiques empêchant la reproduction ou la production d'une descendance féconde. Les forces évolutives favorisant la spéciation vont donc augmenter la divergence génétique interpopulationnelle et diminuer le polymorphisme intrapopulationnel (Gavrilets 2003). Ces mécanismes d'isolement peuvent être post-zygotiques (après fécondation des gamètes et formation d'un zygote) ou pré-zygotiques. Il est possible de classifier les modes de spéciation en différentes grandes catégories (Figure 4). Si l'isolement reproducteur entre populations est en grande partie dû à la présence de barrières biogéographiques (empêchant totalement les flux de gènes), on parle de spéciation allopatrique. Le maintien dans le temps de cette barrière, associé aux phénomènes de dérive génétique, mutations aléatoires et sélection, va conduire à l'isolement reproducteur des deux nouvelles populations et donc à la formation de deux nouvelles espèces. La spéciation allopatrique est un phénomène prenant beaucoup de temps, mais elle peut avoir lieu à de nombreuses échelles spatiales. Chez des espèces marines avec de larges aires de répartition, la spéciation allopatrique peut intervenir à l'échelle de bassins océaniques (Cowman et Bellwood 2012; Postaire et al. 2014).

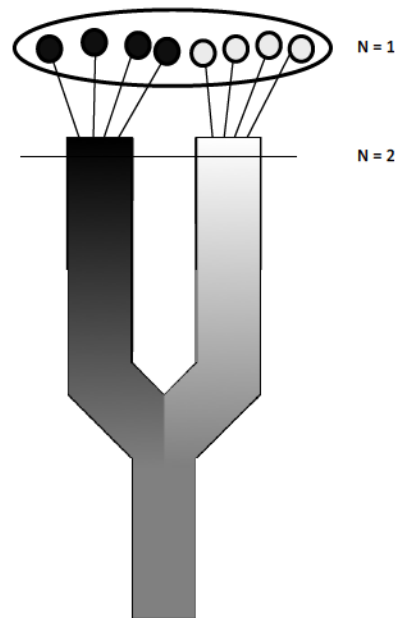


Figure 5. Schéma représentant l'impact du concept d'espèce sur la richesse spécifique. L'absence d'isolement reproducteur (représenté par un ovale) implique de reconnaître les huit individus comme appartenant à la même espèce (partie supérieure). L'analyse phylogénétique identifie deux groupes n'échangeant aucun gène et conclut donc à la présence de deux espèces indépendantes (partie inférieure).

Cependant, cette spéciation peut avoir lieu à des distances inférieures à la centaine de kilomètres (Palumbi 1992; Taylor et Hellberg 2005). L'une des caractéristiques de la spéciation allopatrique est qu'elle n'implique pas de perte drastique de diversité génétique, le processus étant lent et se déroulant sans événements de variations d'effectifs extrêmes (goulot d'étranglement, effet fondateur).

La spéciation sympatrique a lieu dans le cas d'une sélection asymétrique conduisant à l'adaptation à différentes niches écologiques de deux populations pouvant théoriquement se reproduire entre elles (spéciation avec flux de gènes). La spéciation parapatrique est un intermédiaire entre les deux modes précédents : le phénomène de spéciation résulte dans ce cas d'un gradient de fréquences alléliques ou génotypiques sur une zone géographique homogène, avec la présence de zones d'hybridation entre les deux espèces (Figure 4).

1.2.2. Importance du concept d'espèce

Toute étude portant sur la biodiversité de manière générale soulève la question épineuse de définir une espèce et de la délimiter (De Queiroz 2005). Il existe sept concepts « basiques » d'espèces : espèces agamétiques (asexuées) (Turesson 1929), biologiques (Mayr 1942), écologiques (Valen 1976), évolutives (Simpson 1951; Samadi et Barberousse 2006), phylogénétiques ou généalogiques (Donoghue 1985; Mier et Willmann 2000; Baum et Shaw 1995), génétiques (partage d'un même pool de gènes) (Mallet 1995), morphologiques (Michener 1970) et enfin cohésives (interchangeabilité des individus entre les populations (Templeton 1998) ; voir De Queiroz (2007)). A titre d'exemple, la définition de l'espèce biologique considère les espèces comme des groupes de populations naturelles interfécondes « reproductivement » isolées d'autres groupes de populations aux mêmes caractéristiques, alors que le concept d'espèces phylogénétiques définit les espèces comme des groupes monophylétiques d'individus. L'utilisation de l'une ou l'autre des deux définitions précédentes peut faire varier la richesse spécifique mesurée du simple au double tout en entraînant une diminution des effectifs et de l'aire de répartition des espèces (Figure 5) (Agapow et al. 2004). En outre, le concept d'espèce utilisé influe également sur le type de données collectées. En effet, dans le cas de définition et d'identification d'espèces morphologiques (morpho-espèces) des mesures phénétiques seront requises, alors que la définition d'espèces phylogénétiques nécessite l'obtention de matériel génétique, puisqu'elles seront identifiées sur les événements de coalescence entre allèles de différents

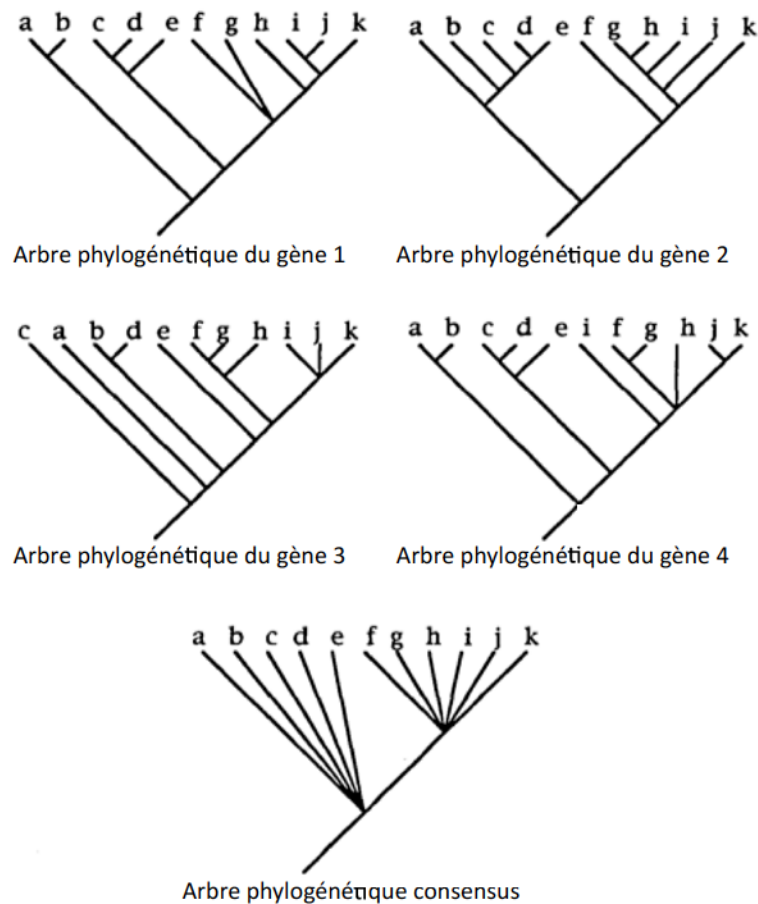


Figure 6. Exemple du concept d'espèce généalogique. 11 individus (a-k) sont échantillonnés dans deux régions (a-e; f-k). Pour chaque individu, quatre gènes indépendants sont séquencés et les arbres phylogénétiques associés construits. L'arbre consensus identifie la structure commune à toutes les phylogénies. Traduit de Baum & Shaw (1995).

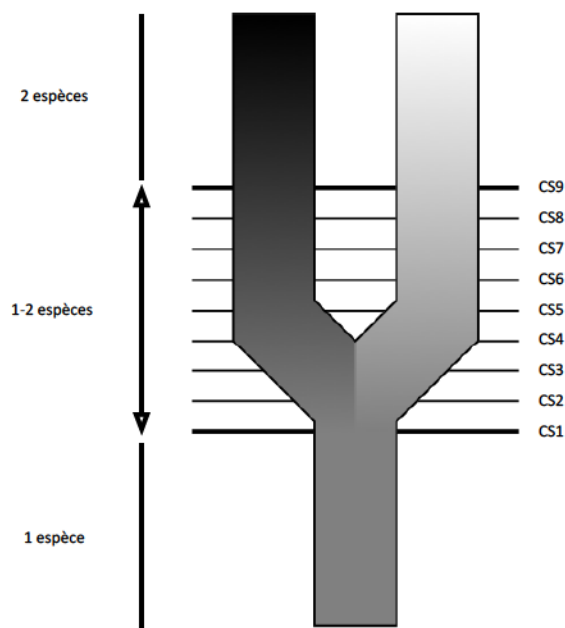


Figure 7. Séparation de lignées évolutives, spéciation et concepts d'espèces. Ce schéma représente la séparation d'une lignée (espèce) pour former deux lignées (espèces). Le dégradé de gris représente la divergence graduelle entre les lignées au cours du temps et les lignes horizontales représentent l'acquisition graduelle des caractéristiques propres à chaque concept d'espèce (CS), c'est-à-dire monophylie réciproque, isolement reproducteur, morphologie distincte, etc. Traduit de De Queiroz (2007).

marqueurs génétiques (Baum et Shaw 1995) (Figure 6).

La définition du concept d'espèce est essentielle car elle influe sur les conclusions d'une étude, et par conséquent sur les potentiels plans de conservation à développer (Agapow et al. 2004; De Queiroz 2005, 2007). Cependant, ces définitions ne sont pas toutes des concepts d'espèces en tant que tels, mais des méthodes de délimitations des espèces. La plupart des chercheurs en biologie évolutive s'accordent sur le fait que les espèces représentent des métapopulations indépendantes, ou lignées évolutives qui se maintiennent dans le temps (Simpson 1951; Samadi et Barberousse 2006; De Queiroz 2007). Le problème ne réside donc pas dans la définition des espèces en tant que telles mais dans la méthode à employer pour les identifier et les délimiter de manière efficace.

De nos jours, les recherches portant sur la délimitation d'espèces se concentrent sur l'identification de lignées évolutives indépendantes (Moritz 1994; De Queiroz 2005) laissant de côté la question de la définition de ce qu'est une espèce au sens large (Mayden 2002; Samadi et Barberousse 2006). Toutefois, ces lignées peuvent aussi être un premier pas dans la définition et l'identification d'espèces à proprement parler : elles s'intègrent au sein de la reformulation du concept d'espèce et du processus de spéciation proposée par (De Queiroz 2007). Selon l'approche proposée par ce chercheur, la seule caractéristique indispensable à l'identification d'espèces est leur indépendance évolutive. Chaque méthode d'identification est ainsi valide et indique l'état d'avancement de la divergence entre deux lignées évolutives (De Queiroz 2007). Tout en proposant une seule définition d'espèce, la définition de De Queiroz (2007) n'invalide pas les anciennes délimitations d'espèces : elle considère simplement que le caractère utilisé (isolement reproducteur, monophylie, niche écologique, etc.) ne définit pas l'espèce, mais fait partie du processus de spéciation (Figure 7).

1.2.3. Choix du concept d'espèce

De nombreuses méthodes de délimitation d'espèces ont été proposées, souvent en lien avec la thématique de recherche (De Queiroz 2007). La plupart des méthodes existantes ne sont d'ailleurs applicables qu'à des taxons relativement bien connus en termes d'écologie, d'histoire évolutive ou de biologie, mais de nombreux taxons ne remplissent pas ces conditions. Dans ces cas-là, la méthode la plus pratique, au-delà de la définition sur des bases morphologiques, est celle se basant sur des données de distances génétiques entre individus (Baum et Shaw 1995) et par extension d'espèce phylogénétique (De Queiroz 1992).

Se basant sur la recherche d'un consensus entre les phylogénies produites par des marqueurs génétiques indépendants, cette approche de délimitation s'inscrit directement dans la systématique phylogénétique, dont la taxinomie fait partie, et dont le but est de classer le vivant en fonction des liens de parenté entre les organismes. Cependant, baser la délimitation d'espèces sur des distances génétiques pose le problème de pouvoir identifier la limite entre deux espèces; car la différence est quantifiée en termes de distances génétiques : cette méthode ne peut être utilisée qu'en complément d'une autre (Baum et Shaw 1995).

1.2.4. Taxinomie

1.2.4.1. Rôle historique et critiques

Avant d'étudier la répartition et l'évolution d'un écosystème et des organismes, il est nécessaire de reconnaître les organismes qui le composent. Il faut donc être capable de les identifier et de les nommer. Reposant sur la compétence et l'expérience des taxinomistes, ce travail d'identification et de description des espèces est tombé en désuétude, souvent considéré comme une simple expertise technique (Sluys 2013). Il est pourtant à la base de tout travail de recherche concernant la biodiversité au sens large, aussi bien pour la conservation des espèces que pour les services qu'elle apporte à l'Homme (Wilson 2004). En outre, cette recherche nous éclaire sur l'évolution des organismes et de leur systématique phylogénétique. Historiquement, le travail du taxinomiste repose sur l'observation des phénotypes des organismes ainsi que sur des mesures morphométriques. Le but est de classer les organismes en fonction de leur degré d'apparentement en isolant des caractères de détermination (synapomorphies) et la gamme de variation de ces caractères. L'objectif final de la taxinomie est donc d'établir des clés de détermination permettant d'identifier tout nouvel échantillon, ainsi que ses plus proches parents évolutifs.

Se baser sur la morphologie pour décrire des espèces peut sembler efficace et présente l'intérêt d'être potentiellement rapide. Toutefois, l'essor des méthodes d'analyses moléculaires a montré le pouvoir résolutif relativement limité de la morphologie dans la description de la diversité du vivant (Holland et al. 2004; Kadarusman et al. 2012; Zhang et Li 2014).

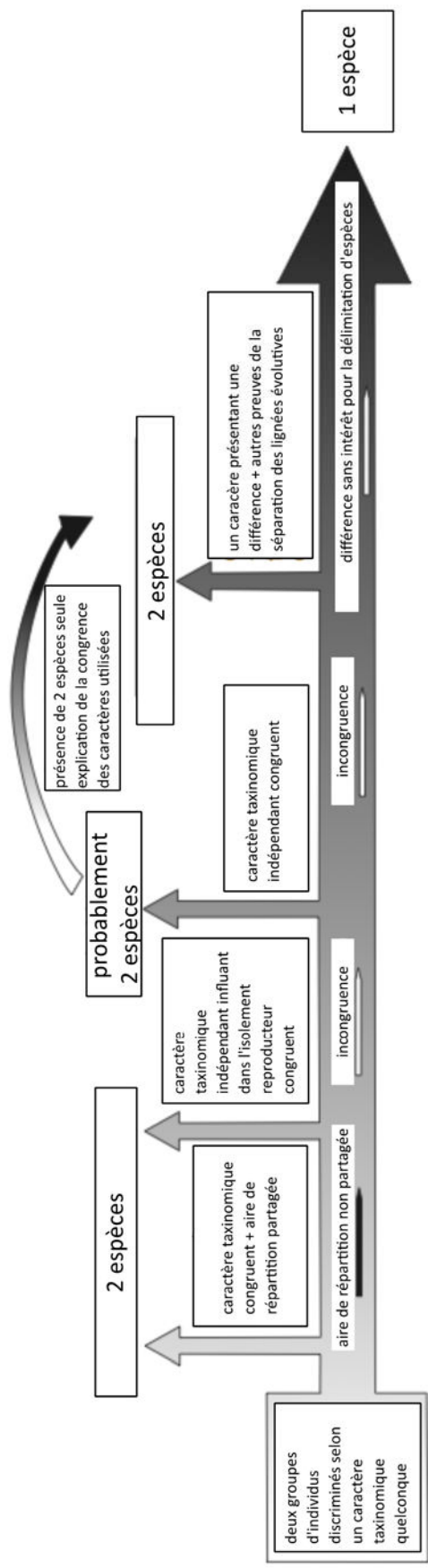


Figure 7. Reproduction schématique du protocole de taxinomie intégrative. Proposé par et traduit de Padial et al. (2010).

En effet, au sein de taxons présentant une morphologie relativement simple et/ou présentant un très fort polymorphisme, il est compliqué d'isoler des caractères morphologiques permettant d'identifier de manière certaine les morpho-espèces (Hoeksema et Crowther 2011). D'une part, les caractères morphologiques ne sont pas de type discret, mais présentent en général une gamme de variations (Condamine et al. 2012; Kitano et al. 2014). Il est donc nécessaire de rassembler un grand nombre d'échantillons pour obtenir une bonne représentation de ce continuum. D'autre part, les caractères morphologiques ne sont pas toujours fixes, pouvant varier au cours de la vie d'un individu mais également en fonction des conditions environnementales (Hoeksema et Crowther 2011; Kongjandtre et al. 2012; Marti-Puig et al. 2014). Par ailleurs, un phénomène de spéciation n'implique pas systématiquement un changement morphologique (Dawson et Jacobs 2001; Lindner et al. 2011; Hubert et al. 2012). Il est en effet possible que des taxons perdent, puis retrouvent, un caractère au cours de leur évolution, ou bien acquièrent un même caractère morphologique de manière indépendante (Leclère et al. 2009). Enfin, l'observation de caractères morphologiques est partiellement et involontairement subjective, et ne garantit donc pas toujours l'obtention de résultats reproductibles entre observateurs. Cependant, ce travail d'identification reste essentiel et requiert une expertise qui ne peut s'obtenir qu'après des années d'expérience et de pratique (Sluys 2013), limitant, de ce fait, le nombre de spécialistes par taxon.

1.2.4.2. Taxinomie intégrative

C'est en partant du constat que chaque définition d'espèce présente ses intérêts, ses conditions d'application et ses limites, que l'idée de taxinomie intégrative a été proposée. Il s'agit de définir les espèces en comparant et compilant toutes les informations disponibles sur les organismes d'intérêt (Wiens 2007; Padial et al. 2010; Schlick-Steiner et al. 2010). Cette approche a pour but d'accélérer et de faciliter le travail des systématiciens et taxinomistes (Wiens 2007), tout en permettant d'étudier plus finement les mécanismes de diversification. Dans le cas où les connaissances sur un taxon sexué sont limitées, cette approche consiste donc à identifier des pseudo-espèces phylogénétiques (ou lignées évolutives) et des morpho-espèces (clusters phénétiques) (Sites et Marshall 2004; Hausdorf et Hennig 2010; Hausdorf 2011), puis de comparer les résultats issus des deux méthodes de délimitation tout en les intégrant dans la démarche de description des espèces (Dayrat 2005; Padial et al. 2010) (Figure 7).

Dans le cadre du concept d'espèce proposé par De Queiroz (2007), seules les hypothèses d'espèces retrouvées selon plusieurs méthodes peuvent être considérées comme des espèces probables, orientant ainsi le travail des taxinomistes. La construction d'arbres phylogénétiques permet d'obtenir une représentation de la diversité d'un taxon et d'harmoniser des taxinomies parfois complexes, mais ne permet pas forcément d'identifier les espèces qui le composent. Cette approche dite de taxinomie intégrative nécessite l'aide des taxinomistes « traditionnels » et d'écologues pour identifier, s'il y en a, des caractères différenciant les lignées évolutives mises en évidence (Schlick-Steiner et al. 2007; Rissler et Apodaca 2007). Il est ainsi possible d'identifier des cas de synonymie, poly- et paraphylie des espèces et/ou d'autres niveaux taxinomiques ayant été définis uniquement sur des bases morphologiques (Funk et Omland 2003; Barco et al. 2010; Kergoat et al. 2014).

1.3. Barcoding et taxinomie

1.3.1. Concept et fonction

Face à l'érosion rapide de la biodiversité et à l'urgence de la protéger, il a été proposé d'accélérer le travail des taxinomistes en fondant l'identification des espèces sur des séquences de marqueurs génétiques prédéfinis, ou barcoding (Meyer et Paulay 2005). Le principe de base est d'associer une séquence d'ADN, un code barre, à des échantillons dont l'identification est connue et arrêtée (Stoeckle et Hebert 2008). Le barcoding repose sur le fait qu'il existe en général un fossé, un « barcoding gap », entre la différence moyenne intra-spécifique et la différence moyenne interspécifique de la séquence d'ADN utilisée (Meyer et Paulay 2005). Chez les animaux, la sélection s'est portée sur un fragment de 650 paires de bases du gène mitochondrial codant pour la cytochrome oxydase 1, ou COI (Hebert et al. 2003). Cependant, d'autres marqueurs ont également été utilisés dans les cas où le COI présentait des problèmes d'amplification, ou bien quand ce marqueur ne parvenait pas à discriminer des espèces du fait d'un taux de mutation trop faible, ou encore quand le polymorphisme intra-spécifique était trop important (Huang et al. 2008). Le barcoding a pour but de compléter les connaissances sur la taxinomie existante (Hajibabaei et al. 2007) et d'être un outil d'identification : le séquençage et la comparaison aux séquences de référence du marqueur doivent permettre d'assigner un nom à un échantillon sans nécessiter l'expertise d'un taxinomiste (Stoeckle et Hebert 2008) et s'intègrent donc naturellement dans la systématique.

Les études de barcoding ont notamment permis la mise en place de bases de données internationales (ex : Barcode Of Life) et ont ouvert la voie au développement de méthodes de délimitation d'espèces ou du moins d'hypothèses d'espèces.

1.3.2. Limites et critiques

Le barcoding n'a pas pour objectif de créer une taxinomie basée uniquement sur l'ADN car il n'est pas adapté à cette tâche (Ebach et Holdrege 2005; Vogler et Monaghan 2006). Cet outil nécessite l'utilisation de marqueurs partagés par le plus grand nombre d'organismes afin de pouvoir analyser nombre d'échantillons en parallèle (Puillandre et al. 2012a). Trouver un marqueur ubiquiste utilisable peut s'avérer difficile, et ce à tous les niveaux taxinomiques. En effet, il arrive que la variation intra-spécifique d'une séquence soit supérieure à la différence interspécifique (Avice 2000), notamment dans le cas d'un isolement reproducteur rapide entre deux lignées (Coyne et Orr 1998), mais les variations inter- et intra-spécifique peuvent également changer de magnitude selon les taxons (Hebert et Gregory 2005). Par conséquent, la base de données combinant les séquences « barcode » et la liste d'échantillons types doit être proche de l'idéal : tout échantillon voucher doit être associé à une séquence unique. Les études et les projets de barcoding aident donc à l'évaluation de la biodiversité d'une région ainsi qu'à l'identification des organismes. Cependant, ils ne permettent pas directement de délimiter les espèces, ni d'étudier en profondeur leurs relations phylogénétiques.

1.4. Phylogénie et études de biodiversité

Bien que la délimitation des espèces, quel que soit le concept utilisé, soit une question prépondérante dans toute politique de conservation, comprendre les mécanismes permettant l'évolution et la diversification d'un taxon supérieur (genre, famille, etc.), ou macroévolution, est un questionnement également passionnant. En effet, en étudiant différents groupes taxinomiques, il est possible de répondre à des questions très variées : quel est le mode de spéciation majoritaire ayant permis le développement de la biodiversité d'une région ? Une région particulière est-elle source de biodiversité ? Les espèces étudiées présentent-elles une origine récente ? Dispose-t-on d'une bonne représentation de la diversité d'un taxon ?

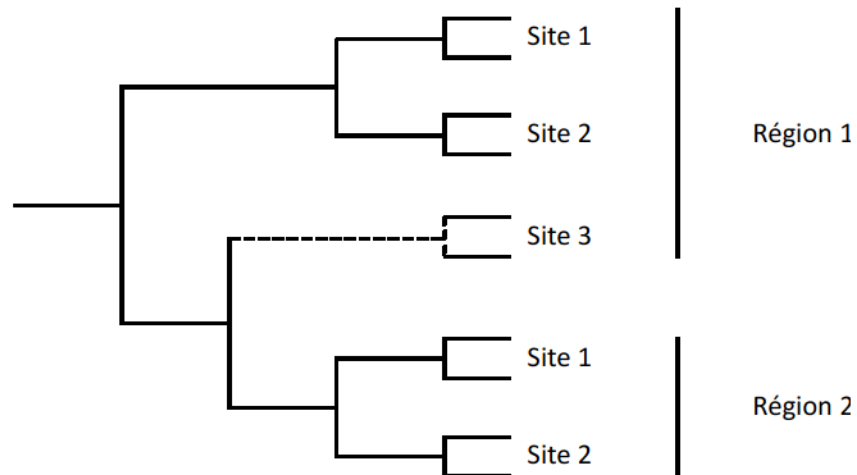


Figure 9. Représentation de l'impact de la couverture géographique. Cet arbre phylogénétique simplifié représente les relations phylogénétiques au sein d'une espèce présente dans deux régions. L'échantillonnage dans la région 1 a omis le site 3 (en pointillé). Sans un échantillonnage complet, les deux régions présentent chacune une lignée évolutive indépendante alors qu'une troisième lignée évolutive, proche de celle présente dans la région 2, est présente dans la région 1.

De même, il est également possible d'étudier l'influence des traits d'histoire de vie sur la diversification des espèces (Paulay 2006). Les espèces marines disposant d'une phase de dispersion plus longue se diversifient-elles moins vite ? Le cycle de vie des organismes a-t-il un impact direct sur la connectivité, présente ou passée, entre les populations (Ragionieri et al. 2010) ? Pour répondre à tout ou partie de ces questions, il est indispensable de construire des arbres phylogénétiques représentatifs de l'évolution des taxons étudiés. Trois facteurs sont importants : la couverture géographique (Cowman et Bellwood 2012; Jörger et al. 2012; Schuchert 2014), l'exhaustivité taxinomique (Zwickl et Hillis 2002; Hodge et al. 2012; Reid et al. 2012) et l'utilisation de marqueurs moléculaires représentatifs de l'évolution des organismes (Kitano et al. 2014; Zhang et Li 2014). Il est alors possible d'étudier l'histoire évolutive des différents taxons, mais également comparer leur taxinomie avec les données moléculaires (Njabo et al. 2008; Dornburg et al. 2012).

1.4.1. Paramètres préliminaires importants

La couverture de l'aire de répartition d'un taxon est un paramètre majeur dans toute étude de taxinomie et d'évaluation de richesse de la biodiversité : elle permet l'évaluation globale de la variabilité d'un caractère chez le taxon d'intérêt. En effet, dans le cas d'une reconstruction phylogénétique, on considère la variation d'un ou plusieurs marqueurs génétiques au sein d'un taxon. Un échantillonnage couvrant la plus grande partie de l'aire biogéographique des espèces étudiées permet alors de retrouver la majorité des événements de coalescence et de définir la variabilité intraspécifique de ce ou ces marqueurs (Bergsten et al. 2012). Cependant, si la couverture géographique de l'échantillonnage est parcellaire, l'arbre phylogénétique obtenu risque d'occulter la présence de lignées indépendantes au sein d'une région donnée, augmentant artificiellement la divergence observée entre les lignées échantillonnées (Figure 9). L'identification de lignées évolutives indépendantes intraspécifiques propres à chaque région peut donc être due à un « trou » dans l'échantillonnage : ainsi il est nécessaire de disposer d'une bonne estimation de l'aire de répartition des taxons étudiés. C'est notamment grâce à un échantillonnage géographiquement étendu que les études de phylogéographie permettent la mise en évidence de potentielles espèces cryptiques au sein d'espèces à répartition supposée circumtropicale ou mondiale (Cowman et Bellwood 2012; Jörger et al. 2012; Schuchert 2014).

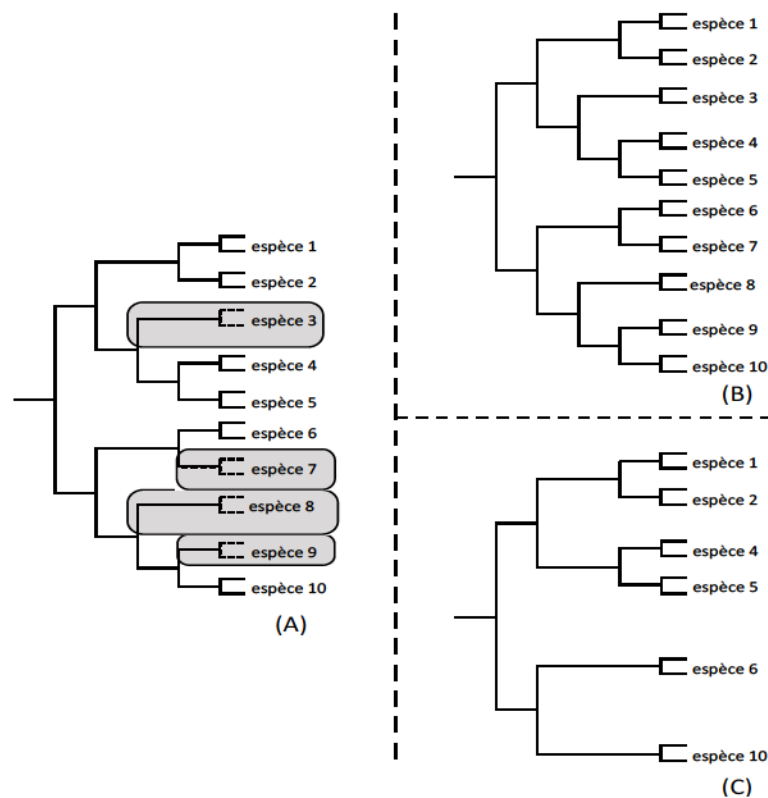


Figure 10. Impact de l'exhaustivité taxinomique sur les reconstructions phylogénétiques. Sur l'arbre phylogénétique théorique (A) sont représentées les relations entre 10 espèces, les cadres gris représentant des espèces inconnues ou bien difficiles à échantillonner. Avec un effort d'échantillonnage suffisant, la structure de l'arbre phylogénétique reconstitué correspond aux relations phylogénétiques réelles (A) entre les espèces (B). Dans le cas contraire (C), des événements de diversification ne sont pas retrouvés, faussant les conclusions sur l'évolution de ce groupe taxinomique.

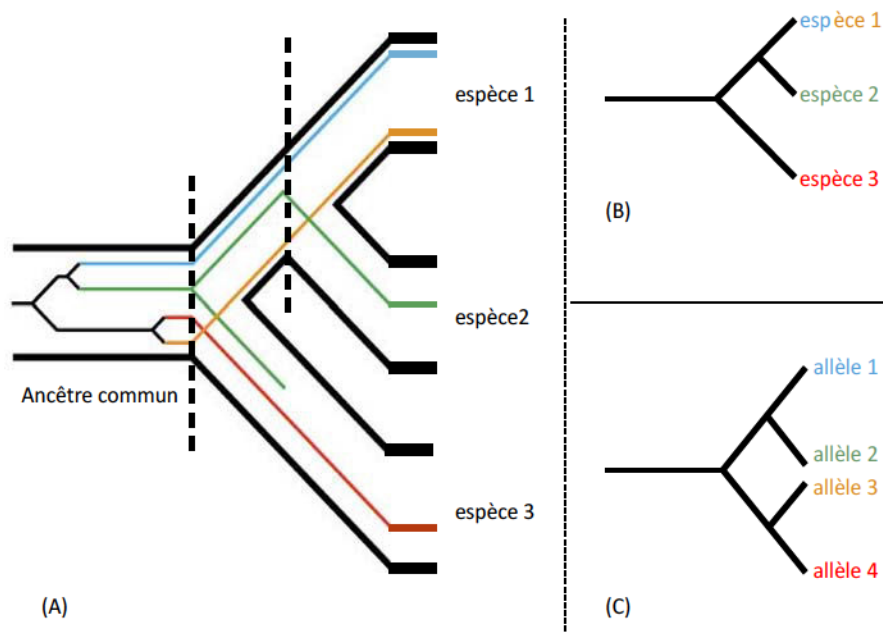


Figure 11. Spéciation et « incomplete lineage sorting ». A chaque événement de spéciation (pointillés verticaux), les allèles d'un marqueur (traits de couleurs) sont dispersés aléatoirement entre les espèces formées (A). La phylogénie représentant les relations interspécifiques (B) ne représente les relations phylogénétiques entre les allèles du marqueur utilisé (C) : l'allèle 3 (jaune) est très proche de l'allèle 4 (rouge) mais les allèles 3 et 4 se retrouvent chacun chez une des deux espèces les plus éloignées (1 et 3).

L'exhaustivité taxinomique permet d'établir une phylogénie représentative de l'évolution et de la diversité d'un taxon, tout en autorisant l'analyse des patrons de spéciation du groupe d'intérêt dans son ensemble (Heath et al. 2008). Cet aspect des reconstructions phylogénétiques nécessite donc une taxinomie relativement bien établie et un effort d'échantillonnage important. En effet, il est nécessaire d'obtenir des échantillons d'une majorité d'espèces ou lignées évolutives, y compris rares, et il peut être difficile de garantir la réussite des réactions de PCR dans le cas d'études à grande échelle taxinomique. Dans le cas où l'échantillonnage taxinomique n'est pas complet, les conclusions d'une étude sont toujours soumises à caution, car ce sont souvent les événements de spéciation récents ou les espèces rares qui ne sont pas référencés (Nee et al. 1994; Berlocher 1998) (Figure 10).

Il est également important d'étudier plusieurs marqueurs génétiques disposant d'histoires évolutives différentes. En effet, la vitesse d'évolution d'un marqueur peut varier en fonction des taxons et de la zone géographique (Timm et al. 2008; Lohse 2009) et l'arbre phylogénétique qu'il produit n'est pas toujours la représentation des liens de parenté entre les organismes, il représente la généalogie du marqueur utilisé. Ce phénomène appelé « incomplete lineage sorting » est dû à un échantillonnage aléatoire du polymorphisme ancestral d'un marqueur au cours de la spéciation : la généalogie d'un gène peut sembler contradictoire ou peu instructive vis-à-vis des relations interspécifiques étudiées (Figure 11). Il est donc plus approprié de décrire les relations phylogénétiques en se basant sur plusieurs marqueurs, car il arrive que les arbres produits à partir de plusieurs marqueurs indépendants ne soient pas concordants (Maddison et Knowles 2006) et de se concentrer sur les relations phylogénétiques mises en évidence par l'arbre consensus.

En outre, dans le cas de marqueurs mitochondriaux, l'histoire évolutive reconstituée est la plupart du temps limitée à une seule lignée parentale, souvent maternelle (Hurst et Jiggins 2005). C'est la différence qui existe entre l'arbre phylogénétique d'un gène et un arbre phylogénétique d'espèces : la compilation des histoires de plusieurs loci au sein d'un même arbre phylogénétique révèle une partie du processus de spéciation en effaçant une partie de la variation issue de l'histoire de chacun des gènes (Baum et Shaw 1995; Maddison et Knowles 2006).

1.4.2. Méthodes de reconstruction phylogénétique

Pour reconstruire les relations de parentés entre les organismes en utilisant l'information génétique, la présence de mutations (mutations ponctuelles, insertions, délétions) sur la séquence étudiée est la plus souvent utilisée. La plupart des méthodes de reconstruction phylogénétique posent comme hypothèse de départ que les séquences étudiées sont homologues, c'est-à-dire qu'elles partagent un ancêtre commun. Elles partagent donc un certain pourcentage de similarité qui peut être mesuré simplement en comparant les séquences nucléotidiques. Pour construire un arbre phylogénétique, plusieurs séquences sont alignées en même temps, en cherchant à limiter les différences entre séquences en alignant les sites homologues. Réalisé de manière automatique, la plupart des algorithmes d'alignement comparent la similarité entre toutes les séquences analysées (Thompson et al. 1994; Katoh et al. 2005), alignent les deux séquences les plus proches, puis ajoutent les autres séquences à ce premier alignement de manière itérative et par ordre décroissant de similarité.

Une fois l'alignement terminé, il est nécessaire de déterminer le modèle d'évolution permettant d'expliquer le mieux la divergence observée entre les séquences étudiées. Les modèles d'évolution sont des groupes d'*a priori* concernant le processus de substitution des nucléotides (ou acides aminés, le cas échéant). Ils décrivent les différentes probabilités de changement d'un nucléotide vers un autre au sein d'un arbre phylogénétique (Liò et Goldman 1998). La sélection du modèle d'évolution a une grande influence sur la précision des arbres phylogénétiques produits (Posada et Buckley 2004; Sullivan et Joyce 2005). Dans le cas de l'utilisation d'un modèle inadapté, les longueurs de branches, le ratio de transversions/transitions et la divergence peuvent être sous-estimés alors que les taux de changement entre nucléotides peuvent être surestimés. De manière générale, la sélection d'un modèle d'évolution incorrect entraîne la construction d'arbres phylogénétiques incorrects ou contradictoires.

Les méthodes de reconstruction phylogénétique sont classées en deux catégories : les méthodes de clustering (UPGMA ou Neighbor-Joining) ou les méthodes d'optimisation de l'arbre (maximum de parcimonie, maximum de vraisemblance, inférence Bayésienne). Les méthodes de clustering ont l'intérêt d'être relativement peu gourmandes en termes de ressources de calcul car elles ajoutent progressivement les taxons étudiés à un arbre unique. Par exemple, la méthode de reconstruction en Neighbor-Joining (Saitou et Nei 1987) minimise la longueur totale de l'arbre en regroupant séquentiellement les taxons dont la

distance qui les sépare est la plus courte.

Les méthodes d'optimisation, très gourmandes en ressources de calcul, cherchent toutes les topologies d'arbres optimisant le critère choisi (parcimonie ou vraisemblance). Cela permet de comparer la robustesse de différents arbres selon une approche statistique. Cependant, comme le nombre d'arbres possibles augmente drastiquement en fonction du nombre de taxons étudiés, seule une partie des topologies possibles est observée. L'optimisation se fait selon une approche heuristique (changements aléatoires des branchements de l'arbre) et aucun algorithme ne garantit la découverte du « meilleur arbre » selon le critère considéré.

La reconstruction selon la méthode de maximum de parcimonie cherche à construire un arbre minimisant le nombre de changements (substitutions) et assume que tout caractère commun (nucléotide) est toujours issu d'un ancêtre commun. Ayant tendance à minimiser la divergence entre taxons peu apparentés et étant très sensible au phénomène « d'attraction des longues branches », cette méthode a été longuement critiquée (Junhyong 1996; Kolaczkowski et Thornton 2004) et n'est plus très utilisée.

La reconstruction selon le maximum de vraisemblance va chercher à trouver l'arbre présentant la plus forte probabilité d'expliquer les données observées et le modèle d'évolution utilisé (Edwards et Cavalli-Sforza 1964; Huelsenbeck et Crandall 1997). L'arbre est ici aussi optimisé selon des méthodes heuristiques qui peuvent être extrêmement coûteuses en ressources de calcul et en temps, car la vraisemblance totale de chaque arbre testé doit être calculée. L'arbre possédant la vraisemblance la plus élevée, selon les données observées, est considéré comme le « vrai arbre ».

La méthode de reconstruction par inférence bayésienne est également basée sur l'idée d'optimisation de paramètres mais est très différente des deux précédentes (Mau et al. 1999). Cette méthode va chercher à identifier un groupe d'arbres probables expliquant les données observées. On obtient ainsi un intervalle de confiance pour toutes les relations phylogénétiques observées. Les méthodes d'inférence bayésienne vont nécessiter la spécification de priors au calcul (modèle d'évolution, longueur totale de l'arbre, groupes monophylétiques, etc.) ainsi que la distribution *a priori* de ces valeurs. Seront ensuite déterminées la probabilité d'observation et la distribution de probabilité des données (probabilité postérieure) sachant la distribution *a priori*. La probabilité postérieure de chacun des paramètres spécifiés est obtenue par l'exploration de l'espace des possibles de l'arbre selon la méthode d'échantillonnage de Chaîne de Markov Monte-Carlo (Hastings 1970).

Cette approche semi-aléatoire itérative est décomposée en deux étapes : des valeurs aléatoires de tous les paramètres spécifiés sont utilisées pour construire un arbre puis la vraisemblance de cet arbre est calculée. Si la vraisemblance de cet arbre est plus importante que celle de l'arbre de départ, ce nouvel arbre est accepté et sert de nouveau point de départ au calcul. Si sa vraisemblance est inférieure, il est rejeté et le calcul recommence à partir de l'arbre précédent. La fréquence avec laquelle un arbre (et son set de paramètres) est échantillonné est alors proportionnelle à sa probabilité postérieure.

Les méthodes de reconstruction phylogénétique ont toutes leurs *a priori*, ce qui explique les possibles divergences de topologies observées selon les méthodes utilisées. Il est possible de déterminer la robustesse des topologies, notamment à l'aide de méthodes de ré-échantillonnage de type bootstrap (Felsenstein 1985), mais ces méthodes n'explorent qu'une partie de l'espace des possibles des arbres, toujours dans les limites des *a priori* des méthodes.

1.5. Délimitation d'espèces et données génétiques

Au cours de la dernière décennie, *via* la chute des prix de séquençage et les potentiels défauts des analyses morphologiques, de nouvelles méthodes ont été développées pour tenter de délimiter les espèces en se fondant sur des données de distances génétiques (Wiens et Penkrot 2002; Wiens 2007). L'utilisation de plus en plus répandue de ces méthodes est également due au fait que l'ADN est relativement facile à obtenir et ne nécessitent pas une connaissance approfondie du taxon d'intérêt (Puillandre et al. 2009; Monaghan et al. 2009; Dornburg et al. 2012). Cette approche de la taxinomie a été largement critiquée du fait de la variation des taux de mutation et de spéciation en fonction des taxons et des régions géographiques (Shearer et al. 2002; Pinceel et al. 2005; Hickerson et al. 2006; Lohse 2009). En outre, la collecte d'information génétique est certes de plus en plus aisée, mais il peut être ardu de collecter un nombre d'individus suffisant pour pouvoir reconstruire avec précision des processus intra-populationnel et intra-spécifique, notamment lorsque que l'on travaille sur de grandes aires géographiques et échelles taxinomiques. Tout en permettant de parer à certaines critiques, séquencer plusieurs marqueurs par individu reste également un frein technique lorsque l'on ne travaille pas sur des organismes modèles. Il existe ainsi un équilibre entre le nombre d'espèces étudiées, le nombre d'individus échantillonnés et le nombre de marqueurs séquencés.

Toutes ces méthodes de délimitation ont la particularité d'être à la jonction entre la génétique des populations et les analyses phylogénétiques, empruntant par conséquent des analyses aux deux et restent encore au stade expérimental (Carstens et al. 2013). Elles s'avèrent particulièrement utiles pour des taxons relativement peu étudiés, dont la taxinomie est peu claire et où la collecte de données moléculaires est la première étape vers une estimation de la richesse spécifique (Esselstyn et al. 2012). Les hypothèses d'espèces ainsi élaborées n'ont pas un statut définitif, mais elles permettent d'orienter et d'accélérer le travail des taxinomistes (Carstens et al. 2013) et ont déjà montré leur utilité (Avisé 2009; Janzen et al. 2009; Barraclough et al. 2009).

1.5.1. Des méthodes en développement

Il existe un large éventail de méthodes, chacune avec leurs conditions d'application spécifiques et leurs limites (Carstens et al. 2013). Leur développement a été initié grâce à, d'une part, l'intégration dans les modèles de coalescence de processus de migration, de dérive génétique, d'expansion et d'isolement des populations et leur applications à des données phylogéographiques et, d'autre part, par le développement de méthodes de reconstruction phylogénétique permettant l'intégration de l'action de certains de ces processus et leur utilisation à des niveaux taxinomique très bas (inter et intra-spécifiques). Les méthodes dites de clustering (Hausdorf et Hennig 2010; Huelsenbeck et al. 2011), reposant sur des données variées (séquence, AFLP, microsatellites) et n'intégrant aucun *a priori* sur le nombre d'espèces étudiées, partitionnent le jeu de données en clusters présentant les caractéristiques de métapopulations indépendantes, mais ne reconstruisant pas directement les relations phylogénétiques entre elles. D'autres méthodes, utilisant un ou plusieurs arbres phylogénétiques, cherchent à modéliser et identifier les traces de processus propres à la génétique des populations au sein des arbres analysés (Pons et al. 2006; O'Meara 2009). Il existe également des méthodes dites de validation d'espèces qui testent si un regroupement *a priori* des individus, par exemple basés sur des données morphologiques, est compatible avec les données phylogénétiques (Yang et Rannala 2010; Carstens et Dewey 2010). Bien que ces méthodes ne fassent pas l'unanimité et restent encore en développement (Lim et al. 2011; Fujita et al. 2012; Carstens et al. 2013), elles ont déjà été appliquées à de grandes échelles taxinomiques.

Au sein de taxons dont les caractères morphologiques sont notamment connus pour être plastiques, elles ont permis de clarifier une partie de la taxinomie existante, révélant une diversité insoupçonnée et accélérant le travail des taxinomistes (Puillandre et al. 2009; Astrin et al. 2012; Puillandre et al. 2012b; Castelin et al. 2012).

1.5.2. GMYC et données de barcoding

Une partie des méthodes de délimitation d'espèces sont fondées sur le modèle GMYC (general mixed Yule-coalescent model) (Pons et al. 2006). Ce modèle pose comme postulat de départ que les événements de spéciation ont une fréquence très inférieure aux événements de coalescence au sein d'une population naturelle à l'équilibre. Ces événements de spéciation sont modélisés selon le modèle de Yule (Yule 1924), qui suppose un taux de spéciation constant et une absence d'événements d'extinction. La variation de fréquence entre événements de spéciation et de coalescence entre allèles proches permet donc en théorie l'identification d'un point à partir duquel les branchements au sein d'un arbre phylogénétique ne représentent plus des événements de diversification, mais des processus de génétique des populations.

Appliquer ce modèle à un arbre phylogénétique a donc pour but d'identifier la présence d'une telle limite et de localiser le point de transition entre cladogénèse pure (spéciation) et événements de coalescence entre allèles proches. Le calcul de la position de ce seuil est optimisé selon la méthode de maximum de vraisemblance et ne peut s'appliquer qu'à un arbre phylogénétique ultramétrique (arbre dont tous les chemins entre la racine et les feuilles de l'arbre sont de même longueur). L'un des principaux intérêts de cette méthode est qu'elle s'applique à une phylogénie produite à l'aide d'un seul marqueur moléculaire, permettant d'utiliser notamment des données issues d'études de barcoding (Pons et al. 2006; Puillandre et al. 2012c; Fujisawa et Barraclough 2013). En outre, elle est peu sensible à la présence d'un échantillonnage présentant de nombreux singletons (c'est-à-dire, un seul haplotype par « espèce » étudiée) (Monaghan et al. 2009; Bergsten et al. 2012; Talavera et al. 2013).

1.5.3. Limites des méthodes de délimitation

L'une des principales critiques des méthodes reposant sur le GMYC est la tendance à surestimer le nombre d'espèces (Carstens et al. 2013). C'est pourquoi les résultats de

différentes méthodes doivent, si possible, être comparés (Powell 2012; Puillandre et al. 2012c). En effet, les espèces délimitées selon des méthodes utilisant le modèle GMYC correspondent souvent à des espèces généalogiques (Baum et Shaw 1995). L'utilisation brute de ce concept d'espèce risque d'identifier chaque lignée de clones (dans le cas d'espèces asexuées sans échanges d'allèles du gène marqueur) ou chaque population (dans le cas d'espèces sexuées avec de faibles flux de gènes) comme une espèce différente (Coyne et Orr 2004; Hausdorf et al. 2011). En outre, ce concept ne prend pas en compte la possibilité d'hybridation entre espèces, entraînant une importante inflation du nombre d'espèces (dans le cas de populations géographiquement isolées) et la mise en synonymie de nombreuses espèces reconnues ne présentant pas d'isolement reproducteur (Agapow et al. 2004; Hausdorf 2011).

L'échantillonnage doit donc couvrir une grande partie de l'aire de répartition des taxons étudiés, mais également un nombre suffisant d'individus, permettant ainsi d'obtenir une bonne estimation de la variabilité du marqueur utilisé (Bergsten et al. 2012). En outre, le marqueur doit être suffisamment variable entre et au sein des espèces et sa variation doit être d'ordre de grandeur différents entre les niveaux intra et interspécifiques (principe du barcoding). Le taux de mutation du marqueur n'a pas d'impact direct sur la délimitation d'espèces, mais sa variabilité est un aspect extrêmement important, car elle va avoir un impact sur son temps de coalescence, qui dépend de la taille efficace des populations (Zink et Barrowclough 2008). En effet, plus le taux de mutation est faible, plus le temps de coalescence est long. Cependant, une taille efficace importante entraîne une probabilité accrue d'apparition de mutations, réduisant alors le temps de coalescence. Théoriquement, une seule mutation sur la séquence étudiée permet l'utilisation des méthodes de délimitation d'espèces. La délimitation d'espèce doit se baser sur un faisceau de preuves car une affirmation aussi importante que celle de l'identification d'une nouvelle espèce doit être soutenue par un argumentaire solide. Les lignées évolutives identifiées par les méthodes de délimitation d'espèces sur des bases génétiques gardent un statut d'espèce hypothétique; seule la collecte d'informations complémentaires (aire géographique, morphologie, comportement, présence de flux de gènes, etc.) permet de conclure sur leur véritable statut.

Dans le cas d'identification de lignées évolutives distinctes au sein de morpho-espèces lors de la construction d'arbres phylogénétiques, il est difficile de déterminer si la divergence observée est due à (1) un maintien d'un polymorphisme ancestral (Moran et Kornfield 1993),

(2) à un isolement ancien suivi d'un contact secondaire entre populations d'une espèce (Pfenninger et Posada 2002; Zamudio et Savage 2003), (3) à la présence de flux géniques faibles ou encore (4) à la présence d'espèces cryptiques (Meyer et al. 2005). Les espèces cryptiques sont deux ou plusieurs espèces distinctes qui ont été classées au sein de la même morpho-espèce (Bickford et al. 2007). La diversité cryptique des espèces marines est un phénomène connu depuis de nombreuses années (Knowlton 1993). Ne pas parvenir à identifier de telles espèces signifie classer des espèces possédant des écologies légèrement différentes sous le même nom, gommant une information importante pour la compréhension du fonctionnement d'un écosystème. En outre, la présence d'espèces cryptiques dans les études de génétique des populations peut modifier les résultats en augmentant la variation au sein de populations et donc effacer la variation entre les populations étudiées. Les études de génétique des populations sont un outil de choix pour aider à déterminer l'origine des lignées évolutives, car elles permettent de mesurer le flux de gènes entre lignées.

1.6. Génétique des populations d'espèces marines

1.6.1. Diversité génétique et génétique des populations

La diversité génétique des populations est liée à l'équilibre de quatre forces évolutives qui sont (1) la migration, (2) la mutation, (3) la dérive génétique et (4) la sélection, mais elle dépend également du système de reproduction des organismes. En génétique, le terme population possède plusieurs définitions, mais la plus communément utilisée définit une population comme un ensemble d'individus vivant dans une zone suffisamment restreinte pour que tous les individus qui la composent puissent se reproduire entre eux. Les outils et les méthodes de génétique des populations cherchent à décrire la distribution de la richesse allélique des différentes populations d'une espèce et son évolution temporelle. En effet, en milieu naturel, la diversité génétique d'une espèce n'est pas répartie de manière uniforme et est dépendante de la direction et de l'importance des flux de gènes (sous forme de propagules, larves, gamètes, individus), impactant à plus long terme les phénomènes de spéciation. Il est communément admis que plus les flux de gènes entre populations seront importants, plus la répartition géographique de la diversité est homogène, diminuant la différenciation des populations. Plusieurs modèles théoriques de structure de populations ont été développés pour décrire la répartition de la diversité génétique des espèces, l'orientation

et l'importance des flux de gènes entre populations. Afin d'identifier la présence de flux de gènes entre lignées évolutives au sein d'une espèce, les marqueurs moléculaires de type microsatellite sont un outil de choix.

Les microsatellites sont des marqueurs (1) co-dominants, (2) *a priori* non codants et neutres, (3) hypervariables et (4) répartis dans tout le génome. Ils sont formés par la répétition d'un motif de 1 à 8 paires de bases. Ils sont extrêmement polymorphes, aussi bien en termes de motif répété que du nombre de répétitions. La longueur des fragments amplifiés (en nombre de paires de bases ou de répétition) va déterminer les différents allèles d'un locus. Dans le cas d'une espèce diploïde, il sera ainsi possible d'associer à chaque individu une combinaison de paires d'allèles (une paire pour chaque locus utilisé), qui correspondra à un génotype multilocus (MLG). Les analyses de diversité génétique et de génétique des populations vont se baser sur ces MLG et sur la fréquence relative des différents allèles au sein de populations afin d'identifier la présence de flux de gènes. De nombreux indices permettent d'estimer la différenciation des populations à plusieurs niveaux (intra-populationnel, inter-populationnel), notamment les indices de fixation de Wright (Wright 1931; Takahata et Nei 1984). La plupart des indices utilisés en génétique de populations posent comme hypothèse initiale la conformité des populations à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) : diploïdie, reproduction sexuée, générations non chevauchantes, panmixie, taille infinie, pas de migration, de mutation ni de sélection et des fréquences alléliques non biaisées par le sexe. Les indices de fixation vont donc mesurer l'écart à cet équilibre, permettant de mettre en évidence des processus intra ou inter-populationnels.

1.6.2. Mesures de différenciation génétique

Au niveau intra-populationnel, la différenciation génétique est mesurée à partir de l'indice de consanguinité (F_{IS}) (Wright 1931). Une consanguinité élevée chez une espèce à reproduction strictement sexuée, révélée par déficit en hétérozygotes par rapport à une population conforme à HWE (panmixie), indique que le régime de reproduction est fermé, et que potentiellement la reproduction se fait préférentiellement entre individus apparentés, sans aucune action des autres forces évolutives. Cependant, dans le cas d'espèces ayant une reproduction en partie clonale ou une diversité génétique faible, cet indice sera biaisé par le fait que plusieurs individus, du fait de leur clonalité, présentent le même MLG.

Ainsi certains MLG seront surreprésentés, ce qui biaisera les fréquences alléliques. C'est notamment le cas chez les coraux scléractiniaires, ceux-ci pouvant se reproduire par fragmentation ou par production de larves asexuées (Ayre et Hughes 2000). Disposer d'un nombre de marqueurs important est donc nécessaire : plus le nombre de marqueurs disponibles sera élevé, plus il sera possible de déterminer si deux individus présentant le même MLG sont issus d'un même événement de reproduction et non d'un tirage aléatoire dans un pool d'allèles limité.

L'indice de différenciation de Wright (F_{ST}) permet quant à lui de déterminer la différenciation entre populations en mesurant l'écart à HWE dû à la structuration des populations. En comparant l'hétérozygotie attendue au sein de chacune des sous-populations à l'hétérozygotie attendue dans la population globale théorique sous HWE, il mesure l'écart à la panmixie et donc la différenciation génétique entre paires de populations. On peut ainsi obtenir une appréciation des flux de gènes entre les différentes populations étudiées : plus les populations sont différenciées, moins les flux de gènes seront importants.

1.6.3. Modélisation des flux de gènes

La plupart des modèles de structuration des populations possèdent comme hypothèse de départ un état d'équilibre, c'est-à-dire que la structure observée et les flux géniques mesurés inter-populations ne varient pas dans le temps. Dans ces modèles, les populations sont donc des ensembles limités appelés dèmes. Il existe trois grands modèles théoriques de structure des populations : modèle en îles, en pas japonais et métapopulation.

Le premier développé, qui est également le plus simple, est celui du modèle en îles. Mis au point par Wright (1931), ce modèle admet que, dans une population divisée en un nombre infini de groupes panmictiques, les individus peuvent migrer d'un groupe à un autre avec la même probabilité, indépendamment de la distance qui les sépare. Les populations ne se maintiennent dans le temps que grâce à la migration à chaque génération d'individus issus de ce pool de migrants. Ce modèle est caractérisé par une absence d'isolement par la distance et est souvent adapté aux espèces disposant de grandes capacités de dispersion (Vrijenhoek 1997).

Le modèle en pas japonais, ou stepping-stone (Kimura et Weiss 1964), ajoute une dimension spatiale au modèle en île. Les populations ne peuvent échanger des gènes qu'avec les populations géographiquement les plus proches. Ce second modèle implique donc

un isolement génétique en fonction de la distance géographique, deux populations adjacentes étant plus proches génétiquement que deux populations géographiquement éloignées (Slatkin 1993).

Enfin, le modèle en métapopulation (Levins 1969) tient compte des événements de colonisation et d'extinction qui peuvent survenir au cours du temps. Il peut donc prendre en considération des événements démographiques comme un goulot d'étranglement ou un effet fondateur (ces derniers ont le même effet sur une population : une réduction de la diversité génétique). Ce modèle intègre également, contrairement aux deux précédents, la possibilité de flux géniques asymétriques entre sous-populations, permettant ainsi d'identifier des populations sources d'individus migrants et des populations puits. La différenciation observée entre les populations selon ce modèle ne sera donc pas liée directement à la distance géographique, mais aux différents flux géniques et événements démographiques.

1.6.4. Génétiques des populations marines dans le Sud-Ouest de l'océan Indien

Les études de génétique des populations d'espèces marines sont particulièrement importantes dans la mise en place de plans de conservation (Gerber et al. 2003; Palumbi 2003; Cowen et al. 2007). En effet, la connectivité entre populations influence grandement la dynamique spatiale d'une espèce, sa structuration en termes de classes de taille, sa répartition géographique, sa diversité génétique et sa résilience face aux perturbations (Botsford et al. 2001). Les disparités en termes de connectivité des populations, c'est-à-dire la capacité des populations à échanger des gènes, sont en partie dues aux différences de cycles de vie des espèces marines. En effet, chez une espèce présentant une phase larvaire courte ou inexistante, supposant des capacités dispersives réduites, comme chez certaines gorgones de Méditerranée, il est attendu un isolement très fort entre populations, même espacées de quelques kilomètres (Mokhtar-Jamaï et al. 2011). Au contraire, une espèce possédant une phase de vie planctonique longue laisse supposer une dispersion facilitée sur de grandes distances, comme chez les oursins du genre *Diadema* Gray, 1825 (Lessios et al. 2001).

Cependant, la relation entre connectivité et durée de vie larvaire n'est pas obligatoirement linéaire (Shanks 2009) : le mode de reproduction et la connectivité des populations ne sont pas toujours directement corrélés, comme chez les coraux scléactiniaires (Ayre et Hughes 2000). Le modèle de structuration des populations peut également changer

en fonction de l'échelle géographique (Hellberg 2009). Ainsi, comme chez certains gastéropodes (Hurtado et al. 2007), les flux de gènes entre populations peuvent suivre un modèle en île au niveau local, mais présenter une absence de flux de gènes entre populations à grande échelle géographique, sans lien direct avec l'écologie des espèces étudiées. Multiplier les modèles biologiques et étudier les flux de gènes entre populations permet l'obtention d'une image représentative de la connectivité génétique entre populations des différents groupes taxinomiques d'un écosystème.

1.6.4.1. Connectivité historique des populations

A l'échelle de l'Indo-Pacifique, la plupart des études portent sur la phylogéographie des espèces (Duda et Lessios 2009; Gaither et al. 2009; Ragionieri et al. 2010; DiBattista et al. 2013; Postaire et al. 2014) et travaillent sur des échelles de temps plus longues que les études de génétiques des populations. En effet, les études de génétiques se basent sur du polymorphisme de longueur de marqueurs neutres (évolution rapide) alors que les études de phylogéographie se basent sur du polymorphisme de séquences (évolution plus lente). La phylogéographie cherche ainsi à lier entre la répartition de la diversité génétique des espèces étudiées et la géographie, actuelle et passée, de la zone d'étude. Se basant sur l'étude de plusieurs taxons (poissons récifaux, échinodermes), plusieurs barrières biogéographiques ont pu être mises en évidence, isolant le Sud-Ouest de l'océan Indien de sa partie Nord, mais également séparant l'Est et l'Ouest du bassin océanique (Vogler et al. 2012; DiBattista et al. 2013; Hoareau et al. 2013). De la même manière, au sein du Sud-Ouest de l'océan Indien, plusieurs études montrent l'isolement historique des différentes zones de la région, notamment en lien avec les variations des niveaux marins (Ragionieri et al. 2010; Hoareau et al. 2013; Postaire et al. 2014). Bien que les études phylogéographiques permettent d'étudier les processus de diversification en cours, elles ne permettent pas de mesurer les flux de gènes entre populations à l'échelle de quelques générations. Ces mesures sont pourtant nécessaires dans les plans de conservation et gestion des stocks des ressources halieutiques.

1.6.4.2. Connectivité actuelle des populations

Les études de génétique des populations portant sur les espèces du Sud-Ouest de l'océan Indien sont rares (Ridgway et Sampayo 2005). Toutefois, il a été montré que dans cet océan, les échanges entre l'Est et l'Ouest sont presque inexistants (Ridgway et Sampayo 2005). En effet, la structure génétique de plusieurs populations d'un concombre de mer *Holothuria nobilis* (Selenka, 1867), a été comparée entre La Réunion et la région australasienne (Est de l'océan Indien). La Réunion, qui se trouve dans la partie Ouest de l'océan Indien présente une forte différenciation avec toutes les autres populations de l'étude (Uthicke et Benzie 2003). En outre, ces études ont mis en évidence la complexité des flux de gènes entre populations. Sur la côte africaine, un faible isolement a été mis en évidence entre le Nord et le Sud du canal du Mozambique chez *Pocillopora verrucosa* (Ellis et Solander, 1786) (Ridgway et al. 2008). Cependant, chez une autre espèce du même genre sur côte africaine du Nord du canal du Mozambique, aucune différenciation génétique n'a été trouvée entre les populations sur de grandes échelles géographiques, alors que, sur de faibles distances, la différenciation est forte entre les populations (Souter 2009).

Dans l'océan Indien, les conditions environnementales semblent jouer un rôle important dans les flux de gènes. C'est notamment le cas chez le poisson perroquet *Scarus ghobban* Forsskål, 1775 dont les flux larvaires sont orientés selon les courants majoritaires de la région (Visram et al. 2010). Cependant, l'écologie des espèces est également un facteur non négligeable. En effet pour l'espadon *Xiphias gladius* Linnaeus, 1758, poisson pélagique, le Sud-Ouest de l'océan Indien ne représente qu'une seule grande population panmictique (Muths et al. 2009). A l'inverse, les populations du poisson récifal *Myripristis berndti* Jordan et Evermann, 1903 présentent une structuration et un isolement par la distance marqué, potentiellement en lien avec la présence de récifs coralliens permettant leur recrutement (Muths et al. 2011). Par ailleurs, il semblerait que la présence de gyres au sein du canal de Mozambique réduise l'hybridation entre deux lignées chez la tortue marine *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) car ces tourbillons méso-échelles empêchent la migration des juvéniles entre le Nord et le Sud du canal (Bourjea et al. 2006), schéma retrouvé chez les coraux *Pocillopora verrucosa* (Ridgway et al. 2008).

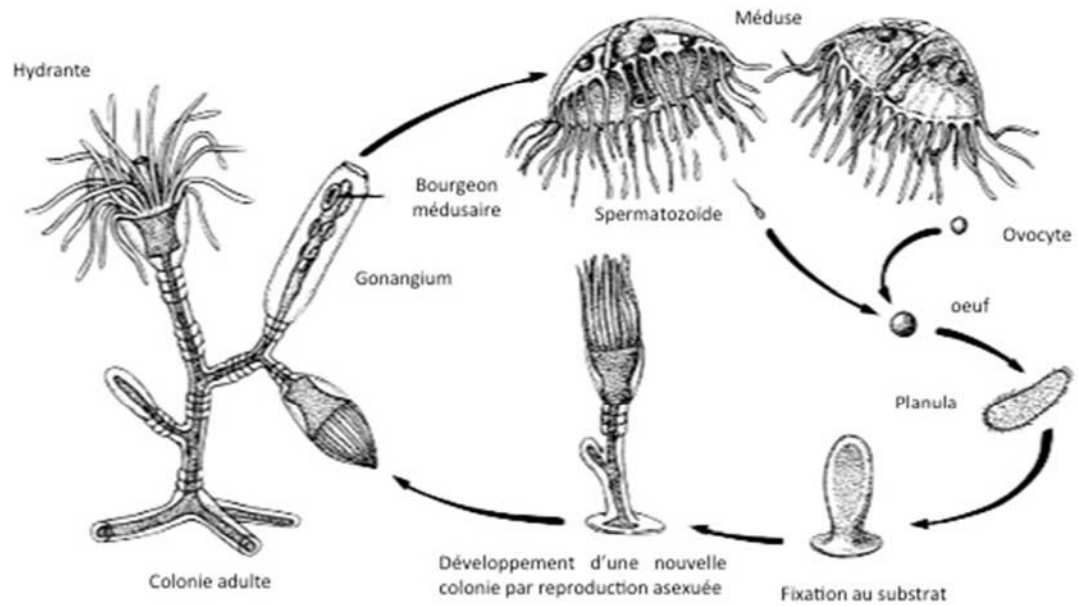


Figure 12. Cycle de vie d'un hydrozoaire.

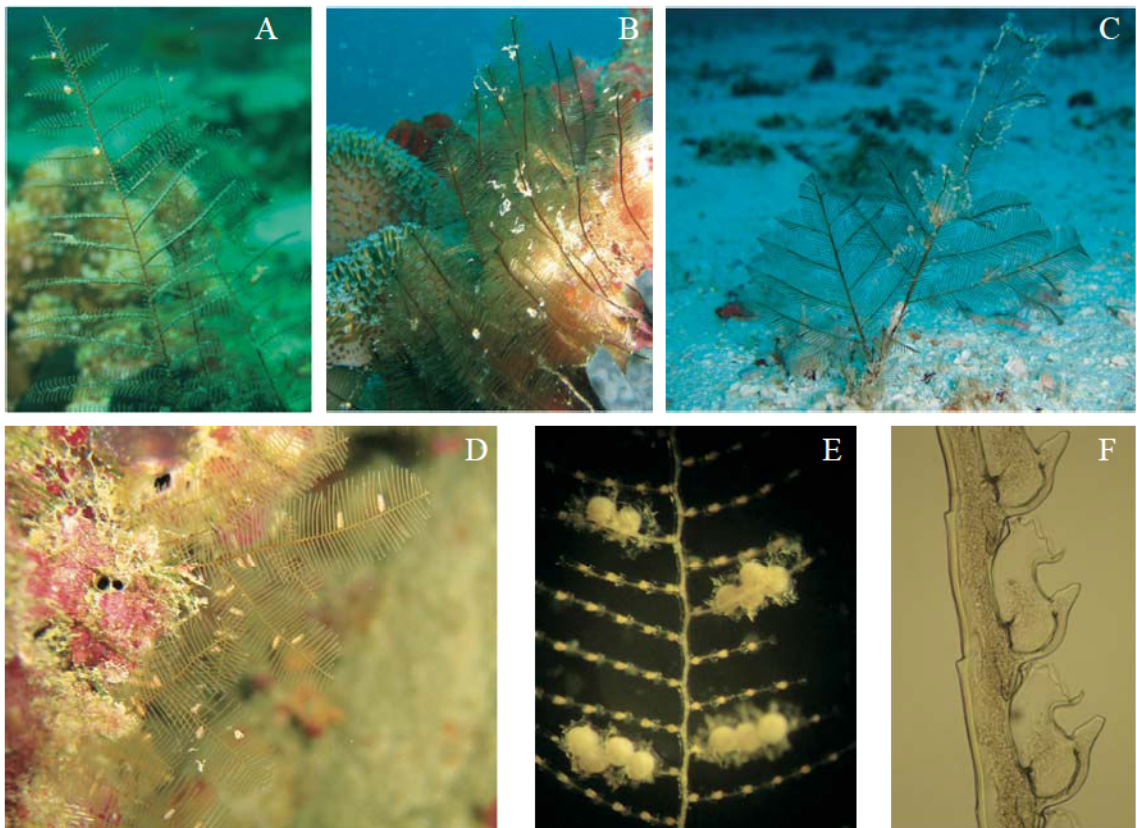


Figure 13. Exemples de colonies d'Aglaopheniidae. A *Gymnangium gracilicaule* (Jäderholm, 1903); B *Gymnangium hians* (Busk, 1852); C *Macrorhynchia singularis* (Billard, 1908); (D-F) *Lytocarpia brevirostris* (Busk, 1852); E corbules (structures d'incubation des larves); F hydrothèques. Photographies issues de Gravier-Bonnet et Bourmaud (2012).

1.7. Modèles d'étude : les hydrozoaires de la famille des Aglaopheniidae

Figurant parmi les groupes taxinomiques marins les plus diversifiés, les hydrozoaires sont pourtant peu étudiés (comparativement à d'autres groupes comme les gastéropodes) en termes d'étude d'évolution, de validité de la taxinomie et de génétique des populations. Cette classe de Cnidaires Médusozoaires est composée de plus de 3700 espèces décrites et récemment révisées (Bouillon et al. 2006). Apparus il y a plus de 580 millions d'années, ils ont colonisé tous les milieux aquatiques, se trouvant ainsi dans les mers tropicales, polaires, les plaines abyssales, côtes rocheuses, dans des eaux douces et saumâtres. Ils font partie des principaux organismes planctophages et suspensivores (Bouillon et al. 2006).

La caractéristique la plus remarquable des hydrozoaires est la production de méduses. Leur cycle de vie ancestral comporte deux phases : une benthique et une planctonique (Figure 12). La phase benthique est caractérisée par une reproduction clonale, l'organisme se développant sous la forme d'une colonie de polypes et libère périodiquement par bourgeonnement des méduses dans la colonne d'eau. Les méduses, sexuées, se développent dans la colonne d'eau et relâchent périodiquement des gamètes. En cas de fécondation, les larves se développent en *planula*, recherchant un substrat de fixation et complétant le cycle.

Le cycle de vie ancestral a subi de nombreuses modifications au cours de l'évolution de cette classe, notamment en présentant une réduction, voire une disparition, de la phase méduse. En cas d'absence de méduse, les larves sont incubées par les colonies dans différents types de structures regroupées sous le terme de gonophores fixes, la dispersion étant assurée par les spermatozoïdes. Les *planulae* ne sont libérées qu'une fois à maturité et ne nagent pas; elles rampent au fond et se fixent à proximité de la colonie mère (au bout de 24h maximum pour *Eudendrium racemosum* (Cavolini, 1785) (Sommer 1990)). Cependant, certaines espèces d'hydrozoaires ont ré-acquis un stade planctonique dispersif plus ou moins actif et de durée variable, que l'on nomme médusoïde, illustrant l'instabilité évolutive de ce caractère (Leclère et al. 2007, 2009).

La famille des Aglaopheniidae (Marktanner-Turneretscher, 1890) fait partie des plus importantes de cette classe, avec plus de 250 morpho-espèces (Bouillon et al. 2006). Composée d'environ huit genres (le nombre varie selon les auteurs), cette famille est présente sous toutes les latitudes et à grande profondeur, mais elle est particulièrement diversifiée en milieu tropical (Millard 1975; Gravier-Bonnet et Bourmaud 2006a, 2006b, 2012; Di Camillo et al. 2009, 2011; Galea 2010, 2013; Soto Àngel et Peña Cantero 2013).

La classification et les clefs de détermination des genres de cette famille se basent en partie sur la morphologie des structures de reproduction, mais également sur la morphologie de la colonie et des hydrothèques (Figure 12) (Millard 1975; Bouillon et al. 2006). Les Aglaopheniidae sont en grande majorité des espèces incubatrices (caractère ancestral) (Leclère et al. 2009) et présentent de structures de reproduction complexes permettant cette incubation. Cependant, plusieurs espèces, au sein de genres différents, disposent d'un stade de dispersion planctonique réduit (caractère dérivé) (Leclère et al. 2009). Malgré cette phase de dispersion supposée réduite pour une majorité d'espèces, les aires de répartitions estimées au sein de cette famille sont très larges, de l'ordre de bassins océaniques entiers (Millard 1975; Gravier-Bonnet et Bourmaud 2006a, 2006b, 2012; Di Camillo et al. 2009, 2011; Galea 2010, 2013; Soto Àngel et Peña Cantero 2013).

1.8. Problématique

La classification et la taxonomie actuelle des Aglaopheniidae est basée en grande partie sur la morphologie des structures de reproduction (gonophores) (Bouillon 2006). Ce groupe de caractères morphologiques étant sujet à convergence évolutive, perte et ré-acquisition au sein des hydrozoaires, il laisse planer un doute sur sa pertinence. Des études phylogénétiques ont d'ailleurs récemment montré que cette classification n'était pas représentative des relations phylogénétiques entre les espèces des milieux tempérés de cette famille (Moura et al. 2012), appelant à une reclassification. En outre, ces résultats semblaient indiquer une diversité cryptique importante et des problèmes de synonymie entre espèces, révélant le besoin d'utiliser une approche intégrative pour tenter de délimiter les espèces de cette famille.

Le premier objectif et deuxième chapitre de cette thèse porte sur l'évaluation de la richesse phylétique de la famille des Aglaopheniidae, en intégrant à la phylogénie existante des espèces tropicales, ce qui n'a jamais été fait à grande échelle taxinomique et géographique. Nous étudierons donc l'évolution de la diversité phylétique de la famille suite à l'intégration d'espèces provenant de plusieurs récifs coralliens de l'Indo-Pacifique (Sud-Ouest de l'océan Indien, Nouvelle-Calédonie et Polynésie Française). En outre, la dernière phylogénie publiée n'avait été reconstruite qu'à l'aide d'un seul marqueur mitochondrial, un fragment de l'ARN ribosomique 16S, utilisé dans les études de barcoding des hydrozoaires.

Nous comparerons donc les phylogénies produites par différents marqueurs moléculaires afin de confirmer les polyphylies des genres mises en évidence par l'utilisation du seul marqueur mitochondrial.

Le deuxième objectif de cette thèse, présenté dans le troisième chapitre, porte sur l'utilisation du GMYC sur la phylogénie des Aglaopheniidae reconstruite à l'aide du 16S, afin d'évaluer la part de la diversité cryptique au sein de cette famille. En effet, la phylogénie générale de la famille publiée par Moura et al. (2012) semblait indiquer la présence d'une diversité cryptique importante au sein des espèces d'Aglaopheniidae, mais également des cas de synonymie et de polyphylie entre plusieurs espèces morphologiquement très similaires. L'utilisation de ce modèle, implémenté selon différentes méthodes, nous permettra donc dans un premier temps d'estimer cette diversité cryptique et son importance en fonction du cycle de vie des espèces, mais également d'apporter des informations aux taxinomistes concernant les cas de synonymie et de polyphylie au sein de cette famille. Dans un second temps, les résultats du modèle seront comparés à une méthode d'assignement d'individus à des populations théoriques par inférence bayésienne à l'aide de marqueurs microsatellites chez de deux espèces échantillonnées largement dans le Sud-Ouest de l'océan Indien et en Nouvelle-Calédonie, *Lytocarpia brevirostris* (Busk, 1852) et *Macrorhynchia phoenicea* (Busk, 1852).

Le troisième objectif de cette thèse, présenté dans le quatrième chapitre, a pour but d'estimer la connectivité des populations et l'importance de l'isolement par la distance des populations d'une espèce d'Aglaopheniidae incubatrice, *Lytocarpia brevirostris*, à différentes échelles spatiales : au sein d'une même île, entre îles au sein d'une province biogéographique, et entre provinces biogéographiques de part et d'autre de l'océan Indien. Ce chapitre fait partie des premières études de génétique de population chez les hydrozoaires et la première chez les Aglaopheniidae : le développement de marqueurs microsatellites a été nécessaire pour la mener à bien. Nous pourrons grâce à cette étude, mesurer l'influence du cycle de vie sur la diversité génétique des populations de cette espèce, mais également déterminer l'importance des flux de gènes entre populations. Nous pourrons ainsi discuter de la vision traditionnelle de l'aire de répartition de espèces d'hydrozoaires, souvent considérée comme extrêmement étendue et de la pertinence de baser la délimitation d'espèce sur des données morphologiques pour cette espèce.

Chapitre 2

Phylogénie de la famille des Aglaopheniidea, une diversité phylétique insoupçonnée

En révision pour publication dans Zoologica Scripta

Résumé

Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique en cours de révision pour publication dans *Zoologica Scripta*.

La morphologie des organismes, utilisée dans le but de classer les organismes, peut être trompeuse et ne pas représenter le degré d'apparentement entre les espèces. C'est notamment le cas chez les cnidaires et particulièrement chez les hydrozoaires. Parmi ces organismes suspensivores, très largement distribués dans tous les écosystèmes aquatiques, la famille des Aglaopheniidae (Marktanner-Turneretscher, 1890) fait partie des plus diversifiées. Les espèces strictement marines de cette famille sont particulièrement nombreuses dans les récifs coralliens tropicaux. La taxinomie de cette famille est entièrement basée sur la morphologie des espèces, et tout particulièrement celle des structures de reproduction qui permettent d'identifier les différents genres de la famille. Néanmoins, une étude précédente, basée sur un échantillonnage centré sur l'Atlantique Nord-Est et sur le marqueur mitochondrial 16S, laisse supposer que cette classification ne permet pas de représenter les relations de parenté entre les genres et espèces de cette famille. Nous avons donc complété cette étude en y incorporant plusieurs espèces échantillonnées sur plusieurs récifs de l'Indo-Pacifique.

Dans un premier temps, nous avons reconstruit une phylogénie générale de la famille en se basant sur le marqueur mitochondrial 16S. Celle-ci est la plus complète à ce jour, incluant six genres et 38 morpho-espèces dont 13 n'avaient jusqu'alors jamais été intégrées dans une phylogénie. Dans un deuxième temps, deux marqueurs nucléaires supplémentaires, l'ITS1-5.8S-ITS2 et le premier exon du gène codant pour la calmoduline, ont été séquencés pour les individus échantillonnés lors de cette étude. Cette deuxième partie avait pour but de comparer les phylogénies produites par les différents marqueurs, puis de reconstruire une phylogénie à partir de la concaténation des trois marqueurs.

Les différentes reconstructions phylogénétiques réalisées lors de cette étude révèlent et réaffirment l'importante polyphylie au sein de cette famille : tous les genres sont polyphylétiques ou disposent d'un statut monophylétique soumis à caution. Pour les morpho-espèces tropicales en particulier, les arbres reconstruits à l'aide des différents marqueurs confirment la polyphylie des genres de cette famille, tout comme l'arbre produit de la concaténation des trois marqueurs.

Cette étude confirme que les caractères morphologiques actuellement utilisés pour classifier cette famille ne représentent pas les relations de parenté entre ses espèces et ses genres. En outre, nos résultats révèlent la diversité phylétique élevée de cette famille. Cette diversité phylétique implique qu'avant toute révision taxinomique de cette famille, il serait nécessaire d'utiliser une approche intégrative, ainsi qu'un échantillonnage très large, taxinomiquement et géographiquement.

2. Phylogenetic relationships within Aglaopheniidae (Cnidaria, Hydrozoa) reveal unexpected generic diversity

Bautisse Postaire^{1,2}, Hélène Magalon^{1,2}, Nicole Gravier-Bonnet^{1,2}, Chloé A-F Bourmaud^{1,2}, J Henrich Bruggemann^{1,2}

1 : Université de La Réunion UMR ENTROPIE 9220, CS 92003, 97744 Saint Denis CEDEX 9, France

2 : Laboratoire d'Excellence CORAIL, www.labex-corail.fr

Abstract

Morphology can be misleading in the representation of phylogenetic relationships, especially in simple organisms like cnidarians and particularly in hydrozoans. These suspension feeders are widely distributed in many marine ecosystems and the family Aglaopheniidae (Marktanner-Turneretscher, 1890) is among the most diverse and visible, especially on tropical coral reefs. The taxonomy of this family is based on morphological characters with particular emphasis on reproductive structures for the identification of genera. The current study is the most comprehensive molecular phylogeny of the Aglaopheniidae to date, including 6 genera and 38 species, of which 13 were investigated for the first time and sampled on tropical coral reefs throughout the Indo-Pacific region. For newly sampled individuals, we sequenced the 16S rRNA, the nuclear locus comprising the complete ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 and the first exon of the calmodulin nuclear gene. Phylogenetic analyses of the data revealed and confirmed a general polyphyly or doubtful monophyly of all sampled genera in tropical regions based on both the mitochondrial and nuclear markers. Our results revealed that the morphological characters used today are unsuited to resolve phylogenetic relationships between species and genera, as well as the high phyletic diversity within this family. Future revision of the classification of this family will require extensive geographic sampling and the use of an integrative approach.

Keywords Hydrozoa, Aglaopheniidae, systematics, molecular phylogeny, polyphyly

Introduction

Prerequisites for conservation planning are inventories of species, which are often recognised and described using morphological clues. However, taxa identification using morphological criteria may be challenging, especially in simple organisms that present few discriminant synapomorphies and high phenotypic plasticity, such as cnidarians (see Daly et al. (2007) for a review). Moreover, molecular phylogenies have shown that a morphological approach is not always representative of the diversity and phylogenetic relationships between species, genera, families and even higher levels in Cnidaria (e.g. Bridge et al. 1992; Chen et al. 1995; Berntson 1999; Daly et al. 2003; Benzoni et al. 2010; Budd et al. 2010; Brugler et al. 2013; Arrigoni et al. 2014). This pervasive problem in Cnidaria is particularly true for Hydrozoa, (see Bridge et al. 1992; Schuchert 1993; Bouillon and Boero 2000; Marques and Collins 2004; Leclère et al. 2009; Peña Cantero et al. 2009; Cartwright and Nawrocki 2010; Lindner et al. 2011), highlighting the need for a systematic revision of this cnidarian class.

The Aglaopheniidae (Marktanner-Turneretscher, 1890) hydrozoan family is one of the largest, comprising 8 genera and over 250 described species (Bouillon et al. 2006). Genera are defined by reproductive apparatus (gonosome) morphology in addition to the general morphology of the rest of the colony (trophosome) (Allman 1883; Nutting 1900; Millard 1975; Calder 1997; Bouillon et al. 2006). However, gonosome morphology and the life cycle of hydrozoan species were recently shown to present several cases of plesiomorphy and convergent evolution (Leclère et al. 2007; Leclère et al. 2009). Therefore, its use as criteria for identifying Aglaopheniidae genera is now arguable. A recently published molecular phylogeny of this family (Moura et al. 2012), based on 25 putative species belonging to 6 genera, partially supported the monophyly of some genera but rejected the usual classification based on gonosome morphology. The study by Moura et al. (2012) included a large number of species; however, most samples were collected from temperate regions in the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea, implying that a part of the phyletic diversity within Aglaopheniidae might have been missed. Nutting (1900) already noted that the Aglaopheniidae diversity (family Statopsea according to the author) was particularly high in the tropical Atlantic Ocean (West Indies). Since then, an important volume of literature has confirmed the diversity of Aglaopheniidae in tropical seas, especially on coral reefs (see Vervoort 1967; Calder 1997; Schuchert 2003; Gravier-Bonnet and Bourmaud 2006a; Gravier-Bonnet and Bourmaud 2006b; Di Camillo et al. 2008; Gravier-Bonnet and

Bourmaud 2012). Consequently, sampling the tropical Indo-Pacific region should be considered a prerequisite to start assessing the phyletic diversity of this family.

The 16S mitochondrial rRNA marker is widely used in cnidarian phylogenetic and phylogeographic studies (e.g. Bridge et al. 1995; Romano and Palumbi 1997; Collins et al. 2005; Peña Cantero et al. 2009; Cartwright and Nawrocki 2010; Miglietta and Cunningham 2012; Addamo et al. 2012; Hibino et al. 2014;) and has shown a certain consistency with nuclear markers (Miranda et al. 2010; Schuchert 2014). However, using a single mitochondrial marker is not appropriate to study old phylogenetic relationships as it may present incomplete lineage sorting and introgression. Additional markers, each having a unique phylogenetic history and evolution speed, should be used in order to improve the resolution and the reliability of phylogenetic reconstructions. The internal transcribed spacers of the nuclear rDNA (ITS: including the entire ITS1, 5.8S gene and ITS2) present interesting characteristics for reconstructing phylogenetic relationships: biparental inheritance, easy amplification and universality (Barco et al. 2010; Imazu et al. 2014; Kitano et al. 2014). However, due to its high variability, ITS is more appropriate for the study of inter-specific phylogenetic relationships (see Schuchert 2014). For higher taxonomic ranks, the calmodulin, an ubiquitously conserved gene, has proved to be a reliable marker (Baba et al. 1984) used for reconstructing cnidarian phylogenies (Lindner et al. 2008).

The present study aims to improve knowledge on Aglaopheniidae phylogeny, primarily, by enlarging geographic coverage of sampling, focussing sampling efforts on tropical coral reefs in the South-West Indian Ocean, the South-West Pacific- two marine biodiversity hotspots (Roberts et al. 2002), as well as in the Central Pacific. By using a multi-locus approach, we provide a new insight into the phylogenetic relationships within this family and discuss current taxonomy and its validity.

Material and Methods

Sampling

Samples were collected manually between 2007 and 2014 from shallow coral reefs habitats (0-40 m depth) at 6 localities in the South-West Indian Ocean (SWIO, 15 sites per locality), one locality in the South-West Pacific (New Caledonia, 18 sites) and one in the Central-Pacific (Moorea, French Polynesia, 3 sites) (Figure 1, Table 1). Each sampling site



Figure 1. Sampling locations in the South-West Indian Ocean and West Pacific and Central Pacific included in this study. EUR: Europa Island; GEY: Geyser bank; GLO: Glorieuses Islands; JUA: Juan de Nova Island; MAY: Mayotte; NCA: New Caledonia; RUN: Reunion Island, MOO: Moorea.

Table 1. Number of newly sampled individuals per location. Each individual was sequenced for all markers. EUR: Europa Island; GEY: Geyser bank; GLO: Glorieuses Islands; JUA: Juan de Nova Island; MAY: Mayotte; NCA: New Caledonia; RUN: Reunion Island, MOO: Moorea.

	South-Western Indian Ocean						Pacific Ocean	
	EUR	GEY	GLO	JUA	MAY	RUN	NCA	MOO
<i>Aglaophenia cupressina</i> Lamouroux, 1816	3	3	1		2			
<i>Aglaophenia postdentata</i> Billard, 1913					1	2		
<i>Aglaophenia sinuosa</i> Bale, 1888							4	
<i>Gymnangium allmani</i> (Marktanner-Turneretscher, 1890)	1						1	
<i>Gymnangium eximium</i> (Allman, 1874)	4	4		5	3	1		4
<i>Gymnangium gracilicaule</i> (Jäderholm, 1903)	4		1	2		1		
<i>Gymnangium hians</i> (Busk, 1852)	4	2			4	1	3	
<i>Gymnangium insigne</i> (Allman, 1876)								2
<i>Lytocarpia brevirostris</i> (Busk, 1852)	7	3	1		1	5	3	
<i>Lytocarpia nigra</i> (Nutting, 1905)	3			3			1	
<i>Lytocarpia phyteuma</i> (Kirchenpauer, 1876)	3	3		1	4		3	6
<i>Lytocarpia</i> sp. 1					1			
<i>Macrorhynchia</i> sp. n.	2	2	1		1			
<i>Macrorhynchia philippina</i> (Kirchenpauer, 1872)	6			1				3
<i>Macrorhynchia phoenicea</i> (Busk, 1852)	3			1	3	3	1	
<i>Macrorhynchia sibogae</i> (Billard 1913)					1			
<i>Macrorhynchia spectabilis</i> (Allman, 1883)			1					
<i>Macrorhynchia</i> sp. 1					1			

was prospected for Aglaopheniidae species using SCUBA or by snorkelling. To facilitate identification, larger colonies (i.e. between 3 to 40 cm high) were preferentially collected with visible gonosomes. Parts of colonies, referred to as individuals, were collected several meters apart to reduce the probability of sampling the same colony (genet) several times. Samples were identified based on morphological characters by CAFB, NG-B and BP, using taxonomic literature (see references listed in Gravier-Bonnet and Bourmaud 2006a; Gravier-Bonnet and Bourmaud 2006b; Gravier-Bonnet and Bourmaud 2012). For species and genera lists the “Hydrozoa Handbook” (Bouillon et al. 2006) was used. A minimum of 3 individuals per species were collected and sequenced. Specimens were fixed and preserved in 90% ethanol for DNA extraction. Whenever possible, a part of each sequenced specimen was also preserved in a 3% formalin solution in seawater. Samples are currently stored in the laboratory at the the University of Reunion Island and are available on request.

Sequencing

Prior to DNA extraction, all gonophores were removed from the colonies. DNA was extracted from one or two hydrocauli per colony using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer’s protocol. Extraction quality was assessed on a 0.8% agarose gel stained with GelRed Nucleic Acid Stain, 10000X in DMSO (Gentaur, Kampenhout, Belgium). Each PCR reaction was conducted in a total volume of 30 µl: 15 µl (0.625 U) of AmpliTaq mix (Applied Biosystems, Waltham, USA), 0.5 µl of each primer (10 µM) and 4 µl of template DNA (final concentration: 1.6 ng/µl), and completed with 10 µl of ultra-pure water. We amplified and sequenced a fragment of the 16S rRNA (16S) mitochondrial gene with primers SHA (5’-ACG GAA TGA ACT CAA ATC ATG T-3’) and SHB (5’-TCG ACT GTT TAC CAA AAA CAT A-3’) (Cunningham and Buss 1993) and two nuclear regions: (1) a fragment of the calmodulin (CAM) gene with primers CAMF1 (5’-GAT CAA YTR CAN GAR GAA CAA ATT GC-3’) and CAMR1 (5’-CCA TCN CCA TCR ATA TCA GC-3’) (Lindner et al. 2008), and (2) the complete internal transcribed spacer 1, 5.8S rDNA and internal transcribed spacer 2 region of the ribosomal DNA (ITS) with partial 18S and 28S ribosomal genes flanking the two ITS, respectively upstream and downstream with primers ITSF (5’-CAC CGC CCG TCG CTA C TA CCG ATT GAA TGG-3’) and ITSr (5’-CGC TTC ACT CGC CGT TAC TAG GGG AAT CC-3’) (Martínez et al. 2010). The PCR conditions for 16S and CAM markers were: (5min at 95°C),

(30s at 94°C; 30s at 46°C; 1min at 72°C) x 5, (30s at 94°C; 30s at 51°C; 1min at 72°C) x 30, and (5min at 72°C). The PCR conditions for the ITS marker were: (5min at 95°C), (30s at 94°C; 30s at 55°C; 1min at 72°C) x 35 and (5min at 72°C). PCR products were visualized on a 1% agarose gel stained with GelRed Nucleic Acid Stain, 10000X in DMSO (Gentaur, Kampenhout, Belgium). PCR products were sequenced in both directions by Genoscope (CEA Evry, France) and by Genoscreen (Lille, France) on capillary sequencer ABI3730XL.

Tree reconstruction

Sequences were checked and edited using Geneious 6.0 (<http://www.geneious.com>; Kearse et al. 2012) and deposited on GenBank (Annexe 4). Additional mitochondrial sequences previously published were retrieved from GenBank (Annexe 4). Sequences were aligned using Muscle algorithm (Geneious plug-in; Edgar 2004) and trimmed to the shortest sequence. To assess the general position of newly sampled species within the Aglaopheniidae phylogeny, 16S marker was analysed first, separately from the others. After checking for incongruences, phylogenetic relationships amongst the coral reef Aglaopheniidae species were analysed using the concatenated dataset (i.e. mitochondrial and nuclear markers). We used Jmodeltest (stand-alone version; Darriba et al. 2012) to determine the best probabilistic model of sequence evolution based on AIC (16S: GTR+I+G; CAM: TPM2uf+I+G; ITS: TIM1+I+G). We performed Maximum Likelihood (ML) using PhyML (Geneious plug-in; Guindon et al. 2010) and Bayesian Inferences (BI) analyses using MrBayes 3.2 (3 independent runs of: $100 \cdot 10^6$ generations, 8 chains, temperature to 0.2, 10% burnin length, sampling every $1 \cdot 10^5$ generations (Geneious plug-in; Ronquist et al. 2012). Nodes can be considered robust if their Posterior Probability (PP) is equal or higher to 0.95 when considering Bayesian reconstruction and when their bootstrap (BS) values are superior to 75% considering ML reconstruction (Erixon et al. 2003). These definitions were used thereafter. The same outgroups as Moura et al. (2012) were used for the 16S tree reconstruction, i.e. *Schizotricha turqueti* Billard, 1906 and *Schizotricha nana* Peña Cantero, Vervoort, and Svoboda, 1996. As no sequences of ITS and calmodulin are available, to date, for these species, sequences from a Campanulariidae species [*Clytia gracilis* (Fraser, 1938)] were used for tree reconstructions, for the nuclear markers and for the concatenated dataset.

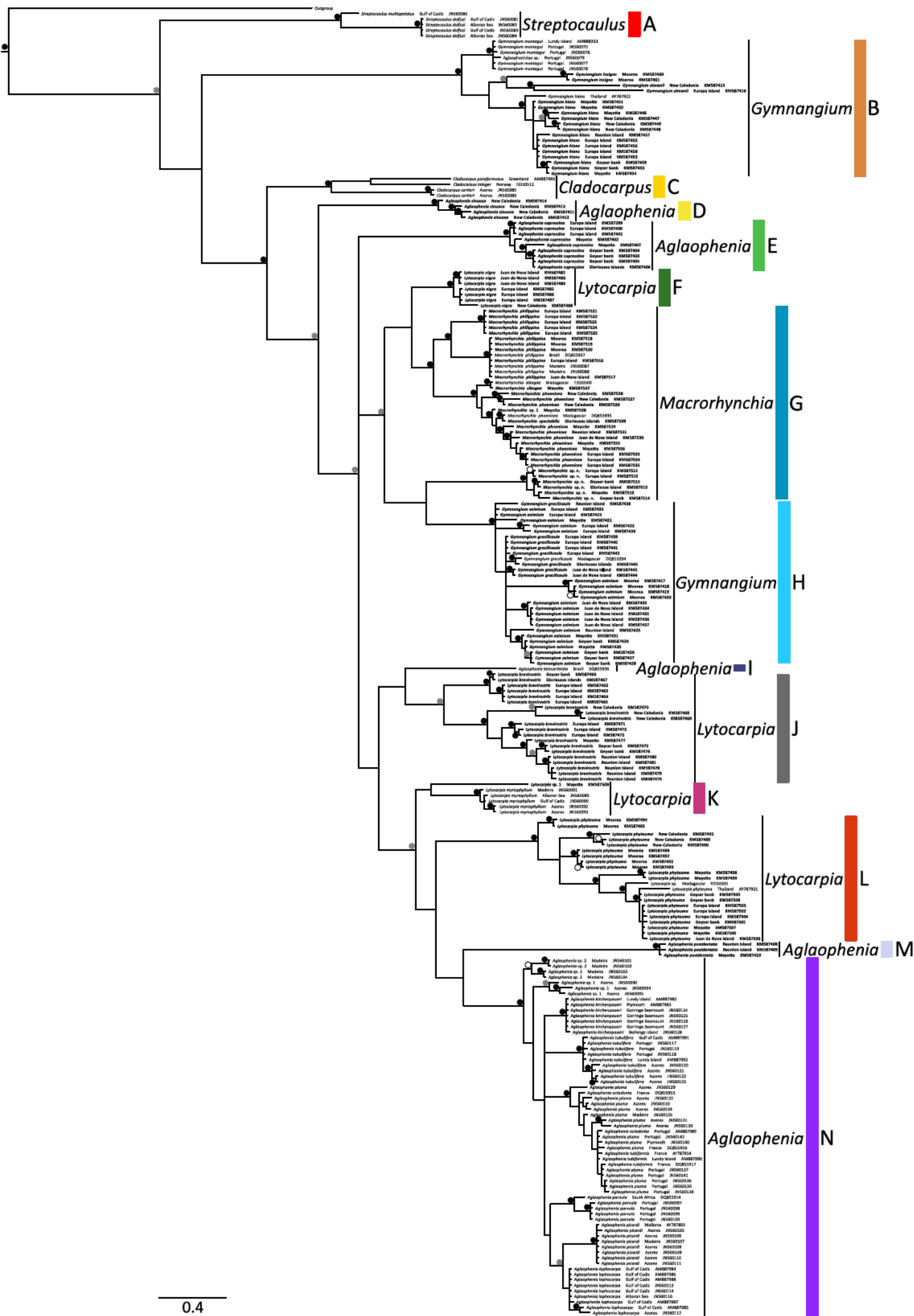


Figure 2. Molecular phylogeny of Aglaopheniidae species generated by PhyML from 16S gene sequences. Black thick vertical lines indicate positions of genera. Support values of nodes are indicated: black dots indicate PP superior to 0.95 and ML bootstrap values superior to 75%; grey dots indicate PP superior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood inferior to 75%; white dots indicate PP inferior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood superior to 75%. Nodes with PP inferior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood inferior to 75% are not indicated. Distances are expressed in number of substitution per site. Uppercase letters and colour codes delineate lineages referred to in Table 2 and congruent with Figure 3.

Results and Discussion

Our research represents the most comprehensive phylogeny study of the family Aglaopheniidae to date, not only in terms of the number of taxa and genes included, but also of geographic coverage, comprising sites from the Atlantic, South-West Indian Ocean and the South-West to Central Pacific. For 16S, a total of 238 sequences were analysed, comprising 6 genera and 38 species (Annexe 4); after alignment, 511 sites were retained of which 274 (53.6%) were parsimony-informative (i.e. at least two different bases for a given site, each represented at least twice). The calmodulin gene data set included 143 sequences of 330 sites, with 95 parsimony-informative sites (28.8%). For ITS, 143 sequences of 937 sites were obtained, with 432 parsimony-informative sites (46.1%). The results of BI and ML were almost identical, but BI analyses provided generally stronger nodal supports than ML. Phylogenies of the mitochondrial and nuclear markers yielded similar topologies for the coral reef species studied, except for the position of *Macrorhynchia* sp. n (Annexe 5). This species formed a robust clade with other *Macrorhynchia* (Kirchenpauer, 1872) species when considering nuclear markers independently (Annexe 5), but not when considering only the mitochondrial marker (Figure 2). As the 16S marker might not be representative of phylogenetic relationships due to its maternal inheritance (Hurst and Jiggins 2005), we analysed the three markers concomitantly by concatenating them for the newly sequenced species (Figure 3).

Groups of taxa in Aglaopheniidae

Nodes discussed below (mitochondrial marker and/or concatenated dataset) are supported by both Bayesian [Posterior Probability (PP)] and Maximum Likelihood [Bootstrap (BS)] reconstructions and are considered robust (i.e. $PP > 0.95$ and $BS > 75$). The phylogeny based on 16S, including all available sequences and newly sequenced species is presented in Figure 2. We identified three divergent and strongly supported clades within the family Aglaopheniidae: first, the genus *Streptocaulus* (Allman, 1883) at the base of the phylogeny (A; $PP = 1$, $BS = 100$); second, the genus *Gymnangium* Hincks, 1874 excluding *G. eximium* (Allman, 1874) and *G. gracilicaule* (Jäderholm, 1903) (B; $PP = 1$, $BS = 100$); third, the genera *Aglaophenia* Lamouroux, 1812, *Cladocarpus* (Allman, 1874), *Lytocarpia* (Kirchenpauer, 1872) and *Macrorhynchia*, and the two species *G. eximium* and *G. gracilicaule* (C-N; $PP = 0.98$, $BS = 79$).

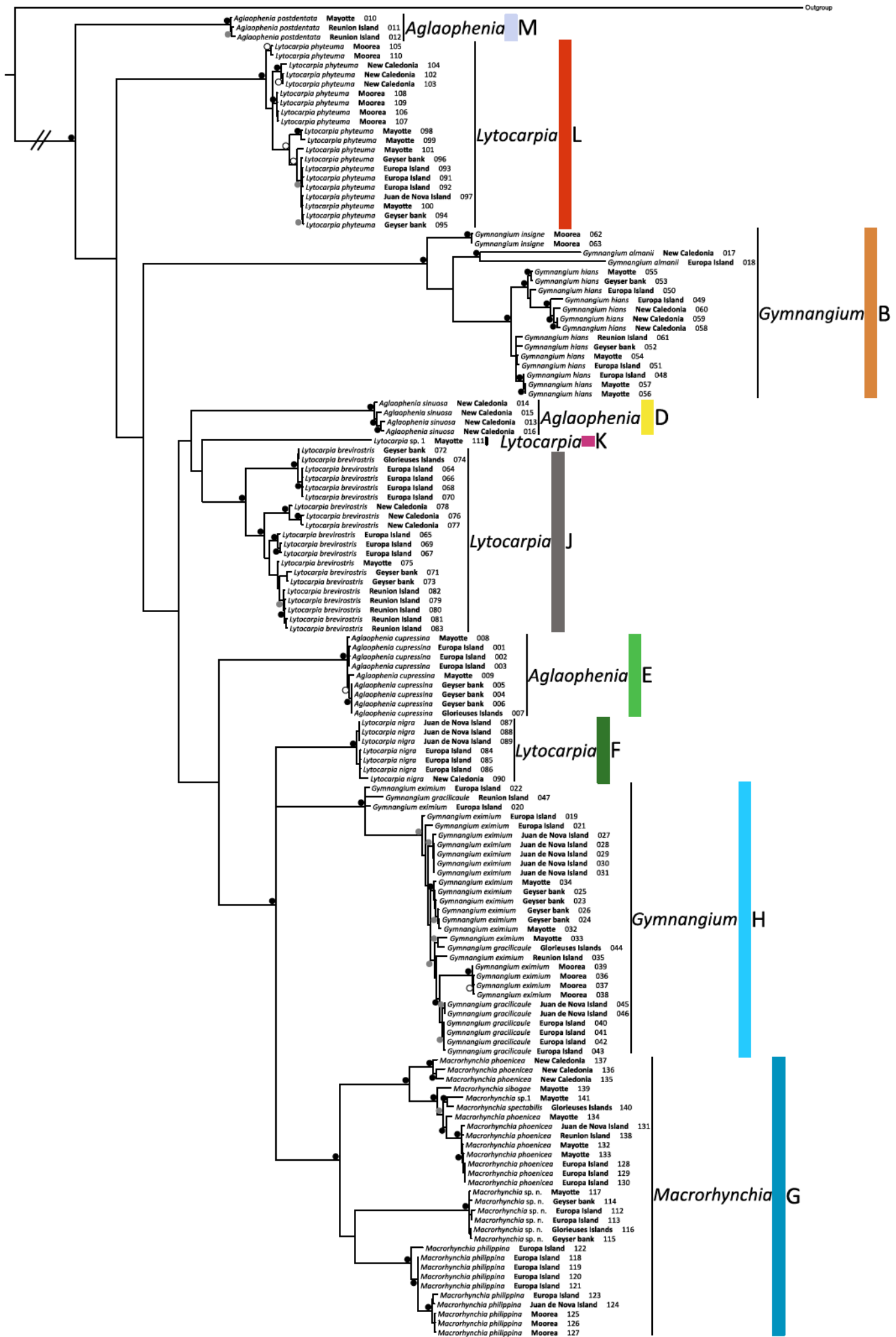


Figure 3. Molecular phylogeny of 18 tropical Aglaopheniidae species generated by PhyML from 16S, ITS and calmodulin sequences. Black thick vertical lines indicate positions of genera. Support values of nodes are indicated: black dots indicate PP superior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood superior to 75%; grey dots indicate PP superior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood inferior to 75%; white dots indicate PP inferior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood superior to 75%. Nodes with PP inferior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood inferior to 75% are not indicated. Distances are expressed in number of substitution per site. Uppercase letters and colour codes delineate lineages referred to Table 2 and congruent with Figure 2.

Table 2. Grouping at genus level of the 38 species analysed based on molecular data in this study. Type species are in bold. Asterisks indicate clades where the type species of the corresponding genus was not sequenced; question marks indicate that the type species of the genus is not in the corresponding clade.

Clade	Genera	Species
A	<i>Streptocaulus</i> *	<i>Streptocaulus multiseptatus</i> , <i>S. dolfusi</i>
B	<i>Gymnangium</i>	<i>G. montagui</i> , <i>G. allmani</i> , <i>G. hians</i> , <i>G. insigne</i>
C	<i>Cladocarpus</i> *	<i>Cladocarpus cartieri</i> , <i>C. integer</i> , <i>C. paraformosus</i>
D	<i>Aglaophenia</i> ?	<i>Aglaophenia sinuosa</i>
E	<i>Aglaophenia</i> ?	<i>Aglaophenia cupressina</i>
F	<i>Lytocarpia</i> ?	<i>Lytocarpia nigra</i>
G	<i>Macrorhynchia</i> *	<i>Macrorhynchia phoenicea</i> , <i>M. philippina</i> , <i>M. sibogae</i> , <i>M. spectabilis</i> , <i>M</i> sp. n.
H	<i>Gymnangium</i> ?	<i>Gymnangium eximium</i> , <i>G. gracilicaule</i>
I	<i>Aglaophenia</i> ?	<i>Aglaophenia latecarinata</i>
J	<i>Lytocarpia</i> ?	<i>Lytocarpia brevirostris</i>
K	<i>Lytocarpia</i>	<i>Lytocarpia myriophyllum</i> , <i>L</i> sp. 1
L	<i>Lytocarpia</i> ?	<i>Lytocarpia phyteuma</i>
M	<i>Aglaophenia</i> ?	<i>Aglaophenia postdentata</i>
N	<i>Aglaophenia</i>	<i>Aglaophenia pluma</i> , <i>A. kirchenpaueri</i> , <i>A. lophocarpa</i> , <i>A. octodonta</i> , <i>A. parvula</i> , <i>A. picardi</i> , <i>A.</i> sp. 1, <i>A.</i> sp. 2, <i>A. tubiformis</i> , <i>A. tubulifera</i>

The newly obtained sequences improved the resolution of the tree and the third major clade (C-N) comprised three sub-clades: (a) the genus *Cladocarpus* (C; PP = 1, BS = 98), (b) the genus *Macrorhynchia* and the species *G. eximium*, *G. gracilicaule* and *Lytocarpia nigra* (Nutting, 1905) gathered in a partially supported clade (F-H; PP = 0.99, BS < 75), and (c) several *Lytocarpia* and *Aglaophenia* species (I-N). The use of nuclear markers confirmed the major clade composed of sub-clades F to H (Figure 3; PP = 0.99, BS = 97).

In the light of these new phylogenies, the genus *Gymnangium* is clearly polyphyletic, either when the 16S is analysed alone (Figure 2, B and H), in agreement with previous studies (Leclère et al. 2009; Moura et al. 2008; Moura et al. 2012), or when the nuclear markers are included (Figure 3, B and H). Akin to *Gymnangium*, the genera *Aglaophenia* and *Lytocarpia* are polyphyletic groups for both mitochondrial and nuclear markers, results congruent with those of Moura et al. (2012). In contrast, the *Macrorhynchia* species are closely related when excluding *Macrorhynchia* sp. n. based on the 16S (Figure 2, G), but nuclear markers reveal the monophyletic status of this genus, including *Macrorhynchia* sp. n (Figure 3, G). Finally, the species of the genera *Cladocarpus* (Figure 2, C) and *Streptocaulus* (Figure 2, A), inhabiting deep waters, were not sampled in the present study: their monophyletic status can therefore neither be confirmed nor discussed.

Phyletic richness of Aglaopheniidae genera

Moura et al. (2012) found the genus *Aglaophenia* to be polyphyletic due to the absence of grouping of *A. latecarinata* Allman, 1877 with other *Aglaophenia* species. The inclusion of three newly sampled species of this genus (*A. cupressina* Lamouroux, 1816, *A. postdentata* Billard, 1913 and *A. sinuosa* Bale, 1888) supports this result. *Aglaophenia cupressina* (E) and *A. sinuosa* (D) are parts of a large clade that includes the genera *Lytocarpia*, *Aglaophenia* and *Macrorhynchia* and two *Gymnangium* species, but are divergent among each other and separated from other *Aglaophenia* (Figure 2, Figure 3). With 75 valid species, the genus *Aglaophenia* is the most diverse of the family (Bouillon et al. 2006). Our results validate its polyphyletic status and suggest that it is composed of several divergent monophyletic taxa: based on our data, the genus *Aglaophenia* is composed by at least five divergent lineages (D, E, I, M, N, Table 2). These results question the validity of this genus and the reliability of the morphological characters used to define it, i.e. gonothecae protected by accessory structures, called corbulae, lacking hydrothecae at the base of the ribs (Millard 1975; Schuchert 2003; Bouillon et al. 2006).

From its creation by Lamouroux (1812), the genus *Aglaophenia* has presented a very complex history summarised by Calder (1997). Today, with a comprehensive sampling as a prerequisite, the genus *Aglaophenia* should attract attention for a taxonomic revision, which might lead to the denomination of new clades in the Aglaopheniidae family. Interestingly, *Aglaophenia* species from the temperate Atlantic Ocean and Mediterranean Sea (Figure 2, N) form a robust clade, which contains the type species (Table 1, *A. pluma* (Linnaeus, 1758)). This N clade is composed of 10 species with low inter-specific genetic divergences (Moura *et al.* 2012) and strong morphologic similarities (P. Schuchert, pers. com.). This clade might represent an evolutionary radiation initiated prior to or after closure of the Tethyan connection between the Atlantic and Indo-Pacific basins, approximately 14 million years ago (Rögl and Steininger 1982).

The addition of new species of *Lytocarpia* to the phylogeny also highlights the polyphyly of this taxon, consistent with the results of Moura *et al.* (2012). The species *Lytocarpia brevirostris* (Busk, 1852) (J), *L. myriophyllum* (Linnaeus, 1758) (K) and *L. phyteuma* (Kirchenpauer, 1876) (L) do not form a clade but are related to *Aglaophenia* species from the Atlantic and the Mediterranean sea (Figure 2, N), whereas *L. nigra* (F) is related to *Macrorhynchia* (G), *Gymnangium eximium* and *G. gracilicaule* (H). These results question the validity of the diagnostic character for distinguishing the genera *Lytocarpia* and *Aglaophenia*, i.e. the presence/absence of an hydrothecae at the basis of each corbula rib (Millard 1975). As previously shown by Moura *et al.* (2012), our results also indicate that the general classification of the Aglaopheniidae based on the morphological characters of the gonosome is not concordant with the phylogeny of the family. Furthermore, species of *Lytocarpia* belong to two of the major sub-clades of Aglaopheniidae (F-H, I-N), indicating that the general diagnostic character of the genus might represent several cases of homoplasy. Indeed, the genus is composed of four divergent lineages, questioning again its general validity (Table 2). However, with only 5 of the 36 currently recognised species included in this study (Bouillon *et al.* 2006) and even if the type species is included (Table 2), our sampling of this genus remains limited and a taxonomically more inclusive analysis is needed before considering revising this genus.

Moura *et al.* (2012) could not draw conclusions on the monophyly of *Macrorhynchia* (Figure 2, G). Our results cautiously suggest the monophyletic status of this genus (Figure 3), keeping in mind the scarce taxon sampling and that the type species is not included (Table 2). Furthermore, the phylogenetic relationships between sampled species are

different considering the mitochondrial marker or the concatenated dataset. Based on the 16S, *Macrorhynchia* sp. n. does not seem to be closely related to other *Macrorhynchia*, while *M. phoenicea* (Busk, 1852), *M. spectabilis* (Allman, 1883) and *M. sibogae* (Billard, 1913) do not form robust clades (Figure 2). The addition of nuclear markers, on the other side, (1) supports the synonymy of *M. sibogae* and *M. phoenicea* suggested by Di Camillo et al. (2009), (2) calls into question the validity of *M. spectabilis* (Figure 3), and (3) highlights the relatedness of *Macrorhynchia* sp. n. to other *Macrorhynchia* species (Figure 3; PP = 1, BS = 100). Thus we concur that the genus *Macrorhynchia* is represented in our phylogeny by at least three species (*M. philippina*, *M. phoenicea* and *Macrorhynchia* sp. n.) with unclear phylogenetic relationships, explaining the doubtful monophyletic status of the genus. The taxon *Gymnangium*, defined by the absence of gonothecae protective structures, is divided into two clades: one basal to the Aglaopheniidae, composed of *G. hians* (Busk, 1852), *G. montagui* (Billard, 1912) [type species], *G. allmani* (Marktanner-Turneretscher, 1890) and *G. insigne* (Allman, 1876) (Figure 2, B) and another composed of *G. eximium* and *G. gracilicaule* related to *Lytocarpia* and *Macrorhynchia* (Figure 2, H). Once more, our results highlight that the morphological characters of the gonosome are not synapomorphic in this taxon, as for other Aglaopheniidae genera: the genus *Gymnangium* is composed of two divergent lineages (Figure 2, Table 2). These results confirm those from previous studies (Leclère et al. 2007; Moura et al. 2012). Thus, this study poses a straightforward question to taxonomists: what common characters explain the phylogenetic relatedness of *Macrorhynchia* species to *L. nigra* and the clade composed of *G. eximium* and *G. gracilicaule*, considering that the morphological characters of the gonosome are not valid? It should be noted that ca. one century ago, based on the trophosome characters (i.e. the whole animal except the temporary reproductive structures), Stechow (1921) proposed to split *Gymnangium* into three genera (*Gymnangium*, *Haliaria* and *Halicetta*).

One of our lineages (*G. gracilicaule* and *G. eximium*) enters in the genus *Halicetta* Stechow, 1921, while the second is still in *Gymnangium* sensu stricto. Thus the classification based on the trophosome seems, in this case, to be more representative of the phylogenetic relationships between some Aglaopheniidae clades. Morphological characters of the gonosome were used in the most recent attempt to classify the family Aglaopheniidae (Calder 1997) which defined two sub-families: Gymnangiinae Calder, 1997 and Aglaopheniinae Marktanner-Turneretscher, 1890, with two tribes within the second sub-family (Aglaopheniini Marktanner-Turneretscher, 1890 and Cladocarpiini Calder, 1997).

Moura et al. (2012) already highlighted that morphological characters of the gonosome are not linked to genetic lineages and the present study clearly supports their conclusion. With this classification criteria, three out of the six Aglaopheniidae genera studied (*Aglaophenia*, *Gymnangium* and *Lytocarpia*) are composed of several highly divergent lineages, based on mitochondrial and nuclear markers: our results reveal that the phyletic diversity of genera is probably underestimated by over 50% (Table 1). It must be noted, however, that all studied species form monophyletic groups: species seem to be identifiable via morphological characters. Thus, our results suggest that it could be important to insert new additional descriptive characters in the current taxonomy (gathering morphological, phylogenetic, ecological, metabolomic, proteomic data...). Once done, it would be interesting to test this approach on the genus *Gymnangium* by constructing a molecular phylogeny of the whole genus and comparing it to the classification proposed by Stechow (1921), potentially resurrecting several genera.

Conclusions

This phylogeny, based on several markers, reveals the high phyletic diversity of the Aglaopheniidae and is one of the necessary steps to re-assess the taxonomy of this notable hydrozoan family. Our results deliver an important message: we are able to identify Aglaopheniidae species in general, but we have a poor representation of the diversity and phylogenetic relationships of the genera within this family. An integrative approach (Dayrat 2005) must be used, in addition to a more comprehensive sampling, to improve our knowledge of this family. This method allowed the proposition of a new classification based on morphological characters representing phylogenetic relationships in the Corynidae (Johnston, 1838), another hydrozoan family with a problematic morphological classification including several poly- and paraphyletic genera (Nawrocki et al. 2010).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support from the French network *Bibliothèque du Vivant*, funded by *Centre National de Séquençage* (CEA), *Centre national de la recherche scientifique* (CNRS), the *Muséum National d'Histoire Naturelle* (MNHN), the *Institut national de recherche agronomique* (INRA), and from the *Laboratoire d'Excellence CORAIL* (HYDROSOOI program). We thank the USR 3278 CRIOBE staff and

L. Penin for sampling hydrozoans in Moorea. The first author was financially supported by a PhD contract from the STS Doctoral School of Reunion Island University. We thank Reshad Jhangeer-Khan (Mauritian Wildlife Foundation) for his corrections and proof reading.

Chapitre 3

L'importance de la diversité cryptique des Aglaopheniidae révélée par l'utilisation du modèle GMYC et des données microsatellites

Résumé

Les inventaires de biodiversité sont la première étape à toute mise en place de plans de conservation. Cependant, ces inventaires nécessitent une connaissance approfondie des taxons pour identifier et décrire les espèces. Afin d'accélérer les processus de description, des méthodes de délimitation d'espèces se basant sur des données génétiques ont été développées. Ainsi, le modèle GMYC (« general mixed Yule – coalescent »), se basant sur l'utilisation d'un seul locus, a été mis au point dans cette optique de description rapide de la biodiversité. Ce modèle cherche à identifier sur un arbre phylogénétique un point de transition entre processus de spéciation et événements de coalescence entre allèles du marqueur utilisé. Cette limite permet de délimiter des hypothèses d'espèces sous la forme de métapopulations indépendantes.

Nous avons appliqué ce modèle, en utilisant le marqueur mitochondrial 16S, pour explorer la diversité cryptique des Aglaopheniidae. En effet, la majorité des espèces de cette famille présente une distribution géographique couvrant plusieurs bassins océaniques, ce qui semble en contradiction avec le cycle de vie majoritaire des espèces de cette famille : elles présentent une *quasi* absence de phase de dispersion planctonique, ce qui devrait impliquer des aires de distribution relativement réduites. En outre, nous avons comparé les résultats à des tests d'assignement basés sur des données de génotypage de microsatellites chez deux espèces, *Lytocarpia brevirostris* et *Macrorhynchia phoenicea*.

Nos résultats mettent en évidence la diversité cryptique importante au sein des morpho-espèces de cette famille. En effet, une majorité des morpho-espèces étudiées présentent plusieurs lignées évolutives indépendantes. En outre, nos résultats soutiennent plusieurs cas de synonymie supposée entre morpho-espèces. Pour *L. brevirostris* les résultats du modèle GMYC et des tests d'assignement par approche bayésienne sont congruents et permettent de confirmer l'existence d'une espèce cryptique présente à la fois dans le Sud-Ouest de l'océan Indien et le Sud-Ouest de l'océan Pacifique. En ce qui concerne *M. phoenicea*, les résultats sont moins concluants, potentiellement à cause d'un échantillonnage insuffisant de plusieurs morpho-espèces phylogénétiquement proches. Néanmoins, les deux analyses confirment la divergence entre deux lignées de *M. phoenicea* dans le Sud-Ouest de l'océan Indien que nous n'avons pas réussi à différencier à l'aide de caractères de détermination (taille et forme de l'hydrothèque, de l'hydroclade et des structures de reproduction), mais distinguables sur la forme générale de la colonie.

Cette utilisation du modèle GMYC sur des séquences de morpho-espèces d'Aglaopheniidae suggère que la diversité cryptique au sein de cette famille est extrêmement élevée, potentiellement à cause des faibles capacités de dispersion de ses nombreuses morpho-espèces. Ce lien de causalité nécessite toutefois des études complémentaires avant d'être confirmé. Néanmoins, le modèle GMYC prouve ici son utilité dans une approche de taxinomie intégrative.

3. Extensive lineage and cryptic diversity in Aglaopheniidae (Hydrozoa) species revealed by GMYC models and microsatellite data

Bautisse Postaire^{1,2}, H       Magalon^{1,2}, Chloé A-F Bourmaud^{1,2}, J Henrich Bruggemann^{1,2}

1 : Université de La R       UMR ENTROPIE 9220, CS 92003, 97744 Saint Denis CEDEX 9, France

2 : Laboratoire d'Excellence CORAIL, www.labex-corail.fr

Abstract

Prospects for a comprehensive inventory of global biodiversity would be greatly improved by automating methods of species delimitation. The general mixed Yule – coalescent (GMYC) model, using single locus data, was recently proposed as a potential mean of increasing the rate of biodiversity exploration. We applied this method to explore the potential cryptic diversity of Aglaopheniidae, a hydrozoan family containing many morpho-species distributed widely in the Indo-Pacific region. For two morpho-species of this family, *Lytocarpia brevirostris* and *Macrorhynchia phoenicea* we further compared the outputs of the model to a Bayesian clustering analysis based on microsatellite data. Our analyses revealed widespread cryptic diversity in this family, almost every morpho-species presenting several independent evolutionary lineages, and supported previously hypothesized cases of synonymy. Comparison of results between the model and microsatellite data was congruent for *Lytocarpia brevirostris*, revealing the existence of a cryptic species inhabiting the South-West Indian Ocean and South-West Pacific. For *Macrorhynchia phoenicea*, results were inconsistent between sequence and microsatellite data, potentially because of insufficient sampling of several morpho-species. However, both analyses confirmed the divergence of two evolutionary lineages in the South-West Indian Ocean that could not be distinguished using morphological characters. GMYC analyses of mitochondrial DNA sequences from Aglaopheniidae suggested that its diversity might be extremely high, likely due to low dispersal capacities, although the link between life cycle and cryptic diversity needs further exploration. In conclusion, considering our results, the GMYC model seems highly valuable to reveal cryptic diversity in Aglaopheniidae; its application in an integrative framework might be very useful to describe the phyletic diversity of morphologically simple organisms.

Keywords: Aglaopheniidae, GMYC, evolutionary lineages, microsatellite, cryptic diversity

Introduction

The global biodiversity crisis requires focussing conservation efforts on key areas that ensure the long-term persistence of the greatest fraction of global biodiversity (Myers et al. 2000; Barnosky et al. 2011). The identification of such key areas requires assessments of alpha diversity, i.e. the number of species present in the area of interest. Historically, species have been described and identified based on morphological characters (Mayr 1942). However, morphological species delimitation methods do not integrate genetic diversity and thus might ignore potential cryptic species (i.e. two distinct species classified under the same taxonomic name based on morphological characters (Bickford et al. 2007)). Indeed, most evolutionary biologists concur that species and higher taxonomic levels form independent genealogic lineages of organisms (Mayden 2002; Samadi and Barberousse 2006) and the past decades have revealed the widespread existence of cryptic diversity among marine organisms, especially in marine invertebrates (Knowlton 1993; Palumbi 1995; Pfenninger and Schwenk 2007; Duda et al. 2008; Lindner et al. 2011; Hoareau et al. 2013; Huelken et al. 2013; Prada et al. 2014). Thus, the problem in species identification is not that of species definition but resides in the issue of choosing a criterion (e.g. morphology, ecology, genetic distances, etc.) to identify and delimit these lineages. There is no consensus on such a criterion (De Queiroz 1992; De Queiroz 2005; De Queiroz 2007) and the method used can possibly lead to a false representation of the evolution and the diversity of a taxon (Agapow et al. 2004). Traditional taxonomic work continues to be important for species inventories and conservation (Daugherty et al. 1990) but ignoring cryptic diversity leads to incomplete taxon sampling and erroneous assessments of biodiversity, biogeography and speciation processes (Heath et al. 2008). Eventually, protecting only the “visible biodiversity” will negatively affect conservation and management efforts of biodiversity and evolutionary processes (Moritz 1999; Moritz 2002; Briggs 2005). Among marine invertebrates, cnidarians in particular can be expected to host cryptic diversity due to the paucity of morphological characters used for description, identification and systematics. Such morphological clues do not necessarily represent phylogenetic relationships as evolution of reproductive, ecological and physiological traits do not always have morphologic outcomes (Stampar et al. 2012; Addamo et al. 2012; McFadden et al. 2014).

Among cnidarians, the class Hydrozoa is particularly subject to morphological plasticity and taxonomic incertitude (Bavestrello et al. 2000; Meroz-Fine et al. 2003; Bouillon et al. 2006; Miglietta et al. 2009). Species of this class are found in almost all aquatic ecosystems: poles to tropics, abyssal plains to shallow waters, freshwater and marine ecosystems (Bouillon et al. 2006). Recent phylogenies have shown that morphological characters thought to be taxonomically significant were in fact highly labile and plastic (Moura et al. 2008; Miglietta et al. 2009; Moura et al. 2012). Although few studies investigated cryptic diversity in hydrozoans, the existence of several cryptic species in cosmopolitan morpho-species was revealed by (Miglietta et al. 2007; Lindner et al. 2011). The majority of hydrozoan systematic studies are limited to mitochondrial genetic data, as they are using a DNA barcoding approach which was originally developed to help species identification by associating DNA sequences to type specimens (Hebert et al. 2003; Vernooij et al. 2010; Puillandre et al. 2011). Even if DNA barcoding, and genetic data in general, was not intended to be a species delimitation tool, several novel methods have been developed to use genetic data as a first step to delimit putative species, especially in taxa with limited comprehensive information (Carstens et al. 2013). Notably, these methods are useful in taxa lacking clear synapomorphies and species boundaries (such as hydrozoans) as they do not require prerequisite knowledge on studied organisms (Castelin and Lambourdière 2010; Esselstyn et al. 2012).

Some of the species delimitation methods are based on the *Generalized mixed Yule-coalescent* (GMYC) model (Pons et al. 2006; Fontaneto et al. 2010; Fujita et al. 2012). Using a likelihood function modelling evolutionary processes, this model states that each node of a phylogenetic tree corresponds to one of two possible events: divergence between species following a strict Yule process [no extinction; (Yule 1924)] or neutral coalescent events between lineages forming a species (Kingman 1982). As coalescent events are assumed to occur at higher rates than speciation, it is thus possible to identify a limit on the phylogenetic tree between interspecific and intraspecific divergence, delimiting clusters of leaves. Such clusters represent independent evolving lineages without gene flow, in which selection and genetic drift operates (Fujita et al. 2012), in other words species hypotheses. Although considered as efficient in identifying species limits (Puillandre et al. 2012) even when single individuals per species (singletons) represent an important proportion of the dataset (Talavera et al. 2013), some studies however highlighted the tendency of GMYC species delimitation methods to overestimate the number of species (Lohse 2009). Indeed, deeply divergent mitochondrial lineages do not always imply distinct species as divergence might be



Figure 1. Main sampling sites of Aglaopheniidae specimens used in this study for phylogenetic reconstruction.

the result of ancestral polymorphism, genetic introgression or hybridization (Ladner and Palumbi 2012). Furthermore, gene trees do not always reflect species evolution (Hoelzer 1997) and phylogenies must be discussed in an integrative framework that includes all available information (Dayrat 2005; Puillandre et al. 2009; Padial et al. 2010; Schlick-Steiner et al. 2010). This is the reason why we applied an additional species delimitation approach on two tropical Aglaopheniidae species: *Lytocarpia brevirostris* (Busk, 1852) and *Macrorhynchia phoenicea* (Busk, 1852). We used newly developed microsatellite markers to assess the congruence between GMYC models and population genetics data. Microsatellites data have been already been efficiently used for this purpose (Hausdorf and Hennig 2010; Hausdorf et al. 2011; Turini et al. 2014). Furthermore, this type of markers has the advantage of being co-dominant, bi-parentally inherited and neutral, unlike mitochondrial markers.

This study is the first to apply bioinformatics tools for species delimitation in hydrozoans and to explore cryptic diversity in the Aglaopheniidae family (Marktanner-Turneretscher, 1890). It aims to establish a link between molecular phylogenies and taxonomy and assist in clarifying taxonomic issues in a highly diversified family without clear synapomorphies and species limits (Postaire et al. submitted, Moura et al. 2012). Identifying putative species may facilitate the work of taxonomists: once species hypotheses are constructed, they can subsequently be compared to other sources of information (e.g. morphology, ecology...).

Material and Methods

Sampling

We collected samples manually, between 2007 and 2014, from shallow coral reefs habitats (0-40 m depth) of three marine provinces as defined by (Spalding et al. 2007). Six localities from two ecoregions of the Western Indian Ocean province were explored (WIO, Western/Northern Madagascar and Mascarene Islands), one locality in the Southeast Polynesian province (SEP, Moorea, Society Islands) and one in the tropical Southwestern Pacific province (SWP; New Caledonia) (Figure 1, Annexe 4). We prospected each sampling site for Aglaopheniidae morpho-species using SCUBA or snorkelling. We preferentially collected parts of the larger colonies (i.e. between 3 and 40 cm), referred herein to as individuals, and at several meters distance to limit the probability of sampling several times the same colony (genet). We identified individuals based on morphological characters and

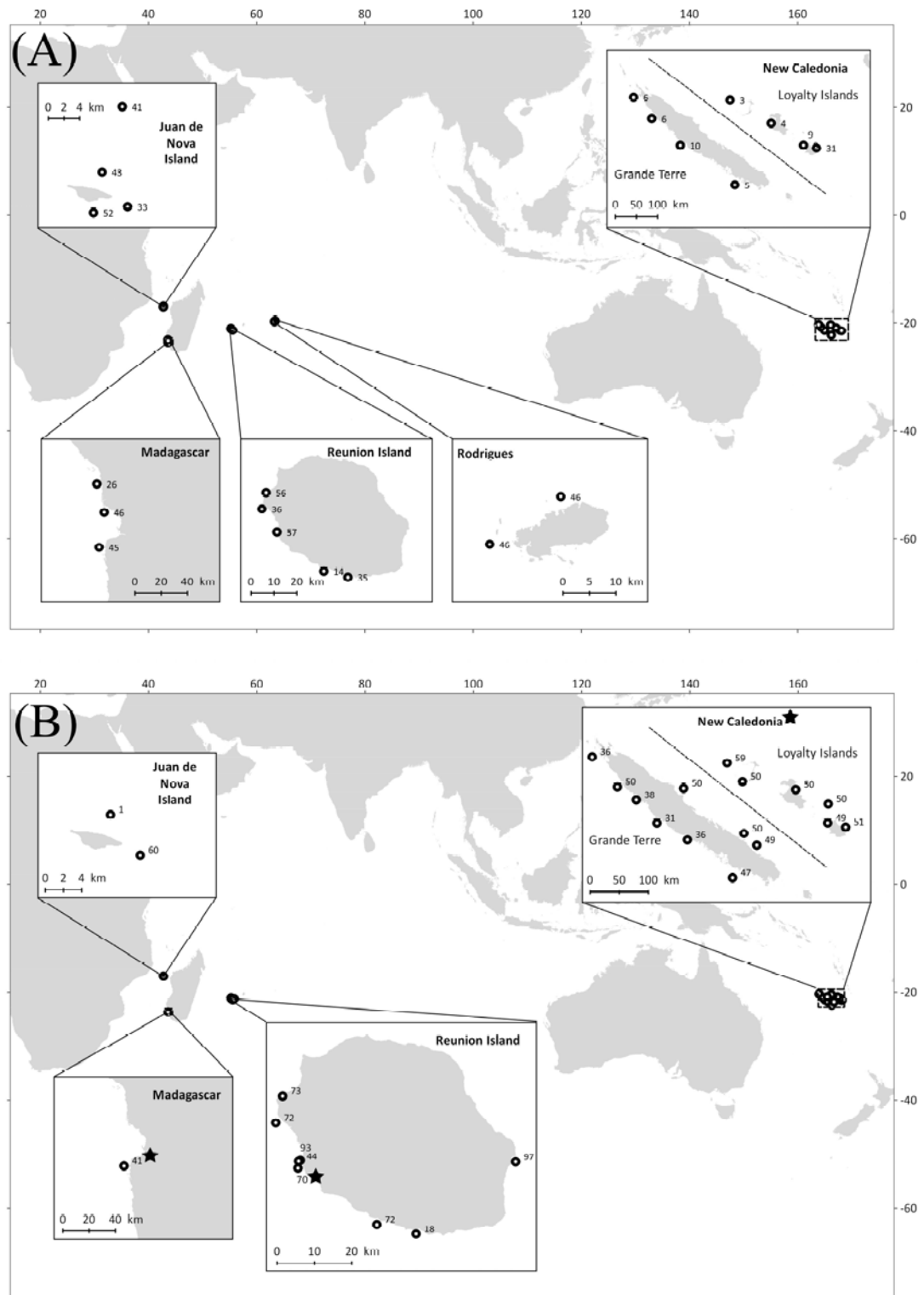


Figure 2. Populations' localisation and sampled number of colonies of *Lytocarpia brevirostris* (A) and *Macrorhynchia phoenicea* (A). Populations of *Macrorhynchia phoenicea* with A star indicates the localisation of the "bicolor" morph populations; all colonies of New Caledonia belonged to this group.

using the taxonomic literature [see references listed in (Gravier-Bonnet and Bourmaud 2006a, 2006b, 2012)]. We used the “Hydrozoa Handbook” (Bouillon et al. 2006) for species and genera lists. A minimum of 3 individuals per morpho-species were collected and sequenced. We used specimens that were fixed and preserved in 90% ethanol for DNA extraction. Whenever possible, a part of each sequenced specimen was also preserved in a 3% formalin solution in seawater. Samples are available on request and are stored in the laboratory at the Reunion Island University.

For population genetics analyses, we sampled individuals of *L. brevirostris* (n = 679, Figure 2A) and *M. phoenicea* (n = 1337, Figure 2B) following the same protocol as above at several locations in the Western Indian Ocean and in New Caledonia. During individual identification, we separated samples of *M. phoenicea* into two groups, “bicolore” and “gracile” morphs, based on the general aspect of the colonies. We could not distinguish these two groups on the basis of morphological characters of the hydrotheca.

DNA extraction

All reproductive structures were removed from colonies prior to DNA extraction. One or two hydrocauli per individual were used for extraction with DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) following manufacturer’s protocol. We assessed the extraction quality on a 0.8% agarose gel stained with GelRed Nucleic Acid Stain, 10000X in DMSO (Gentaur).

Mitochondrial marker sequencing

We amplified and sequenced a fragment of the 16S rRNA (16S) mitochondrial gene with primers SHA (5’-ACG GAA TGA ACT CAA ATC ATG T-3’) and SHB (5’-TCG ACT GTT TAC CAA AAA CAT A-3’) (Cunningham and Buss 1993). PCR reactions were conducted in 30 µL: 10 µL of ultra-pure water, 15 µL (0.625U) of AmpliTaq mix (Applied Biosystems), 0.5 µL of each primer (10µM) and 4 µL of template DNA (10 ng/µL). The PCR consisted in (5 min at 95°C), (30 s at 94°C; 30 s at 46°C; 1 min at 72°C) x 5, (30 s at 94°C; 30 s at 51°C; 1 min at 72°C) x 30, and (5 min at 72°C). PCR products were visualized on a 1% agarose gel stained with GelRed Nucleic Acid Stain, 10000X in DMSO (Gentaur). PCR products were sequenced in both directions at the Genoscope (CEA Evry, France) and by Genoscreen (Lille, France) on capillary sequencer ABI3730XL.

Microsatellite amplification and genotyping

We used the microsatellite markers developed for *Lytocarpia brevirostris* (Postaire et al. in press) and *Macrorhynchia phoenicea* (Postaire et al. submitted). All forward microsatellite primers used in this study were extended with a universal M13 tail (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'). This allowed for a cost-efficient fragment length analysis by hybridizing universal dye-labelled oligonucleotides in a two-step PCR, as described by (Schuelke 2000). The reactions were carried out in a 10 µL reaction volume containing: 2 µL of template DNA (10 ng/µL), 0.25 µL of each primer (M13-forward primer: 1 µM; reverse primer: 10 µM), 2.25 µL of ultra-pure water, 0.25 µL of the dye-labelled M13-extension (10 µM) and 5 µL AmpliTaq mix (Applied Biosystems). The PCR consisted in (5 min at 95°C), (30 s at 94°C; 30 s at 62°C; 1 min at 72°C, -1°C per cycle) x 7, (30 s at 94°C; 30 s at 55°C; 1 min at 72°C) x 30, (30 s at 94°C; 30 s at 56°C; 30 s at 72°C) x 8 and (5 min at 72°C). The fragments were amplified using four different fluorescent dye labels (6-FAM, VIC, NED, PET; Applied Biosystems). Fragment analysis was performed on an ABI Prism 3730 automated sequencer (Applied Biosystems) at the Plateforme Gentyane (Clermont-Ferrand, France) of the Institut National de Recherche Agronomique (INRA). Genotypes were analysed using GeneMapper v.4 (Applied Biosystems).

Phylogenetic analysis

Sequences were checked and edited using Geneious 6.0 (Kearse et al. 2012) and deposited on GenBank (Annexe 4). Additional 16S sequences previously published (Moura et al. 2008) were retrieved from GenBank (Annexe 4).

Sequences were aligned using MAFFT (Katoh et al. 2005) and trimmed to the shortest sequence. JModeltest v.2.5 (Posada 2008; Darriba et al. 2012) identified the GTR+I+G model as the best substitution model based on AICc criterion. GMYC analyses require an ultrametric tree (i.e. calibrated with a molecular clock), which was constructed using BEAST 2.1.1. (Bouckaert et al. 2014). We used a relaxed log-normal clock with a coalescent tree prior as these have been identified as best prior parameters to use in GMYC analyses (Monaghan et al. 2009; Esselstyn et al. 2012). Monte Carlo Marko chains (MCMC) ran for $35 \cdot 10^6$ generations, sampling every 3 500 generations. Chains convergence was assessed using Tracer 1.6 (Rambaut et al. 2013). The consensus tree (maximum clade credibility tree;

10% burn-in) was constructed with TreeAnnotator 1.7 (Rambaut and Drummond 2013). All analyses were performed on unique haplotypes only as it does not impact the GMYC analysis and it allows to reduce computation time (Talavera et al. 2013).

Species delimitation with coalescent model

We used the GMYC method developed by (Pons et al. 2006) and (Monaghan et al. 2009) implemented in R (R Development Core Team 2004) with the package *ape* (Paradis et al. 2004) to define GMYC entities. To account for uncertainty in species delimitation, we used three applications of this method: (1) the single-threshold species delimitation GMYC model, (2) the multiple threshold species delimitation GMYC model using the package *splits* (Ezard et al. 2009) and (3) Bayesian GMYC (bGMYC) model developed by (Reid and Carstens 2012) in the package *bGMYC*.

Using the consensus tree, single- and multiple threshold GMYC species delimitation models allow identifying one or several thresholds, respectively, dividing coalescent and Yule processes on the tree (Monaghan et al. 2009). The second model allows variation of evolution rates along branches and thus several shift points between Yule and coalescent processes across the phylogenetic tree. We compared the results and the likelihood of these two models. Reid and Carstens (2012) developed a Bayesian implementation of the GMYC model that accounts for uncertainty in the phylogeny and model parameters by sampling trees and conducting MCMC. This application gives marginal probabilities to species hypotheses. As recommended by the authors, we conducted the Bayesian GMYC analysis by resampling the tree file generated by BEAST at a lower frequency, resulting in 100 trees (one every 350 000 generations). Each of the 100 trees was re-run for 50 000 generations, with 40 000 generations of burn-in and sampling every 100 steps, resulting in 100 new trees per initially sampled tree. In fine, 10 000 new trees were used for the bGMYC analysis. First runs suggested that MCMC chains reached stationarity after 5 000 generations. MCMC estimates from each tree were pooled to calculate the probabilities that two leaves in the phylogeny are conspecific. We set the probability of two leaves being conspecific at 0.90 or higher i.e. each GMYC cluster has a minimum probability of 0.90 to represent a species. This threshold was used because these clusters corresponded to robust genetic clades and morphological characters mostly supported the clusters identified using this value. We excluded lower threshold values: it conducted to identify as species hypotheses larger clades, composed of several morpho-species with distinct reproductive systems. As GMYC model

methods have a general tendency to over-estimate the true number of species from the dataset, we compared the congruence between the two GMYC methods (i.e. best of single- or multiple threshold versus Bayesian) and conserved GMYC entities found in both.

Microsatellite data analysis

Prior to further analysis, identical multilocus genotypes (MLGs) were identified with GENCLONE (Arnaud-Haond and Belkhir 2007) using the maximum set of loci for each sampling location and analysis were conducted on unique MLGs only. We estimated the number of populations and conducted population assignment of individuals using methods implemented in STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). The analysis assigns individual nuclear MLGs of all individuals (n) probabilistically to one of K (K is user-defined) clusters so that Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) is maximized and linkage disequilibrium (LD) minimized in each cluster.

For *L. brevirostris*, a first analysis was conducted using 15 microsatellites loci and individuals for which the 16S was sequenced (55 genotyped individuals over 69 sequenced individuals). As the small number of samples might violate the model assumption, we subsequently analysed the whole dataset of *L. brevirostris* (506 MLGs). We eliminated markers presenting a high proportion of missing data ($\geq 10\%$), resulting in 10 usable loci. Bayesian clustering of the *M. phoenicea* complex (see results) was conducted using 8 loci, first using only the genotyped individuals (18 out of 21 individuals sequenced) and then using the entire dataset (1087 MLGs).

We ran STRUCTURE using the admixture model with default settings for inferring alpha and the correlated allele frequency model, without any location or population priors. As the number of sampled populations in *L. brevirostris* was lower than in *M. phoenicea*, we set the number of clusters to range from $K = 1$ to $K = 10$ for the former and to a range from $K = 1$ to $K = 20$ for the latter. The program was run as four iterations of 500,000 MCMC generations after an initial burn-in of 50,000 generations for each K . (Evanno et al. 2005) proposed a method to choose the most likely K by analysing the second-order rate of change of the posterior probability (PP) of the data (ΔK) between successive K values, which was done using Structure Harvester v.0.6.94 (Earl and vonHoldt 2012). Results files were permuted using CLUMPP v.1.1.2 (Jakobssen and Rosenberg 2006) and visualized using DISTRUCT v.1.1 (Rosenberg 2004).

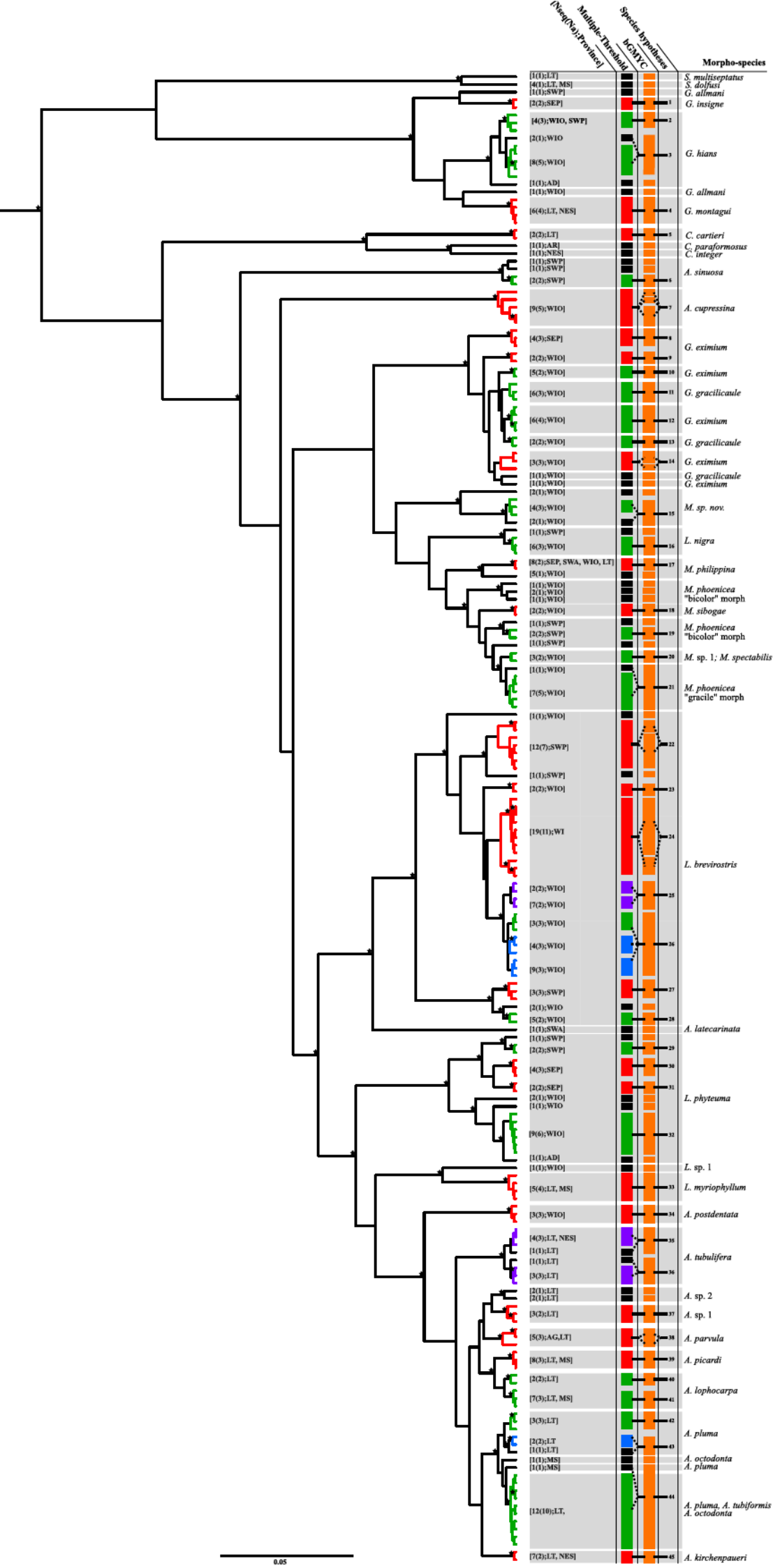


Figure 3. Maximum clade credibility tree generated by BEAST from 16S gene sequences with results of the multiple threshold GMYC analysis, bGMYC analysis (with a 0.90 probability of being conspecific), the 45 species hypotheses based on both GMYC analyses, and morpho-species. A star indicates tree nodes with posterior probability ≥ 0.95 . Distances are expressed in relative divergence time assuming a relaxed lognormal molecular clock. *A.*: *Aglaophenia*; *C.*: *Cladocarpus*; *G.*: *Gymnangium*; *L.*: *Lytocarpia*; *M.*: *Macrorhynchia*; *S.*: *Streptocaulus*. Outgroups have been removed. Terminals are labelled with the number of sequences (Nseq), the number of unique haplotypes (Na) enclosed in parentheses and the sampling marine provinces. AD: Andaman; AG: Agulhas; AR: Arctic; LT: Lusitania; MS: Mediterranean Sea; NES: Northern European seas; SEP: Southeastern Polynesia; SWA: warm temperate Southwestern Atlantic; SWP: Southwestern tropical Pacific; WIO: Western Indian Ocean. Coloured clusters on the tree indicate species hypotheses identified by the four thresholds GMYC model and black bars represent singletons. Orange vertical bars indicate species hypotheses identified by the bGMYC analysis. Grey rectangles indicate morpho-species (N.B.: *A. pluma*, *A. octodonta* and *A. tubiformis* are not monophyletic).

Table 1. List of morpho-species and corresponding GMYC entities as defined by multiple-thresholds (number of clusters and singletons per morpho-species) and bGMYC (number of putative species per morpho-species using a probability of 0.90 for two haplotypes of being conspecific). Number of individuals (Nseq), unique haplotypes (Na) and sampling region are indicated.

	Nseq	Na	Sampling Province	GMYC multiple threshold entities		bGMYC entities	Species hypotheses
				clusters	singletons		
<i>Aglaophenia cupressina</i> Lamouroux, 1816	9	5	WIO	1	0	3	7
<i>Aglaophenia kirchenpaueri</i> (Heller, 1868)	7	2	LT; NES	1	0	1	45
<i>Aglaophenia latecarinata</i> Allman, 1877	1	1	SWA	NA	1	1	
<i>Aglaophenia lophocarpa</i> Allman, 1877	9	5	LT; MS	2	0	2	40; 41
<i>Aglaophenia octodonta</i> (Heller, 1868)	2	2	LT; MS	1	1	2	44
<i>Aglaophenia parvula</i> Bale, 1882	5	3	AG; LT	1	0	2	38
<i>Aglaophenia picardi</i> Svoboda, 1979	8	3	LT; MS	1	0	1	39
<i>Aglaophenia pluma</i> (Linnaeus, 1758)	15	13	LT; MS	1	1	1	44
<i>Aglaophenia postdentata</i> Billard, 1913	3	3	WIO	1	0	1	34
<i>Aglaophenia sinuosa</i> Bale, 1888	4	4	SWP	1	2	3	6
<i>Aglaophenia</i> sp. 1	5	3	LT	1	0	1	37
<i>Aglaophenia</i> sp. 2	4	2	LT	0	2	2	
<i>Aglaophenia tubiformis</i> Marktanner-Turneretscher, 1890	3	3	LT; MS	1	0	1	44
<i>Aglaophenia tubulifera</i> (Hincks, 1861)	9	8	LT; NES	2	2	2	35; 36
<i>Cladocarpus cartieri</i> Bedot, 1921	2	2	LT	1	0	1	5
<i>Cladocarpus integer</i> Sars, 1874	1	1	NES	NA	1	1	
<i>Cladocarpus paraformosus</i> Schuchert, 2000	1	1	AR	NA	1	1	
<i>Gymnangium almanii</i> (Marktanner-Turneretscher, 1890)	2	2	WIO; SEP	0	2	2	
<i>Gymnangium eximium</i> (Allman, 1874)	21	15	WIO; SEP	5	1	7	8; 9; 10; 12; 14
<i>Gymnangium gracilicaule</i> (Jäderholm, 1903)	9	6	WIO	2	1	3	11; 13
<i>Gymnangium hians</i> (Busk, 1852)	14	9	WIO; SWP; AD	2	2	3	2; 3
<i>Gymnangium insigne</i> (Allman, 1876)	2	2	SEP	1	0	1	1
<i>Gymnangium montagui</i> (Billard, 1912)	6	4	LT; NES	1	0	1	4
<i>Lytocarpia brevirostris</i> (Busk, 1852)	69	41	WIO; SWP	10	3	12	22; 23; 24; 25; 26; 27; 28
<i>Lytocarpia myriophyllum</i> (Linnaeus, 1758)	5	4	LT; MS	1	0	1	33
<i>Lytocarpia nigra</i> (Nutting, 1905)	7	4	WIO; SWP	1	1	2	16
<i>Lytocarpia phyteuma</i> (Kirchenpauer, 1876)	22	17	WIO; SWP; SEP	4	4	8	29; 30; 31; 32
<i>Lytocarpia</i> sp. 1	1	1	WIO	NA	1	1	
<i>Macrorhynchia philippina</i> (Kirchenpauer, 1872)	13	3	WIO; SEP; SWA; LT	1	1	2	17
<i>Macrorhynchia phoenicea</i> (Busk, 1852); “bicolor” morph	8	7	WIO; SWP	1	5	6	19

Results

16S variability in Aglaopheniidae

A total of 37 morpho-species were used in this study. A set of 236 sequences of 537 base pairs, with 166 unique haplotypes was generated and analysed; this dataset comprised 372 polymorphic sites, 165 identical sites (30.7%), 40 singleton sites, 82.3% pairwise identity and a GC content of 23.6% (base composition: A = 41.8%, C = 15.2%, G = 14.5%, T = 28.5%). The 16S sequences of *M. phoenicea* (“bicolor” morph) presented a deletion of 95 base pairs when compared to the other Aglaopheniidae sequences, even the other *M. phoenicea* morph (“gracile”). The phylogeny produced by BEAST and the results of GMYC analyses are presented in Figure 3 (right and left, respectively). Before analysis and after the tree construction, all outgroups were pruned from the tree.

Outputs of GMYC models

The single threshold model (phylogeny composed of several species with one coalescent time value) was preferred over the null model (single species phylogeny with only coalescent processes; $P < 0.05$). This model identified 38 GMYC clusters (95% Confidence Interval = [2-50]). Based on AICc scores, the multiple threshold model was not only preferred over the null model ($P < 0.001$) but also performed slightly better than the single threshold model (AICc multiple = -2933; AICc single = -2927); therefore the latter was excluded from further analyses. The multiple threshold model identified four independent switches between speciation and coalescent processes, resulting in 48 GMYC clusters (95% Confidence Interval = [34-48], Figure 3). Except 38 singletons, all of the 194 haplotypes were classified into GMYC clusters (Figure 3) and 33 GMYC clusters out of 48 (69%) identified by the multiple threshold model yielded a nodal Posterior Probability (PP) ≥ 0.95 . Eleven GMYC clusters correspond to taxonomic entities (i.e. morpho-species) whereas all others split nominal morpho-species into several clusters (Figure 3).

The bGMYC analysis identified 44 clusters presenting a probability ≥ 0.90 of being conspecific. Over the 82 GMYC entities identified, 35 represented singletons and 34 bGMYC clusters out of 47 (72%) yielded a nodal PP ≥ 0.95 (Figure 3) over 37 morpho-species sampled.

<i>Macrorhynchia phoenicea</i> (Busk, 1852); “gracile” morph	8	6	WIO	1	1	2	21
<i>Macrorhynchia sibogae</i> (Billard, 1913)	2	2	WIO	1	0	1	18
<i>Macrorhynchia</i> sp. 1	1	1	WIO	NA	0	0	20
<i>Macrorhynchia</i> sp. n.	8	5	WIO	1	2	2	15
<i>Macrorhynchia spectabilis</i> (Allman, 1883)	2	1	WIO	1	0	1	20
<i>Streptocaulus dolfusi</i> (Billard, 1924)	4	1	LT; MS	NA	1	1	
<i>Streptocaulus multiseptatus</i> (Bale, 1915)	1	1	LT	NA	1	1	

Comparison of models outputs

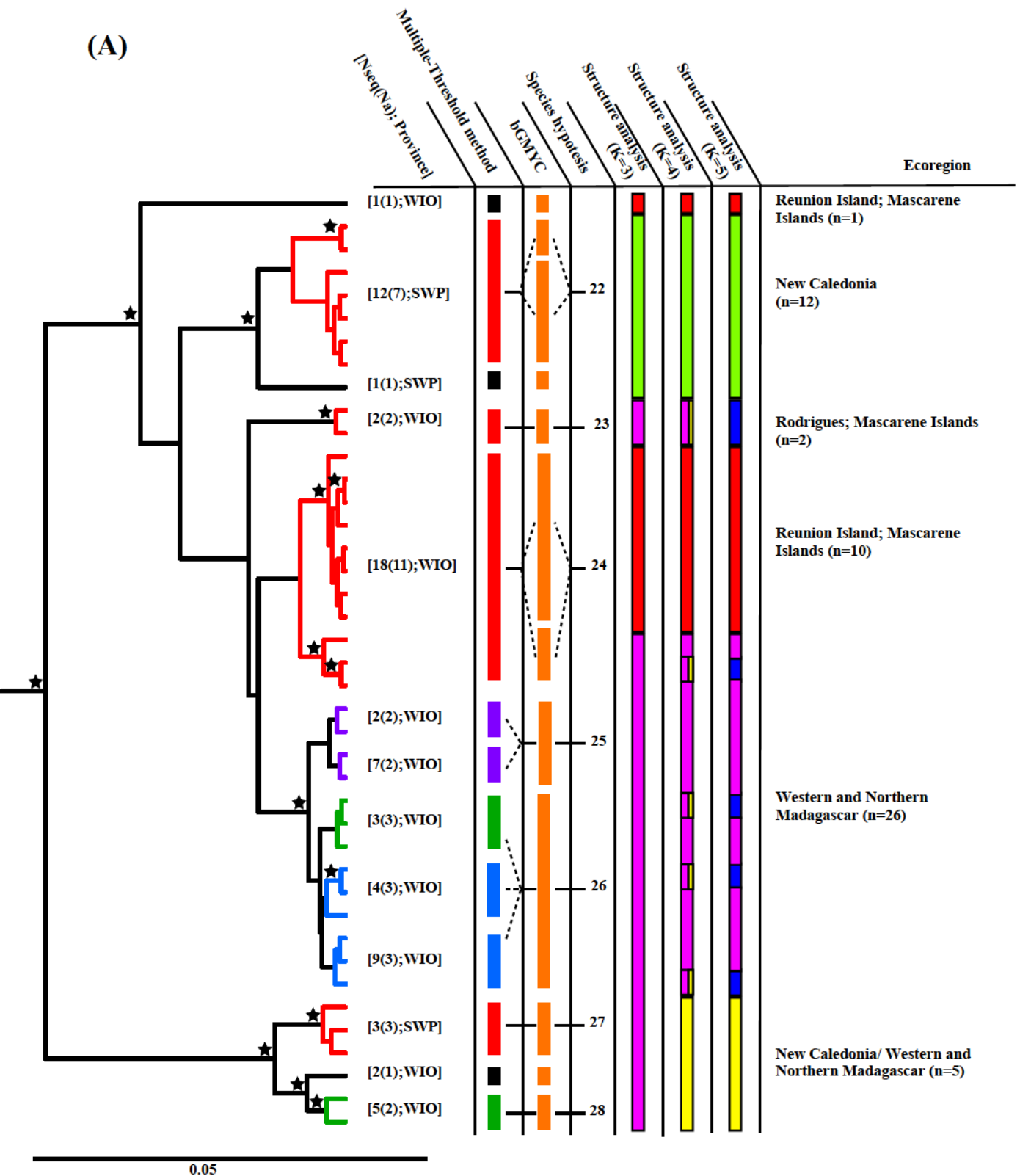
The comparison of the multiple threshold and bGMYC methods led to the identification of 45 GMYC clusters (Figure 3, Table 1), referred hereafter as species hypotheses (SH). GMYC models highlighted incongruences between genetic and morphological data: *Aglaophenia pluma*, *A. tubiformis* and *A. octodonta* form a polyphyletic complex (SH 42 to 44) as do *Gymnangium eximium* and *G. gracilicaule* (SH 8 to 14) and *Macrorynchia phoenicea* (bicolor and gracile morphs were monophyletic), *M. spectabilis*, *M. sibogae* and *M. sp.1* (SH 18 to 21) (Figure 3, Table 1). Seven nominal morpho-species were represented by singletons (*Streptocaulus multiseptatus*, *S. dolfusi*, *Cladocarpus integer*, *C. paraformosus*, *A. harpago*, *A. latecarinata*, *Lytocarpia sp.1*) and two morpho-species were each represented by two un-clustered singletons (*G. almanii* and *A. sp.2*). All other singletons were assigned to nominal morpho-species also represented by clustered haplotypes.

Three morpho-species (*A. tubulifera*, *L. phyteuma*, *L. brevirostris*) were composed of at least two, four and seven SH, respectively, when excluding singletons (Figure 3, Table 1). For *L. phyteuma*, these clusters were partly related to the geographic origin of samples: one (SH 29) in the Southeast Polynesian province, two in the Southwestern Pacific Ocean (SH 30 and 31) and one in the Western Indian Ocean (SH 32). For *L. brevirostris*, GMYC entities were not only related to the geography: SH 23 to 26 were found in the same geographic region (Western Indian Ocean) and form a robust clade, more related to SH 22 (Southwestern Pacific Ocean) than to SH 28 from the Western Indian Ocean and SH 27 from the Southwestern Pacific Ocean.

Species delimitation in *Lytocarpia brevirostris* and *Macrorynchia phoenicea* based on microsatellite data

For *L. brevirostris*, mean estimates of posterior probabilities of the microsatellite data of 55 individuals calculated with STRUCTURE for a given cluster number slowly increased with K to attain a maximum at $K = 5$. The statistic ΔK showed a maximum at $K = 3$ and a second peak at $K = 5$. For $K = 2$, one cluster was formed by individuals belonging to SH 22, 27 and 28, which were highly divergent entities based on the sequence data (Figure 4A).

(A)



(B)

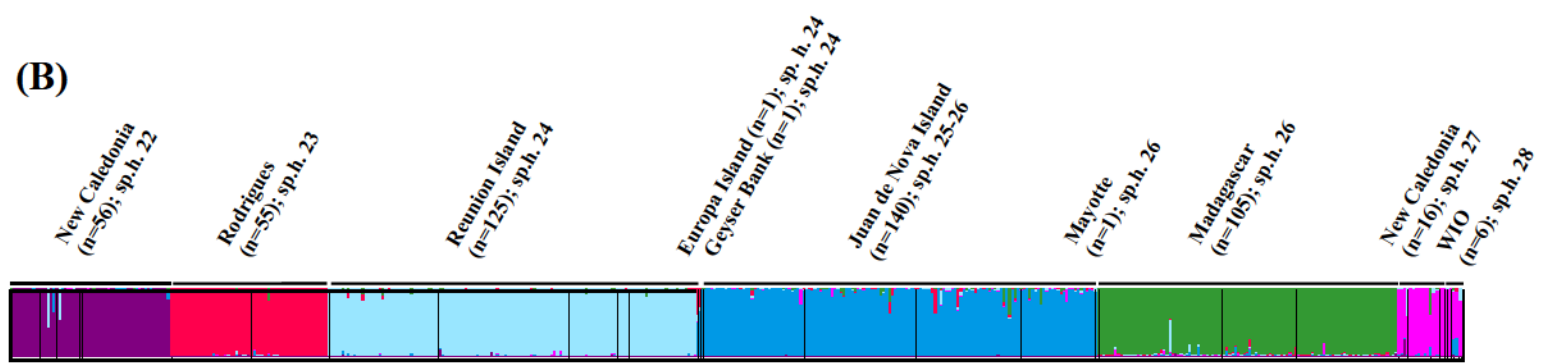


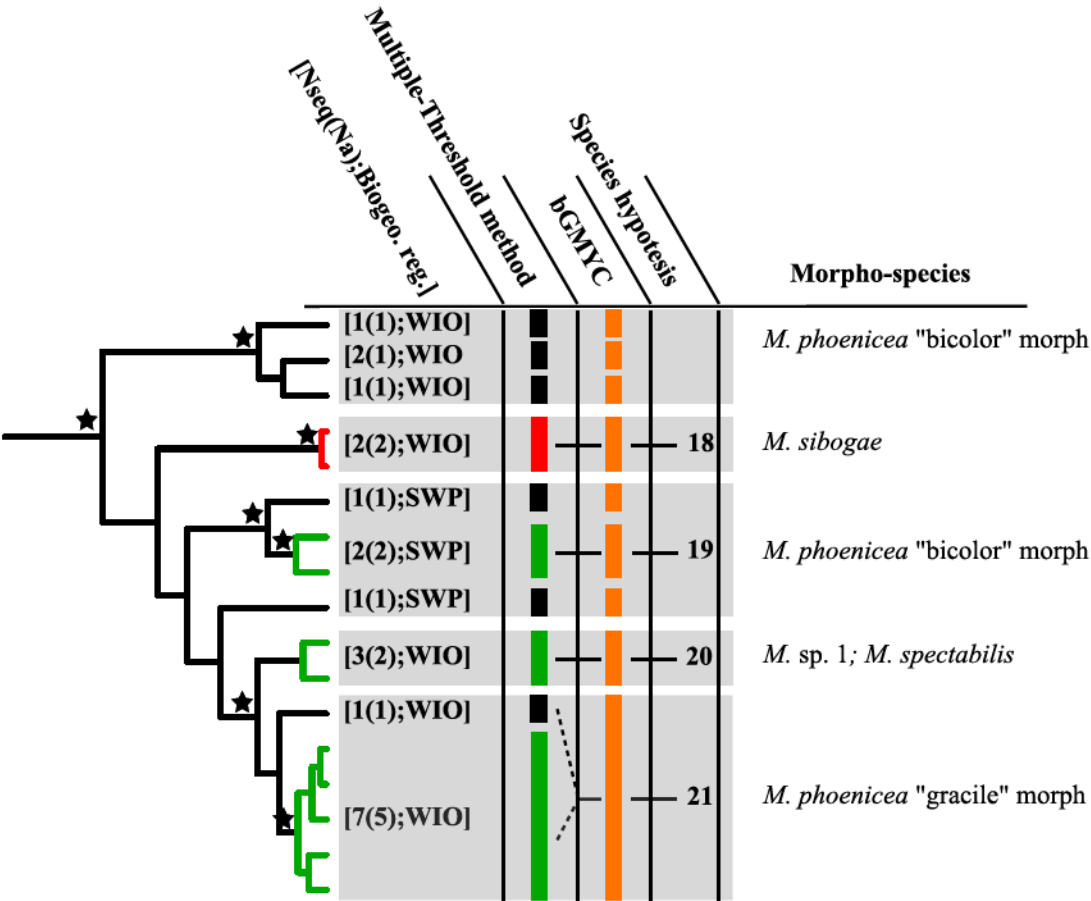
Figure 4. Sub-tree of *L. brevirostris* corresponding to the maximum clade credibility tree generated by BEAST from 16S gene sequences with results of the multiple threshold GMYC analysis, bGMYP analysis (with a 0.90 probability of being conspecific) (A) with Structure outputs ($n = 55$) for $K = 2$ to $K = 5$ using sequenced individuals only and Structures outputs for the entire dataset (B, $n = 506$). A star indicates tree nodes with posterior probability ≥ 0.95 . Distances are expressed in relative divergence time assuming a relaxed lognormal molecular clock. Terminals are labelled with the number of sequences (Nseq), the number of unique haplotypes (Na) enclosed in parentheses and the sampling marine provinces. SWP: Southwestern tropical Pacific; WIO: Western Indian Ocean. Coloured clusters on the tree and coloured vertical bars indicate species hypotheses identified by the four thresholds, respectively, and black bars represent singletons. Orange vertical bars indicate species hypotheses identified by the bGMYP analysis.

At $K = 3$, the identified clusters corresponded mostly to individuals sampled in the same geographic location: (1) one cluster for New Caledonia (SH 22), (2) one clustering all individuals from Reunion Island (part of SH 24 plus a non-clustered sequence), and (3) one cluster comprising individuals from other locations of the Western Indian Ocean and New Caledonia (SH 23, 25 to 28 and the remaining's of SH 24, sampled in the Western Indian Ocean except Reunion Island) (Figure 4A). At $K = 4$, the third cluster splitted in two parts and individuals from SH 27 and 28 were gathered together, whereas all individuals from the Western Indian Ocean (Mozambique Channel and Rodrigues) were clustered together with some incertitude in the assignment of the two individuals from Rodrigues and several individuals from Juan de Nova and Madagascar. For $K = 5$, the cluster formed by individuals of the Western Indian Ocean splitted in one cluster formed by individuals of Juan de Nova Island and another composed by samples from Rodrigues, Juan de Nova Island and Madagascar (Figure 4A). The analysis of the whole dataset of *L. brevisrostris* (463 MLGs) based on 10 loci showed that the statistic ΔK presented a clear maximum at $K = 6$: five clusters correspond to major sampling sites plus a cluster formed by individuals from Western Indian Ocean and Southwestern Pacific Ocean, containing all individuals from SH 27 and 28 (Figure 4B).

For the *M. phoenicea* complex, Bayesian clustering analyses of the sequenced samples ($n = 18$) did not converge to a single scheme (data not shown), potentially because several biogeographical regions were represented by only few samples (Figure 5A). Indeed, STRUCTURE intends to create populations where HWE is maximized and LD minimized, which might be difficult considering only sequenced samples (from 2 to 8 individuals per gmyc entity). For the entire dataset ($n = 1087$ MLGs), ΔK showed a maximum at $K = 2$, a second peak at $K = 7$ and a third one at $K = 14$. The first peak corresponded to the clustering of samples according to their origin: Southwestern Pacific Ocean versus Western Indian Ocean (Figure 5B). As this clustering was consistent with increasing values of K , we decided to use samples from the Western Indian Ocean and all individuals from the phylogeny in a second analysis.

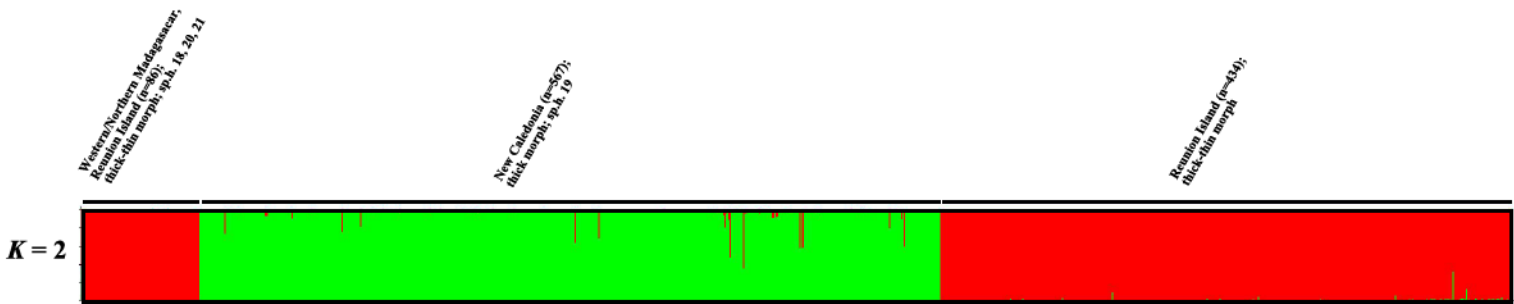
This second round was conducted from $K = 1$ to $K = 10$. In the Western Indian Ocean ($n = 524$), the statistic ΔK showed a maximum at $K = 5$, with a first peak at $K = 3$. At $K = 3$, (1) one cluster regrouped all individuals from Reunion Island identified as *M. phoenicea* 'bicolor morph' plus all individuals from New Caledonia corresponding to SH 19, (2) a

(A)



(B)

Entire dataset: n = 1087; WIO and SWP



WIO only: n = 524

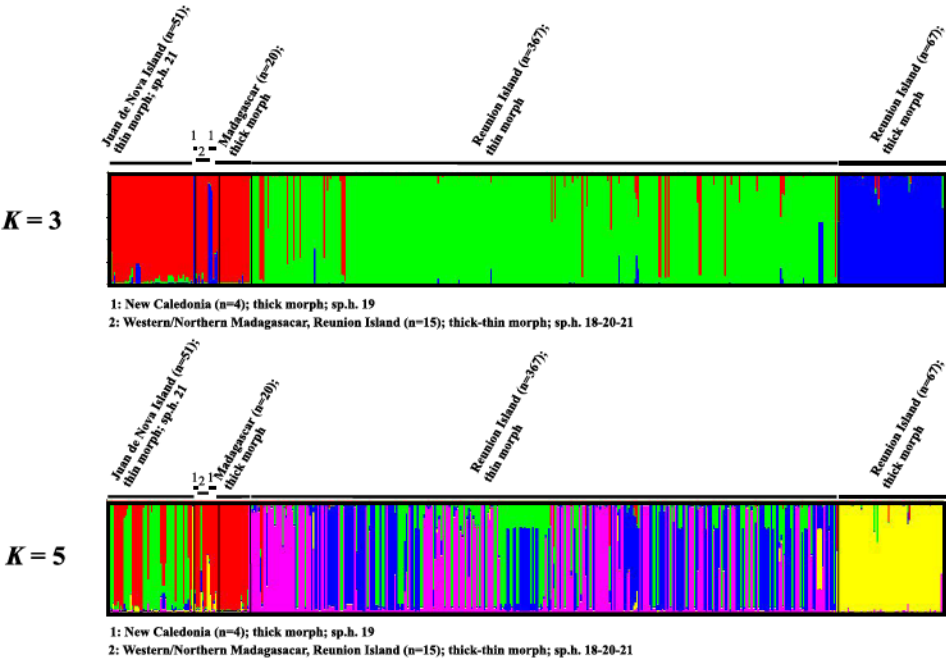


Figure 5. Sub-tree of *M. phoenicea* complex corresponding to the maximum clade credibility tree generated by BEAST from 16S gene sequences with results of the multiple threshold GMYC analysis, bGMYC analysis (with a 0.90 probability of being conspecific) (A) and Structures outputs using for the entire dataset (n = 1067) for the first round and individuals from the WIO (n = 524) for the second round (B). A star indicates tree nodes with posterior probability ≥ 0.95 . Distances are expressed in relative divergence time assuming a relaxed lognormal molecular clock. Terminals are labelled with the number of sequences (Nseq), the number of unique haplotypes (Na) enclosed in parentheses and the sampling marine provinces. SWP: Southwestern tropical Pacific; WIO: Western Indian Ocean. Coloured clusters on the tree and coloured vertical bars indicate species hypotheses identified by the four thresholds, respectively, and black bars represent singletons. Orange vertical bars indicate species hypotheses identified by the bGMYC analysis.

second cluster gathered all individuals from the Northern and Western Madagascar ecoregion (bicolor and gracile morphs indistinctly) plus all doubtful morpho-species and the sequenced samples from Reunion Island “gracile morph”, corresponding to SH 18, 19, and 21; and (3) a cluster composed of all other samples from Reunion Island “gracile morph” (Figure 5B). For $K=5$, (1) the cluster composed by Reunion Island “bicolor morph” individuals was also recovered, (2) samples from Reunion Island “gracile morph” were spread among three clusters, and (3) samples from Western and Northern Madagascar were spread among two clusters (bicolor and gracile morphs indistinctly), clustering with all doubtful morpho-species and the sequenced samples from Reunion Island “gracile morph” (Figure 5B). The inconsistent clustering scheme might reflect of a low number of individuals per morpho-species, especially for *M. spectabilis* and *M. sibogae*, but might also be the result of scoring errors and the mixing of phylogenetic and population genetics information. Nevertheless, the divergence between the bicolor and gracile morphs from Reunion Island was also recovered from the microsatellite data.

Discussion

We used the mitochondrial marker 16S to study lineage diversity in Aglaopheniidae and detect potential cryptic species. The multiple threshold GMYC method identified 48 SH, bGMYC identified 44 SH. and the combination of both methods outputs led to the identification of 45 SH (Figure 3, Table 1). Identified SH do not always correspond to morpho-species, revealing potential cases of synonymy and the presence of independent lineages within several morpho-species. Nevertheless, the majority of recovered morpho-species are monophyletic and SH within morpho-species are most often related to geographic origin (Figure 3, *L. phyteuma*, *L. brevirostris*, *M. phoenicea* complexes).

Life cycle and evolutionary lineages

High diversity of independent lineages in widely distributed hydrozoan species has already been documented for another brooding hydrozoa morpho-species: *Plumularia setacea* (Schuchert 2014). Using extensive sampling over its assumed global distribution range, the author uncovered that each sampling locality presented highly divergent geographically delimited lineages, but lacking clear morphological distinctions. The author

argued that this result might not reflect ecological factors and morphological convergence, as sampled individuals were sampled in “similar ecosystems”. It is more likely the outcome of a low dispersal capacity of this taxon, as incubating larvae might reduce geneflow, but the relationship between pelagic larval duration and dispersal capacity measured via population genetics is not straightforward (Ayre and Hughes 2000; Teske et al. 2007; Siegel et al. 2008; Shanks 2009; Weersing and Toonen 2009; Faurby and Barber 2012). When considering species with potentially high dispersal capacities, genetic exchanges across ocean basins can be limited due to the presence of biogeographic barriers (Ridgway and Sampayo 2005; Ayre et al. 2009; Muths et al. 2011). However, in several Ophioridae species, the presence of a planktotrophic larva was associated with a low phylogenetic diversity across ocean basins, whereas lecithotrophic taxa presented important cryptic diversity and allopatric speciation over relatively small geographic scales (Hoareau et al. 2013). Thus the link between life cycle strategies and diversification processes is not always clear. In the family Aglaopheniidae, the majority of morpho-species are brooders. Polyps incubate their larvae, which are released only when mature and ready to settle (Millard 1975; Boero and Bouillon 1993; Bouillon et al. 2006). Such reproductive strategies might facilitate vicariant events and allopatric speciation, (Paulay and Meyer 2002). However, several taxa of this family present a reduced medusa stage in their life cycle and thus have potentially higher dispersal capacities.

In the present study *Gymnangium hians* and *Macrorhynchia philippina* have a reduced medusa stage (Millard 1975; Bourmaud and Gravier-Bonnet 2004) and were represented by a few SH and singletons, composed of individuals inhabiting distinct biogeographical provinces. In contrast, species with supposedly lower dispersal capacities (brooders) presented a higher number of independent lineages: *L. phyteuma* and *L. brevirostris* were composed of several robust clades occurring either in distinct, or within the same biogeographic provinces. Thus, in the light of our results, larval brooding seems to limit a taxon’s dispersal capacities and hence the connectivity between populations, potentially enhancing diversification opportunities in Aglaopheniidae, but this aspect needs a more comprehensive sampling of the family to be explored. Nevertheless, while the majority of Aglaopheniidae morpho-species are thought to present global distributions (Costello et al. 2013), our result indicate that these taxa might actually be composed of a mosaic of independent meta-populations, restricted to small geographic areas and potentially forming cryptic species, similarly to some other cnidarians and gastropods (Aurelle et al. 2011;

Mokhtar-Jamaï et al. 2011; Jörger et al. 2012). To our knowledge, population genetics in hydroids are still scarce (but see Darling and Folino-Rorem 2009) and it would therefore be particularly interesting to explore further the impact of life cycle on the relative number of evolutionary lineages in this class.

Morpho-species and species hypotheses

GMYC models reveal a possible synonymy of several morpho-species: *Aglaophenia pluma*, *A. tubiformis* and *A. octodonta* do not form monotypic clusters but are regrouped into three SH, as *M. phoenicea*, *M. spectabilis* and *M. sibogae*. Another example is the couple *G. eximium* and *G. gracilicaule*. Possible synonymies of these morpho-species are further supported by their high morphological similarity and their low genetic diversity [only for the *Aglaophenia* trio (Moura et al. 2012)].

Previous phylogenetic studies of other cnidarian groups have already revealed complex species relationships without clear boundaries, possible hybridization and high cryptic diversity (Reimer et al. 2007; Souter 2009), highlighting the difficulty of using morphological characters to delimit species in this class. However, difficulty in determining distinctive morphological characters in hydrozoans should not lead to “over-synonymizing” morpho-species based on genetic characters (Waugh 2007). Even if morphological characters do not represent phylogenetic relationships in this family (Postaire et al., in revision), almost all morpho-species form robust monophyletic clades; hence morphological characters are useful in the identification of these taxonomic entities. Furthermore, our results could also reflect a recent divergence and/or diversification and the GMYC models do not perform well in these cases (Reid and Carstens 2012). Therefore, hydrozoans, or at least Aglaopheniidae, may present a good case where integrative approaches are necessary to settle species limits and synonymy by combining as much information as possible (Padial et al. 2010; Schlick-Steiner et al. 2010).

Moura et al. (2012) predicted the synonymy of the three *Aglaophenia* species based on morphological characters and the 16S phylogeny and the present results corroborate this conclusion. However, as GMYC models identify three SH, finer morphological measures, ecological data and population genetics are required to fully resolve this issue. Indeed, population genetics data of morpho-species presenting several SH or corresponding to possible synonyms are helpful in determining whether those lineages are interbreeding or not

and thus whether identified lineages correspond to biological species (Mayr 1942). In the case of *L. brevirostris*, the use of microsatellite data and Bayesian clustering analysis confirmed (1) several species hypotheses identified by GMYC modelling, merging some of them and (2) revealed the existence of a highly divergent lineage present, at the same time, in the Western Indian Ocean and the Southwestern Pacific Ocean within this morpho-species (SH 27 and 28). However, several aspects need to be taken into account when interpreting microsatellite data. When used on species with low gene flow and high population differentiation, the level of differentiation between species and isolated populations might be indistinguishable, like between populations from SWP and Western Indian Ocean for *L. brevirostris*. Furthermore, population genetics requires extensive sampling, potentially explaining why microsatellite data could not fully resolve relationships within the *M. phoenicea* complex. Even if they confirmed the divergence between the bicolor and gracile morphs of *M. phoenicea* from Reunion Island and the divergence of SWP populations from those from the Western Indian Ocean, the sampling of *M. spectabilis*, *M. sibogae* and *M. sp.1* is too limited to conclude on their taxonomic status. Nevertheless, this type of data combined with more extensive sampling, could help clarifying the status of *Macrorhynchia* and *Gymnangium* morpho-species, as phylogeny and morphology are not congruent over all sampled individuals living in similar ecosystems.

GMYC and species delimitation

Molecular markers may present the ability to identify and delineate species boundaries in certain taxonomic groups by the information they contain (Boissin et al. 2008; Niemiller et al. 2011). However, the main problem is to determine where to place these boundaries? If this problem can be overcome, the definition of a species, operational taxonomic unit, or evolutionary independent unit remains to be resolved (Mayden 2002; De Queiroz 2005; Samadi and Barberousse 2006).

Before considering each cluster identified by coalescent-based species delimitation methods as putative species, the specificity and priors of the model must be considered. First of all, GMYC models might fail to recognise clades undergoing rapid radiation or recently formed species (Reid and Carstens 2012). Furthermore, GMYC models assume that the studied taxa do not present a meta-population structure (i.e. each identified cluster of haplotypes is a meta-population in itself). As it is very unlikely that Aglaopheniidae

morpho-species are represented by a single evolutionary lineage over the world, splitting of morpho-species in several GMYC entities over the same sampling regions might reflect complex population genetic structuring and incomplete lineage sorting (Talavera et al. 2013). One way to improve our study would be to use a second independent nuclear marker. However, there are few universal primers in hydrozoans and already available markers are either too much conserved or small for the species delimitation methods used (Baba et al. 1984; Lindner et al. 2011) or may present high intra-specific variation (Coleman 2003; Merino-Serrais et al. 2012). The sampling scheme of our study also needs improvements: methods used require samples from the entire species range, with several individuals from each sampling site (Lim et al. 2011; Powell 2012; Talavera et al. 2013). However, for the majority (if not all) of studied morpho-species, distribution ranges are roughly estimated, if not inaccurate. Our results suggest that actual ranges may be smaller than assumed, as in many other understudied cosmopolitan taxa (Payo et al. 2013). However, despite the fact that we did not collect precise morphological or ecological data and that the only information available is the sampling location, our study is the first trying to identify cryptic species based on genetic data in Aglaopheniidae. The identification of a highly divergent lineage (SH 27 and 28) in *L. brevirostris* when using two different implementations of the GMYC and the confirmation of the presence of this lineage based on microsatellite data, which is a cryptic species based on the phylogenetic species concept (Baum and Shaw 1995), confirms the potential of this method and the presence of cryptic diversity in Aglaopheniidae. Furthermore, as shown by using microsatellite data in *L. brevirostris* and in the *M. phoenicea* complex, a conservative approach should be to consider as putative species each robust GMYC species hypotheses corresponding to a major biogeographic province, or even ecoregion, as defined by (Spalding et al. 2007) and complete the delineation of species by population genetic studies and other type of data.

Conclusions

In this study, we employed species delimitation tools based on GMYC to assess the congruence between genetic data and morphological classification in hydrozoans from the Aglaopheniidae family, and confronted sequenced based species delimitation methods to microsatellite data. This study did not aim to delimit and describe new species and must be

seen as a first step in an integrative framework towards future taxonomic revisions that are necessary for this family. We identified several independent lineages in nominal morpho-species. These lineages must be considered important targets for future research to confirm or infirm their species status. The mode of reproduction and associated dispersal capacities seem to be associated to the number of evolutionary lineages within morpho-species. This first insight in Aglaopheniidae diversity using bioinformatics species delineation tools reveals part of the high and unexpected diversity of this family and underlines the need of using integrative taxonomy in this taxon, and the congruence of sequence and microsatellite data when associated with a population sampling. As a first insight, our study must be completed by further phenotypic, ecological, and molecular investigations on all identified lineages. However, our results and the discovery of multiple independent lineages, putative species in several nominal Aglaopheniidae species and eventually a cryptic species in a morpho-species have direct implications in taxonomy and conservation. The existing taxonomic framework, already recognising more than 250 morpho-species, might seriously underestimate the true diversity within this family.

Acknowledgements

Hydrozoan sampling in the western lagoon of New Caledonia (HM) was carried out during cruise Cobelo of RV Alis; collections in the Loyalty Islands and in southeastern New Caledonia (HM) were done during cruise Bibelot of RV Alis. Sampling in Madagascar (HM) was supported by project Biodiversity (POCT FEDER fund) and sampling in Juan de Nova was supported by program Biorecie (POCT FEDER fund). Sampling in Reunion Island (CAFB, HB, HM, BP) was supported by program HYDROSOOI (Labex CORAIL fund). We gratefully acknowledge the Plateforme Gentyane of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Clermont-Ferrand, France) for guidance and technical support. We would like to thank Laurence Maurel for the figures representing sampling sites. The first author was financially supported by a PhD contract from the Doctoral School of the Reunion Island University.

Chapitre 4

L'importance de l'isolement par la distance chez *Lytocarpia brevirostris*, un hydrozaire tropical largement distribué

Résumé

L'isolement par la distance, c'est-à-dire une différenciation génétique des populations corrélée positivement à la distance géographique, est une des premières des étapes des processus de diversification des espèces marines. En effet, cet isolement peut entraîner l'apparition d'un isolement reproducteur s'il est maintenu sur des échelles de temps suffisamment longues. Chez les espèces marines côtières, la connectivité entre les populations va être conditionnée par la dispersion de propagules sous la forme de gamètes, larves ou d'individus et par la présence d'habitat disponible pour le recrutement. Les capacités de dispersion, notamment l'existence et la durée d'une phase de vie planctonique, vont donc avoir une influence, même indirecte, sur la connectivité des populations et sur les processus de diversification.

Les études de génétique des populations permettent d'estimer l'importance et la direction des flux de gènes entre populations, et donc de mettre en évidence un isolement par la distance des populations, mais également son importance en fonction de la distance géographique.

À l'aide de marqueurs microsatellite développés lors cette thèse, nous avons étudié la connectivité des populations de *Lytocarpia brevirostris*, une espèce incubatrice d'Aglaopheniidae, entre 13 populations du Sud-Ouest de l'océan Indien et une population du Pacifique Sud-Ouest. Nous avons mesuré la différenciation génétique des populations à l'échelle des îles, des provinces biogéographiques et de l'Indo-Pacifique, et estimé l'importance de l'isolement par la distance de ces populations.

À l'échelle locale (intra-populationnelle), les analyses montrent que la dispersion asexuée est une caractéristique importante de cette espèce, les individus échantillonnés à proximité faisant souvent partie des mêmes lignées clonales. Cette propagation asexuée n'a pas été retrouvée aux échelles supérieures, chaque lignée clonale identifiée étant circonscrite à une population. En outre, en ne gardant qu'un seul individu par lignée clonale, nos résultats révèlent le taux de consanguinité élevé des populations, indiquant une reproduction entre individus apparentés. Nos résultats mettent également en évidence une différenciation génétique très élevée des populations, quelle que soit la distance séparant les populations (de quelques kilomètres à plusieurs milliers). Cette différenciation des populations est accompagnée de surcroît d'un isolement par la distance marqué, que ce soit à l'échelle de l'Indo-Pacifique ou au sein des provinces biogéographiques étudiées.

Notre étude montre le fort isolement des populations de *L. brevirostris* à toutes les échelles géographiques. Le fort taux de consanguinité dans toutes les populations confirme les faibles capacités de dispersion supposées de cette espèce. En outre, l'incubation des larves jusqu'à maturation chez *L. brevirostris*, caractéristique partagée par une majorité d'Aglaopheniidae, semble avoir un impact direct sur la connectivité des populations, empêchant la dispersion sur des distances supérieures à quelques kilomètres. Ces résultats exposent la probable diversité cryptique importante des espèces incubatrices d'hydrozoaires, chaque île hébergeant potentiellement une lignée évolutive indépendante.

4. The importance of isolation by distance in *Lytocarpia brevirostris*, a widely distributed tropical hydrozoan

Bautisse Postaire^{1,2}, J Henrich Bruggemann^{1,2}, Chloé A-F Bourmaud^{1,2}, H       Magalon^{1,2}

1 : Université de La Réunion UMR ENTROPIE 9220, CS 92003, 97744 Saint Denis CEDEX 9, France

2 : Laboratoire d'Excellence CORAIL, www.labex-corail.fr

Abstract

Isolation by distance is one of the main models of speciation in marine species, and species presenting low dispersal capacities are expected to show this pattern of population isolation. Studies of population genetic structures provide information on the direction and magnitude of propagules (gametes, larvae, individuals) transport and hence are important in the assessment of isolation by distance patterns at several geographic scales. This paper reports population genetic structures in the tropical hydrozoan *Lytocarpia brevirostris*, a brooding species, from 13 populations of South-Western Indian Ocean and one population from Loyalty Islands (New Caledonia, South-Western Pacific). At the local scale, populations presented asexual propagation at fine scale. Asexual propagation was not found at higher geographical scales, each repeated genotype was restricted to a single population. After repeated genotypes removal, all populations presented significant positive F_{IS} values, ranging from 0.094*** to 0.335***, rejecting panmixis hypothesis. Gene flow among all islands and populations was found to be extremely low between reefs separated by as close as <10 km to more than 11000 km, with a significant populations genetic differentiation (F_{ST} ranging from 0.012*** to 0.560***). A general pattern of isolation by distance was found at the Indo-Pacific scale, but also within sampled ecoregions of South-Western Indian Ocean (Western/Northern Madagascar and the Mascarene archipelago). Bayesian clustering analyses identified each sampled island as an independent population, and an analysis of molecular variance indicated that population genetic differentiation was significant at small (within island) and intermediate spatial scale (among islands). This study showed that population differentiation in *L. brevirostris* is high at all spatial scales. This aspect is discussed in light of the life cycle of this species, potentially preventing regular dispersal at distances higher than a few kilometers. The study reveals the probable high cryptic diversity

of hydrozoan brooding species, each island potentially housing an independent lineage.

Keywords: Hydrozoa, microsatellite, population genetics, brooding species, IBD

Introduction

The relative importance of biogeographic barriers opposing the dispersal of organisms is often estimated via the assessment of population's connectivity over several geographic scales. This connectivity represents 'the demographic linking of local populations through the dispersal of individuals among them as larvae, juveniles or adults' (Sale et al. 2005). It represents a continuum, from an absence of connectivity (closed populations, mainly self recruiting) to high connectivity (open populations, most of the recruitment happens via migration of individuals). Open oceans are often regarded as a geographic barrier to the dispersal of organisms that lack a larval stage or possess relatively short-lived, non-feeding larvae whereas, for marine species with long planktonic phase, they represent a virtual vast area without any barrier. However, there exists a large body of literature detailing examples of lecithotrophs, brooders and direct developers, with biogeographic ranges spanning oceans (Kyle and Boulding 2000; Ayre and Hughes 2000; Boissin et al. 2008). An organism's mode of reproduction is expected to impact its populations' genetic structure and biogeographic distribution: low dispersal capacities prevent the dispersion of propagules (gametes, larva or individuals) (Mokhtar-Jamäi et al. 2011). Thus, marine species with low dispersal capacities should present low distribution ranges and strong population differentiation related to the geographic distance, an isolation by distance (IBD) pattern. Over the time, this IBD might increase the number of speciation opportunities, mainly allopatric, by favouring vicariance events and thus formation of independent evolutionary lineages (Paulay and Meyer 2002; Malay and Paulay 2010). The influence of life cycle and reproductive strategies are important traits when assessing populations differentiation and thus connectivity but (Shanks 2009) observed that the relationship between direct or indirect development, pelagic larval duration and dispersal capacities is not always straightforward. Many aspects, such as larval behaviour and species ecology, must also be considered to explain the patterns of marine populations connectivity (Shanks 2009). Furthermore, seascape connectivity, the process linking habitat patches and populations through the exchange of organisms across the marine environment, is a key driver of population dynamics and genetic structuring, and is therefore

central to defining management and conservation units (White et al. 2010), but is also important in the diversification processes of marine organisms (Boissin et al. 2011). In this context, multiplying the number of biological models is necessary to understand the functioning of ecosystems and the maintenance of natural populations over time.

Hydrozoans are extremely common in all marine ecosystems and present broad biogeographical distributions, with a high variety of life cycles and reproductive features (Bouillon et al. 2006). The Aglaopheniidae (Marktanner-Turneretscher, 1890) represent one of the largest families, with more than 250 valid species (Bouillon et al. 2006) and is particularly diversified in tropical marine ecosystems. *Lytocarpia brevirostris* (Busk, 1852) is a typical tropical Aglaopheniidae species with a broad geographic distribution: it is found on coral reefs throughout the Indo-Pacific region (Millard 1975; Gravier-Bonnet and Bourmaud 2006a; Gravier-Bonnet and Bourmaud 2006b; Di Camillo et al. 2011; Gravier-Bonnet and Bourmaud 2012). This orange feather-like colonial hydroid is an incubatory species, like the majority of Aglaopheniidae species. Larvae are incubated in dedicated structures of the colony (named corbulae), and planulae are released only when mature (Sommer 1990). Hydrozoan planulae usually crawl rather than swim and settle in less than 24h, suggesting low dispersal capacities (Sommer, 1990; see Gili and Hughes (1995) for a review of hydrozoan ecology). Intuitively, this feature contradicts with the species' extensive geographic range spanning several major biogeographic provinces. Hydroids are among the least studied models for population genetics: to our knowledge, this aspect is practically absent from the literature (but see Darling and Folino-Rorem (2009) and Schuchert (2014)). The few available studies highlighted the high genetic differentiation between individuals sampled in the same region and presented the authors with a dilemma: was it the result of intra-specific polymorphism with extreme population differentiation or the extensive cryptic diversity in the studied species? Consequently, the general wide distribution of marine incubatory hydroid species could be (1) a taxonomic artefact and species might in fact be complexes of sibling species with limited dispersal abilities, or (2) single species with an extensive population subdivision. As gene flows across ocean basins are known to vary in intensity and direction according to oceanic circulation (Dawson and Jacobs 2001; Hohenlohe 2004; Cowen et al. 2007; Weersing and Toonen 2009), influencing both population differentiation and speciation processes, it is sometimes difficult to determine whether morphologically slightly differentiated populations have evolved into evolutionary independent units. Considering these previous results, one could further argue that each

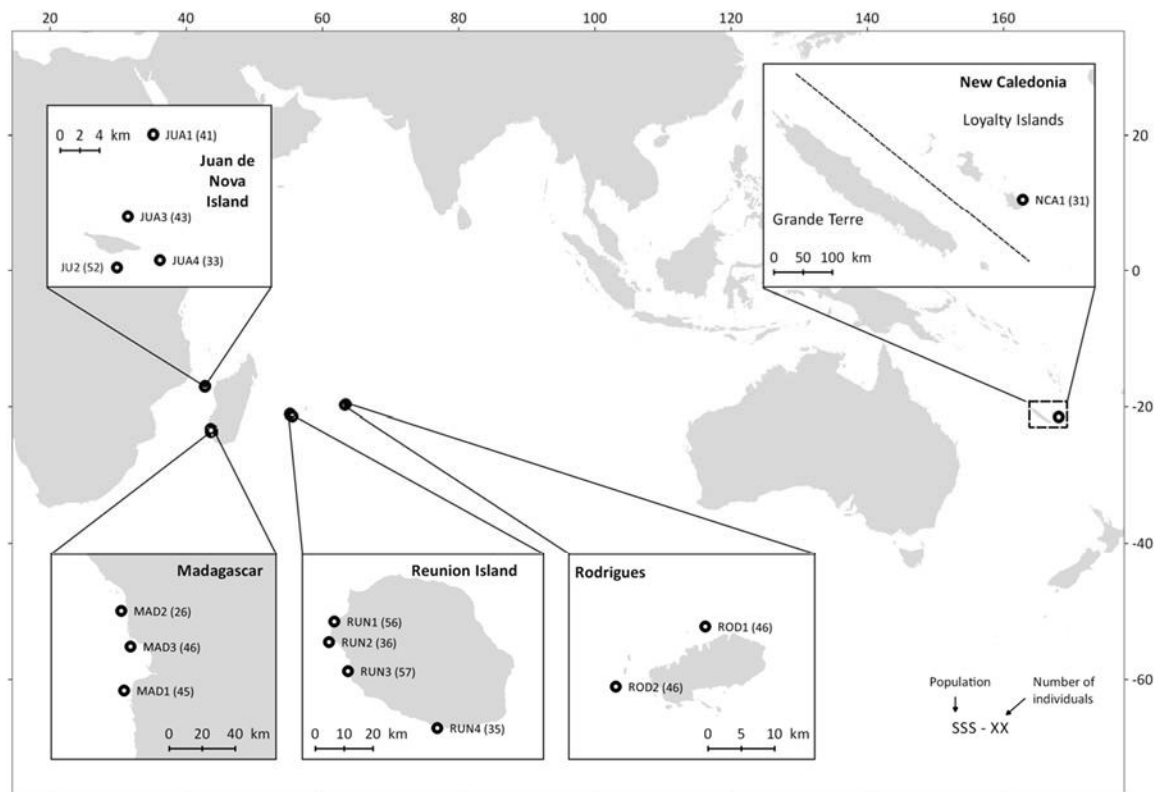


Figure 1. Sampling locations in the WIO and the SWP with the number of individuals sampled. Individual sites are labelled as designated in Table 1.

population, restricted to small geographic regions, potentially represents an independent species [based on the genealogic species concept (Baum and Shaw 1995)]. Indeed, the classification of organisms into species may be hampered by variation of genetic and morphological characters within and between populations. One of the solutions to start answering the problem of extensive population subdivision or complexes of sibling species in incubatory hydrozoans is to conduct an analysis of population structuring based on an extensive sampling of populations on a large geographic scale. Microsatellites are co-dominant neutral markers that have proven very useful to assess the genetic connectivity of populations over several geographic scales: islands, archipelagos and ocean basins (Weersing and Toonen 2009; Mokhtar-Jamaï et al. 2011).

In this study, we aimed to assess the structuring and connectivity of *Lytocarpia brevirostris* populations using microsatellite loci. We sampled populations in the Mascarene archipelago (Reunion Island, Rodrigues), Madagascar, the Mozambique Channel (13 populations) and one population in New Caledonia (Loyalty Islands), covering two biogeographic provinces: the South-Western Indian Ocean (SWIO, the southern part of the Western Indian Ocean province) and South-Western Pacific Ocean (SWP) (Spalding et al. 2007). We evaluated patterns of connectivity at three levels: within sampling location (short distance connectivity), among reefs within a biogeographic region (intra-regional comparisons) and between biogeographical regions (inter-regional connectivity).

Material & Methods

Sample collection and DNA extraction

Each sampling site was explored randomly using SCUBA. When encountered, adult colonies were sampled individually and placed in sequentially numbered plastic bags. Where possible, we collected samples from colonies at least few centimetres to several decimetres apart to minimise the probability of sampling clones. Larger colonies (3-10 cm high) with visible reproductive structures were preferentially collected. A total of 593 colonies were obtained (Figure 1, Table 1) and identified based on morphological characters (Millard 1975). Specimens were fixed and preserved in 90% ethanol preceding DNA extraction. Prior to DNA extraction, all reproductive structures were removed from the colonies. DNA was

Table 1: *L. brevisrostris* samples (N = 583) used in this study. Given are the total sample size (N), the number of unique multilocus genotypes (N_{MLG}) and the clonal richness ($N_{MLG} - 1/N - 1$) per population. GPS locations are in decimal degrees. Observed (H_o), expected (H_E) heterozygosity and inbreeding coefficient (F_{IS}) per population are indicated. Under the F_{IS} are indicated the test significance for deviation to Hardy-Weinberg equilibrium: NS: non significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Marine Province	Ecoregion	Island	Site name	Population	Latitude	Longitude	N	N_{MLG}	R	H_o	H_E	F_{IS}
WIO	Mascarene Islands	Reunion Island	Cap la Houssaye	RUN1	-21.01766	55.23836	56	36	0.636	0.374	0.416	0.104 *
			Passe de l'hermitage	RUN2	-21.08659	55.22065	36	13	0.342	0.344	0.447	0.238 **
			Saint Leu	RUN4	-21.184194	55.28418	57	42	0.732	0.438	0.488	0.104 **
			Manapany	RUN4	-21.37500	55.58358	35	23	0.647	0.354	0.477	0.263 *
	Rodrigues	Rodrigues	Petits Patés	ROD1	-19.65386	63.41501	46	13	0.266	0.452	0.475	0.051 ***
			Ilot Cocos	ROD2	-19.74016	63.2866	46	11	0.222	0.331	0.433	0.238 ***
	Western/Northern Madagascar	Juan de Nova Island	Juan 2	JUA1	-16.95337	42.76011	41	34	0.825	0.489	0.636	0.235 ***
			Juan 6	JUA2	-17.08177	42.72536	52	39	0.745	0.545	0.661	0.177 ***
			P7	JUA3	-17.03280	42.7358	43	36	0.833	0.462	0.647	0.290 ***
			Biodiv 7	JUA4	-17.07470	42.7665	33	25	0.750	0.572	0.707	0.194 ***
	Madagascar	Madagascar	Anakao	MAD1	-23.66586	43.59985	45	27	0.590	0.395	0.472	0.166 ***
			Ifaty	MAD2	-23.19096	43.58291	26	18	0.680	0.350	0.526	0.341 ***
			Tuléar	MAD3	-23.40370	43.63818	46	24	0.511	0.363	0.512	0.294 ***
SWP	New Caledonia	Maré	Sud Cap Coster	NCA1	-21.48673	168.11940	31	31	1	0.454	0.592	0.239 ***

extracted from one or two hydrocauli per colony using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol.

Microsatellite genotyping

We used 16 microsatellite loci specific for *Lytocarpia brevirostris* (Postaire et al. in press). Forward primers were indirectly fluorochrome labelled (6-FAM, VIC, NED, PET) by adding a 19-bp M13 tail at their 5' end (5'- CACGACGTTGTAAAACGAC-3'). Each amplification reaction was performed in a total volume of 10 μ L: 5 μ L of MasterMix Applied 2x (Applied Biosystems), 2.25 μ L of demineralised water, 0.25 μ L (1 μ M) of forward primer tagged with the M13 tail, 0.25 μ L of reverse primer (10 μ M), 0.25 μ L of fluorescent dyed M13 tail (10 μ M) and 2 μ L of genomic DNA (10 ng/ μ L). The thermocycling program was as follows: 94°C for 5 min + 7 x (94°C for 30 s, 62°C [-1°C at each cycle] for 30 s, 72°C for 30 s) + 30 x (94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s) + 8 x (94°C for 30 s, 56°C for 30 s, 72°C for 30 s) for the final hybridization of fluorescent dyed M13 tail + 72°C for 5 min. PCR products were genotyped using an ABI 3730 genetic analyser (Applied Biosystems) and allelic sizes were determined on GeneMapper v 4.0 (Applied Biosystems) using an internal size standard (Genescan LIZ-500, Applied Biosystems). For each island, markers presenting a high proportion of missing data ($\geq 10\%$) were excluded from further analysis. Identical multilocus genotypes (MLGs) were identified with GENCLONE v.2.0 (Arnaud-Haond and Belkhir 2006) (Table 1) using the maximum set of loci for each sampling location. Unique MLGs and the maximum common number of loci (i.e. 10 loci: Lb01, Lb02, Lb03, Lb05, Lb06, Lb07, Lb08, Lb10, Lb11, Lb16; see Results) between populations were then used for subsequent analyses.

All tests in this study were corrected for false discovery rate (FDR) in multiple tests (Benjamini and Hochberg 1995). We used MICRO-CHECKER v2.3 (van Oosterhout et al. 2004) to check for scoring errors and to estimate null allele frequencies. Linkage disequilibrium was tested using Arlequin v3.5 (Excoffier et al. 2005) among all pairs of loci in each population with a permutation test ($n = 1000$). Observed (H_O), expected (H_E) heterozygosities and tests for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were computed using the software Arlequin v3.5 (Excoffier et al. 2005) for all populations and over all loci.

Population differentiation and gene flow analyses

We investigated population structure using different approaches: measures of differentiation and a Bayesian clustering method. First, the geographic origin of samples (i.e. locality) was treated as an a priori defined population. Population-level pairwise F_{ST} comparisons and Fisher's exact tests of population differentiation (tests if the observed HW disequilibrium is caused by the variation of allelic frequencies between populations) were performed in Arlequin v3.5. (Excoffier et al. 2005). The significance of the observed F_{ST} statistics was tested using the null distribution generated from 5000 non-parametric random permutations. To infer mechanisms that may be responsible for the observed patterns of population structure, we compared estimates of genetic differentiation to geographic distances among localities of the SWIO and SWP. We used a Mantel test (Mantel 1967) to evaluate the correlation between linearized genetic differentiation ($F_{ST} / (1 - F_{ST})$; Slatkin's distance) and the $\log_{10}$ of the straight-line geographic distance between localities. This relationship is expected to be positive and linear in the context of a two-dimensional IBD model (Rousset 1997). All Mantel tests were performed using the program GENODIVE (Meirmans and van Tienderen 2004) with 10^4 random permutations to assess significance.

Population differentiation was also assessed without a priori stratification of samples. Bayesian clustering analyses were used to estimate the most probable number of populations (K) given the data as implemented in the program STRUCTURE v2.3.2 (Pritchard et al. 2000), using the admixture model with correlated allele frequencies (Falush et al. 2003). This analysis assumes that, within a set of samples, there are K populations and individuals are assigned to each putative population under HWE and minimized linkage disequilibrium. We studied the assignment of samples using again a hierarchical approach. Four independent runs were conducted for each value of K from 1 to 10 with a burn-in period of $5 \cdot 10^4$ steps followed by $5 \cdot 10^5$ Markov chain Monte Carlo iterations. We used the statistic proposed by (Evanno et al. 2005) to estimate the number of clusters K implemented in STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt 2012). The STRUCTURE output of the best number of K were summarized with CLUMPP v1.0 (Jakobssen and Rosenberg 2006) and formatted with DISTRUCT v1.1 (Rosenberg 2004). Arlequin v3.5 was then used to perform hierarchical analysis of molecular variance using clusters identified by STRUCTURE as groups.

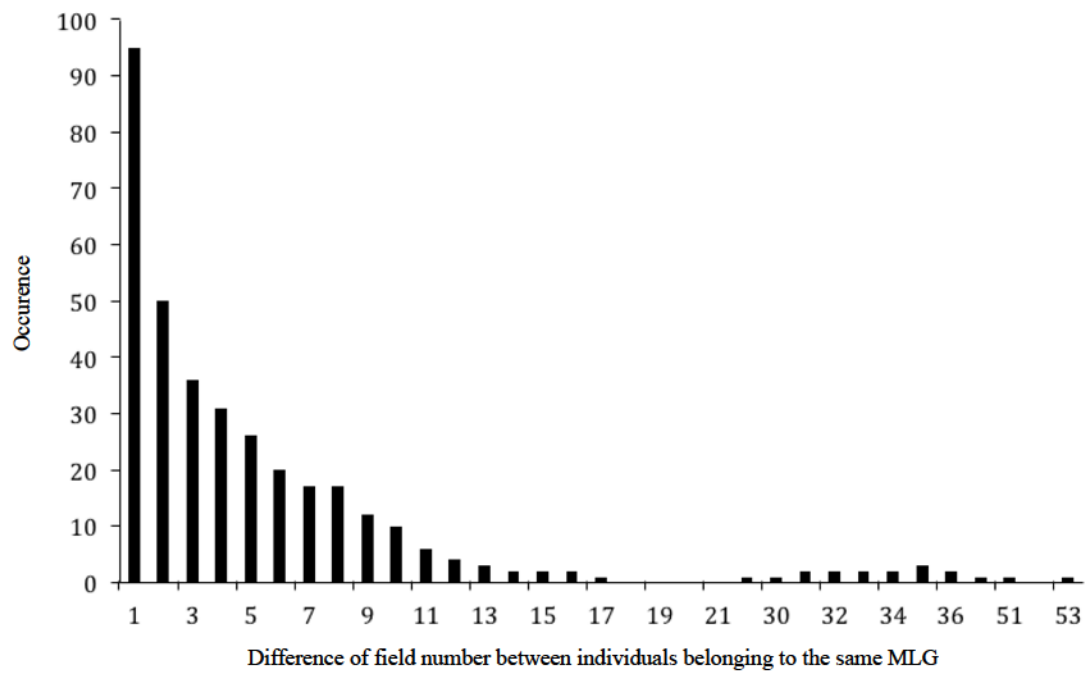


Figure 2. Field numbers (ordered bags) difference between pairs of individuals belonging to the same MLG.

Results

Multilocus genotyping and potential importance of asexual reproduction

Over the 16 available loci, 15 loci amplified correctly on individuals from Reunion Island (all except Lb13), 12 loci (all except Lb04, Lb09 and Lb12, Lb13) amplified correctly on samples from Juan de Nova Island, Madagascar and Rodrigues (SWIO except Reunion Island) and 10 loci (all except Lb04, Lb09, Lb12, Lb13, Lb14 and Lb15) amplified correctly on samples from Loyalty Islands (SWP). Our analysis of 593 samples yielded 419 MLGs, suggesting that asexual reproduction occurred in the sampled populations. The composition of repeated MLGs are mostly represented by individuals with proximate field numbers and thus sampled close to one another (Figure 2). All repeated MLGs were pruned from the dataset before further analyses.

Genetic variability

Global significant linkage disequilibrium among loci was detected ($P < 0.05$, 49 tests significant over 630 after FDR correction, i.e. 7.7%) in the global dataset. However, half of the positive tests (25 out of 49) occurred in small populations with low clonal diversity (ROD1, ROD2) and might only represent the low genetic diversity of these populations and thus we decided to conserve all loci. They were all polymorphic with a total number of alleles ranging from eight (Lb01, Lb07 and Lb11) to 24 (Lb02). Some loci were monomorphic in several populations: Lb02 in population NCA1, Lb01 and Lb06 in ROD1 and ROD2, Lb06 in ROD2, Lb05 in RUN2 and Lb10 in RUN4. As not a single locus was monomorphic over all populations, we decided to analyse all loci. Observed heterozygosities ranged from 0.303 - 0.572, and unbiased expected heterozygosities from 0.375 - 0.696 for ROD2 and JUA4, respectively (with a mean value of 0.401 and 0.715, respectively). Multilocus F_{IS} values ranged between 0.094*** for ROD1 and 0.335*** for MAD3 and were all significant ($P < 0.05$, Table 1). Over all loci, significant heterozygotes deficiencies were found in all populations (after FDR correction). For each locus in each population, presence of null alleles was checked. Null alleles were detected for several loci in several populations. However, (1) as the number of loci was not constant between populations and (2) as in several cases the F_{IS} value was significant without evidence of null alleles, we decided to analyze all loci.

Table 2. *L. brevirostris* pairwise F_{ST} values for all pairs of populations. All values were statistically significant ($P < 0.05$) after FDR correction.

Population	JUA1	JUA2	JUA3	JUA4	MAD1	MAD2	MAD3	NCA1	ROD1	ROD2	RUN1	RUN2	RUN3
JUA2	0.013												
JUA3	0.019	0.025											
JUA4	0.020	0.014	0.039										
MAD1	0.216	0.202	0.218	0.203									
MAD2	0.226	0.215	0.222	0.200	0.122								
MAD3	0.238	0.212	0.226	0.215	0.039	0.075							
NCA1	0.337	0.331	0.338	0.298	0.426	0.400	0.421						
ROD1	0.303	0.277	0.270	0.249	0.464	0.431	0.443	0.447					
ROD2	0.322	0.296	0.298	0.272	0.486	0.450	0.482	0.475	0.162				
RUN1	0.341	0.328	0.323	0.300	0.336	0.316	0.337	0.417	0.489	0.516			
RUN3	0.300	0.288	0.291	0.265	0.328	0.327	0.332	0.410	0.508	0.537	0.073		
RUN2	0.338	0.326	0.321	0.293	0.330	0.305	0.335	0.404	0.467	0.489	0.016	0.102	
RUN4	0.361	0.343	0.343	0.322	0.337	0.322	0.344	0.452	0.540	0.560	0.112	0.203	0.117

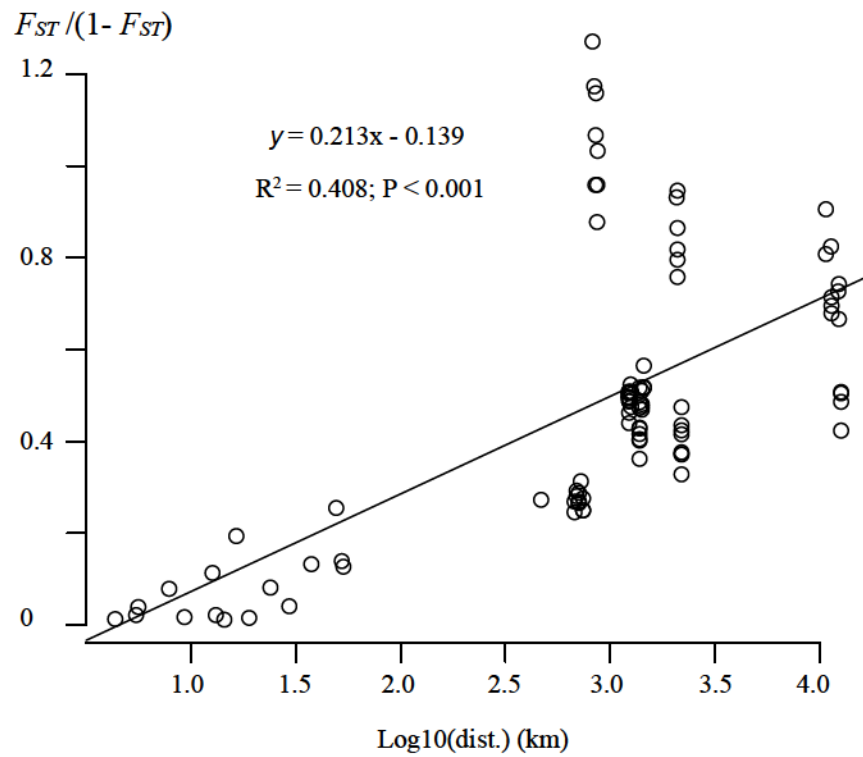


Figure 3. Correlation between genetic distances computed as $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ and the logarithm of geographical distances between sample pairs $\text{Log}_{10}(\text{dist.})$ in km at the Indo-Pacific scale.

Assessment of connectivity over different geographic scales

All pairwise differentiation tests were significant but not a single exact Fisher's test was significant (after FRD correction). Pairwise F_{ST} values indicated a high differentiation between populations (Table 2), ranging from 0.012*** to 0.560***. Concerning Reunion Island populations, the highest differentiation was found between RUN2 and RUN4 populations ($F_{ST} = 0.203$ ***). In the SWIO, the minimum differentiation occurred between populations from the same island (minimum $F_{ST} = 0.013$ *, between JUA1 and JUA2) and the maximum F_{ST} values occurred between populations ROD2 (Rodrigues) and RUN4 (Reunion Island) ($F_{ST} = 0.560$ ***). Populations ROD1 and ROD2 were highly differentiated from all other populations of the SWIO (F_{ST} ranged from 0.248*** to 0.560***). When comparing populations from SWIO with the population from New Caledonia, F_{ST} values were also important and highly significant, ranging from 0.297*** to 0.475*** (Table 2). From a general point of view, population differentiation was the lowest between populations from the same island and is high at every other scale.

Mantel tests revealed a significant positive correlation between transformed F_{ST} values and the logarithm of the geographical distances among localities ($n = 91$, $r = 0.639$ ***, $R^2 = 0.408$), suggesting a strong pattern of IBD at the Indo-Pacific scale (Figure 3). Similarly, both in the SWIO region ($n = 78$, $r = 0.624$ ***, $R^2 = 0.390$), as within each of the two sampled ecoregions, Western/Northern Madagascar and the Mascarene Islands ($n = 21$, $r = 0.977$ **, $R^2 = 0.955$ and $n = 15$, $r = 0.957$ *, $R^2 = 0.917$, respectively), a general pattern of IBD was evidenced.

The analysis of STRUCTURE output revealed that the plot of $\text{LnP}(D)$ as a function of K showed a clear plateau starting at $K = 5$ (Figure 4A), the most likely number of clusters. Each cluster corresponded to a sampled island (Figure 4B).

The AMOVA calculated (using provinces as groups; islands as populations) revealed a highly significant genetic structuring among islands within provinces (SWIO and SWP) and within islands ($P < 0.001$; Table 3), but not between provinces. The percentage of genetic variation explained by differences among islands within provinces was higher than the percentage of genetic variation explained by differences among provinces (26.10%*** and 12.50% N.S., respectively), and the highest percentage of genetic variation was found within islands (61.40%***).

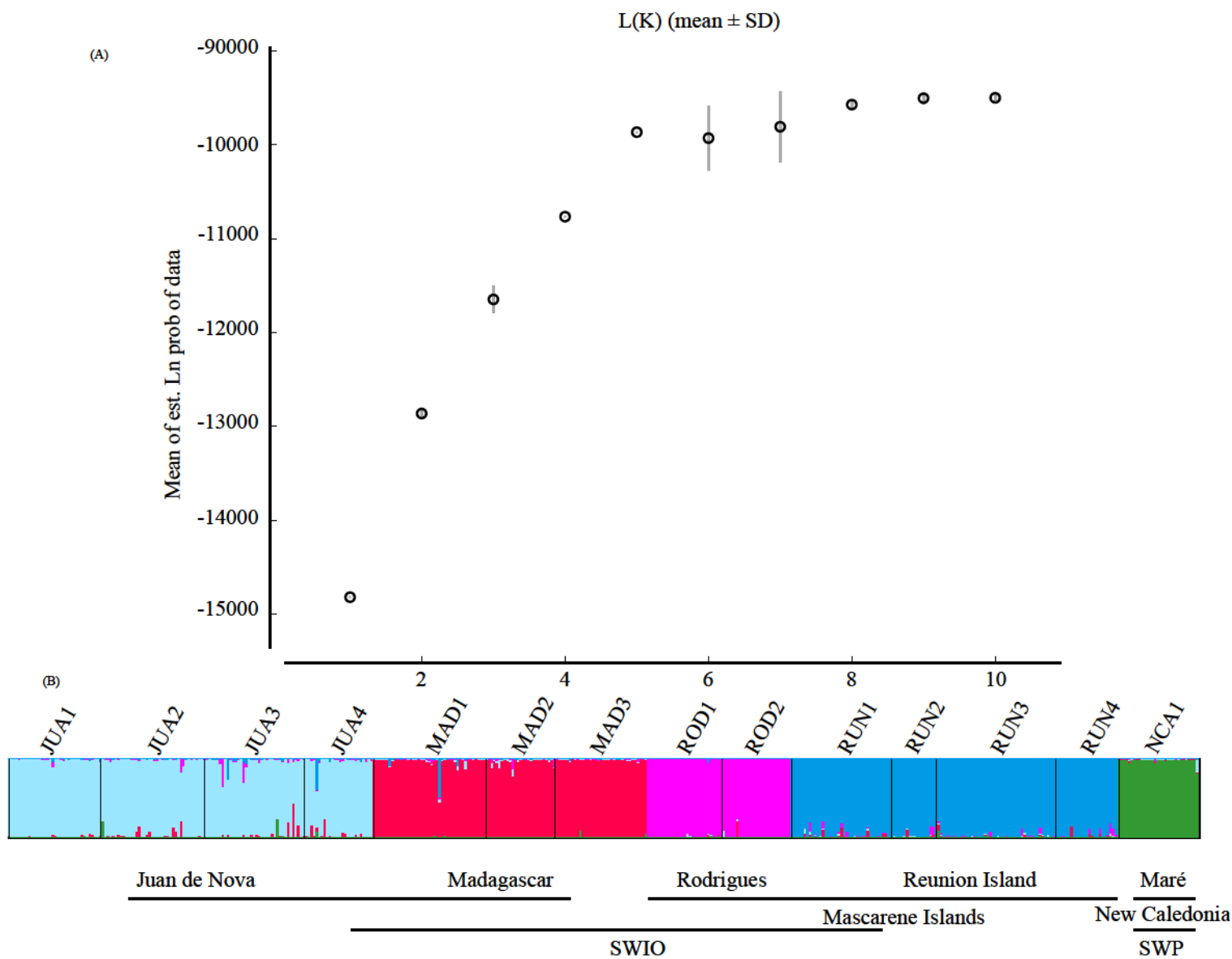


Figure 4. Assignment probabilities of individuals to putative population clusters using an admixture model. (A) Mean $\text{LnP}(K)$ values. (B) Average probability of membership (y-axis) of individuals ($n = 456$; x-axis) in $K = 5$ clusters as identified by STRUCTURE.

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) of *L. brevirostris* populations grouped per island.

Source of variation	d.f.	% of variance	P
Among provinces WIO/SWP	1	12.50	N.S.
Among islands within provinces	3	26.10	***
Within islands	901	61.40	***

Discussion

The results of the analysis of 10 microsatellite loci indicated strong genetic differentiation of *Lytocarpia brevirostris* populations over several geographic scales in the Indo-Pacific region. Based on a mitochondrial marker, high genetic differentiation observed among populations of incubatory hydrozoans was previously observed (Schuchert 2014). Pairwise F_{ST} identified the populations from Rodrigues and New Caledonia as the most differentiated, but all sampled populations showed high isolation. The use of microsatellites allowed the identification of strong and significant differences at small geographic scales, indicating that gene flow is low even at distances <10 km (e.g. between JUA2 and JUA4 populations from Juan de Nova). One of the important results is the high differentiation of Rodrigues populations to all other locations, underlining its isolated position in the SWIO and even from the closest sampled island of the Mascarene archipelago (Reunion Island) at 800 km distance.

Mantel tests over several geographical scales revealed that populations' differentiation is related to geographic distance. Furthermore, Bayesian clustering analyses identified the samples from each island as a putative population, while the AMOVA showed that a high and significant percentage of the global differentiation occurred between islands. This pattern of IBD, which corresponds to a stepping-stone population model, was however not detected at the island scale. Our results clearly suggest that open seawater represents a barrier to dispersal for *L. brevirostris*, as some other coastal organisms with low dispersal capacities (Ragionieri et al. 2010; Aurelle et al. 2011).

Within sampled populations, shared MLG were strongly correlated to field number, meaning that nearby sampled colonies were genetically related. Colonies were often found in caves or along the same cliff: thus it is likely that repeated genotypes among samples represent fragments from a genet extending over multiple decimetres. However, we cannot rule out the possibility that the repeated genet observed also derives from spatially separated colonies (fragments of an ancient extended colony). This asexual reproduction needs further investigation with a specific approach (Baums et al. 2006; Arnaud-Haond et al. 2007). Nevertheless, all populations showed a significant deviation from HWE due to a heterozygote deficiency. Heterozygote deficiency is relatively common in marine colonial organisms, such as scleractinian corals (Ayre and Hughes 2000), but the exact mechanism driving this effect cannot always be determined. Considering the reproductive strategy of

L. brevirostris (incubation of larvae), this pattern might be explained by restricted dispersal of gametes and/or larvae. Indeed, observations of larval behaviour in hydrozoans tend to indicate that dispersal after planulae release is low as they tend to settle nearby their mother colony (Sommer 1990). Furthermore, in hydrozoans, the few observations in aquaria reported that the life span of spermatozooids in the water column was only a few hours (Yund 1990), limiting gene flows among colonies. Even if reproduction has been observed all along the year (BP, pers. obs.), this mode of development naturally decreases dispersal opportunities and gene flow among populations. This suggests that ocean circulation plays relatively a small role in determining spatial patterns of genetic differentiation in *L. brevirostris* populations of the SWIO and SWP. Instead, larval brooding, movements of larvae and exchange of gametes having small-scale genetic outcomes (within populations or islands) seem to be mostly responsible of the observed pattern.

The Indo-Pacific distribution of *L. brevirostris* may be explained by rafting of adult colonies fixed on floating objects. Indeed, despite a general emphasis in the past on larvae as the principal means of dispersal, the importance of rafting in the marine environment is increasingly recognized (DeVantier 1992; Johnson et al. 2001; Thiel and Gutow 2005; Rocha et al. 2006). Even if rafting events are rare, they might occur at a sufficient rate to maintain exchange of individuals between marine provinces. This assumption is supported by the presence of a potential cryptic species in *L. brevirostris* present in the SWIO and the SWP (Postaire et al. in prep). This aspect needs to be further explored by modelling gene flows in correlation with ocean circulation models. This approach has already been useful to explain patterns of connectivity in several marine organisms (Tremblay et al. 2007; Ragionieri et al. 2010; Thomas et al. 2012).

To our knowledge, this is the first study on the genetic connectivity of populations of marine hydroids, revealing the high subdivision of the studied species. This is a clear illustration of the link between patterns of genetic differentiation and life cycle strategies. Considering that the SWIO and the SWP are relatively poorly studied marine biodiversity hotspots (Ridgway and Sampayo 2005), we believe that our approach provides valuable information for the management and creation of marine protected areas. Indeed, the design of marine reserve networks requires an understanding of larval transport over several scales, whether reserves will be self-recruiting, whether they will receive recruits from surrounding areas, and whether reserve networks can exchange recruits (Briggs 2005; Jones et al. 2009;

Christie et al. 2010). Considering our results, connectivity of populations between islands or even between reefs on the same island might be extremely low for species without long planktonic phase during their life cycle, underlining the need of the multiplicity of protected zones to preserve evolutionary processes in these species (Briggs 2005; Obura 2012a; Obura 2012b).

Our study also provides taxonomic clues. Indeed, the extensive population subdivision of *L. brevirostris* is concordant with the phylogeny based on mitochondrial marker of this morpho-species and reveals that populations inhabiting a marine ecoregion (Spalding et al. 2007) seem to represent independent evolutionary units (Postaire et al., in prep) and even species when considering the genealogical concept (Baum and Shaw 1995). However, *L. brevirostris* is thought to present a Indo-Pacific distribution, with an important morphological plasticity over sampling sites (Millard 1975). Considering this morphological data, the high population differentiation and the importance of IBD over several geographic scales in this morpho-species, taxonomists should ponder revising *L. brevirostris* by considering samples from each sampled island as potentially new species.

Acknowledgements

Hydrozoan sampling in the Loyalty Islands (HM) was carried out during cruise Bibelot of RV Alis. Sampling in Madagascar and Rodrigues (HM) was supported by project Biodiversity (POCT FEDER fund) and sampling in Juan de Nova was supported by program Biorecie (POCT FEDER fund). Sampling in Reunion Island (BP, HM, HB, CAFB) was supported by program HYDROSOOI (Labex CORAIL fund). We gratefully acknowledge the Plateforme Gentyane of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Clermont-Ferrand, France) for guidance and technical support. We would like to thank Laurence Maurel for the figures representing sampling sites. The first author was financially supported by a PhD contract from the Doctoral School of the University of Reunion Island.

Chapitre 5

Discussion générale et conclusions

5. Discussion générale et conclusions

La protection et la conservation des écosystèmes requièrent une certaine compréhension de leur fonctionnement, notamment en ce qui concerne le maintien dans le temps et dans l'espace des populations et des communautés, ainsi que les processus évolutifs sous-jacents. Ainsi, pour établir des plans de conservation efficaces, l'étude des mécanismes de diversification et de maintien de la diversité génétique des populations animales et végétales est essentielle. Il est toutefois nécessaire d'inclure des groupes d'organismes modèles disposant de caractéristiques écologiques et de traits d'histoire de vie variés, afin de mesurer l'influence de ces différentes caractéristiques sur leur évolution et les flux de gènes entre populations.

Les hydrozoaires sont particulièrement adaptés à cette optique. En effet, cette classe de cnidaires est représentée dans tous les écosystèmes aquatiques et présente une richesse spécifique importante : 3702 espèces sont décrites à ce jour (Bouillon et al. 2006). Au-delà de cette grande richesse spécifique, leur principale particularité est la grande variabilité de leur cycle de vie, comportant des phases de reproduction sexuée et asexuée, avec une ou plusieurs phases de dispersion planctonique de durée variable (de quelques heures à plusieurs mois). Au sein des hydrozoaires, la famille des Aglaopheniidae est très intéressante. Cette famille comprend à ce jour plus de 250 morpho-espèces (Bouillon et al. 2006), habitant la plupart des écosystèmes marins et présente une richesse spécifique particulièrement élevée dans la bande intertropicale. Le cycle de reproduction au sein de cette famille est considéré comme le plus dérivé de l'état ancestral (Leclère et al. 2009), avec l'absence *quasi* totale de phase planctonique, bien que certaines espèces aient réacquis un stade dispersif proche de la méduse au cours de leur évolution (Bourmaud et Gravier-Bonnet 2004; Leclère et al. 2007, 2009). Cette phase planctonique très courte laisserait supposer des capacités de dispersion faibles, comme chez certaines algues et poissons (Shanks et al. 2003; Siegel et al. 2003), avec des aires de répartition réduites et un fort taux d'endémisme, à l'identique de certains groupes de gastéropodes marins (Paulay 2006; Castelin et Lambourdière 2010) ou d'échinodermes (Hoareau et al. 2013; Naughton et al. 2014). Pourtant, la grande majorité des espèces d'Aglaopheniidae, identifiées selon des critères morphologiques, présentent des aires de répartition s'étendant sur un ou plusieurs bassins océaniques (Millard 1975; Bouillon et al. 2006; Di Camillo et al. 2009, 2011; Galea 2010; Gravier-Bonnet et Bourmaud 2012; Galea 2013; Soto Àngel et Peña Cantero 2013), ce qui semble contradictoire. L'étude de la

morphologie seule n'est donc peut-être pas la méthode de délimitation d'espèce la plus à même d'appréhender la diversité de cette famille.

Toute étude portant sur l'évolution des organismes réclame une connaissance de la diversité réelle des taxons étudiés et donc une bonne représentation de la richesse spécifique de ceux-ci. Toutefois, les taxons sont des groupes artificiels fixes, créés à partir de l'observation de synapomorphies entre organismes (quel que soit le critère utilisé), alors que les lignées évolutives sont des entités dynamiques pouvant s'hybrider, être imbriquées, ou bien se séparer puis se rejoindre au cours de leur évolution (Samadi et Barberousse 2006). Cette différence intrinsèque représente le principal problème dans le processus de délimitation des espèces et dans la mesure de la diversité des organismes. Des synapomorphies considérées comme valides historiquement ne représentent pas toujours l'apparement entre organismes, comme par exemple les structures de reproduction chez les Aglaopheniidae (Calder 1997; Leclère et al. 2009; Moura et al. 2012). De nos jours, la taxinomie cherche donc à identifier une correspondance entre classification des organismes à l'aide d'un ou plusieurs caractères morphologiques et reconstructions phylogénétiques, permettant de relier taxons et lignées évolutives.

Cette thèse a eu pour objectif d'explorer la diversité phylétique des Aglaopheniidae, notamment au sein du Sud-Ouest de l'océan Indien, à plusieurs niveaux : générique (au sens taxinomique du terme), spécifique et intra-spécifique (populationnel). La première étape a consisté à mesurer la richesse phylétique des Aglaopheniidae en comparant une phylogénie de cette famille à ses classification et taxinomie actuelles. Puis, afin de mesurer la diversité intra-spécifique et donc l'adéquation du concept de morpho-espèce à cette famille, plusieurs méthodes de délimitation d'espèces se basant sur des données génétiques ont été utilisées. Enfin, afin d'analyser l'impact du mode de reproduction majoritaire de cette famille sur la connectivité entre populations en fonction de la distance géographique, nous avons étudié la structuration des populations d'une morpho-espèce « type », *Lytocarpia brevirostris* (Busk, 1852), en utilisant les outils de la génétique des populations. Nos résultats montrent que (1) la diversité générique est bien supérieure à celle décrite par la taxinomie traditionnelle et confirment donc que (2) les caractères morphologiques utilisés pour classifier cette famille ne sont pas des synapomorphies. Ils indiquent en outre que (3) le concept de morpho-espèce est inadapté pour appréhender la diversité évolutive des Aglaopheniidae, mais également que (4) les mécanismes de spéciation prépondérants chez ces espèces, l'allopatrie et/ou la parapatie, agissent sur plusieurs échelles géographiques et temporelles.

5.1. Une diversité sans lien direct avec la morphologie

La famille des Aglaopheniidae, bien qu'ayant une histoire taxinomique tumultueuse (voir Calder 1997; Moura et al. 2012), est relativement bien étudiée (Bourmaud et Gravier-Bonnet 2004; Gravier-Bonnet et Bourmaud 2006a, 2006b, 2012; Di Camillo et al. 2008, 2009, 2011; Moura et al. 2012). Elle est composée de morpho-espèces de grande taille, avec de nombreux caractères micro- et macro-morphologiques distinctifs (Bouillon et al. 2006) et elle présente une morphologie relativement complexe par rapport aux autres hydrozoaires, facilitant une partie du travail taxinomique. Enfin, de nombreuses espèces de cette famille habitent les habitats côtiers, pouvant être assez facilement échantillonnées.

L'analyse de la reconstruction phylogénétique de cette famille, basée sur plusieurs marqueurs moléculaires (mitochondriaux et nucléaires), met en évidence que tous ses genres sont polyphylétiques ou présentent un statut monophylétique discutable. Nos résultats confirment donc la diversité phylétique de cette famille (Moura et al. 2012), le nombre de genres étant sous-estimé au minimum de 50% (voir chapitre 2). En outre, nos résultats confirment l'importance des phénomènes de convergence évolutive et de conservatisme phénotypique chez cette famille (Leclère et al. 2007, 2009; Moura et al. 2012). Les phénomènes de convergence évolutive sont fréquents chez les cnidaires de manière générale (Belmonte et al. 1997; Collins 2002; Sinniger et al. 2008; McFadden et al. 2010; Gittenberger et al. 2011; Hoeksema et Crowther 2011; Brugler et al. 2013; Kayal et al. 2013; Arrigoni et al. 2014; Kitano et al. 2014), et ils ont également été mis en évidence à plusieurs reprises chez les hydrozoaires (Govindarajan et al. 2006; Leclère et al. 2007, 2009; Nawrocki et al. 2010; Cartwright et Nawrocki 2010). L'utilisation de ces critères morphologiques pour classer les taxons, comme c'est le cas chez les Aglaopheniidae, aboutit à une sous-estimation de la diversité phylétique car ces critères peuvent être trompeurs pour des organismes relativement simples sur le plan anatomique : comme chez d'autres cnidaires, leur relative simplicité anatomique ne permet pas d'estimer le nombre de lignées évolutives indépendantes composant un taxon (Dawson et Jacobs 2001; Souter 2009; Flot et al. 2011). Cependant, l'étude des caractères morphologiques des Aglaopheniidae semble à même d'expliquer un certain apparentement entre lignées car les morpho-espèces sont pour la plupart des regroupements monophylétiques, bien que l'on ignore ce que représente vraiment celui-ci.

5.1.1. Conservatisme phénotypique ou convergence évolutive ?

Dans le cas d'une spéciation par simple dérive génétique des populations, la nature même de la dérive génétique (le hasard détermine quels allèles passent d'une génération à l'autre) implique une accumulation des différences génétiques et donc potentiellement phénotypiques au cours du temps. Plus on remonte dans l'arbre phylogénétique des lignées étudiées, plus le nombre de différences entre organismes augmente : si la morphologie ne change pas alors que la divergence évolutive augmente, cela indique qu'il existe des pressions de sélection, plus ou moins forte, la contraignant. La conservation du phénotype entre lignées indépendantes est donc due à des pressions de sélection similaires, issues de l'environnement, influençant les caractères morphologiques. Ces pressions peuvent prendre la forme d'une sélection stabilisante : par une sélection négative envers les phénotypes extrêmes, la sélection stabilisante (Wiens 2004; Wiens et Graham 2005) empêche l'apparition de nouvelles formes et fonctions. Par conséquent des populations, voire des espèces, resteront morphologiquement similaires sur de longues périodes de temps. Chez un groupe ne reposant pas sur des facteurs visuels pour assurer la rencontre des partenaires pour la reproduction, comme les hydrozoaires, la sélection stabilisante au niveau morphologique sera liée à l'accès à la ressource nutritive (élimination des phénotypes ne pouvant pas se nourrir) : la morphologie des individus dépendra de cette sélection stabilisante et des conditions environnementales. La morphologie est donc fortement liée à l'écologie des lignées, et non pas seulement à leur phylogénie. En d'autres termes, le phénotype des espèces n'est pas obligatoirement le reflet direct des processus de spéciation. Pour résumer, il existe un différentiel entre spéciation et accumulation de différences morphologiques, d'autant plus chez un groupe dont la morphologie est *quasi* exclusivement liée à l'accès à la ressource nutritive : un changement drastique de morphologie impliquera très probablement un changement de niche écologique.

A un niveau de divergence évolutive élevé, c'est-à-dire au-delà des morpho-espèces, il semble que la morphologie des colonies d'Aglaopheniidae soit soumise à une sélection stabilisante. En effet, bien que l'organisation et la forme des hydrothèques, des hydroclades et le type de branchement des hydroclades soient variables, toutes les morpho-espèces sont de grandes « plumes » rigides. Il semble donc que les membres de cette famille occupent des niches écologiques relativement similaires. Néanmoins, un groupe de caractères dénote fortement par rapport aux autres : les structures de reproduction. La polyphylie des genres,

qui sont identifiés à partir de ce critère, montre que ces caractères ont évolué à plusieurs vers la même morphologie au sein de lignées indépendantes. Comme déjà démontré chez les hydrozoaires de manière générale, les caractères liés au mode de reproduction sont sujets non seulement à convergence évolutive, mais également à réversion (Leclère et al. 2007, 2009). La possibilité de convergence et de réversion implique que ce caractère n'est pas évolutivement stable et ne devrait donc pas être utilisé dans la classification de cette famille (Moura et al. 2012), et *a fortiori* des hydrozoaires.

A un niveau de divergence inférieur dans leur arbre phylogénétique, c'est-à-dire celui des morpho-espèces, il semble également qu'une sélection stabilisante induise la conservation du phénotype entre lignées indépendantes. Cette sélection, ayant probablement pour origine la niche écologique occupée par les morpho-espèces, pourrait expliquer la monophylie des morpho-espèces étudiées, mais également leur diversité cryptique. Comme le montre l'étude de la répartition de la diversité phylétique et des processus de diversification des poissons coralliens (Hubert et al. 2011), les changements de niches écologiques semblent jouer un rôle accessoire dans les processus de diversification des espèces coralliennes. L'apparition de nouvelles espèces est liée à la colonisation de nouvelles îles, disposant de niches écologiques encore inoccupées, et non à la compétition interspécifique conduisant à un changement de niche écologique. Nos résultats indiquent la présence de nombreuses lignées évolutive indépendantes au sein de certaines morpho-espèces. Au vu du fait que la majorité des lignées identifiées présentent une répartition géographique limitée, elles représenteraient donc des espèces différentes utilisant une niche écologique identique, ce qui implique un taux d'endémisme extrêmement important chez cette famille. La diversité évolutive de cette famille est donc sous-estimée, de nombreuses morpho-espèces représentant en fait des groupes de lignées évolutives, ou espèces au sens premier du terme. En outre, comme le souligne la grande proportion de singletons dans l'analyse à l'aide du modèle GMYC, l'échantillonnage de la diversité phylétique des morpho-espèces étudiées est incomplet. Ce modèle cherche à recréer des métapopulations indépendantes à partir des haplotypes échantillonnés (Pons et al. 2006). La présence de singletons indique donc que la diversité réelle du marqueur (en nombre d'haplotypes) est supérieure au nombre d'haplotypes échantillonnés, car les singletons sont trop divergents par rapport aux *a priori* du modèle pour faire partie des métapopulations identifiées. En d'autres termes, une partie de la diversité des taxons reste donc inconnue. Les Aglaopheniidae sont

parmi les hydrozoaires les plus étudiés, avec de nombreuses séquences disponibles par morpho-espèce sur les bases de données internationales. Il est donc hautement probable que d'autres familles d'hydrozoaires, morphologiquement plus simples et/ou moins accessibles, présentent une diversité cryptique aussi importante et pour le moment inconnue (Schuchert 2005, 2014; Miglietta et al. 2007; Lindner et al. 2011; Moura et al. 2011, 2012). En outre, de nombreuses régions du monde (ex : Caraïbes, Pacifique Est) et écosystèmes (ex : plaines abyssales) restent encore à échantillonner. Un échantillonnage intensif des morpho-espèces d'Aglaopheniidae pourrait en outre conduire à la découverte de nombreuses espèces cryptiques, comme celle mise en évidence chez *Lytocarpia brevirostris* (voir chapitre 3, en se basant sur des données de séquence et de microsatellites), disposant de leurs propres lignées évolutives.

5.1.2. Importance des données écologiques

Bien que théoriquement possible (Estes et Arnold 2007), l'importance de la sélection stabilisante dans les processus de diversification des espèces et la manière de la mesurer restent abondamment débattues, tant sur les protocoles de mesure que sur les méthodes d'analyse à employer ou la robustesse des tests statistiques utilisés (Kingsolver et al. 2012). En outre, on ne peut observer que le résultat de cette sélection : des espèces phylogénétiquement proches utilisent la même niche, mais on ignore l'importance de la force de sélection les empêchant de changer de niche. L'une des approches pour étudier cette force de sélection stabilisante peut être l'étude de la plasticité phénotypique des organismes. Plus ils seront plastiques, moins la pression de sélection sur les caractères phénotypiques mesurés sera importante. Pourtant, le principal défaut des recherches étudiant la plasticité phénotypique des organismes est l'absence de collecte de données écologiques, même parcellaires, empêchant de relier la morphologie aux pressions évolutives issues de la niche écologique utilisée (Kingsolver et al. 2012; voir Bruno et Edmonds (1997) pour un exemple chez les coraux).

Les données écologiques manquent cruellement chez la plupart des hydrozoaires (mais voir Gili et Hughes (1995)), expliquant peut-être en partie la difficulté d'établir une classification représentative des liens de parenté entre lignées évolutives de cette classe. Chez les Aglaopheniidae, la plupart des espèces du Sud-Ouest de l'océan Indien présentent

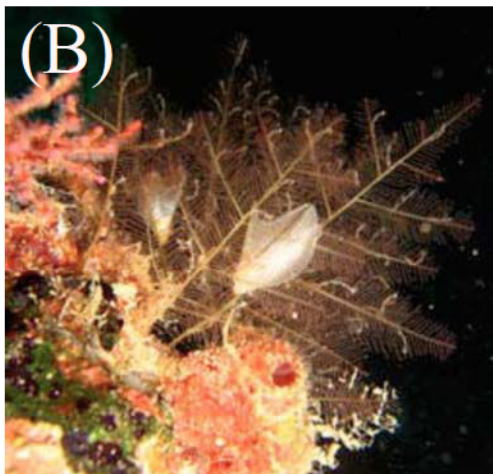
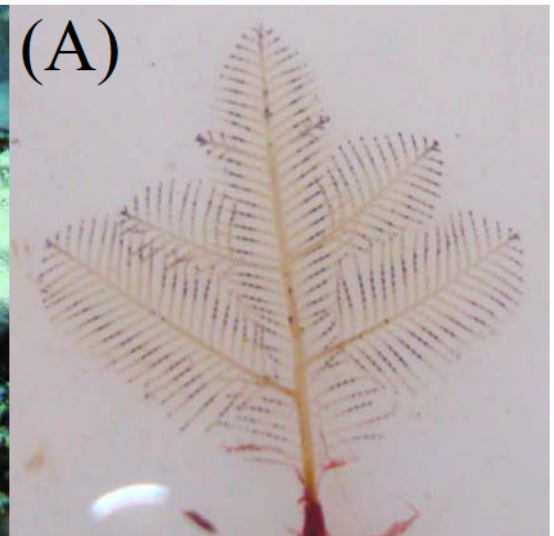
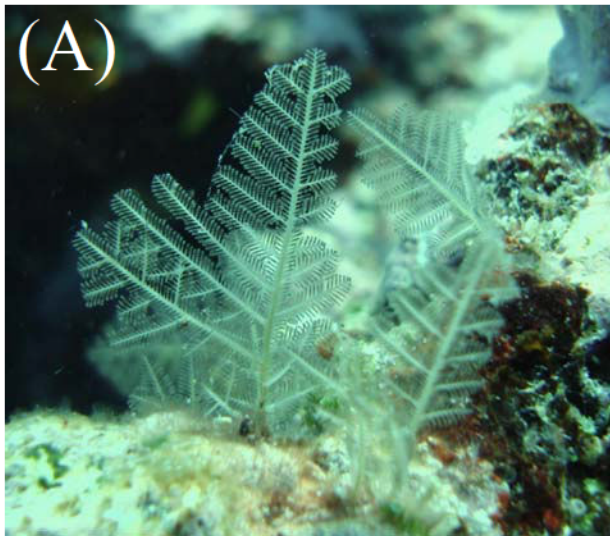


Figure 1. Colonies de *Macrorhynchia phoenicea*; A : morphe « bicolore »; B : morphe « gracile ».

des gammes d'habitats et des aires de répartition très larges, relativement homogènes entre espèces (Millard 1975). Néanmoins, des préférences générales d'habitats en termes de luminosité, de profondeur et d'hydrodynamisme ont depuis été notées chez plusieurs morpho-espèces dans trois récifs de l'Ouest de l'océan Indien (Gravier-Bonnet et Bourmaud 2006a, 2006b, 2012), ainsi que le long de la pente externe d'un récif en Indonésie (Di Camillo et al. 2008, 2009, 2011).

L'échantillonnage lors de cette thèse nous a permis de relever des variations dans la répartition des morpho-types du complexe d'espèces *Macrorhynchia phoenicea* au sein des récifs coralliens prospectés (voir chapitre 3) (Figure 1). En effet, des populations du morphe « gracile » ont pu être échantillonnées sur les pentes externes des récifs de Juan de Nova (sur une épave) et de La Réunion entre 0 et 20 m de profondeur, alors que le morphe « bicolore » a été échantillonné sur les pentes externes à Madagascar, en Nouvelle-Calédonie (entre 0 et 20 m de profondeur) et sur un tombant de l'Ouest de La Réunion (entre 25 et 35 m de profondeur). Bien que la profondeur ne semble pas être un facteur discriminant majeur dans leur distribution, le morphe « gracile » se trouvait préférentiellement sous les surplombs rocheux à l'abri des courants forts, alors que le morphe « bicolore » se trouvait en pleine lumière, dans le courant, souvent au pied de colonies branchues des coraux du genre *Pocillopora* Lamarck, 1816. Notre échantillonnage semble donc confirmer des différences en termes de micro-habitats préférentiels et d'aires de répartition chez ces deux morpho-types de *M. phoenicea*. Par ailleurs, ces morphes, que nous n'avons pas pu discerner selon des critères morphologiques classiques (forme et taille de l'hydrothèque, des hydroclades et des structures de reproduction) mais semblant disposer de micro-habitats et de forme générale de colonie différents, ont également pu être différenciés par la reconstruction d'un arbre phylogénétique. Nos résultats, bien que préliminaires, montrent l'intérêt de collecter des informations écologiques dans le but d'identifier des caractères morphologiques permettant d'appréhender la diversité des taxons, en combinaison avec des données phylogénétiques et d'éliminer des critères de détermination les caractères morphologiques subissant une sélection stabilisante.

Comme le montrent nos résultats, la collecte de données écologiques et phylogénétiques pourrait permettre d'identifier certaines convergences évolutives et ainsi aider à identifier de nouveaux caractères utiles à la classification des Aglaopheniidae et offrant une bonne représentation de l'apparentement entre lignées. Cette méthode a déjà prouvé son potentiel

chez plusieurs taxons, tant terrestres comme les amphibiens (Rissler et Apodaca 2007) que marins comme les gastéropodes marins (Johannesson 2003) ou les hydrozoaires (Nawrocki et al. 2010; Kim et al. 2013). Une révision de la taxinomie de cette famille requiert donc *a minima* non seulement la combinaison de caractères morphologiques et de données écologiques des morpho-espèces, mais également l'utilisation de données génétiques.

5.2. Une diversité cryptique importante en lien avec le cycle de vie

L'analyse de la structuration spatiale des populations de *Lytocarpia brevirostris* indique que l'isolement par la distance, à plusieurs échelles géographiques, pourrait être la règle chez de nombreux Aglaopheniidae (voir chapitre 4). En effet, chez d'autres organismes marins incubant leurs larves (cnidaires, mollusques, échinodermes; Kyle et Boulding 2000; Mokhtar-Jamaï et al. 2011; Ledoux et al. 2011), la réduction de la phase de dispersion larvaire entraîne une structuration importante des populations, parfois même à l'échelle de quelques kilomètres comme chez la gorgone rouge, *Paramuricea clavata* (Risso, 1826)(Mokhtar-Jamaï et al. 2011). *Lytocarpia brevirostris* étant une espèce côtière, elle nécessite la présence de substrat dur pour s'établir et se maintenir. Or, l'aire de distribution de *L. brevirostris* comprend de nombreuses îles océaniques. L'isolement par la distance détecté semble donc lié à la disponibilité des habitats, chaque site propice au recrutement étant séparé des autres par des étendues de haute mer. Le lien potentiel entre disponibilité de l'habitat et isolement par la distance a été mis en évidence chez des gastéropodes marins (Donald et al. 2011), mais a également été émis comme hypothèse pour expliquer la structuration des populations d'un poisson récifal du Sud-Ouest de l'océan Indien (Muths et al. 2011).

Néanmoins, l'isolement par la distance pourrait également être le reflet d'un biais lié à un échantillonnage non exhaustif des populations de *L. brevirostris* au sein de son aire de distribution. Cependant, même à petite échelle (île, quelques kilomètres), les populations de *L. brevirostris* échantillonnées sont très différenciées génétiquement, car très isolées, confirmant les très faibles capacités de dispersion de cette espèce et rejetant ainsi l'hypothèse du biais d'échantillonnage.

D'un point de vue évolutif, la modélisation de l'impact d'un isolement par la distance sur les espèces avec de faibles capacités de dispersion montre qu'elles sont naturellement enclines à former de nouvelles espèces, même au sein d'un milieu uniforme (Hoelzer et al.

2008). *Lytocarpia brevirostris* semble se conformer à ce modèle, présentant une diversité cryptique importante au sein de la zone échantillonnée, et donc *a fortiori* sur l'ensemble de son aire de répartition : chaque île présenterait une lignée évolutive indépendante, pouvant être considérée comme une espèce cryptique. Considérant que la plupart des espèces d'Aglaopheniidae disposent d'un cycle de vie similaire (espèces incubatrices), le nombre de lignées évolutives de cette famille pourrait être extrêmement important et le taux d'endémisme pourrait suivre le même schéma. Un tel lien entre le mode de reproduction et la diversité cryptique a été mis en évidence chez les holothuries : les espèces qui disposent de phases de vie planctonique courtes présentent un nombre de lignées évolutives supérieur aux autres (Michonneau et al. 2015). Ce lien a également été montré chez une morpho-espèce d'hydrozoaires incubatrice, *Plumularia setacea* (Linnaeus, 1758) (Schuchert 2014). De même, chez des ophiures du Sud-Ouest de l'océan Indien, la faible durée de vie larvaire et le nombre important de lignées évolutives sont corrélés (Hoareau et al. 2013). La majorité des morpho-espèces d'Aglaopheniidae sont très certainement des mosaïques de métapopulations n'échangeant que très peu d'allèles entre elles. Mais il existe néanmoins une exception : *Macrorhynchia philippina* présente une lignée commune à l'Atlantique et à l'Indo-Pacifique (voir chapitre 3). C'est une morpho-espèce un peu à part chez les Aglaopheniidae : contrairement à la majorité des autres morpho-espèces, celle-ci est hermaphrodite et produit des médusoïdes comportant un nombre important d'ovocytes (Bourmaud et Gravier-Bonnet 2004). Ces deux caractéristiques, pouvant faciliter la fécondation et la dispersion, pourraient expliquer la présence d'une lignée à répartition mondiale, mais cet aspect nécessite de plus amples recherches.

Le mode de reproduction pourrait donc avoir un impact non négligeable sur les processus de diversification et la diversité sous-jacente des Aglaopheniidae. En effet, l'isolement par la distance des populations est un des premiers stades de formation des espèces, en limitant les flux de gènes et en mettant en place un isolement pré-zygotique progressif entre populations apparentées. Cet isolement par la distance se traduit sur des échelles de temps longues par des phénomènes de spéciation parapatrique, c'est-à-dire des phénomènes de spéciation en présence de flux de gènes. La spéciation parapatrique est très difficile à mettre en évidence, car elle montre le même patron, du moins en apparence, que la spéciation allopatrique : les aires de répartition des espèces nouvellement formées ne se chevauchent pas (Coyne et Orr 2004). En outre, au vu du mode de reproduction et de la

quasi absence de morpho-espèces communes entre l'Atlantique et l'Indo-Pacifique (voir chapitre 3), la spéciation allopatrique (qui s'effectue sans flux de gènes) pourrait également jouer un rôle dans la diversification des Aglaopheniidae. Par ailleurs, le nombre variable de lignées en fonction des morpho-espèces au sein de la province la plus prospectée (Sud-Ouest de l'océan Indien) et la divergence entre les lignées du Sud-Ouest de l'océan Indien et de Nouvelle-Calédonie laissent supposer plusieurs événements de vicariance (première étape de la spéciation allopatrique). La spéciation allopatrique chez les espèces marines peut être due à la formation d'une barrière biogéographique, comme la formation de l'isthme de Panama il y a environ 3 millions d'années qui a séparé les communautés de poissons récifaux (Bermingham et al. 1997; Knowlton et Weigt 1998), démultipliant la richesse spécifique de la région. La spéciation allopatrique chez les espèces marines peut également prendre la forme d'une coupure des flux de gènes entre populations suite à une modification de la circulation océanique, conduisant à une divergence des populations. Ce sont les variations des niveaux marins au cours des différentes périodes géologiques qui ont aidé à la formation des points chauds de biodiversité du Sud-Ouest de l'océan Indien (Hoareau et al. 2013; Postaire et al. 2014), mais également celui de l'archipel indo-australien (Lohman et al. 2011). Enfin, la spéciation allopatrique peut avoir lieu suite à la colonisation d'un nouveau milieu par un groupe d'individus, comme chez les crustacés du genre *Calcinus* Dana, 1851 (Malay et Paulay 2010). Les populations nouvellement installées évoluent alors indépendamment de la population mère. Ce mode de spéciation est également appelé spéciation péripatrique et serait à l'origine d'une grande partie de la biodiversité marine (Paulay et Meyer 2002; Hickerson et Meyer 2008).

Ainsi, les lignées identifiées dans cette thèse, propres à chaque région biogéographique, voire à chaque île, peuvent avoir pour origine l'isolement des populations suite aux variations historiques des niveaux marins, ou bien être issues de plusieurs événements de colonisation. Cependant, il est également possible que la communication entre populations soit encore effective, assurée par la migration d'individus fixés sur des objets flottants comme des morceaux de bois, de plastique ou encore des algues, dérivant au gré des courants marins (Thiel et Gutow 2005). Par ailleurs, des radeaux, formés par des squelettes coralliens qui hébergent une très grande diversité d'organismes marins, ont déjà été observés au niveau de la Grande Barrière de Corail (DeVantier 1992). Ce type de migrations à longue distance a été mis en évidence à l'aide de marqueurs microsatellites chez des gastéropodes

entre les régions Ouest et Est de l'océan Pacifique (Donald et al. 2011). Bien qu'ils soient rares à l'échelle d'une vie humaine, ces événements de migration pourraient assurer une communication suffisante pour empêcher la mise en place d'un isolement reproducteur.

Notre échantillonnage n'est pas assez complet pour déterminer l'importance relative de la parapatricie par rapport à l'allopatricie à l'échelle de la famille. Cependant, il est possible de modéliser des flux migratoires entre populations en se basant sur des données de génétique des populations, ce qui permettrait de mesurer l'importance des flux de gènes en fonction de la distance géographique au sein des espèces étudiées. En perspective, cette approche sera utilisée sur *Lytocarpia brevirostris* et *Macrorhynchia phoenicea* afin d'apporter des éléments de réponse sur l'importance de la spéciation allopatricie chez ces deux morpho-espèces incubatrices d'Aglaopheniidae.

5.3. Conclusions

Cette thèse représente la première étude de la diversité phylétique et de la richesse cryptique au sein des Aglaopheniidae. Ainsi, les résultats de nos recherches mettent en évidence que tous les différents niveaux de divergence évolutive explorés possèdent une importante diversité phylétique que la classification et la taxinomie de la famille ne permettent pas encore d'appréhender. Néanmoins, les résultats de ce travail montrent le potentiel des procédures de taxinomie intégrative, compilant des données morphologiques, écologiques et génétiques dans le processus de délimitation d'espèces chez ces organismes. Soulignant le fait que la richesse spécifique des Aglaopheniidae est grandement sous-estimée et l'isolement par la distance important entre les populations d'une espèce type de cette famille, notre étude révèle que l'endémisme chez cette famille pourrait être très élevé : chaque province, voire chaque île, hébergerait des lignées évolutives indépendantes. Cette richesse spécifique semble en lien avec le cycle de vie des espèces de cette famille, ne présentant pas pour la plupart de longues phases de dispersion larvaire, ce qui nécessite des recherches supplémentaires. Appliquées à d'autres familles d'hydrozoaires, comme par exemple les Sertulariidae, les méthodes utilisées dans cette thèse pourraient révéler également une diversité insoupçonnée jusqu'alors.

6. Références bibliographiques

- Addamo AM, Reimer JD, Taviani M, Freiwald A, Machordom A (2012) *Desmophyllum dianthus* (Esper, 1794) in the Scleractinian Phylogeny and Its Intraspecific Diversity. PLoS ONE 7:e50215. doi: 10.1371/journal.pone.0050215
- Agapow PM, Bininda-Emonds ORP, Crandall KA, Gittleman J L, Mace GM, Marshall JC, Purvis A (2004) The Impact of Species Concept on Biodiversity Studies. Q Rev Biol 79:161–179. doi: 10.1086/383542?ref=search-gateway:64db22132e8f9a71b9bf6725db1d6837
- Allman GJ (1874) On the diagnosis of new genera and species of hydroids. Nat 11:179.
- Allman GJ (1876) Diagnoses of new genera and species of hydroids. Journal of the Linnean Society of London, Zoology 12:251–284.
- Allman GJ (1877) Report on the Hydroida collected during the exploration of the gulf stream by L. F. de Pourtalès, assistant United states Coast survey. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology 5:1–66.
- Allman GJ (1883) Report on the Hydroida dredged by H.M.S. Challenger during the years 1873-76. Part I. Plumularidae. Report on the scientific Results of the Voyage of HMS Challenger, Zoology 7:1–20.
- Andréfouët S, Muller-Karger FE, Robinson JA, Kanenburg CJ, Torres-Pulliza D, Spraggins SA, Murch B (2006) Global assessment of modern coral reef extent and diversity for regional science and management applications: a view from space. 1:1732–1745.
- Arnaud-Haond S, Belkhir K (2007) GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. Molecular Ecology Notes 7:15–17. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01522.x
- Arnaud-Haond S, Duarte CM, Alberto F, Serrão EA (2007) Standardizing methods to address clonality in population studies. Molecular Ecology 16:5115–5139. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03535.x
- Arrigoni R, Terraneo TI, Galli P, Benzoni F (2014) Lobophylliidae (Cnidaria, Scleractinia) reshuffled: Pervasive non-monophyly at genus level. Molecular Phylogenetics and Evolution 73:60–64. doi: 10.1016/j.ympev.2014.01.010
- Astrin JJ, Stüben PE, Misof B, Wägele JW, Gimmich F, Raupach MJ, Ahrens D (2012) Exploring diversity in cryptorhynchine weevils (Coleoptera) using distance-, character-

- and tree-based species delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63:1–14. doi: 10.1016/j.ympev.2011.11.018
- Aurelle D, Ledoux JB, Rocher C, Borsa P, Chenuil A, Féral J-P (2011) Phylogeography of the red coral (*Corallium rubrum*): inferences on the evolutionary history of a temperate gorgonian. *Genetica*. doi: 10.1007/s10709-011-9589-6
- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge
- Avice JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36:3–15. doi: 10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x
- Ayre DJ, Hughes TP (2000) Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the Great Barrier Reef, Australia. *Evolution* 54:1590–1605.
- Ayre DJ, Minchinton TE, Perrin C (2009) Does life history predict past and current connectivity for rocky intertidal invertebrates across a marine biogeographic barrier? *Molecular Ecology* 18:1887–1903. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04127.x
- Baba ML, Goodman M, Berger-Cohn J, et al (1984) The early adaptive evolution of calmodulin. *Mol Biol Evol* 1:442–455.
- Bale WM (1888) On some new and rare Hydroida in the Australian Museum collection. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 3:745–799.
- Barber PH, Bellwood DR (2005) Biodiversity hotspots: evolutionary origins of biodiversity in wrasses (Halichoeres: Labridae) in the Indo-Pacific and new world tropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35:235–253. doi: 10.1016/j.ympev.2004.10.004
- Barco A, Claremont M, Reid DG, Houart R, Bouchet P, Williams ST, Cruaud C, Couloux A, Oliverio M (2010) A molecular phylogenetic framework for the Muricidae, a diverse family of carnivorous gastropods. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:1025–1039. doi: 10.1016/j.ympev.2010.03.008
- Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, Marshall C, McGuire JL, Lindsey EL, Maguire KC, Mersy B, Ferre EA (2011) Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nat* 471:51–57. doi: 10.1038/nature09678
- Barraclough TG, Hughes M, Ashford-Hodges N, Fujisawa T (2009) Inferring evolutionarily significant units of bacterial diversity from broad environmental surveys of single-locus data. *Biology Letters* 5:425–428. doi: 10.1098/rsbl.2009.0091
- Baum DA, Shaw KL (1995) Genealogical perspectives on the species problem. *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics* 53:289–303.
- Baums IB, Miller MW, Hellberg ME (2006) Geographic variation in clonal structure in a

- reef-building caribbean coral, *Acropora palmata*. Ecological Monographs 76:503–519. doi: 10.1890/0012-9615(2006)076[0503:GVICSI]2.0.CO;2
- Bavestrello G, Puce S, Cerrano C, Sarà M (2000) Phenotypic plasticity in hydrozoans: morph reversibility. Riv Biol 93:283–294.
- Bellard C, Leclerc C, Courchamp F (2013) Impact of sea level rise on the 10 insular biodiversity hotspots. Global Ecology and Biogeography 23:203–212. doi: 10.1111/geb.12093
- Belmonte G, Miglietta A, Rubino F, Boero F (1997) Morphological convergence of resting stages of planktonic organisms: a review. 355:159–165. doi: 10.1023/A:1003071205424
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological) 57:289–300. doi: 10.2307/2346101?ref=no-x-route:6ebf31d96de7cf134a3383027f7f2cef
- Benzoni F, Stefani F, Pichon M, Galli P (2010) The name game: morpho-molecular species boundaries in the genus *Psammocora* (Cnidaria, Scleractinia). Zoological Journal of the Linnean Society 160:421–456. doi: 10.1111/j.1096-3642.2010.00622.x
- Bergsten J, Bilton DT, Fujisawa T, Elliott M, Monaghan MT, Balke M, Hendrich L, Geiger J, Herrmann J, Foster GN, Ribera I, Nillson AN, Barraclough TG, Vogler AP (2012) The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. Systematic Biology 61:851–869. doi: 10.2307/41677983?ref=search-gateway:810bcf8fb5e8d510b73ff20486b6b881
- Berlocher SH (1998) Can Sympatric speciation via host or habitat shift be proven from phylogenetic and biogeographic evidence. Endless Forms
- Bermingham E, McCafferty SS, Martin AP (1997) Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. Molecular systematics of fishes 113–128.
- Berntson E (1999) Phylogenetic Relationships within the Class Anthozoa (Phylum Cnidaria) Based on Nuclear 18S rDNA Sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 13:417–433. doi: 10.1006/mpev.1999.0649
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. TREE 22:148–155. doi: 10.1016/j.tree.2006.11.004
- Billard A (1906) Hydroïdes [expédition Antarctique Française (1903-1905) commandée par le dr Jean Charcot]. Masson, Paris
- Billard A (1912) Hydroïdes de Roscoff. Archives de Zoologie Expérimentale et Générale

51:459–478.

- Billard A (1913) Les hydroïdes de l'expédition du Siboga, i. Plumulariidae. Résultats Exploration Siboga 7:1–115.
- Boero F, Bouillon J (1993) Zoogeography and life cycle patterns of Mediterranean hydromedusae (Cnidaria). Biological Journal of the Linnean Society 48:239–266. doi: 10.1006/bijl.1993.1017
- Boissin E, Féral JP, Chenuil A (2008) Defining reproductively isolated units in a cryptic and syntopic species complex using mitochondrial and nuclear markers: the brooding brittle star, *Amphipholis squamata* (Ophiuroidea). Molecular Ecology 17:1732–1744. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03652.x
- Boissin E, Hoareau TB, Berrebi P (2011) Effects of current and historic habitat fragmentation on the genetic structure of the sand goby *Pomatoschistus minutus* (Osteichthys, Gobiidae). Biological Journal of the Linnean Society
- Botsford LW, Hastings A, Gaines SD (2001) Dependence of sustainability on the configuration of marine reserves and larval dispersal distance. Ecology Letters 4:144–150.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, et al (2014) BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. PLoS Comput Biol 10:e1003537. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003537
- Bouillon J, Boero F (2000) The hydrozoa: a new classification in the light of old knowledge. Thalassia Salentina 24:3–45.
- Bouillon J, Gravili C, Pagès F, et al (2006) An Introduction to Hydrozoa. Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris
- Bourjea J, Lapègue S, Gagnevin L, Broderick D, Mortimer JE, Ciccione S, Roos D, Taquet C, Grizal H (2006) Phylogeography of the green turtle, *Chelonia mydas*, in the Southwest Indian Ocean. Molecular Ecology 16:175–186. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03122.x
- Bourmaud CAF, Gravier-Bonnet N (2004) Medusoid release and spawning of *Macrorhynchia philippina* Kirchenpauer, 1872 (Cnidaria, Hydrozoa, Aglaopheniidae). Hydrobiologia 530/531:365–372.
- Bridge D, Cunningham CW, DeSalle R, Buss LW (1995) Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. Mol Biol Evol 12:679–689.
- Bridge D, Cunningham CW, Schierwater B, DeSalle R, Buss LW (1992) Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure.

PNAS 89:8750–8753.

- Briggs JC (2005) Coral reefs: Conserving the evolutionary sources. *Biological Conservation* 126:297–305. doi: 10.1016/j.biocon.2005.06.018
- Brugler MR, Opresko DM, France SC (2013) The evolutionary history of the order Antipatharia (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia) as inferred from mitochondrial and nuclear DNA: implications for black coral taxonomy and systematics. *Zoological Journal of the Linnean Society* 169:312–361. doi: 10.1111/zoj.12060
- Bruno JF, Edmunds PJ (1997) Clonal Variation for Phenotypic Plasticity in the Coral *Madracis Mirabilis*. *Ecology* 78:2177–2190. doi: 10.2307/2265954?ref=no-x-route:19399072923791d6a46266b8cdcfbb79
- Budd AF, Romano SL, Smith ND, Barbeitos MS (2010) Rethinking the Phylogeny of Scleractinian Corals: A Review of Morphological and Molecular Data. *Integrative and Comparative Biology* 50:411–427. doi: 10.1093/icb/icq062
- Busk G (1852) An account of the Polyzoa and sertularian zoophytes collected in the voyage of the “rattlesnake” on the coast of Australia and the Louisiade Archipelago. In: MacGillivray J (ed) *Narrative of the voyage of H.M.S. Rattlesnake, commanded by the late Captain Owen Stanley during the years 1846-50*. Boone, London, pp 343–402
- Calder DR (1997) Shallow-water Hydroids of Bermuda : Superfamily Plumularioidea. *Life Sciences Contributions Royal Ontario Museum* 161:1–85.
- Carstens BC, Dewey TA (2010) Species Delimitation Using a Combined Coalescent and Information-Theoretic Approach: An Example from North American Myotis Bats. *Systematic Biology* 59:syq024–414.
- Carstens BC, Pelletier TA, Reid NM, Satler JD (2013) How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22:4369–4383. doi: 10.1111/mec.12413
- Cartwright P, Nawrocki AM (2010) Character Evolution in Hydrozoa (phylum Cnidaria). *Integrative and Comparative Biology* 50:456–472. doi: 10.1093/icb/icq089
- Castelin M, Lambourdière J (2010) Hidden diversity and endemism on seamounts: focus on poorly dispersive neogastropods. *Biological Journal of the Linnean Society* 100:420–438.
- Castelin M, Lorion J, Brisset J, et al (2012) Speciation patterns in gastropods with long-lived larvae from deep-sea seamounts. *Molecular Ecology* 21:4828–4853. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05743.x
- Chen CA, Odorico DM, Lohuis ten M, Veron JE, Miller DJ (1995) Systematic relationships within the Anthozoa (Cnidaria: Anthozoa) using the 5'-end of the 28S rDNA. *Molecular*

- Phylogenetics and Evolution 4:175–183.
- Christie MR, Tissot BN, Albins MA, Beets JP, Jia Y, Ortiz DM, Thompson SE, Hixon MA (2010) Larval Connectivity in an Effective Network of Marine Protected Areas. *PLoS ONE* 5:e15715. doi: 10.1371/journal.pone.0015715
- Cinner JE, Daw T, McClanahan TR (2009) Socioeconomic Factors that Affect Artisanal Fishers' Readiness to Exit a Declining Fishery. *Conservation Biology* 23:124–130. doi: 10.1111/j.1523-1739.2008.01041.x
- Cinner JE, McClanahan TR (2006) Socioeconomic factors that lead to overfishing in small-scale coral reef fisheries of Papua New Guinea. *Environmental Conservation* 33:73. doi: 10.1017/S0376892906002748
- Coleman AW (2003) ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* 19:370–375. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00118-5
- Collins AG (2002) Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* 15:418–432. doi: 10.1046/j.1420-9101.2002.00403.x
- Collins AG, Winkelmann S, Hadrys H, Schierwater B (2005) Phylogeny of Capitata and Corynidae (Cnidaria, Hydrozoa) in light of mitochondrial 16S rDNA data. *Zool Scripta* 34:91–99. doi: 10.1111/j.1463-6409.2005.00172.x
- Condamine FL, Silva-Brandão KL, Kergoat GJ, Sperling FAH (2012) Biogeographic and diversification patterns of Neotropical Troidini butterflies (Papilionidae) support a museum model of diversity dynamics for Amazonia. *BMC Evolutionary Biology* 12:16.
- Costello MJ, Bouchet P, Boxshall G, Fauchald K, Gordon D, Hoeksema BW, Poore GCB, van Soest RWM, Störh S, Walter TC, Vanhoorne B, Decock W, Appeltans W (2013) Global Coordination and Standardisation in Marine Biodiversity through the World Register of Marine Species (WoRMS) and Related Databases. *PLoS ONE* 8:e51629. doi: 10.1371/journal.pone.0051629
- Courchamp F, Hoffmann BD, Russell JC, Leclerc C, Bellard C (2014) Climate change, sea-level rise, and conservation: keeping island biodiversity afloat. *TREE* 29:127–130. doi: 10.1016/j.tree.2014.01.001
- Cowen RK, Gawarkiewicz G, Pineda J, Thorrold SR, Werner FR (2007) Population Connectivity in Marine Systems. *Oceanography* 20:14–21.
- Cowman PF, Bellwood DR (2012) The historical biogeography of coral reef fishes: global patterns of origination and dispersal. *Journal of Biogeography* 40:209–224. doi: 10.1111/jbi.12003
- Coyne JA, Orr HA (1998) The evolutionary genetics of speciation. *Proc R Soc B* 353:287–

305. doi: 10.1098/rstb.1998.0210
- Coyne JA, Orr HA (2004) Speciation. Sinauer Associates, Inc, Sunderland
- Cunningham CW, Buss LW (1993) Molecular evidence for multiple episodes of paedomorphosis in the family Hydractiniidae. *Biochemical Systematics and Ecology* 21:57–69. doi: 10.1016/0305-1978(93)90009-G
- Daly M, Brugler MR, Cartwright P, Collins AG, Dawson M, Fautin DG, France SC, McFadden CS, Opresko DM, Rodriguez E, Romano SL, Stake JL (2007) The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* 1668:127–182.
- Daly M, Fautin DG, Cappola VA (2003) Systematics of the Hexacorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Zoological Journal of the Linnean Society* 139:419–437. doi: 10.1046/j.1096-3642.2003.00084.x
- Darling JA, Folino-Rorem NC (2009) Genetic analysis across different spatial scales reveals multiple dispersal mechanisms for the invasive hydrozoan *Cordylophora* in the Great Lakes. *Molecular Ecology* 18:4827–4840. doi: 10.1111/j.1365-294x.2009.04405.x
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat* 9:772–772. doi: 10.1038/nmeth.2109
- Daugherty CH, Cree A, Hay JM, Thompson MB (1990) Neglected taxonomy and continuing extinctions of tuatara (*Sphenodon*). *Nat* 347:177–178.
- Dawson M, Jacobs DK (2001) Molecular Evidence for Cryptic Species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biological Bulletin* 200:92–96. doi: 10.2307/1543089?ref=search-gateway:39b4acb0e55e3c06fbfb2ab3d3807e0b
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85:407–415. doi: 10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x
- De Queiroz K (1992) Phylogenetic definitions and taxonomic philosophy. *Biol Philos* 7:295–313. doi: 10.1007/BF00129972
- De Queiroz K (2005) Ernst Mayr and the Modern Concept of Species. *PNAS* 102:6600–6607. doi: 10.2307/3375299?ref=search-gateway:04a7b83d0149051476833ccfbbedd565
- De Queiroz K (2007) Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* 56:879–886. doi: 10.1080/10635150701701083
- DeVantier LM (1992) Rafting of tropical marine organisms on buoyant coralla. *Marine Ecology Progress Series* 86:301–302.
- Di Camillo CG, Bavestrello G, Valisano L, Puce S (2008) Spatial and temporal distribution in a tropical hydroid assemblage. *J Mar Biol Ass* 88:1589. doi:

10.1017/S0025315408002981

- Di Camillo CG, Puce S, Bavestrello G (2009) *Macrorhynchia* species (Cnidaria: Hydrozoa) from the Bunaken Marine Park (North Sulawesi, Indonesia) with a description of two new species. *Italian Journal of Zoology* 76:208–228. doi: 10.1080/11250000802182018
- Di Camillo CG, Puce S, Bavestrello G (2011) *Lytocarpia* and *Cladocarpus* (Cnidaria: Hydrozoa, Aglaopheniidae) from the Bunaken National Marine Park (North Sulawesi, Indonesia). *Mar Biodiv* 41:517–536. doi: 10.1007/s12526-011-0081-4
- DiBattista JD, Berumen ML, Gaither MR, Rocha LA, Eble JA, Choat JH, Craig MT, Skillings DJ, Bowen BW (2013) After continents divide: comparative phylogeography of reef fishes from the Red Sea and Indian Ocean. *Journal of Biogeography* 40:1170–1181. doi: 10.1111/jbi.12068
- Donoghue, MJ (1985) A Critique of the Biological Species Concept and Recommendations for a Phylogenetic Alternative. *The Bryologist*, 88(3), 172. <http://doi.org/10.2307/3243026>
- Donald KM, Keeney DB, Spencer HG (2011) Contrasting population makeup of two intertidal gastropod species that differ in dispersal opportunities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 396:224–232. doi: 10.1016/j.jembe.2010.10.028
- Dornburg A, Webster R, Warren DL, Brandley MC, Iglesias TL, Wainwright PC, Near TJ, Moore JA (2012) Molecular phylogenetics of squirrelfishes and soldierfishes (Teleostei: Beryciformes: Holocentridae): Reconciling more than 100 years of taxonomic confusion. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1–12. doi: 10.1016/j.ympev.2012.07.020
- Duda TF Jr, Bolin MB, Meyer CP, Kohn AJ (2008) Hidden diversity in a hyperdiverse gastropod genus: Discovery of previously unidentified members of a *Conus* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:177–186. doi: 10.1016/j.ympev.2008.08.009
- Duda TF Jr, Lessios HA (2009) Connectivity of populations within and between major biogeographic regions of the tropical Pacific in *Conus ebraeus*, a widespread marine gastropod. 28:651–659. doi: 10.1007/s00338-009-0485-9
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet Resour* 4:359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Ebach MC, Holdrege C (2005) DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nat* 434:697–697. doi: 10.1038/434697b
- Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and

- space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:113. doi: 10.1186/1471-2105-5-113
- Edwards AWF, Cavalli-Sforza LL (1964) Reconstruction of evolutionary trees. In: Heywood VH, McNeill J (eds) *Phenetic and phylogenetic classification*, Sytematics Association. London, pp 67–76
- Erixon P, Svennblad B, Britton T, Oxelman B (2003) Reliability of Bayesian Posterior Probabilities and Bootstrap Frequencies in Phylogenetics. *Systematic Biology* 52:665–673. doi: 10.1080/10635150390235485
- Esselstyn JA, Evans BJ, Sedlock JL, Khan FAA, Heaney LR (2012) Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule–coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. *Proc R Soc B* 9. doi: 10.1098/rspb.2012.0705
- Estes S, Arnold SJ (2007) Resolving the paradox of stasis: models with stabilizing selection explain evolutionary divergence on all timescales. *The American Naturalist* 169:227–244. doi: 10.1086/510633
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294x.2005.02553.x
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1:47–50.
- Ezard T, Fujisawa T, Barraclough TG (2009) Splits: species' limits by threshold statistics. R package version
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567–1587.
- Faurby S, Barber PH (2012) Theoretical limits to the correlation between pelagic larval duration and population genetic structure. *Molecular Ecology* 21:3419–3432. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05609.x
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on Phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Flot J-F, Blanchot J, Charpy L, Cruaud C, Licuanan WY, Nakano Y, Payri C (2011) Incongruence between morphotypes and genetically delimited species in the coral genus *Stylophora*: phenotypic plasticity, morphological convergence, morphological stasis or interspecific hybridization? *BMC Ecology* 11:22. doi: 10.1186/1472-6785-11-22
- Fontaneto D, Iakovenko N, Eyres I, Kaya M, Wyman M, Barraclough TG (2010) Cryptic diversity in the genus *Adineta* Hudson & Gosse, 1886 (Rotifera: Bdelloidea:

- Adinetidae): a DNA taxonomy approach. *Hydrobiologia* 662:27–33. doi: 10.1007/s10750-010-0481-7
- Fraser CM (1938) Hydroids of the 1934 Allan Hancock Pacific expedition. *Allan Hancock Pacific Expedition* 4:1–105.
- Fujisawa T, Barraclough TG (2013) Delimiting Species Using Single-locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Datasets. *Systematic Biology* 62:syt033–724. doi: 10.1093/sysbio/syt033
- Fujita MK, Leaché AD, Burbrink FT, et al (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *TREE* 27:480–488. doi: 10.1016/j.tree.2012.04.012
- Funk DJ, Omland KE (2003) Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:397–423. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421
- Gaither MR, Toonen RJ, Robertson DR, Planes S, Bowen BW (2009) Genetic evaluation of marine biogeographical barriers: perspectives from two widespread Indo-Pacific snappers (*Lutjanus kasmira* and *Lutjanus fulvus*). *Journal of Biogeography* 37:133–147. doi: 10.1111/j.1365-2699.2009.02188.x
- Galea HR (2010) Additional shallow-water thecate hydroids (Cnidaria: Hydrozoa) from Guadeloupe and Les Saintes, French Lesser Antilles. *Zootaxa*
- Galea HR (2013) New additions to the shallow-water hydroids (Cnidaria: Hydrozoa) of the French Lesser Antilles: Martinique. *Zootaxa*. doi: 10.11646/zootaxa.3686.1.1
- Gavrilets S (2003) Perspective: Models of Speciation: What Have We Learned in 40 Years? *Evolution* 57:2197–2215. doi: 10.2307/3448772?ref=search-gateway:e9f54d283d556a98813186cc1becf9af
- Gerber LR, Botsford LW, Hastings A, et al (2003) Population Models for Marine Reserve Design: A Retrospective and Prospective Synthesis. *Ecological Applications*. doi: 10.2307/3099997?ref=search-gateway:2369d68d6a076f55e1f8b0e9bdd26e01
- Gili J-M, Hughes RG (1995) The ecology of marine benthic hydroids. *Oceanography and Marine Biology* 33:351–426.
- Gittenberger, A, Reijnen, B T., & Hoeksema, B W (2011). A molecularly based phylogeny reconstruction of mushroom corals (Scleractinia: Fungiidae) with taxonomic consequences and evolutionary implications for life history traits. *Contributions to Zoology*, 80(2), 107–132.
- Goreau T, McClanahan TR, Hayes R, Strong AI (2000) Conservation of Coral Reefs after

- the 1998 Global Bleaching Event. *Conservation Biology* 14:5–15. doi: 10.2307/2641898?ref=search-gateway:24d454cfc02d7ccea9ab1c77a3d2151a
- Govindarajan AF, Boero F, Halanych KM (2006) Phylogenetic analysis with multiple markers indicates repeated loss of the adult medusa stage in Campanulariidae (Hydrozoa, Cnidaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:820–834. doi: 10.1016/j.ympev.2005.11.012
- Gravier-Bonnet N, Bourmaud CAF (2006a) Hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) of Coral Reefs: Preliminary Results on Community Structure, Species Distribution and Reproductive Biology in Juan de Nova Island (Southwest Indian Ocean). *Western Indian Ocean Journal of Marine Science* 5:123–132. doi: 10.4314/wiojms.v5i2.28504
- Gravier-Bonnet N, Bourmaud CAF (2006b) Hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) of Coral Reefs: Preliminary Results on Community Structure, Species Distribution and Reproductive Biology in the île Glorieuses (Southwest Indian Ocean). In: *Western Indian Ocean Marine Science Association, Okinawa*, pp 188–196
- Gravier-Bonnet N, Bourmaud CAF (2012) Hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) of Baa Atoll (Indian Ocean, Maldives Archipelago). *Atoll Research Bulletin* 590:85–123.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, et al (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59:307–321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
- Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23:167–172. doi: 10.1016/j.tig.2007.02.001
- Hastings WK (1970) Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 57:97–109.
- Hausdorf B (2011) Progress toward a general species concept. *Evolution* 65:923–931. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01231.x
- Hausdorf B, Hennig C (2010) Species Delimitation Using Dominant and Codominant Multilocus Markers. *Systematic Biology* 59:13. doi: 10.1093/sysbio/syq039
- Hausdorf B, Wilkens H, Strecker U (2011) Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1–9. doi: 10.1016/j.ympev.2011.03.009
- Hausdorf B, Wilkens H, Strecker U (2011) Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in

- Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1–9. doi: 10.1016/j.ympev.2011.03.009
- Heath TA, Hedtke SM, Hillis DM (2008) Taxon sampling and the accuracy of phylogenetic analyses. *J Syst Evol.* doi: 10.3724/SP.J.1002.2008.08016
- Hebert PDN, Gregory TR (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54:852–859. doi: 10.1080/10635150500354886
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc B* 270:S96–S99. doi: 10.1098/rsbl.2003.0025
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc B* 270:S96–S99. doi: 10.1098/rsbl.2003.0025
- Hellberg ME (2009) Gene Flow and Isolation among Populations of Marine Animals. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:291–310. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120223
- Hibino Y, Todd PA, Yang S-Y, et al (2014) Molecular and morphological evidence for conspecificity of two common Indo-Pacific species of *Palythoa* (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiologia* 733:31–43. doi: 10.1007/s10750-013-1587-5
- Hickerson MJ, Meyer CP (2008) Testing comparative phylogeographic models of marine vicariance and dispersal using a hierarchical Bayesian approach. *BMC Evolutionary Biology* 8:322–18. doi: 10.1186/1471-2148-8-322
- Hickerson MJ, Meyer CP, Moritz C (2006) DNA Barcoding Will Often Fail to Discover New Animal Species over Broad Parameter Space. *Systematic Biology* 55:729–739. doi: 10.1080/10635150600969898
- Hincks T (1874) Notes on Norwegian Hydroida from deep water. *Annals and Magazine of Natural History* 13:125–137.
- Hoareau TB, Boissin E, Paulay G, Bruggemann JH (2013) The Southwestern Indian Ocean as a potential marine evolutionary hotspot: perspectives from comparative phylogeography of reef brittle-stars. *Journal of Biogeography* 40:2167–2179. doi: 10.1111/jbi.12155
- Hodge JR, Read CI, van Herwerden L, Bellwood DR (2012) The role of peripheral endemism in species diversification: Evidence from the coral reef fish genus *Anampses* (Family: Labridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62:653–663. doi: 10.1016/j.ympev.2011.11.007
- Hoegh-Guldberg O (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's

- coral reefs. *Mar Freshwater Res* 50:839–866. doi: 10.1071/MF99078
- Hoeksema BW, Crowther AL (2011) Masquerade, mimicry and crypsis of the polymorphic sea anemone *Phyllodiscus semoni* and its aggregations in South Sulawesi. *Contributions to Zoology*
- Hoelzer GA (1997) Inferring Phylogenies From mtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees Revisited. *Evolution* 51:622. doi: 10.2307/2411136
- Hoelzer GA, Drewes R, Meier J, Doursat R (2008) Isolation-by-Distance and Outbreeding Depression Are Sufficient to Drive Parapatric Speciation in the Absence of Environmental Influences. *PLoS Comput Biol* 4:e1000126–11. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000126
- Hohenlohe PA (2004) Limits to gene flow in marine animals with planktonic larvae: models of *Littorina* species around Point Conception, California. *Biological Journal of the Linnean Society* 82:169–187. doi: 10.1111/j.1095-8312.2004.00318.x
- Holland BS, Dawson M, Crow GL, Hofmann DK (2004) Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Mar Biol* 145:1119–1128. doi: 10.1007/s00227-004-1409-4
- Huang D, Meier R, Todd PA, Chou LM (2008) Slow Mitochondrial COI Sequence Evolution at the Base of the Metazoan Tree and Its Implications for DNA Barcoding. *J Mol Evol* 66:167–174. doi: 10.1007/s00239-008-9069-5
- Hubert N, Paradis E, Bruggemann JH, Planes S (2011) Community assembly and diversification in Indo-Pacific coral reef fishes. *Ecology and Evolution*, 1(3), 229–277. <http://doi.org/10.1002/ece3.19>
- Hubert N, Meyer CP, Bruggemann JH, Guérin F, Komeno RJL, Espiau B, Causse R, Williams JT, Planes S (2012) Cryptic Diversity in Indo-Pacific Coral-Reef Fishes Revealed by DNA-Barcoding Provides New Support to the Centre-of-Overlap Hypothesis. *PLoS ONE* 7:e28987. doi: 10.1371/journal.pone.0028987
- Huelsenbeck JP, Crandall KA (1997) Phylogeny Estimation and Hypothesis Testing Using Maximum Likelihood. *Annu Rev Ecol Syst* 28:437–466. doi: 10.2307/2952500?ref=no-x-route:624bd0d38a807309350cdeeb5a543d9b
- Huelsenbeck JP, Andolfatto P, Huelsenbeck ET (2011) Structurama: Bayesian Inference of Population Structure. *Evolutionary Bioinformatics* 2011:55–59. doi: 10.4137/EBO.S6761
- Huelsken T, Keyse J, Liggins L, Penny S, Trembl EA, Riginos C (2013) A Novel Widespread

- Cryptic Species and Phylogeographic Patterns within Several Giant Clam Species (Cardiidae: *Tridacna*) from the Indo-Pacific Ocean. PLoS ONE 8:e80858. doi: 10.1371/journal.pone.0080858
- Hughes TP, Bellwood DR, Connolly SR (2002) Biodiversity hotspots, centres of endemism, and the conservation of coral reefs. Ecology Letters 5:775–784. doi: 10.1046/j.1461-0248.2002.00383.x
- Hughes TP, Baird AH, Bellwood DR, Card M, Connolly SR, Folke C, Grosberg R, Hoegh-Guldberg O, Jackson JBC, Kleypas J, Lough JM, Marshall P, Nyström M, Palumbi SR, Pandolfi JM, Rosen B, Roughgarden J (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. Science 301:929–933. doi: 10.1126/science.1085046
- Hurst GDD, Jiggins FM (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. Proc R Soc B 272:1525–1534. doi: 10.1098/rspb.2005.3056
- Hurtado LA, Frey MA, Gaube P, Pfeiler E, Markow TA (2007) Geographical subdivision, demographic history and gene flow in two sympatric species of intertidal snails, *Nerita scabricosta* and *Nerita funiculata*, from the tropical eastern Pacific. Mar Biol 151:1863–1873. doi: 10.1007/s00227-007-0620-5
- Imazu MA, Ale E, Genzano GN (2014) A comparative study of populations of *Ectopleura crocea* and *Ectopleura ralphi* (Hydrozoa, Tubulariidae) from the Southwestern Atlantic Ocean. Zootaxa 3753:421–439. doi: 10.11646/zootaxa.3753.5.2
- Jäderholm E (1903) Aussereuropäische Hydroiden im schwedischen Reichsmuseum. Arkiv för Zoologi 1:259–312– pls 12–15.
- Jakobssen M, Rosenberg NA (2006) CLUMPP: cluster matching and permutation program, version 1.0. University of Michigan
- Janzen DH, Hallwachs W, Blandin P, et al (2009) Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. Molecular Ecology Resources 9:1–26. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02628.x
- Johannesson K (2003) Evolution in Littorina: ecology matters. Journal of Sea Research 49:107–117. doi: 10.1016/S1385-1101(02)00218-6
- Johnson MP, Allcock AL, Pye SE, Chambers SJ, Fitton DM (2001) The Effects of Dispersal Mode on the Spatial Distribution Patterns of Intertidal Molluscs. J Anim Ecology 70:641–649. doi: 10.2307/2693544?ref=search-gateway:59c66ae093faa701f6b297962e136427
- Johnston G (1838) A history of British zoophytes. Lizards, Edinburgh

- Jones GP, Almany GR, Russ GR, Sale PF, Steneck RS, van Hoppen MJH, Willis BL (2009) Larval retention and connectivity among populations of corals and reef fishes: history, advances and challenges. 28:307–325. doi: 10.1007/s00338-009-0469-9
- Jorde LB, Little PFR, Dunn MJ, Subramaniam S (eds) (2004) Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. 5:1–52– pls 1–8. doi: 10.1002/047001153X
- Jörger KM, Norenburg JL, Wilson NG, Schrödl M (2012) Barcoding against a paradox? Combined molecular species delineations reveal multiple cryptic lineages in elusive meiofaunal sea slugs. BMC Evolutionary Biology 12:1–1. doi: 10.1186/1471-2148-12-245
- Junhyong K (1996) General inconsistency conditions for maximum parsimony: effects of branch lengths and increasing number of taxa. Systematic Biology 45:363–374.
- Kadarusman, Hubert N, Hadiaty RK, Sudarto, Paradis E, Pouyaud L (2012) Cryptic Diversity in Indo-Australian Rainbowfishes Revealed by DNA Barcoding: Implications for Conservation in a Biodiversity Hotspot Candidate. PLoS ONE 7:e40627. doi: 10.1371/journal.pone.0040627
- Katoh K, Kuma K-I, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acid Research 33:511–518. doi: 10.1093/nar/gki198
- Kayal E, Roure B, Philippe H, Collins AG, Lavrov DV (2013) Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. BMC Evolutionary Biology 13:1–1. doi: 10.1186/1471-2148-13-5
- Kearse M, Moir R, Wilson A, et al (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28:1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Kergoat GJ, Soldati L, Clamens A-L, Jourdan H, Jabbour-Zahab R, Genson G, Bouchar P, Condamine FL (2014) Higher level molecular phylogeny of darkling beetles (Coleoptera: Tenebrionidae). Syst Entomol n/a–n/a. doi: 10.1111/syen.12065
- Kim SW, Kerr AM, Paulay G (2013) Colour, confusion, and crossing: resolution of species problems in *Bohadschia* (Echinodermata: Holothuroidea). Zoological Journal of the Linnean Society 168:81–97. doi: 10.1111/zoj.12026
- Kimura M, Weiss GH (1964) The Stepping Stone Model of Population Structure and the Decrease of Genetic Correlation with Distance. Genetics 49:561–576.
- Kingman JFC (1982) On the Genealogy of Large Populations. Journal of Applied Probability 19:27. doi: 10.2307/3213548

- Kingsolver JG, Diamond SE, Siepielski AM (2012) Synthetic analyses of phenotypic selection in natural populations: lessons, limitations and future directions. *Evol Ecol* 26:1101–1118. doi: 10.1007/s10682-012-9563-5
- Kirchenpauer GH (1876) Ueber die Hydroidenfamilie Plumularidae, einzelne gruppen derselben und ihre Fruchthälter, ii. Plumularia und Nemertesia. *Abhandlungen aus dem Gebiet der Naturwissenschaften*, herausgegeben von dem naturwissenschaftlichen Verein 6:1–59.
- Kitano YF, Benzoni F, Arrigoni R, Shirayaama Y, Wallace CC, Fukami H (2014) A Phylogeny of the Family Poritidae (Cnidaria, Scleractinia) Based on Molecular and Morphological Analyses. *PLoS ONE* 9:e98406. doi: 10.1371/journal.pone.0098406
- Knowlton N (1993) Sibling Species in the Sea. *Annu Rev Ecol Syst* 24:189–216. doi: 10.2307/2097177?ref=no-x-route:6fd57abefd9da82509fb8bc4e399d2dd
- Knowlton N, Weigt LA (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc R Soc B* 265:2257–2263.
- Kolaczkowski B, Thornton JW (2004) Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nat* 431:981–984.
- Kongjandtre N, Ridgway T, Cook LG, et al (2012) Taxonomy and species boundaries in the coral genus *Favia* Milne Edwards and Haime, 1857 (Cnidaria: Scleractinia) from Thailand revealed by morphological and genetic data. 31:581–601. doi: 10.1007/s00338-011-0869-5
- Kyle CJ, Boulding EG (2000) Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Mar. Biol.*
- Ladner JT, Palumbi SR (2012) Extensive sympatry, cryptic diversity and introgression throughout the geographic distribution of two coral species complexes. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05528.x
- Lamouroux JVF (1812) Extrait d'un mémoire des polypiers coralligènes non entièrement pierreux. *Nouveau Bulletin des Sciences par la Société Philomatique de Paris* 3:181–188.
- Lamouroux JVF (1816) Histoire des Polypiers coralligènes flexibles, vulgairement nommés Zoophytes. Caen
- Leclère L, Schuchert P, Manuel M (2007) Phylogeny of the Plumularioidea (Hydrozoa, Leptothecata): evolution of colonial organisation and life cycle. *Zool Scripta* 36:371–394. doi: 10.1111/j.1463-6409.2007.00283.x
- Leclère L, Schuchert P, Cruaud C, et al (2009) Molecular Phylogenetics of Thecata

- (Hydrozoa, Cnidaria) Reveals Long-Term Maintenance of Life History Traits despite High Frequency of Recent Character Changes. *Systematic Biology* 58:509–526. doi: 10.1093/sysbio/syp044
- Ledoux JB, Tarnowska K, Gérard K, Lhuillier E, Jacquemin B, Weydmann A, Féral JP, Chenuil A (2011) Fine-scale spatial genetic structure in the brooding sea urchin *Abatus cordatus* suggests vulnerability of the Southern Ocean marine invertebrates facing global change. *Polar Biology* 35:611–623. doi: 10.1007/s00300-011-1106-y
- Lessios HA, Kessing BD, Pearse JS (2001) Population structure and speciation in tropical seas: global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. *Evolution* 55:955–975. doi: 10.1111/j.0014-3820.2001.tb00613.x
- Levins R (1969) Some Demographic and Genetic consequences of Environmental Heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 15(3), 237–240.
- Lim GS, Balke M, Meier R (2011) Determining Species Boundaries in a World Full of Rarity: Singletons, Species Delimitation Methods. *Systematic Biology* 61:165–169. doi: 10.1093/sysbio/syr030
- Lindner A, Cairns SD, Cunningham CW (2008) From offshore to onshore: multiple origins of shallow-water corals from deep-sea ancestors. *PLoS ONE* 3:e2429. doi: 10.1371/journal.pone.0002429
- Lindner A, Govindarajan AF, Migotto AE (2011) Cryptic species, life cycles, and the phylogeny of *Clytia* (Cnidaria: Hydrozoa: Campanulariidae). *Zootaxa* 2980:23–36.
- Linnaeus C (1758) *Systema naturae*, 10 edn. Laurenti salvii, Holmiae, Stockholm
- Liò P, Goldman N (1998) Models of molecular evolution and phylogeny. *Genome Res* 8:1233–1244.
- Lohman DJ, de Bruyn M, Page T, von Rintelen K, Hall R, Ng PKL, Shih HT, Carvalho GR, von Rintlen T (2011) Biogeography of the Indo-Australian Archipelago. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42:205–226. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145001
- Lohse K (2009) Can mtDNA Barcodes Be Used to Delimit Species? A Response to Pons et al. (2006). *Systematic Biology* 58:439–442. doi: 10.1093/sysbio/syp039
- Maddison WP, Knowles LL (2006) Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology* 55:21–30. doi: 10.1080/10635150500354928
- Malay MCMD, Paulay G (2010) Peripatric speciation drives diversification and distributional pattern of reef hermit crabs (decapoda: diogenidae: *Calcinus*). *Evolution* 64:634–662. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00848.x

- Mallet J (1995) A species definition for the modern synthesis. *TREE* 10:294–299. doi: 10.1016/0169-5347(95)90031-4
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27:209–220.
- Margules CR, Pressey RL (2000) Systematic conservation planning. *Nat* 405:243–253. doi: 10.1038/35012251
- Marktanner-Turneretscher G (1890) Hydroiden des K. & K.Naturhistorischen Hofmuseums. *Annalen des K K Naturhistorischen Hofmuseums* 5:195–286.
- Marques AC, Collins AG (2004) Cladistic Analysis of Medusozoa and Cnidarian Evolution. *Invertebrate Biology* 123:23–42. doi: 10.2307/3227078?ref=search-gateway:e1fe208a97e7f52b3e1ad99746286b15
- Marti-Puig P, Forsman ZH, Haverkort-Yeh RD, Knapp ISS, Maragos JE, Toonen RJ (2014) Extreme phenotypic polymorphism in the coral genus *Pocillopora*; micro-morphology corresponds to mitochondrial groups, while colony morphology does not. *Bull Mar Sci* 90:21. doi: 10.5343/bms.2012.1080
- Martínez DE, Iñiguez AR, Percell KM, Willner JB, Signorovitch J, Campbell RD (2010) Phylogeny and biogeography of *Hydra* (Cnidaria: Hydridae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57:403–410. doi: 10.1016/j.ympev.2010.06.016
- Mau B, Newton MA, Larget B (1999) Bayesian Phylogenetic Inference via Markov Chain Monte Carlo Methods. *Biometrics* 55:1–12.
- Mayden RL (2002) On biological species, species concepts and individuation in the natural world. *Fish and Fisheries* 3:171–196. doi: 10.1046/j.1467-2979.2002.00086.x
- Mayr E (1942) *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*. Harvard University Press
- McFadden CS, Sanchez JA, France SC (2010) Molecular Phylogenetic Insights into the Evolution of Octocorallia: A Review. *Integrative and Comparative Biology* 50:389–410. doi: 10.1093/icb/icq056
- McFadden CS, Brown AS, Brayton C, Brayton C, Hunt CB, van Ofwegen LP (2014) Application of DNA barcoding in biodiversity studies of shallow-water octocorals: molecular proxies agree with morphological estimates of species richness in Palau. *Coral reefs* 33:275–286. doi: 10.1007/s00338-013-1123-0
- Meier R, Willmann R (2000) The Hennigian Species Concept. In Q. D. Wheeler & R. Meier, *Species Concepts and Phylogenetic Theory* (pp. 30–43). New York: Columbia

University Press.

- Meirmans PG, van Tienderen PH (2004) GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* 4:792–794. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00770.x
- Merino-Serrais P, Casado-Amezúa P, Ocaña Ó, Templado J, Machordom A (2012) Slight genetic differentiation between western and eastern limits of *Astroides calycularis* (Pallas, 1776) (Anthozoa, Scleractinia, Dendrophylliidae) distribution inferred from COI and ITS sequences. *GRAELLSIA* 68:207–218. doi: 10.3989/graellsia.2012.v68.057
- Meroz-Fine E, Brickner I, Loya Y, Ilan M (2003) The hydrozoan coral *Millepora dichotoma*: speciation or phenotypic plasticity? *Mar Biol* 143:1175–1183. doi: 10.1007/s00227-003-1135-3
- Meyer CP, Geller JB, Paulay G (2005) Fine Scale Endemism on Coral Reefs: Archipelagic Differentiation in Turbinid Gastropods. *Evolution* 59:113–125. doi: 10.2307/3449001?ref=search-gateway:5225921c7d9ca5f1f07171b2ab26429c
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *Plos Biol* 3:e422. doi: 10.1371/journal.pbio.0030422
- Michener CD (1970) Diverse approaches to systematics. *Evol Biol* 4:1–38. doi: 10.1007/978-3-642-69024-2_1
- Michonneau F, McPherson S, O'Loughlin PM, Paulay G (2015) More than meets the eye: diversity and geographic patterns in sea cucumbers. *bioRxiv*. doi: 10.1101/014282
- Miglietta MP, Piraino S, Kubota S, Schuchert P (2007) Species in the genus *Turritopsis* (Cnidaria, Hydrozoa): a molecular evaluation. *J Zoological System* 45:11–19. doi: 10.1111/j.1439-0469.2006.00379.x
- Miglietta MP, Schuchert P, Cunningham CW (2009) Reconciling genealogical and morphological species in a worldwide study of the Family Hydractiniidae (Cnidaria, Hydrozoa). *Zool Scripta* 38:403–430. doi: 10.1111/j.1463-6409.2008.00376.x
- Miglietta MP, Cunningham CW (2012) Evolution of life cycle, colony morphology, and host specificity in the family hydractiniidae (hydrozoa, cnidaria). *Evolution* 66:3876–3901. doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01717.x
- Millard NAH (1975). Monograph on the Hydroida of Southern Africa. (Trustees of the South African Museum) (Vol. 68). Kaapstad. 513pp.
- Miranda LS, Collins AG, Marques AC (2010) Molecules Clarify a Cnidarian Life Cycle – The “Hydrozoan” *Microhydrula limopsicola* Is an Early Life Stage of the Staurozoan *Halicystus antarcticus*. *PLoS ONE* 5:e10182. doi: 10.1371/journal.pone.0010182

- Mokhtar-Jamaï K, Pascual M, Ledoux JB, Coma R, Féral JP, Garrabou J, Aurelle D (2011) From global to local genetic structuring in the red gorgonian *Paramuricea clavata*: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Molecular Ecology* 20:3291–3305. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05176.x
- Monaghan MT, Wild R, Elliot M, et al (2009) Accelerated Species Inventory on Madagascar Using Coalescent-Based Models of Species Delineation. *Systematic Biology* 58:298–311. doi: 10.1093/sysbio/syp027
- Moran P, Kornfield I (1993) Retention of an ancestral polymorphism in the Mbuna species flock (Teleostei: Cichlidae) of Lake Malawi. *Mol Biol Evol*
- Moritz C (1994) Defining “evolutionarily significant units” for conservation. *TREE* 9:373–375.
- Moritz C (1999) Conservation Units and Translocations: Strategies for Conserving Evolutionary Processes. *Hereditas* 130:217–228. doi: 10.1111/j.1601-5223.1999.00217.x
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* 51:238–254. doi: 10.1080/10635150252899752
- Moura CJ, Harris DJ, Cunha MR, Rogers AD (2008) DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep - sea environments. *Zool Scripta* 37:93–108. doi: 10.1111/j.1463-6409.2007.00312.x
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD (2011) The use of the DNA barcode gene 16S mRNA for the clarification of taxonomic problems within the family Sertulariidae (Cnidaria, Hydrozoa). *Zool Scripta* 40:520–537. doi: 10.1111/j.1463-6409.2011.00489.x
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD (2012) A molecular phylogenetic appraisal of the systematics of the Aglaopheniidae (Cnidaria: Hydrozoa, Leptothecata) from the north - east Atlantic and west Mediterranean. *Zoological Journal of the Linnean Society* 164:717–727. doi: 10.1111/j.1096-3642.2011.00784.x
- Muths D, Grewe P, Jean C, Bourjea J (2009) Genetic population structure of the Swordfish (*Xiphias gladius*) in the southwest Indian Ocean: Sex-biased differentiation, congruency between markers and its incidence in a way of stock assessment. *Fisheries Research* 97:263–269. doi: 10.1016/j.fishres.2009.03.004
- Muths D, Tessier E, Gouws G, Craig M, Mwale M, Mwaluma J, Mwandya A, Bourjea P (2011) Restricted dispersal of the reef fish *Myripristis berndti* at the scale of the SW Indian Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 443:167–180. doi: 10.3354/meps09394
- Myers N (1988) Threatened Biotas: “Hot Spots” in Tropical Forests. *The Environmentalist*

- 8:187–208.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, et al (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nat* 403:853–858. doi: 10.1038/35002501
- Naughton KM, O’Hara TD, Appleton B, Gardner MG (2014) Sympatric cryptic species in the crinoid genus *Cenolia* (Echinodermata: Crinoidea: Comasteridae) delineated by sequence and microsatellite markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 78:160–171. doi: 10.1016/j.ympev.2014.05.006
- Nawrocki AM, Schuchert P, Cartwright P (2010) Phylogenetics and evolution of Capitata (Cnidaria: Hydrozoa), and the systematics of Corynidae. *Zool Scripta* 39:290–304. doi: 10.1111/j.1463-6409.2009.00419.x
- Nee S, Holmes EC, May RM, Harvey PH (1994) Extinction Rates can be Estimated from Molecular Phylogenies. *Proc R Soc B* 344:77–82. doi: 10.1098/rstb.1994.0054
- Niemiller ML, Near TJ, Fitzpatrick BM (2011) Delimiting species using multilocus data: diagnosing cryptic diversity in the southern cavefish, *Typhlichthys subterraneus* (teleostei: amblyopsidae). *Evolution* 66:846–866. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01480.x
- Njabo KY, Bowie RCK, Sorenson MD (2008) Phylogeny, biogeography and taxonomy of the African wattle-eyes (Aves: Passeriformes: Platysteiridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48:136–149. doi: 10.1016/j.ympev.2008.01.013
- Nutting CC (1900) American Hydroids. Part I. The Plumulariidae. *Special Bulletin of the US national Museum* 4:1–285.
- Nutting CC (1905) Hydroids of the Hawaiian Islands collected by the steamer Albatross in 1902. *Bulletin of the United States Fish Commission* 23:931–959.
- Nyström M, Folke C, Moberg F (2000) Coral reef disturbance and resilience in a human-dominated environment. *TREE* 15:413–417. doi: 10.1016/s0169-5347(00)01948-0
- O’Meara BC (2009) New Heuristic Methods for Joint Species Delimitation and Species Tree Inference. *Systematic Biology* 59:syp077–73. doi: 10.1093/sysbio/syp077
- Obura DO (2012a) The diversity and biogeography of Western Indian Ocean reef-building corals. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0045013.g001
- Obura DO (2012b) Evolutionary mechanisms and diversity in a western Indian Ocean center of diversity.
- Padial JM, Miralles A, la Riva De I, Vences M (2010) The integrative future of taxonomy. *Front Zool* 7:16. doi: 10.1186/1742-9994-7-16
- Palumbi SR (1992) Marine speciation on a small planet. *TREE* 7:114–118. doi:

10.1016/0169-5347(92)90144-z

- Palumbi SR (1995) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Oceanographic Literature Review*
- Palumbi SR (2003) Population Genetics, Demographic Connectivity, and the Design of Marine Reserves. *Ecological Applications*. doi: 10.2307/3100004?ref=no-x-route:64e0973c472fc57553744dd9da05f881
- Paradis E, Clavier J, Strimmer K (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289–290. doi: 10.1093/bioinformatics/btg412
- Paulay G, Meyer CP (2002) Diversification in the Tropical Pacific: Comparisons between Marine and Terrestrial Systems and the Importance of Founder Speciation. *Integrative and Comparative Biology* 42:922–934. doi: 10.2307/3884609?ref=search-gateway:b89ddf7f5e344859ee813136651dbea8
- Paulay G (2006) Dispersal and divergence across the greatest ocean region: Do larvae matter? *Integrative and Comparative Biology* 46:269–281. doi: 10.1093/icb/icj027
- Payo DA, Leliaert F, Verbruggen H, D’hondt S, Calumpong HP, De Clerk O (2013) Extensive cryptic species diversity and fine-scale endemism in the marine red alga *Portieria* in the Philippines. *Proc R Soc B* 280:20122660–20122660. doi: 10.1098/rspb.2012.2660
- Peña Cantero AL, Vervoort W, Svoboda A (1996) Species of *Schizotricha* Allman, 1883 (Cnidaria, Hydrozoa) from recent antarctic expeditions with RV Tolarstern,/with the description of a new species. *Zoologische Mededelingen* 70:411–435.
- Peña Cantero AL, Sentandreu V, Latorre A (2009) Phylogenetic relationships of the endemic Antarctic benthic hydroids (Cnidaria, Hydrozoa): what does the mitochondrial 16S rRNA tell us about it? *Polar Biology* 33:41–57. doi: 10.1007/s00300-009-0683-5
- Pfenninger M, Posada D (2002) Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (helicellinae, stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 36:1776–1788.
- Pfenninger M, Schwenk K (2007) Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* 7:6.
- Pimm SL, Russell GJ, Gittleman JL, Brooks TM (1995) The future of biodiversity. *Science* 269:347–350. doi: 10.1126/science.269.5222.347
- Pinceel J, Jordaens K, Backeljau T (2005) Extreme mtDNA divergences in a terrestrial slug (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae): accelerated evolution, allopatric divergence and secondary contact. *Journal of Evolutionary Biology* 18:1264–1280. doi: 10.1111/j.1420-

9101.2005.00932.x

- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, et al (2006) Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology* 55:595–609. doi: 10.1080/10635150600852011
- Posada D, Buckley TR (2004) Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. *Systematic Biology* 53:793–808. doi: 10.1080/10635150490522304
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* 25:1253–1256. doi: 10.1093/molbev/msn083
- Postaire Bautisse, Bruggemann JH, Magalon H, Faure B (2014) Evolutionary Dynamics in the Southwest Indian Ocean Marine Biodiversity Hotspot: A Perspective from the Rocky Shore Gastropod Genus *Nerita*. *PLoS ONE* 9:e95040. doi: 10.1371/journal.pone.0095040
- Powell JR (2012) Accounting for uncertainty in species delineation during the analysis of environmental DNA sequence data. *Methods in Ecology and Evolution* 3:1–11. doi: 10.1111/j.2041-210X.2011.00122.x
- Prada C, McIlroy SE, Beltrán DM, Valint DJ, Ford SA, Hellberg ME, Coffroth MA (2014) Cryptic diversity hides host and habitat specialization in a gorgonian-algal symbiosis. *Molecular Ecology* 23:3330–3340. doi: 10.1111/mec.12808
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959. doi: 10.1016/0379-0738(94)90222-4
- Puillandre N, Baylac M, Boisselier-Dubayle MC, et al (2009) An integrative approach to species delimitation in Benthomangelia (Mollusca: Conoidea). *Biological Journal of the Linnean Society* 96:696–708.
- Puillandre N, Macpherson E, Lambourdière J, Cruaud C, Boisselier-Dubayle MC, Samadi S (2011) Barcoding type specimens helps to identify synonyms and an unnamed new species in Eumunida Smith, 1883 (Decapoda: Eumunididae). *Invertebrate Systematics*, 25(4), 322. <http://doi.org/10.1071/IS11022>
- Puillandre N, Bouchet P, Boisselier-Dubayle MC, et al (2012a) New taxonomy and old collections: integrating DNA barcoding into the collection curation process. *Molecular Ecology Resources* 12:396–402. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03105.x
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012b) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21:1864–1877. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x

- Puillandre N, Modica MV, Zhang Y, et al (2012c) Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology* 21:2671–2691. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05559.x
- R Development Core Team (2004) R: A language and environment for statistical computing. doi: 10.1371/journal.pone.0091306.g006
- Ragionieri L, Cannicci S, Schubart CD, Fratini S (2010) Gene flow and demographic history of the mangrove crab *Neosarmatium meinerti*: A case study from the western Indian Ocean. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 86:179–188. doi: 10.1016/j.ecss.2009.11.002
- Rambaut A, Drummond AJ (2013) TreeAnnotator v1. 7.0.
- Rambaut A, Drummond AJ, Suchard M (2013) Tracer v1. 6.
- Reid DG, Dyal P, Williams ST (2012) A global molecular phylogeny of 147 periwinkle species (Gastropoda, Littorininae). *Zool Scripta* 41:125–136. doi: 10.1111/j.1463-6409.2011.00505.x
- Reid NM, Carstens BC (2012) Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC Evolutionary Biology* 12:196. doi: 10.1186/1471-2148-12-196
- Reid WV (1998) Biodiversity hotspots. *TREE* 13:275–280.
- Reimer JD, Takishita K, Ono S, Maruyama T (2007) Diversity and evolution in the zoanthid genus *Palythoa* (Cnidaria: Hexacorallia) based on nuclear ITS-rDNA. *Coral reefs* 26:399–410. doi: 10.1007/s00338-007-0210-5
- Renema W, Bellwood DR, Braga JC, Bromfield K, Hall R, Johnson KG, Lunt P, Meyer CP, McMonagle LB, Morley RJ, O’Dea A, Todd JA, Wesselingh FP, Wilson MEJ, Pandolfi JM (2008) Hopping Hotspots: Global Shifts in Marine Biodiversity. *Science*, 321(5889), 654–657. <http://doi.org/10.1126/science.1155674>
- Ridgway T, Riginos C, Davis J, Hoegh-Guldberg O (2008) Genetic connectivity patterns of *Pocillopora verrucosa* in southern African Marine Protected Areas. *Marine Ecology Progress Series* 354:161–168. doi: 10.3354/meps07245
- Ridgway T, Sampayo EM (2005) Population genetic status of the Western Indian Ocean: what do we Know? *Western Indian Ocean J Mar Sci* 4:1–9.
- Rissler L, Apodaca J (2007) Adding More Ecology into Species Delimitation: Ecological Niche Models and Phylogeography Help Define Cryptic Species in the Black Salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology* 56:924–942. doi: 10.1080/10635150701703063

- Roberts CM, McClean CJ, Veron JEN, Hawkins JP, Allen GR, McAllister DE, Mittermeier CG, Schueler FW, Spalding M, Wells F, Vynne C, Werner TB (2002) Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science* 295:1280–1284. doi: 10.1126/science.1067728
- Rocha S, Carretero MA, Vences M, Galw F, James Harris D (2006) Deciphering patterns of transoceanic dispersal: the evolutionary origin and biogeography of coastal lizards (*Cryptoblepharus*) in the Western Indian Ocean region. *Journal of Biogeography* 33:13–22. doi: 10.1111/j.1365-2699.2005.01375.x
- Rögl F, Steininger FF (1982) Neogene paratethys, Mediterranean and Indo-pacific seaways. In: Seel (ed) *Fossils and Climate*. Geological journal. Special issue, Liverpool, pp 171–200
- Romano SL, Palumbi SR (1997) Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16S ribosomal gene region in scleractinian corals. *J Mol Evol* 45:397–411.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Hohna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenken T (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61:539–542. doi: 10.1093/sysbio/sys029
- Rosenberg NA (2004) distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137–138. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145:1219–1228.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Sale P, Cowen R, Danilowicz B, et al (2005) Critical science gaps impede use of no-take fishery reserves. *TREE* 20:74–80. doi: 10.1016/j.tree.2004.11.007
- Samadi S, Barberousse A (2006) The tree, the network, and the species. *Biological Journal of the Linnean Society* 89:509–521.
- Schlick-Steiner BC, Seifert B, Stauffer C, et al (2007) Without morphology, cryptic species stay in taxonomic crypsis following discovery. *TREE* 22:391–392. doi: 10.1016/j.tree.2007.05.004
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, et al (2010) Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annu Rev Entomol* 55:421–438. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085432
- Schuchert P (1993) Phylogenetic analysis of the Cnidaria. *J Zoological System* 31:161–173.

- doi: 10.1111/j.1439-0469.1993.tb00187.x
- Schuchert P (2003) Hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) of the Danish expedition to the Kei Islands. *Steenstrupia* 27:137–256.
- Schuchert P (2005) Species boundaries in the hydrozoan genus *Coryne*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36:194–199. doi: 10.1016/j.ympev.2005.03.021
- Schuchert P (2014) High genetic diversity in the hydroid *Plumularia setacea*: A multitude of cryptic species or extensive population subdivision? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76:1–9. doi: 10.1016/j.ympev.2014.02.020
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233–234. doi: 10.1038/72708
- Shanks AL, Grantham BA, Carr MH (2003) Propagule Dispersal Distance and the Size and Spacing of Marine Reserves. *Ecological Applications*. doi: 10.2307/3100005?ref=no-x-route:e2ad542d759ddb0a079d1084643c6910
- Shanks AL (2009) Pelagic Larval Duration and Dispersal Distance Revisited. *Biological Bulletin* 216:373–385. doi: 10.2307/25548167?ref=search-gateway:233085b1ae5f2c01fe5f1bd61a120511
- Shearer TL, van Oppen MJH, Romano SL, Wörheide G (2002) Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology* 11:2475–2487. doi: 10.1046/j.1365-294x.2002.01652.x
- Siegel DA, Kinlan BP, Gaylord B, Gaines SD (2003) Lagrangian Descriptions of Marine Larval Dispersion. *Marine Ecology Progress Series* 70:117–128.
- Siegel DA, Mitarai S, Costello CJ, Gaines SD, Kendall BE, Warner R, Winters KB (2008) The Stochastic Nature of Larval Connectivity among Nearshore Marine Populations. *PNAS* 105:8974–8979. doi: 10.2307/25462902?ref=search-gateway:c2241a301d1164705d3849ecc2e484d6
- Simpson GG (1951) The species concept. *Evolution* 5:285. doi: 10.2307/2405675
- Sinniger F, Reimer JD, Pawlowski J (2008) Potential of DNA Sequences to Identify Zoanthids (Cnidaria: Zoantharia). *Zoological Science* 25:1253–1260. doi: 10.2108/zsj.25.1253
- Sites JW Jr, Marshall JC (2004) Operational criteria for delimiting species. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35:199–227. doi: 10.2307/annurev.ecolsys.35.112202.30000009
- Slatkin M (1993) Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations. *Evolution* 47:264–279.
- Sluys R (2013) The unappreciated, fundamentally analytical nature of taxonomy and the

- implications for the inventory of biodiversity. *Biodiversity and Conservation* 22:1095–1105. doi: 10.1007/s10531-013-0472-x
- Sommer C (1990) Post-embryonic larval development and metamorphosis of the hydroid *Eudendrium racemosum* (Cavolini) (Hydrozoa, Cnidaria). *Helgolander Meeresunters* 44:425–444. doi: 10.1007/BF02365478
- Soto Àngel JJ, Peña Cantero AL (2013) Shallow-water benthic hydroids from the Maltese Islands (Central Mediterranean). *Marine Ecology* 34:177–196. doi: 10.1111/maec.12035
- Souter P (2009) Hidden genetic diversity in a key model species of coral. *Mar Biol* 157:875–885. doi: 10.1007/s00227-009-1370-3
- Spalding M, Ravilious C, Green EP (2001) *World Atlas of Coral Reefs, Illustrated*.
- Spalding M, Fox HE, Allen GR, et al (2007) Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* 57:573–583. doi: 10.1641/b570707?ref=search-gateway:b72113934926fd8177ecf8a78b6eb369
- Stampar SN, Maronna MM, Vermeij MJA, Silveira FLD, Morandini AC (2012) Evolutionary Diversification of Banded Tube-Dwelling Anemones (Cnidaria; Ceriantharia; *Isarachmanthus*) in the Atlantic Ocean. *PLoS ONE* 7:e41091. doi: 10.1371/journal.pone.0041091
- Stechow E (1921) Über Hydroiden der Deutschen Tiefsee-Expedition, nebst Bemerkungen über einige andere Formen. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* 53:223–236.
- Stoeckle MY, Hebert PDN (2008) Bar Code of Life: DNA Tags Help Classify Animals. *Scientific American* 299:82–88.
- Sullivan J, Joyce P (2005) Model selection in phylogenetics. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:445–466. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152633
- Takahata N, Nei M (1984) FST and GST statistics in the finite island model. *Genetics*, 107, 501–504.
- Talavera G, Dincă V, Vila R (2013) Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. *Methods in Ecology and Evolution* 4:1101–1110. doi: 10.1111/2041-210X.12107
- Taylor MS, Hellberg ME (2005) Marine Radiations at Small Geographic Scales: Speciation in Neotropical Reef Gobies (*Elacatinus*). *Evolution* 59:374–385. doi: 10.2307/3448927?ref=search-gateway:54014ca426370326a730b5702aceb1b2
- Templeton AR (1998) Species and speciation: geography, population structure, ecology, and gene trees. In: *Endless Forms*. Oxford University Press, pp 32–43

- Teske PR, Papadopoulos I, Zardi GI, et al (2007) Implications of life history for genetic structure and migration rates of southern African coastal invertebrates: planktonic, abbreviated and direct development. *Mar Biol* 152:697–711. doi: 10.1007/s00227-007-0724-y
- Thiel M, Gutow L (2005) The ecology of rafting in the marine environment. II. The rafting organisms and community. *Oceanography and Marine Biology* 43:279–418.
- Thomas Y, Le Gendre R, Garen P, Dumas F, Andréfouët S (2012) Bivalve larvae transport and connectivity within the Ahe atoll lagoon (Tuamotu Archipelago), with application to pearl oyster aquaculture management. *Marine Pollution Bulletin* 65:441–452. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.12.027
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22:4673–4680. doi: 10.1007/978-1-4020-6754-9_3188
- Timm J, Figiel M, Kochzius M (2008) Contrasting patterns in species boundaries and evolution of anemone fishes (Amphiprioninae, Pomacentridae) in the centre of marine biodiversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:268–276. doi: 10.1016/j.ympev.2008.04.024
- Treml EA, Halpin PN, Urban DL, Pratson LF (2007) Modeling population connectivity by ocean currents, a graph-theoretic approach for marine conservation. *Landscape Ecol* 23:19–36. doi: 10.1007/s10980-007-9138-y
- Turesson G (1929) Zur natur und begrenzung der artenheiten. *Hereditas* 6:323–334.
- Turini FG, Steinert C, Heubl G, Bringmann G (2014) Microsatellites facilitate species delimitation in Congolese *Ancistrocladus* (Ancistrocladaceae), a genus with pharmacologically potent naphthylisoquinoline alkaloids. *Taxon*. doi: 10.2307/2731085?ref=no-x-route:cc6087f37b1c6bb678f2fd58bf0bb1ab
- Uthicke S, Benzie JAH (2003). Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. *Molecular Ecology*, 12(10), 2635–2648. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01954.x
- Valen LV (1976) Ecological Species, Multispecies, and Oaks. *Taxon* 25:233. doi: 10.2307/1219444
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data.

- Molecular Ecology Notes 4:535–538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Vernooy R, Haribabu E, Muller MR, Vogel JH (2010) Barcoding life to conserve biological diversity: beyond the taxonomic imperative. *Plos Biol* 8:5.
- Vervoort W (1967) Report on a Collection of Hydroida From the Caribbean Region, Including an Annotated Checklist of Caribbean Hydroids. *Zoologische Verhandelingen* 92:1–122.
- Visram S, Yang M-C, Pillay RM, Said S, Henriksson O, Grahn M, Chen CA (2010) Genetic connectivity and historical demography of the blue barred parrotfish (*Scarus ghobban*) in the western Indian Ocean. *Mar Biol* 157:1475–1487. doi: 10.1007/s00227-010-1422-8
- Vogler AP, Monaghan MT (2006) Recent advances in DNA taxonomy. *J Zoological System* 45:1–10. doi: 10.1111/j.1439-0469.2006.00384.x
- Vogler C, Benzie J, Barber PH, Erdmann MV, Ambariyanto, Sheppard C, Tenggardjaja K, Gérard K, Worheide G (2012) Phylogeography of the Crown-of-Thorns Starfish in the Indian Ocean. *PLoS ONE* 7:e43499–10. doi: 10.1371/journal.pone.0043499
- Vrijenhoek RC (1997) Gene flow and genetic diversity in naturally fragmented metapopulations of deep-sea hydrothermal vent animals. *Journal of Heredity* 88:285–293.
- Waugh J (2007) DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays* 29:188–197. doi: 10.1002/bies.20529
- Weersing K, Toonen RJ (2009) Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series* 393:1–12. doi: 10.3354/meps08287
- White C, Selkoe KA, Watson J, et al (2010) Ocean currents help explain population genetic structure. *Proc R Soc B* 277:1685–1694. doi: 10.1098/rspb.2009.2214
- Wiens JJ (2004) Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution* 58:193–197.
- Wiens JJ (2007) Species Delimitation: New Approaches for Discovering Diversity. *Systematic Biology* 56:875–878. doi: 10.1080/10635150701748506
- Wiens JJ, Graham CH (2005) Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:519–539. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102803.095431
- Wiens JJ, Penkrot TA (2002) Delimiting Species Using DNA and Morphological Variation and Discordant Species Limits in Spiny Lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* 51:69–91. doi: 10.1080/106351502753475880
- Wilkinson CC (2008) Status of Coral reefs of the World: 2008. Global Coral Reef

Monitoring Network and Reef and Rainforest Research Centre, Townsville

- Willig MR, Kaufman DM, Stevens RD (2003) Latitudinal Gradients of Biodiversity: Pattern, Process, Scale, and Synthesis. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:273–309. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.012103.144032
- Wilson EO (2004) Taxonomy as a fundamental discipline. *Proc R Soc B* 359:739. doi: 10.1098/rstb.2003.1440
- Wilson KA, McBride MF, Bode M, Possingham HP (2006) Prioritizing global conservation efforts. *Nat* 440:337–340. doi: 10.1038/nature04366
- Worm B, Barbier EB, Beaumont N, et al (2006) Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* 314:787–790. doi: 10.1126/science.1132294
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16:97–159.
- Yang Z, Rannala B (2010) Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:9264–9269. doi: 10.1073/pnas.0913022107
- Yule GU (1924) "A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. JC Willis, F.R.S. *Proc R Soc B* 213:21–87.
- Yund PO (1990) An in situ measurement of sperm dispersal in a colonial marine hydroid. *Journal of Experimental Zoology* 253:102–106. doi: 10.1002/jez.1402530114
- Zamudio KR, Savage WK (2003) Historical isolation, range expansion, and secondary contact of two highly divergent mitochondrial lineages in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Evolution* 57:1631–1652.
- Zhang Y, Li S (2014) A spider species complex revealed high cryptic diversity in South China caves. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79:353–358. doi: 10.1016/j.ympev.2014.05.017
- Zink RM, Barrowclough GF (2008) Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology* 17:2107–2121. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03737.x
- Zwickl DJ, Hillis DM (2002) Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Systematic Biology* 51:588–598. doi: 10.1080/10635150290102339

Annexes

7. Liste des Annexes

- 1 – **Postaire B**, Aurelle D, Bourmaud CAF, Bruggemann JH, Magalon H (2015) Isolation and characterisation of 16 microsatellite loci from a widespread tropical hydrozoan, *Lytocarpia brevirostris* (Busk, 1852). Conservation Genetics Resources. *sous presse*
- 2 – **Postaire B**, Aurelle D, Bourmaud CAF, Bruggemann JH, Magalon H. Isolation and characterisation of 26 microsatellite loci from a widespread tropical hydrozoan, *Macrorhynchia phoenicea* (Leptothecata, Aglaopheniidae), and cross-amplification in closely related species. Biochemical Systematics and Ecology. *soumis*
- 3 – **Postaire B**, Bruggemann JH, Magalon H, Faure B (2014) Evolutionary dynamics in the Southwest Indian Ocean marine biodiversity hotspot: a perspective from the rocky shore gastropod genus *Nerita*. PLoS ONE, 9(4), e95040. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0095040>
- 4 – Liste des individus par morpho-espèce utilisés lors de cette thèse, les séquences et les numéros d'accèsion GenBank associés, ainsi que les numéros d'échantillons.
- 5 – Arbres phylogénétiques des morpho-espèces tropicales échantillonnées lors de cette thèse, reconstruits à partir des séquences d'un fragment du marqueur mitochondrial 16S, du premier exon de la calmoduline et l'ITS

Annexe 1

Isolation and characterisation of 16 microsatellite loci from a widespread tropical hydrozoan, *Lytocarpia brevirostris* (Busk, 1852)

Bautisse Postaire, Didier Aurelle, Chloé A.-F. Bourmaud,
J. Henrich Bruggemann et Hélène Magalon

Conservation Genetics Resources (2015). *sous presse*

Isolation and characterisation of 16 microsatellite loci from a widespread tropical hydrozoan, *Lytocarpia brevirostris* (Busk, 1852)

B. Postaire^{1,2,*}, D. Aurelle³, C.A.F. Bourmaud^{1,2}, J.H. Bruggemann^{1,2}, H. Magalon^{1,2}

¹ Université de La Réunion, Laboratoire ECOMAR-FRE3560 INEE-CNRS, CS 92003, 97744 St Denis Cedex 09, La Réunion (France)

² Laboratoire d'Excellence CORAIL, France

³ Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université, IMBE UMR 7263, 13397, Marseille, France

Abstract

We isolated and characterized 16 polymorphic microsatellite loci for *Lytocarpia brevirostris* (Aglaopheniidae), a hydrozoan common in the tropical Indo-Pacific region. Four to 34 alleles per locus were detected at the Indo-Pacific scale. At the population level, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities ranged across 0.100–0.625 and 0.097–0.597, respectively. Three markers showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, all of them presenting null alleles. Linkage disequilibrium was detected in three pairs of loci among 120. These primers provide powerful tools for studying population genetic diversity and the implication of life cycle strategies on population differentiation in tropical hydrozoans. This will be valuable for the conservation of coral reefs biodiversity and the design of marine protected areas.

Keywords: Hydrozoa, Aglaopheniidae, microsatellite, *Lytocarpia brevirostris*

Data Accessibility : Accessibility numbers in GenBank are indicated in Table 1.

Table 1: Microsatellite loci developed for *Lytocarpia brevirostris* and their primers sequences (F: forward, R: reverse). Accession numbers in GenBank are indicated. Diversity indices are issued from Arlequin v 3.5.1.2. N_a : number of alleles per locus; N : number of genotyped individuals; H_o : observed heterozygosity; H_e : expected heterozygosity; F_{IS} : inbreeding coefficient. Under the F_{IS} are indicated the significance of the P -values for deviation to Hardy-Weinberg equilibrium: NS: non significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. Null allele frequencies (r) are issued from MicroChecker v 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004), and presence or absence is indicated below (yes or no). Annealing temperature $T_a = 55^\circ\text{C}$.

Name	Primer sequence (5'-3')	GenBank accession number	Repeat motif	Size (bp)	N_a	N	H_o	H_e	F_{IS}	r
Lb01	F: TGTGTTTGTATGATGTTTCAGTCCA R: AAAGATGAAGAGTCCATAACATGAA	KM675771	(GTTT) ₅	105-121	7	42	0.357	0.359	0.006 NS	-0.007 no
Lb02	F: CAAGGTGAGTCCCAGATTGTA R: TCCAATGATGTTTCCCCATT	KM675772	(AC) ₈	133-166	21	41	0.341	0.538	0.369 *	0.162 yes
Lb03	F: GCAACTGTATTTGCATCCTTTG R: ATGTAATAATCACAACGAAAACAGA	KM675773	(ACA) ₈	145-172	9	41	0.366	0.479	0.239 NS	0.101 no
Lb04	F: AACAAGCGCAAAATAATTGTTAG R: AGTGAATGGGATACCGCAAG	KM675774	(TC) ₇	147-173	11	42	0.476	0.597	0.205 NS	0.096 no
Lb05	F: TTGTTTGTGTAGTCTGTCTCTG R: GTTCTGTTTCAGGCCTCAGC	KM675775	(AG) ₈	203-243	16	41	0.293	0.256	-0.144 NS	-0.157 no
Lb06	F: TTGCTGTCTAAAGATAGGAACCTTCG R: TGAAACCGTTTGATTGTAAGATG	KM675776	(ACA) ₆	217-291	20	40	0.525	0.556	0.056 NS	0.013 no
Lb07	F: ATCCACATCGGACAGTGAGTC R: TTCAAGTACCAGTGCAACAGC	KM675777	(TTG) ₆	254-272	7	40	0.625	0.564	-0.109 NS	-0.070 no
Lb08	F: AACCAAGGAATATCGTCAACAGA R: AAAACATTAAGCTACCAACGTTTTG	KM675778	(GGA) ₇	291-333	15	41	0.512	0.583	0.123 NS	0.059 no
Lb09	F: TCATTTGGTATGTAATGCTCTTTTG R: CAGTTATTAATGAGAAGAGCGCAG	KM675779	(AAG) ₈	157-169	4	39	0.231	0.232	0.004 NS	0.026 no
Lb10	F: AAGACCCACATTCCGCTTTA R: GGTGATTCTGGTTACAAAGCA	KM675780	(GTT) ₆	154-187	20	41	0.244	0.259	0.059 NS	0.013 no
Lb11	F: GCCGGTAAGGAGGAATAGGT R: TTGAACATAAAAAGGGACAAACAAA	KM675781	(AAG) ₇	176-188	7	40	0.425	0.367	-0.161 NS	-0.100 no
Lb12	F: TAACGGCATATGCGTCATTC R: TTCGCGTCTTAACAGGGTGT	KM675782	(CA) ₆	203-219	5	40	0.100	0.097	-0.030 NS	-0.051 no
Lb13	F: TTGAAATTAATGCACTTAAGGAAA R: CACTTTGTTATACTCGGGCG	KM675783	(CAA) ₆	236-283	22	39	0.103	0.236	0.569 ***	0.186 yes
Lb14	F: ACAGCATGTTTGTGTAATGATTT R: TCCCATCATTGTTCACATATAACA	KM675784	(AG) ₆	259-291	25	42	0.286	0.358	0.204 NS	0.074 no
Lb15	F: TTGAAGACAGCGTATGACGTTT R: AACACCCTAACCCATCACCA	KM675785	(TC) ₇	294-338	34	40	0.375	0.429	0.128 NS	0.096 no
Lb16	F: GATCCTTCAACCAAGAATATCATTT R: GCTTGGCGGTAGCAAACCTCT	KM675786	(AC) ₇	300-319	19	40	0.125	0.208	0.404 **	0.134 yes

Text

Hydrozoans are one of the most diverse marine suspension feeders (Bouillon et al. 2006). Their various reproductive modes and life cycles are expected to affect population connectivity levels and diversification patterns. However, these aspects have been rarely explored, population genetics tools for these organisms being scarce. Here we describe the isolation of 16 microsatellite markers for *Lytocarpia brevirostris*, a typical and common tropical Aglaopheniidae, one of the most speciose families in tropical reefs. Total genomic DNA of eight individuals from Reunion Island was isolated using DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen™) following manufacturer's protocol and sent to GenoScreen, Lille, France (www.genoscreen.fr). One µg was used for the development of microsatellites libraries through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries as described in Malausa et al. (2011). A total of 22708 reads were obtained, of which 4196 contained microsatellite motifs. Obtained sequences were analysed with QDD (Megl  cz et al. 2010). Finally, 16 microsatellite markers were selected and characterized for *L. brevirostris* (criteria: PCR product > 100 bp and number of repeats ≥ 6). Genotyping of these 16 markers was conducted on 42 individuals from a Reunion Island population and on four populations (n = 170) from Juan de Nova Island (Eparses Islands, Mozambique Channel) and one population (n = 63) from New Caledonia. Microsatellite loci developed in this study were directly fluorochrome labelled. Each amplification reaction was performed in a total volume of 10 µL: 5 µL of MasterMix Applied 2x (Applied Biosystems), 2.5 µL of demineralised water, 0.25 µL of each primer (10 µM) and 2 µL of genomic DNA (10 ng/µL). The thermocycling program was as follows: 94°C for 5 min + 7 x (94°C for 30 s, 62°C [-1°C at each cycle] for 30 s, 72°C for 30 s) + 35 x (94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s) + 72°C for 5 min. PCR products were genotyped using an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) and allelic sizes were determined using GeneMapper v 4.0 (Applied Biosystems).

Allele size span and number of alleles per locus are indicated in Table 1; however population statistics were calculated on the Reunion Island population only. Diversity indices, Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were assessed using Arlequin v 3.5.1.2 (Excoffier and Schneider 2005). All loci were

polymorphic, the number of alleles for the tested population ranged from 2 to 9, observed heterozygosity ranged from 0.100 to 0.625 and expected heterozygosity from 0.097 to 0.597 (Table 1). We performed tests of linkage disequilibrium between all pairs of loci using Genepop v 4.2: 26 tests were significant ($\alpha = 0.05$) but only three remained significant after FDR correction for multiple testing (Lb03 x Lb07; Lb03 x Lb15; Lb02 x Lb08). Three loci (Lb02, Lb13, Lb16) were found to deviate from Hardy-Weinberg equilibrium: all of them showed significant heterozygotes deficit (F_{IS} ranged from 0.369 to 0.569). This was probably due to the presence of null alleles as assessed using MicroChecker v2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004; Table 1). The development of these markers will be very useful in studying hydrozoan population genetics, which remain poorly documented. Moreover little is known on the existence of cryptic species and on the level of endemism in these organisms. Thus, assessing the genetic diversity of these species and studying their population structure is crucial in describing coral reefs biodiversity and their conservation.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Plateforme Gentyane of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Clermont-Ferrand, France) for guidance and technical support. The first author was financially supported by a PhD contract from the Doctoral School of the University of Reunion Island.

References

- Bouillon J, Gravili C, Pagès F, Gili J.-M, Boero F (2006). An Introduction to Hydrozoa. (P. Grandcolas, J.-M. Betsch, P. Bouchet, & C. Erard) (Vol. 194). Paris: Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 47–50.
- Malause T, Gilles A, Meglecz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Delye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Le Corre V, Lung-Escarmant B, Male PJG, Ferreira S, Martin JF (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium

pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol Ecol Res*, 11:638-644

Meglecz E, Costedoat C, Dubut V, Gilles A, Malausa T, Pech N, Martin JF (2010) QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinform*, 26:403-404

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Annexe 2

Isolation and characterisation of 26 microsatellite loci from a widespread tropical hydrozoan, *Macrorhynchia phoenicea* (Leptothecata, Aglaopheniidae), and cross-amplification in closely related species.

Bautisse Postaire, Didier Aurelle, Chloé A.-F. Bourmaud,
J. Henrich Bruggemann et Hélène Magalon

Biochemical Systematics and Ecology. *soumis*

Isolation and characterisation of 26 microsatellite loci from a widespread tropical hydrozoan, *Macrorhynchia phoenicea* (Leptothecata, Aglaopheniidae), and cross-amplification in closely related species.

B. Postaire^{1,2,*}, D. Aurelle³, C.A.F. Bourmaud^{1,2}, J.H. Bruggemann^{1,2}, H. Magalon^{1,2}

¹ Université de La Réunion UMR ENTROPIE 9220, CS 92003, 97744 Saint Denis CEDEX 9, France

² Laboratoire d'Excellence CORAIL, www.labex-corail.fr

³ Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université, IMBE UMR 7263, 13397, Marseille, France

Abstract

We isolated and characterized 26 microsatellite loci for *Macrorhynchia phoenicea* (Busk, 1852), a common tropical hydrozoan in coral reefs. The number of alleles per locus ranged from 4 to 24. The observed heterozygosity ranged from 0.000 to 0.970 and the expected heterozygosity from 0.029 to 0.833. Ten loci were at Hardy-Weinberg equilibrium. No pair of loci presented linkage disequilibrium. Transferability of up to 18 loci was positive across four other Aglaopheniidae species from different genera. These loci will be used in studying reef population connectivity for these particular species at the scale of the Indo-Pacific, a promising but little explored research field.

Keywords : Aglaopheniidae, population genetics, cross-amplification, microsatellites, *Macrorhynchia*, hydrozoan, connectivity

Introduction

Hydrozoans are one of the most diverse marine suspension feeders, characterized by their great variety of reproductive modes and life cycles (Bouillon et al., 2006). Life history traits are expected to affect population connectivity levels and diversification

patterns (Schroth et al., 2002). However, this aspect has been rarely explored in hydroids and population genetics tools and data remain scarce for these organisms. To our knowledge, the only study of population genetics of hydrozoans using microsatellites focused on a freshwater invasive species in the Great Lakes region (USA) (Darling and Folino-Rorem, 2009).

The family Aglaopheniidae is one of the most diverse, comprising more than 250 valid species, with species presenting a global geographical distribution from temperate to tropical seas and from sea surface to several hundreds meters depth (Bouillon et al., 2006). This family of feather-like hydroids is particularly diversified in coral reefs. Useful information on evolutionary processes and dispersal capacities of marine species can be generated using co-dominant neutral molecular markers such as microsatellites (Donald et al., 2011). However, while well represented and largely distributed on coral reefs, microsatellite markers have been developed, to date, for only one Aglaopheniidae species (*Lytocarpia brevirostris*; Postaire et al. in press).

Here we describe the isolation of 26 microsatellite markers for *Macrorhynchia phoenicea* (Busk, 1852), a common tropical hydroid of this family measuring several centimetres, inhabiting tropical coral reefs from South Pacific islands to Africa, from 2 to 70 m depth (Millard, 1975). Furthermore, we tested these new markers on four phylogenetically closely related species: *M. philippina* (Kirchenpauer, 1872), *M. sibogae* (Billard, 1913), *M. spectabilis* (Allman, 1883) and *Lytocarpia nigra* (Nutting, 1905). Studying the genetic diversity of these species and their populations' structure is crucial for assessing coral reefs biodiversity and conservation planning, as little is known on the extent of cryptic speciation and levels of endemism among these organisms.

Material and Methods

Construction of a microsatellite-enriched library and primer selection

Total genomic DNA of nine individuals (whole colonies cleared from reproductive structures) from Reunion Island was isolated using DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen™) following manufacturer's protocol and sent to GenoScreen, Lille, France (www.genoscreen.fr). One µg was used for the development of microsatellites libraries through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries as described

in Malausa et al., (2011). A total of 18530 reads were obtained, of which 2958 contained microsatellite motifs. Obtained sequences were analysed with QDD (Megléc et al., 2010). Among the 204 primer pairs designing to amplify fragments containing a microsatellite motif, and on the basis on our criteria (PCR product > 100 bp and number of repeats ≥ 6), we selected 96 pairs of primers for testing their polymorphism on 16 individuals (eight from Reunion Island and eight from New Caledonia). Forward primers were indirectly fluorochrome labeled (6-FAM) by adding a 19-bp M13 tail at their 5' end (5'- CACGACGTTGTAAAACGAC-3')(Schuelke, 2000). Each amplification reaction was performed in a total volume of 10 μ L: 5 μ L of MasterMix Applied 2x (Applied Biosystems), 2.25 μ L of demineralised water, 0.25 μ L (1 μ M) of forward primer tagged with the M13 tail, 0.25 μ L of reverse primer (10 μ M), 0.25 μ L of fluorescent dyed M13 tail (10 μ M) and 2 μ L of genomic DNA (10 ng/ μ L). The thermocycling program was as follows: 94°C for 5 min + 7 x (94°C for 30 s, 62°C [-1°C at each cycle] for 30 s, 72°C for 30 s) + 30 x (94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s) + 8 x (94°C for 30 s, 56°C for 30 s, 72°C for 30 s) for the final hybridization of fluorescent dyed M13 tail + 72°C for 5 min. PCR products were genotyped using an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) and allelic sizes were determined using GeneMapper v 4.0 (Applied Biosystems). Primer pairs were eliminated from further development when (1) they failed to amplify, (2) they amplified multiple fragments, or (3) genotype scoring was deemed unreliable. Finally, a total of 26 candidate loci were successfully kept for characterizing polymorphism on a single population.

Table 1: Microsatellite loci developed for *Macrorhynchia phoenicea* (first part) and their primer sequences (F: forward, R: reverse). Accession numbers in GenBank are indicated. Diversity indices are issued from Arlequin v 3.5.1.2. N_a : number of alleles per locus at the Indo-Pacific scale; N_{apop} : number of alleles per locus in the tested population (Reunion Island); N : number of genotyped individuals; H_o : observed heterozygosity; H_E : expected heterozygosity; F_{IS} : inbreeding coefficient. Under the F_{IS} are indicated the significance of the P -values for deviation to Hardy-Weinberg equilibrium (1000 permutations): NS: non significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. Null allele frequencies (r) are issued from Micro-Checker v 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004), and presence or absence is indicated below (yes or no).

Locus	Primer sequence (5'-3')	GenBank accession number	Repeat motif	Dye	Panel	Size (bp)	N_a	N_{apop}	N	H_o	H_E	F_{IS}	r
Mp01	F: GGCAACTAACAACCGCATTT R: AATAAGTCAGAAGCATTATGGTCAA	KM675787	(TATC) ₁₃	VIC	1	99-170	16	7	34	0.206	0.833	0.756 ***	0.360 yes
Mp02	F: CCAATAACATGCATGCAACA R: TCGAACCTTGTGTCCTTGTG	KM675788	(CAA) ₉	6-FAM	1	106-133	8	2	34	0.029	0.029	0.000 NS	-0.014 no
Mp03	F: GGTTCAAATTAAAAGACGTCCC R: TCCTAACCCCTTTCTTACCCC	KM675789	(ACA) ₇	NED	1	153-194	13	2	34	0.029	0.275	0.895 ***	0.291 yes
Mp04	F: CTTCCAGCCATGAAAGTTGA R: ATACGCTCCTGGATTGGTTG	KM675790	(CAA) ₇	PET	1	150-189	14	2	34	0.000	0.506	1.000 ***	0.414 yes
Mp05	F: TGCTAATTATAGACAGGTTACATTTGA R: TTGGGCTAGGTAACATTACCACT	KM675791	(TAGC) ₅	6-FAM	1	228-256	6	3	34	0.970	0.534	-0.840 ***	-0.733 no
Mp06	F: CGAGAATTCCACCCAATG R: CGACGATTTACTACAAGTCCAAGA	KM675792	(TGT) ₁₁	VIC	1	268-333	17	4	34	0.029	0.244	0.881 ***	0.268 yes
Mp07	F: ATGCGTATGCAAAGGATTGG R: AAGGAGGCAGTTGCTATGGT	KM675793	(GA) ₉	6-FAM	2	140-164	10	3	34	0.029	0.086	0.663 NS	0.142 yes
Mp08	F: GTCAAGTTGGTTTCACTCATGC R: ACAAGCAACGATGAAGGGAC	KM675794	(GTT) ₇	VIC	2	155-167	10	3	34	0.323	0.586	0.452 ***	0.231 yes
Mp09	F: ATTGATTCACGCTTGTGCAG R: GGTGTGTAGATCAGGTAATGTGG	KM675795	(AG) ₇	NED	2	176-196	10	2	34	0.059	0.058	-0.015 NS	-0.030 no
Mp10	F: TTATCCCCTGCTAAACATGAAACA R: CGCGTTATGTAGATCAGCCA	KM675796	(CGTTGT) ₅	6-FAM	2	236-347	24	3	34	0.000	0.262	1.000 ***	0.308 yes
Mp11	F: GGAAAACGACCACAATCCAA R: CTCTTGATTTGATTGAGGAATGT	KM675797	(CTAT) ₉	VIC	2	289-338	10	3	34	0.235	0.643	0.638 ***	0.288 yes
Mp12	F: CGAGTCGTTGCAGGGTTACT R: TCGACGTTATATCTCAAACCTCA	KM675798	(AGAT) ₇	VIC	3	135-223	21	3	34	0.088	0.319	0.727 ***	0.260 yes
Mp13	F: CTTACCCGCTATTAGCTCTTCA R: TTCATAGCGATACGAAACACG	KM675799	(GA) ₇	6-FAM	3	138-164	8	2	34	0.000	0.395	1.000 ***	0.372 yes

Mp14	F: TTTCTCCAAATTGTTCCAAGC R: GCAAATGCCTAAGCTGCAA	KM675800	(GTT) ₆	NED	3	177-204	7	2	34	0.000	0.058	1.000 NS	0.157 yes
Mp15	F: GAGGCGTTTCCTTTTCAAAT R: GAACGTTTCCTCGGAGTGAC	KM675801	(CAA) ₉	PET	3	202-228	9	3	34	0.176	0.388	0.548 ***	0.228 yes
Mp16	F: TCAGAGTTCAAGGGCCAAGT R: TGGGAAGTGTGACCTCGATT	KM675802	(AAC) ₆	6-FAM	3	197-218	6	2	34	0.029	0.187	0.845 ***	0.236 yes
Mp17	F: GCTTTCTCAACAGTTTTCTATTGG R: CGTGTGAGCCTTTCACCTTGAT	KM675803	(TG) ₉	6-FAM	4	114-144	15	6	34	0.618	0.798	0.228 ***	0.096 yes
Mp18	F: TCCCACTGCGTTGTATTGTG R: GGAAATAATTGGTTTCCAGACAA	KM675804	(ATCT) ₆	VIC	4	127-180	16	6	34	0.588	0.727	0.194 NS	0.077 no
Mp19	F: CAGACATAAATTACGAATAATTAACCA R: CCTGCTTTTCTCTTTTGCTTTC	KM675805	(GT) ₉	NED	4	153-174	5	3	34	0.412	0.505	0.218 NS	0.097 no
Mp20	F: CGCTGACCAAGTCCGTTTAAT R: GTTGAAGTTCACCAACGGCT	KM675806	(GTT) ₆	PET	4	192-204	5	2	34	0.029	0.029	0.000 NS	-0.015 no
Mp21	F: TCCGTTGTGTCTATGATATGTTCTT R: CCACATGGTTATCGTCAGCA	KM675807	(TTG) ₇	6-FAM	4	271-315	16	4	34	0.265	0.331	0.204 NS	0.072 no
Mp22	F: TTCGCTCTTTCATTCATCCG R: GAGAAAAGAAATGAAACGCACA	KM675808	(TG) ₆	6-FAM	5	119-129	6	4	34	0.176	0.518	0.663 ***	0.287 yes
Mp23	F: GGCGACGAAGATTTGAGAAC R: GAGTGTGGATGTTGCGTGAG	KM675809	(AAC) ₁₂	VIC	5	126-168	15	4	34	0.353	0.347	-0.017 NS	-0.036 no
Mp24	F: AATACGGCGTCAGAAACCTC R: GCGATCCACCAAATGCTTAT	KM675810	(CT) ₈	NED	5	136-164	24	4	34	0.118	0.528	0.780 ***	0.331 yes
Mp25	F: CACTGGACTACGATCACTCATTG R: AGGAGACGAGAATGTCGGAA	KM675811	(TGT) ₇	PET	5	157-169	4	3	34	0.059	0.437	0.867 ***	0.340 yes
Mp26	F: CAAGATCAAGGACACCGAGC R: TCAAATCATCGCCACTAGACA	KM675812	(CAA) ₆	6-FAM	5	219-242	9	2	34	0.000	0.058	1.000 NS	0.157 yes

Table 2: Cross-amplification for 26 microsatellite markers designed for *Macrorhynchia phoenicea* across four Aglaopheniidae species: *L. nigra* (n = 6), *M. philippina* (n = 10), *M. sibogae* (n = 1) and *M. spectabilis* (n = 1) (+, amplified; +P, polymorphic; -, no amplification). Size ranges of the PCR product in base pairs (19 bp M13 tail comprised) and number of alleles (in brackets) were also indicated.

Locus	<i>L.nigra</i> (n = 6)	<i>M.philippina</i> (n = 10)	<i>M.sibogae</i> (n = 1)	<i>M.spectabilis</i> (n = 1)
Mp01	-	-	-	-
Mp02	-	-	-	-
Mp03	+P 162-165 (2)	+P 162-165 (2)	-	+P 165-168 (2)
Mp04	+ 162 (1)	+P 159-162 (2)	-	+P 162-174 (2)
Mp05	+P 230-256 (3)	+P 230-256 (4)	-	+P 232-240 (2)
Mp06	+P 305-311 (3)	+P 292-311 (3)	-	+P 305-311 (2)
Mp07	+ 140 (1)	+P 144-150 (4)	-	+ 148 (1)
Mp08	+P 159-167 (4)	+P 155-167 (5)	-	+P 161-165 (2)
Mp09	+P 186-188 (2)	+P 186-188 (2)	+ 188 (1)	+ 186 (1)
Mp10	+ 253 (1)	+P 253-269 (4)	-	+ 253 (1)
Mp11	-	-	-	-
Mp12	-	-	-	-
Mp13	+P 154-160 (2)	+ 160 (1)	-	+ 162 (1)
Mp14	+ 182 (1)	+ 182 (1)	-	+ 182 (1)
Mp15	+P 210-225 (4)	+P 213-225 (3)	-	+P 208-216 (2)
Mp16	+ 212 (1)	+P 212-215 (2)	-	+ 212 (1)
Mp17	+P 130-134 (2)	+P 124-134 (4)	-	+P 128-130 (2)
Mp18	+ 144 (1)	-	-	-
Mp19	-	+ 159 (1)	-	+P 164-178 (2)
Mp20	+P 198-201 (2)	+P 198-201 (2)	+P 198-201 (2)	+ 201 (1)
Mp21	-	+ 291 (1)	-	+P 272-275 (2)
Mp22	+P 121-129 (3)	+P 121-127 (3)	+P 121-127 (2)	+ 121 (1)
Mp23	+P 136-139 (2)	+P 136-139 (2)	+P 136-139 (2)	+P 132-142 (2)
Mp24	+ 143 (1)	+P 141-145 (3)	-	+P 154-156 (2)
Mp25	-	-	-	+ 169 (1)
Mp26	+P 222-233 (4)	+P 227-236 (2)	+ 236 (1)	+ 233 (1)

Polymorphism testing and microsatellite cross-amplification

Genotyping of these 26 markers was conducted on 34 individuals from a *M. phoenicea* population from Reunion Island (Saint Pierre; 21.35015 S, 55.48202 E) and, to explore allelic richness at large geographic scale, on individuals from Juan de Nova Island, Scattered Islands (n = 16), Madagascar (n = 16) and New Caledonia (n = 16) using the same protocol as above. Each locus was assigned a dye (6-FAM, VIC, NED, PET) and they were pooled in panels according to amplified fragment sizes to maximize efficiency and minimize costs. Cross-amplifications of these 26 markers were also tested using the same protocol on *M. philippina*, *M. sibogae*, *M. spectabilis* and *L. nigra*.

Data analysis

Allele size span and number of alleles per locus are indicated for the whole dataset (i.e. all sampling sites from South Western Indian Ocean and Pacific); population statistics were calculated for the Reunion Island population only (n = 34). Diversity indices were assessed and tests to Hardy-Weinberg equilibrium performed using Arlequin v 3.5.1.2 (Excoffier et al., 2005). Tests of linkage disequilibrium between all pairs of loci were conducted using Genepop v 4.2. Null alleles and other potential technical biases were tested using Micro-Checker v2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004).

Results and Discussion

All loci were polymorphic. From the genotyping of the Indo-Pacific sampling, the number of alleles ranged from 4 to 24; in the tested population from Reunion Island, the number of alleles ranged from 2 to 7. Observed heterozygosity in the Reunion Island population ranged from 0.000 to 0.970 and expected heterozygosity from 0.029 to 0.833 (Table 1). Over 325 linkage disequilibrium tests between all pairs of loci, only 16 were significant after False Discovery Rate (FDR) correction for multiple testing (Benjamini and Hochberg, 1995). In the tested population, 10 loci over 26 were at Hardy-Weinberg equilibrium. All the other loci showed significant heterozygotes deficit (F_{IS} ranging from 0.228 to 1) except Mp05 ($F_{IS} = -0.84$). This is potentially due to the presence of null alleles as assessed using Micro-Checker v2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004; Table 1), but this result is also consistent with inbreeding and might reflect the specific sexuality (gonochoric) and mode of larval development of this species. Indeed, like the majority of Aglaopheniidae,

M. phoenicea is a brooder species, incubating its larvae in dedicated structures. When mature, planulae released usually crawl (rather than swim) for a short distance before metamorphosis which usually starts in less than one day (Sommer, 1990). The only true planktonic phase of their life cycle corresponds to the release of spermatozooids in the water column, which life span has been studied for only one other hydroid species, and seems to be reduced to a few hours (Yund, 1990). In addition, Aglaopheniidae species do not seem to reproduce during mass spawning events like many scleractinians: in several species in Reunion Island coral reefs, the presence of reproductive structures have been observed during several months (CAFB pers. obs.). In temperate marine hydrozoans species, the reproduction period is related to environmental factors and consequently colonies in the same location tend to reproduce at the same time (Gili and Hughes, 1995). Thus fertilization occurs preferentially between close individuals, which are potentially related. These aspects naturally decrease the genetic diversity of populations, as migration events are potentially rare. The assumption of reduced gene flow between populations will be addressed in a population genetic study of this species with a broad geographical coverage, from South-Western Indian Ocean to Pacific. Cross-species amplification tests revealed that various loci amplified across closely related species of this family (Table 2). Among the 26 loci, (1) 12 and 9 were polymorphic while amplifying *M. philippina* (n = 10) and *L. nigra* (n = 6), respectively; (2) *M. spectabilis* (n = 1) and *M. sibogae* (n = 1) were heterozygotes for 11 and 3 loci, respectively. This shows high transferability within the same genus, and between genera from the same family. These loci might be useful for other species within this family that have not been tested in this study. More generally, these loci will be useful in phylogeographic studies, potentially revealing biogeographic barriers, and particularly to study relationships between larval dispersal capacities and gene flows of coastal benthic species.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Plateforme Gentyane of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Clermont-Ferrand, France) for guidance and technical support. The first author was financially supported by a PhD contract from the Doctoral School of the University of Reunion Island.

References

- Allman GJ (1883) Report on the Hydroida dredged by H.M.S. Challenger during the years 1873-76. Part I. Plumularidae. Report on the scientific Results of the Voyage of H.M.S. Challenger, Zoology 7, 1–20.
- Benjamini Y, Hochberg Y, (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) 57, 289–300. doi:10.2307/2346101?ref=no-x-route:6ebf31d96de7cf134a3383027f7f2cef
- Billard A (1913) Les hydroïdes de l'expédition du Siboga, i. Plumulariidae. Résultats Exploration Siboga 7, 1–115.
- Bouillon J, Gravili C, Pagès F, Gili J-M, Boero F (2006) An Introduction to Hydrozoa. Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris.
- Busk G (1852) An account of the Polyzoa and sertularian zoophytes collected in the voyage of the “rattlesnake” on the coast of Australia and the Louisiade Archipelago, in: MacGillivray, J. (Ed.), Narrative of the Voyage of H.M.S. Rattlesnake, Commanded by the Late Captain Owen Stanley During the Years 1846-50. Boone, London, pp. 343–402.
- Darling JA, Folino-Rorem NC (2009) Genetic analysis across different spatial scales reveals multiple dispersal mechanisms for the invasive hydrozoan *Cordylophora* in the Great Lakes. Molecular Ecology 18, 4827–4840. doi:10.1111/j.1365-294x.2009.04405.x
- Donald KM, Keeney DB, Spencer HG (2011) Contrasting population makeup of two intertidal gastropod species that differ in dispersal opportunities. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 396, 224–232. doi:10.1016/j.jembe.2010.10.028
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics 1, 47–50.
- Gili J-M, Hughes RG (1995) The ecology of marine benthic hydroids. Oceanography and Marine Biology 33, 351–426.
- Kirchenpauer GH (1872). Ueber die Hydroidenfamilie Plumulariidae, einzelne Gruppen derselben und ihre Fruchtbehälter. I. *Aglaophenia*. Abhandlungen aus dem Gebiet der Naturwissenschaften, herausgegeben von dem naturwissenschaftlichen Verein 5, 1–52–pls 1–8.
- Malausau T, Gilles A, Meglécz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castgnone-Serrano P, Délye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Le

- Corre V, Lung-Escarmant B, Malé P-JG, Ferreira S, Martin J-F (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources* 11, 638–644. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.02992.x
- Megléczy E, Costedoat C, Dubut V, Gilles A, Malausa T, Pech N, Martin J-F (2010) QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics* 26, 403–404. doi:10.1093/bioinformatics/btp670
- Millard NAH (1975) Monograph on the Hydroida of Southern Africa. (Trustees of the South African Museum) (Vol. 68). Kaapstad. 513pp.
- Nutting CC (1905) Hydroids of the Hawaiian Islands collected by the steamer Albatross in 1902. *Bulletin of the United States Fish Commission* 23, 931–959.
- Schroth W, Jarms G, Streit B, Schierwater B (2002) Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology* 2, 1.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18, 233–234. doi:10.1038/72708
- Sommer C (1990) Post-embryonic larval development and metamorphosis of the hydroid *Eudendrium racemosum* (Cavolini) (Hydrozoa, Cnidaria). *Helgolander Meeresunters* 44, 425–444. doi:10.1007/BF02365478
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Yund PO (1990) An *in situ* measurement of sperm dispersal in a colonial marine hydroid. *Journal of Experimental Zoology* 253, 102–106. doi:10.1002/jez.1402530114

Annexe 3

Evolutionary dynamics in the Southwest Indian Ocean marine
biodiversity hotspot: a perspective from the rocky shore gastropod
*genus **Nerita**.*

Bautisse Postaire, J. Henrich Bruggemann, H       Magalon et
Baptiste Faure

PLoS ONE (2014) 9(4), e95040, doi: 10.1371/journal.pone.0095040



Evolutionary Dynamics in the Southwest Indian Ocean Marine Biodiversity Hotspot: A Perspective from the Rocky Shore Gastropod Genus *Nerita*

Bautisse Postaire^{1,2*}, J. Henrich Bruggemann^{1,2}, H       Magalon^{1,2}, Baptiste Faure^{1,3}

¹ Laboratoire d'Écologie MARine, Université de la Réunion, FRE3560 INEE-CNRS, Saint Denis, La Réunion, France, ² Labex CORAIL, Perpignan, France, ³ Biotope, Service Recherche et Développement, Mèze, France

Abstract

The Southwest Indian Ocean (SWIO) is a striking marine biodiversity hotspot. Coral reefs in this region host a high proportion of endemics compared to total species richness and they are particularly threatened by human activities. The island archipelagos with their diverse marine habitats constitute a natural laboratory for studying diversification processes. Rocky shores in the SWIO region have remained understudied. This habitat presents a high diversity of molluscs, in particular gastropods. To explore the role of climatic and geological factors in lineage diversification within the genus *Merita*, we constructed a new phylogeny with an associated chronogram from two mitochondrial genes [cytochrome oxidase subunit 1 and 16S rRNA], combining previously published and new data from eight species sampled throughout the region. All species from the SWIO originated less than 20 Ma ago, their closest extant relatives living in the Indo-Australian Archipelago (IAA). Furthermore, the SWIO clades within species with Indo-Pacific distribution ranges are quite recent, less than 5 Ma. These results suggest that the regional diversification of *Merita* is closely linked to tectonic events in the SWIO region. The Reunion mantle plume head reached Earth's surface 67 Ma and has been stable and active since then, generating island archipelagos, some of which are partly below sea level today. Since the Miocene, sea-level fluctuations have intermittently created new rocky shore habitats. These represent ephemeral stepping-stones, which have likely facilitated repeated colonization by intertidal gastropods, like *Merita* populations from the IAA, leading to allopatric speciation. This highlights the importance of taking into account past climatic and geological factors when studying diversification of highly dispersive tropical marine species. It also underlines the unique history of the marine biodiversity of the SWIO region.

Citation: Postaire B, Bruggemann JH, Magalon H, Faure B (2014) Evolutionary Dynamics in the Southwest Indian Ocean Marine Biodiversity Hotspot: A Perspective from the Rocky Shore Gastropod Genus *Nerita*. PLoS ONE 9(4): e95040. doi:10.1371/journal.pone.0095040

Editor: Sharvyn Jane Goldstien, University of Canterbury, New Zealand

Received October 9, 2013; Accepted March 22, 2014; Published April 15, 2014

Copyright: © 2014 Postaire et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding was provided by the French Agence Nationale de Recherche (programme BIOTAS, no. ANR-06-BDIV-002) and the EU-funded program RUN-EMERGE. We acknowledge the les Territoires Australes et Antarctiques Françaises for logistic support during our fieldwork. We further thank the Affaires Maritimes and the Réserve Naturelle Marine de La Réunion for sampling permits. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bautisse.postaire@univ-reunion.fr

Introduction

The heterogeneity of species distribution is primarily due to latitudinal, longitudinal and altitudinal gradients in environmental conditions [1]. However, such gradients do not explain the presence of highly species-rich regions, or “biodiversity hotspots”. Marine and terrestrial biodiversity hotspots have been defined as restricted regions with high species richness, high endemism and facing habitat loss due to human activities [2,3]. Over the past two decades, 34 terrestrial et 10 marine biodiversity hotspots have been identified [2,4]. The Indo-Australian archipelago (IAA), as defined by [5], represents the most important marine biodiversity hotspot, with species richness declining gradually westward and eastward [6,7]. Two main theories have been proposed to explain this distribution of marine biodiversity: the centre-of-origin and the centre-of-overlap hypothesis [8]. The first proposes that this region generates novel species arising in sympatry or allopatry between islands that subsequently migrate outwards to peripheral regions. The second theory proposes that the IAA, located at the limit of several biogeographical regions, accumulates species

formed by allopatric speciation outside the IAA. It should be noted that these hypotheses are not mutually exclusive and patterns may vary among taxa (reviewed in [9]).

Shallow marine habitats are strongly affected by tectonics, eustatic sea-level changes, physical disturbances and run-off from land, impacts that continually modify habitat availability over various time scales [10,11]. Furthermore, climatic variation over geologic time changes environmental conditions and ocean currents at global and regional scales [10]. These abiotic changes alter gene flow and species distribution and may eventually lead to the formation of new species due to vicariance and/or new selective pressures [12]. Several studies argued that part of the origin of the IAA marine hotspot could be explained by abiotic factors, such as sea level fluctuation and oceanic circulation, tectonic activity and temperature changes [13–18]. Recent studies further pointed out the role of habitat, with coral reefs enhancing species diversification [17,19].

The Southwest Indian Ocean (SWIO) region, corresponding to the Western Indian marine ecoregion [20], comprises a main landmass, Madagascar, and several island archipelagos such as

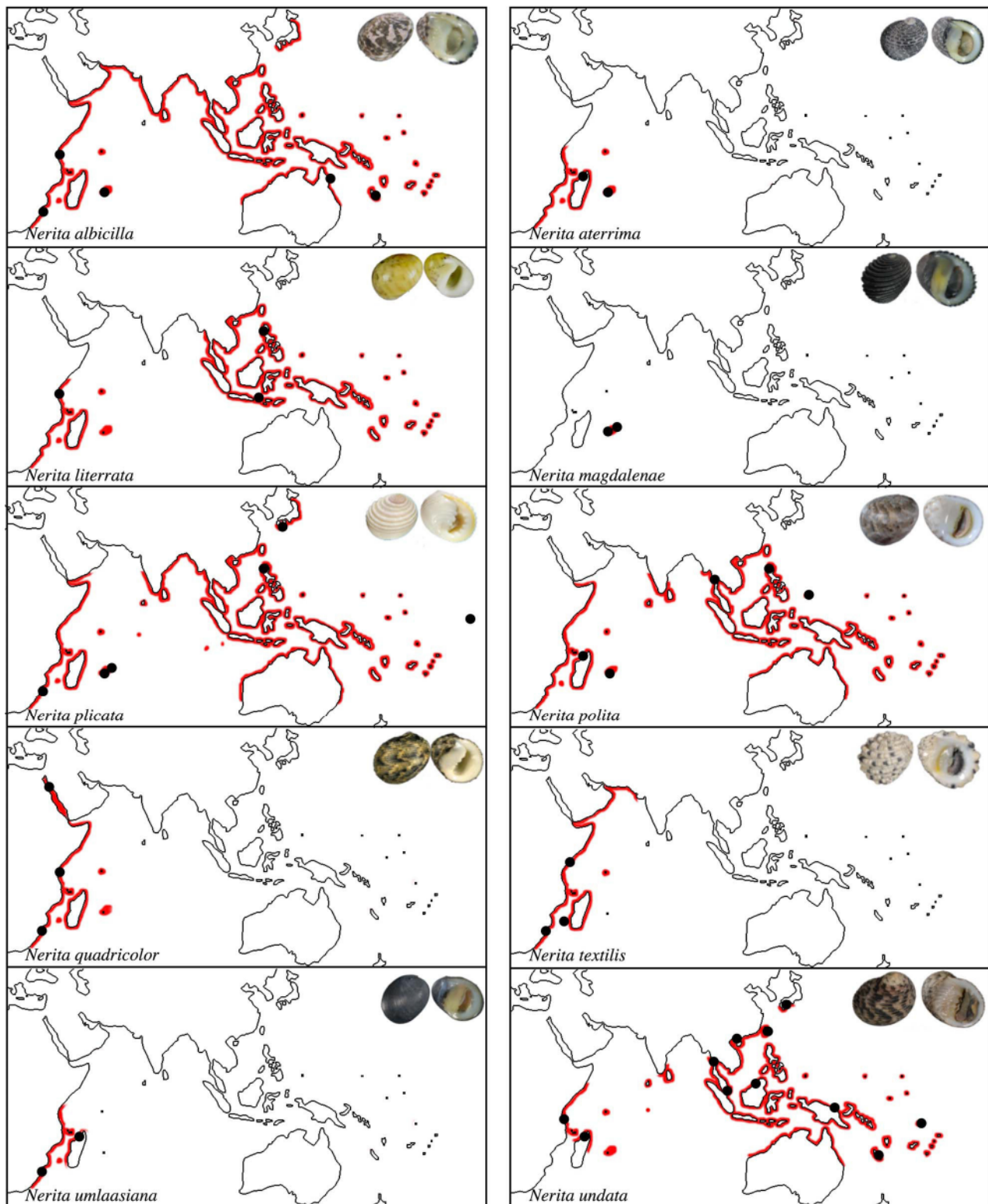


Figure 1. Geographic distribution of *Nerita* species living in the South-Western Indian Ocean, adapted from [16]. Grey dots indicate sampling sites from [16]; grey squares indicate sampling sites of new haplotypes.
doi:10.1371/journal.pone.0095040.g001

Comoros, Mascarenes and Seychelles, each with different origins and ages. While Madagascar and the Seychelles are fragments of eastern Gondwana, the Mascarene archipelago was formed during

the past 10 Ma by the volcanic activity of a mantle plume, which has been active since the late Cretaceous [21]. This region hosts a high proportion of endemics and is highly threatened by human

activities, hence its classification as a marine biodiversity hotspot [2,22]. It further is one of the regions where terrestrial and marine biodiversity hotspots coincide. The study of the SWIO terrestrial biota revealed a high relatedness between SWIO and Asian species, leading to the hypothesis of the presence of discontinuous land bridges connecting islands and continents to explain present species distributions [23–25]. The extent of such ephemeral bridges varied with sea level and is thought to have facilitated the colonisation of SWIO by terrestrial species following a stepping-stone model [24,26,27]. The study of SWIO marine taxa, focusing on reef-associated species, also highlighted the relatedness of SWIO and IAA faunas, but also revealed the presence of numerous cryptic species [8,17,28,29]. In contrast, a recent study argued that the northern Mozambique Channel hosts scleractinian corals that are relicts of the West Tethys biodiversity [30]. While these studies revealed the complex and contrasted evolutionary histories of SWIO marine taxa, they concerned mainly reef-associated biota, leaving aside other marine ecosystems.

Rocky shores represent only 3000 km² area in the Indian Ocean (excluding the Western Australian coast) [31]. In spite of the limited extent, this habitat is extremely interesting for studying species evolution. Rocky shores are characterised by strong gradients in environmental conditions at small scales, varying within meters and hours, and so exert strong selection pressures enhancing species diversification over time [32]. Several biogeographical studies revealed the high variability of genetic structures and speciation patterns of rocky shore species, with some taxa showing only weak imprint of past variations in environmental conditions while others displaying distribution patterns that are highly correlated to the geological history [33–35]. Differential dispersal capacities provides an intuitive explanation for these discrepancies among species: population structure of species with long-lived planktonic larva show little imprint of environmental changes due to high connectivity, as speciation occurs at ocean basin scales and exclusively by allopatric processes [36]. However, attributing the observed biogeographic patterns and population genetic structures to the specificities of larval life alone is too simplistic, as the ecological requirements of the adult stage also determine the distribution of marine species [37,38]. Knowing the geographic range, the ecological requirements and life history traits, in addition to geological history, is challenging but often necessary to accurately resolve the evolutionary history of a species.

The Neritidae (Rafinesque) (Neritimorpha [39]) family is composed of tropical gastropods inhabiting a wide variety of habitats: open seawater, rocky shores, brackish and fresh waters,

mangroves, mud and sand. However, the genus *Nerita* (Linnaeus), with more than 60 known extant species is almost restricted to tropical rocky shores and has already been subject to phylogeographic studies [16,40,41]. Niche changes have played a relatively minor role in the diversification of the genus [16]. Species diversity in this genus peaks in the IAA region, but many species present large biogeographical ranges, from the SWIO to Hawaii [16]. Members of the genus have planktotrophic larvae that live for weeks up to months before settling [42,43]. Those long-lived larvae are expected to limit the number of regional endemics due to high connectivity between populations, which is generally observed in *Nerita*. Contrasting with this general pattern, the SWIO rocky shores present a high proportion of endemics. Among the ten *Nerita* species present, one is endemic to the Mascarene archipelago, *N. magdalenae* (Gmelin), two are endemic to the SWIO, *N. aterrima* (Gmelin) and *N. umlaasiana* (Krauss), while two are restrained to the western coasts of the Indian Ocean, *N. textilis* (Gmelin) and *N. quadricolor* (Gmelin) ([16], Figure 1). The phylogeny of the genus is almost resolved and several clades restricted to the SWIO have been identified within species presenting an Indo-Pacific distribution. Further study of the diversification of the genus have set its origin at the end of the Paleocene and showed a constant diversification rate since then [38]. According to this study, species living in the SWIO originated during two distinct periods, at the beginning (± 22 Ma; *N. magdalenae*, *N. textilis* and *N. aterrima*) and the end of the Miocene (± 9 Ma; *N. quadricolor* and *N. umlaasiana*).

Time-calibrated phylogenies contain information on the temporal diversification of clades, permitting the exploration of macroevolutionary processes such as variation of speciation and extinction rates over time [44]. When biogeographical information of extant lineages is also considered, a chronogram allows understanding how past geological and climatic events influenced present-day species richness and distribution patterns [45]. According to [40], the IAA is a centre-of-overlap, conclusion supported by the observation that no recent lineage of *Nerita* species has originated within this region. However, this study did not fully explore the diversification patterns of SWIO *Nerita* species and clades.

The present study focuses on the origins and diversification of SWIO *Nerita* species and complements previous phylogenies. It participates to the global effort in understanding how the unique biodiversity of the SWIO region appeared and was maintained through geological times. Many questions remain unanswered: Are local species formed via regional or more global speciation processes? Do they present trans-ocean origins? Are they ancient

Table 1. Number of newly sampled specimens per location.

	Reunion Island	Mauritius	Europa Island	Madagascar
<i>Nerita albicilla</i> (Linnaeus 1758)	4			
<i>Nerita aterrima</i> (Gmelin 1791)	6			
<i>Nerita magdalenae</i> (Gmelin 1791)	3	2		
<i>Nerita plicata</i> (Linnaeus 1758)	6	2		
<i>Nerita polita</i> (Linnaeus 1758)	3			
<i>Nerita quadricolor</i> (Gmelin 1791)			3	
<i>Nerita textilis</i> (Gmelin 1791)			2	
<i>Nerita umlaasiana</i> (Krauss 1848)				1

Each specimen was sequenced for both markers (CO1 and 16S).

doi:10.1371/journal.pone.0095040.t001

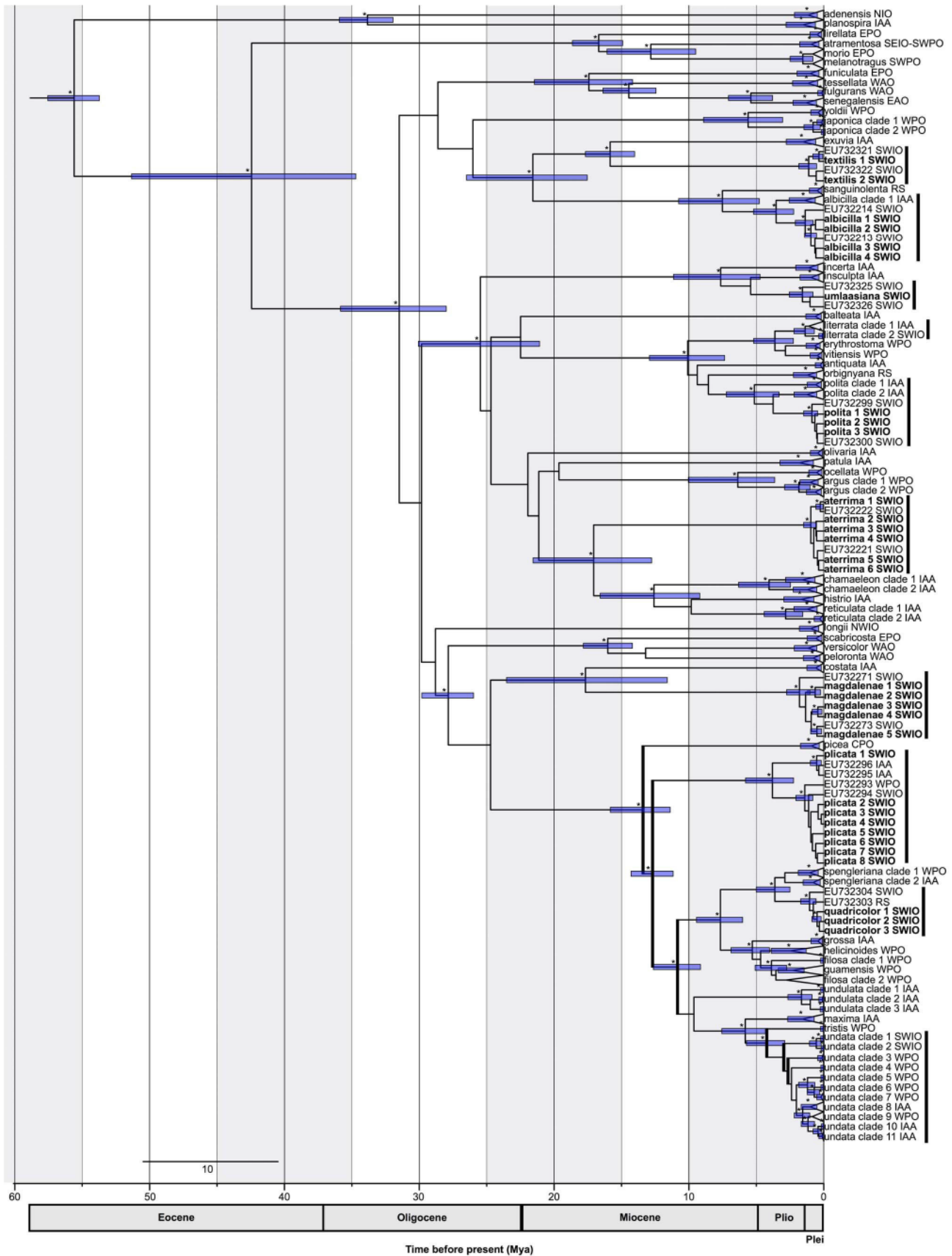


Figure 2. Maximum clade credibility tree. Branch lengths are proportional to time in million years (Ma) and are estimated with Bayesian relaxed lognormal molecular clocks for each marker on the concatenated dataset. Clades with significant increase of diversification rates are indicated by thick black lines ($p < 0.05$). Asterisks on branches represent clades supported by the Bayesian analysis (posterior probability > 0.95). Bars represent the 95% HPD interval around the dated nodes. NWIO: Northwest Indian Ocean; SEIO: Southeast Indian Ocean; SWIO: Southwest Indian Ocean; IAA: Indo-Australian archipelago; SWPO: Southwest Pacific Ocean; WPO: West Pacific Ocean; CPO: Central Pacific Ocean; EPO: East Pacific Ocean; RS: Red Sea; WAO: West Atlantic Ocean; EAO: East Atlantic Ocean. Each triangle tips represent two sequences from Genbank. Bold names represent new sequences. Thick black lines identify species present in the SWIO.
doi:10.1371/journal.pone.0095040.g002

or relatively recent species? To answer such questions, we used up-to-date methods of chronogram reconstruction and macroevolution studies to (1) reveal variations in the diversification history of *Nerita* species, and (2) study the potential influence of extrinsic geological and climatic factors on the diversification of the genus.

Materials and Methods

Sampling

We thank the Affaires Maritimes, the Réserve Naturelle Marine de La Réunion and the Territoires Australes et Antarctiques Françaises for sampling permits and the latter also for logistic support during fieldwork at the Eparses Islands. We collected shells and tissues of eight *Nerita* morpho-species from different locations within the SWIO (32 individuals in total, Table 1, Figure 1). Species were identified *a posteriori* using online databases and taxonomic works [46,47]. To detect possible cryptic species, we collected and sequenced at least three individuals per morpho-species. Samples from Madagascar and Europa Island were collected between 2008 and 2010 and samples from Reunion and Mauritius were collected in 2011. Each individual (shell) was photographed alive. Samples previous to 2010 were stored in 90% ethanol at room temperature and samples of later campaigns were preserved after dissection in 70% ethanol and stored at -20°C .

Sequencing

DNA of each individual was extracted from ~ 10 mg of foot tissue with DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. Extraction quality was assessed visually on a 0.8% agarose gel stained with GelRed Nucleic Acid Stain, 10000X in DMSO (Gentaur). We amplified and sequenced fragments of two mitochondrial genes, cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) and 16S rRNA (16S). Each PCR reaction was conducted in 25 μl : 8.5 μl of ultra-pure water, 12.5 μl (0.625U) of AmpliTaq mix (Applied Biosystems), 1 μl of each primer (10 μM) and 2 μl of template DNA (final concentration: 1.6 ng/ μl). Each gene was amplified with the following sets of primers: CO1 with HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') and LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') [48] and 16S with 16Sar (5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3') and 16Sbr (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3') [49]. The PCR profile for both markers consisted of an initial denaturation step (5 min at 95°C), 5 cycles of denaturation (30 s at 94°C), annealing (30 s at 46°C) and elongation (1 min at 72°C), 30 cycles of denaturation (30 s at 94°C), annealing (30 s at 51°C) and elongation (1 min at 72°C), and a final extension step (10 min at 72°C). PCR products were visualized on a 1% agarose gel stained with GelRed Nucleic Acid Stain, 10000X in DMSO (Gentaur). PCR products were sequenced in both directions at Genoscreen (www.genoscreen.fr) by the Sanger method (3730XL, Applied Biosystems).

Tree Construction

The 64 new sequences were checked and edited using Geneious 6.0 (created by Biomatters, available on from <http://www.geneious.com/>) and deposited in Genbank (Table S1). To

complete our data set, sequences for CO1 and 16S genes were downloaded from Genbank (Table S1). In fine, 370 *Nerita* sequences were used (185 for each marker). The complete data set was aligned using the ClustalW algorithm (default options) and confirmed by eye. Using Modeltest v3.7 [50,51] and AIC, GTR+I+ Γ was the best evolution model. Lack of significant divergence in the phylogenies of the two markers permitted conducting the analysis on the combined data set [40]. Three methods of phylogenetic tree construction were used: (1) Neighbor-joining (NJ, 1000 bootstrap permutations) was calculated using Geneious 6.0 (2) Maximum Likelihood (ML) was implemented using the PHYML Geneious plug-in [52] and (3) Bayesian analyses were performed using MrBayes v3.2 (MB, 30.10^6 generations, 8 chains, 3 runs, temperature to 0.2) [53]. Bayesian analyses were conducted on Titan, Reunion University's cluster. Each tree was rooted by the outgroup *Bathynnerita naticoides* [54].

Estimation of Nodes Ages

We used BEAST v1.7.5 [55] to reanalyse the combined dataset of CO1 and 16S sequences incorporating an uncorrelated relaxed, lognormal molecular clock for both markers. This method allows the construction of phylogeny and estimation of divergences times at the same time, calculating the 95% Highest Posterior Density (HPD) of each node. The chronogram was calibrated as in [40]. We used a GTR+ Γ +I substitution model for each marker. We used the birth-death model for the tree reconstruction [56], which assumes constant speciation and extinction rates over time (exponential increase of species number over time) with a faster accumulation of lineages when considering recent past geological time (accumulation of lineages that are not extinct yet).

Analyses were undertaken with three independent chains of 1.10^8 generations, sampling every 10^4 generations. The convergence of all parameters was assessed using Tracer v1.5 [57]. Final tree was produced by constructing a consensus tree from the data set of accepted trees (burnin: 25%, total accepted: 7500) with the maximum clade credibility option and median node height using TreeAnnotator v1.7.5 [58]. Final tree editing was performed using FigTree v1.4 [59].

Diversification Analysis

Tree imbalance assessment. We assessed the imbalance of the tree using β . The β parameter compares the observed nodal imbalance among clades to the equal-rates Markov model [60]. Under the theoretical model, each node has the same probability of splitting, and β should not be distinguishable from 0. Strong negative or positive values indicate variations in the splitting probability among lineages indicating whether lineages within a tree have diversified with different rates [60]. We performed this analysis for the whole genus using *apTreeshape* [61] package under R [62].

To explore the evolution of the genus through time, lineage-through-time (LTT) plots were constructed. Based on the chronogram, it represents the evolution of the number of lineages against the node ages and thus the change in diversification rate

Table 2. Determination of the number of rate shifts for *Nerita*.

Rs	T0	Tu	Div	T1	Tu	Div	T2	Tu	Div	Div	p value	Log-likelihood
0	0	0.49	0.068									-204.656
1	0	0.99	0.00013	24	0.57	0.058					0.0403	-202.554
2	0	0.98	0.0042	6	0.18	0.006	24	6.10^{-7}	0.13		0.0709	-200.923

Log-likelihood values were tested against the model with one more shift. Rs : rate shifts, Tn : n rate shift, Tu : turnover, Div: diversification.
doi:10.1371/journal.pone.0095040.t002

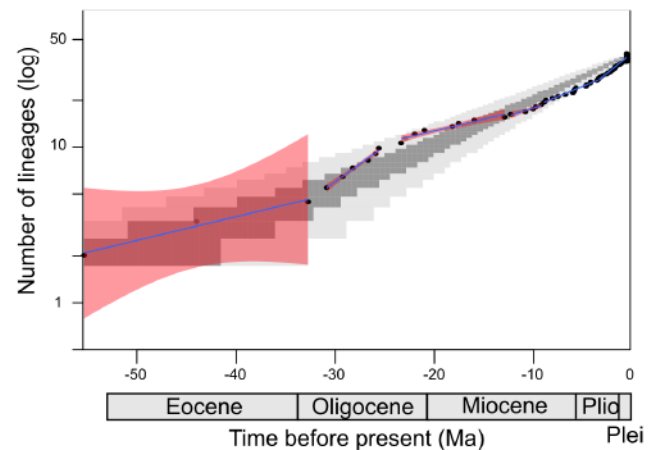


Figure 3. LTT plot of the maximum clade credibility tree. Grey zone represent the 50% (dark grey) and 95% (light grey) null distribution of LTT plots generated under the Yule model. Black dots represent observed values. Blue lines represent successive linear models fitted to the data and confidence intervals (red).
doi:10.1371/journal.pone.0095040.g003

through time. One thousand random trees were calculated with the same parameters (root height, number of taxa, diversification and extinction rates) as our data to assess a null distribution of LTT curves. Under a constant birth-death model, a straight line is expected with slope equal to $b-d$ (b : speciation, d : extinction) [56,63].

Diversification rate shifts. Departures from a constant rate of diversification (null hypothesis) were analysed using the constant rate test. This test uses the gamma (γ) statistic to compare the positions of nodes of the studied phylogeny to those from a theoretical phylogeny generated under a constant rate of diversification [63] using the package *ape* [64]. Negative values of γ imply a reduction of the speed of accumulation of lineages and thus of diversification rate; positive values imply an acceleration of lineage accumulation. The gamma statistic assumes that all extant lineages have been sampled and that speciation and extinction occur with equal probability among lineages. To account for incomplete sampling, we used the MCCR test [63]. We simulated a thousand phylogenies with 100 taxa under the pure birth model. We compared the γ value of the original phylogeny to the distribution of values of the random phylogenies. To test the second assumption of the constant rate test, we used the relative cladogenesis (RC) test with a Bonferroni correction implemented the *geiger* package [65]. This test calculates the probability that a particular lineage existing at a time t will have n descendants under a constant rate birth-death model at the present time. The null hypothesis of this test is that all ancient branches have the same proportion of extant species [66]. It allows identifying branches producing more descendant than the others at the same time interval.

When using phylogenies with a non-null extinction rate [67], the power of the γ statistic for detecting changes in diversification rates is lower than likelihood methods (e.g., ΔAIC_{RC}) (Table S2). The ΔAIC_{RC} test statistic included in the *laser* package [68] compares data fits to rate-constant diversification models (Yule and birth-death, AIC_{RC}) and several rate-variable models (Yule-2-rate, Yule-3-rate, logistic density-dependent DDL and exponential density-dependent DDX, AIC_{RV}) with likelihood ratio tests and AIC scores. Under DDL model, the speciation rate slows in relation to a logistic growth depending on: the initial speciation rate, the number of lineages at a specific point and a parameter

Table 3. Parameters of the linear models fitted to the LTT for each geological period.

Geological period (in Ma)	Slope (lineage per Ma)	Intercept
Eocene to early Oligocene (−50, −30)	1.11	0.020
Early Oligocene to early Miocene (−30, −20)	2.44	0.059
Early Miocene to mid-Miocene (−20, −15)	1.79	0.036
Mid-Miocene to late Miocene (−15, −10)	1.60	0.023
Late Miocene (−10, −5)	1.63	0.026
Pliocene to nowadays (−5, 0)	1.77	0.051

doi:10.1371/journal.pone.0095040.t003

similar to the carrying capacity. Under the DDX model, the speciation rate at a certain point of time is function of initial speciation rate, the number of lineage at this specific point and the magnitude of the rate change as the number of lineage increases (a rate change equals to 0 implies constant speciation through time) [69]. In the other two rate-variable models, the speciation rate under a pure birth model within a clade is assumed to change before one or several breakpoints [68]. For example, the Yule-2-rate assumes a first speciation rate, a final speciation rate, and inserts a breakpoint in time when rate shifts (optimized during model fitting). According to [67], rate-constant models can be rejected with confidence when the difference between AIC_{RC} and AIC_{RV} is close to 4 for small phylogenies ($n_{\text{taxa}} = 30$) and 5.5 for large phylogenies ($n_{\text{taxa}} = 100$). We assessed the critical values of the ΔAIC_{RC} test by simulating 1000 phylogenies of 74 taxa under the pure birth model (Table S3).

We used the *TreePar* package 2.5 [70] to highlight changes in diversification rates (speciation-extinction), i.e. the slope of the LTT, through time by adjusting the starting time of the analysis and taking into account incomplete sampling. The control of these

two parameters allows controlling the possibility that recent evolution and incomplete sampling may hide diversification phases during the early stages of the phylogeny. The sampling parameter represents the proportion of extant lineages present in the phylogeny (this parameter set to 1 indicates that all lineages have been sampled). This method needs the specification of the boundaries of the period studied (here from 34 to 3 Ma, covering Oligocene, Miocene and Pliocene), the grid (here 1 Ma) and the number of shifts to include. On each point of the grid, a shift is inserted and rates are estimated. Once the best shift point is determined, it is fixed and the analysis restarts to insert another shift point. Likelihood ratio tests were used to compare the current model to a model with one more shift point.

Sliding window analysis. In order to explore potential bursts of diversification through time, we performed a sliding-window analysis [71]. Assuming that all non-sampled lineages were formed during the Pleistocene (e.g. 2.6 Ma to Present), we set a window of 5 Ma wide and a step of 1 Ma, and calculated a diversification rate for each step using the chronogram from BEAST from 56 to 2.6 Ma. In [72], the diversification rate is given as $-\ln(N_b/N_t)/\Delta t$, where N_b is the number of lineages at the beginning of the period, N_t the number of lineages at the end of the period and Δt the length of the period in million years.

Results

Molecular Dating

Our phylogenetic analysis was fully consistent with the previous published phylogeny of *Nerita* [40]. No new clades within *Nerita* species were discovered. The tree generated with an uncorrelated relaxed lognormal molecular clock for both markers indicates divergence times (Figure 2). The relaxed molecular clock estimated that the genus *Nerita* originated 55.7 Ma ago (95% HPD: 53.7 to 57.6 Ma). Even though some nodes are poorly supported, the majority of nodes ages were estimated with high confidence. Our chronogram, using two independent molecular clocks, dated all diversification events more recently than previous findings, though with the same topology and confidence of nodes. Estimated ages of *Nerita* species present in the SWIO region are all younger than 20 Ma: *N. aterrima* appeared 17.26 Ma (95% HPD: 12.76 to 22.71 Ma); *N. magdalenae* 17.9 Ma (95% HPD: 11.27 to 23.8 Ma); *N. quadricolor* 3.59 Ma (95% HPD: 2.4 to 4.99 Ma); *N. textilis* 15.86 Ma (95% HPD: 13.99 to 17.65 Ma); *N. umlaasiana* 5.39 Ma (no 95% HPD given by BEAST). For species with Indo-Pacific range, individuals collected in the SWIO show divergent and strongly supported monophyletic clades (except *N. polita*): *N. albicilla* SWIO diverged from the IAA clade 3.64 Ma (95% HPD: 2.18 to 5.63 Ma); *N. polita* 3.73 Ma (no 95% HPD given by BEAST); *N. litterata* 1.13 Ma (no 95% HPD given by BEAST); two *N. undata* clades 2.67 Ma (no 95% HPD given by BEAST).

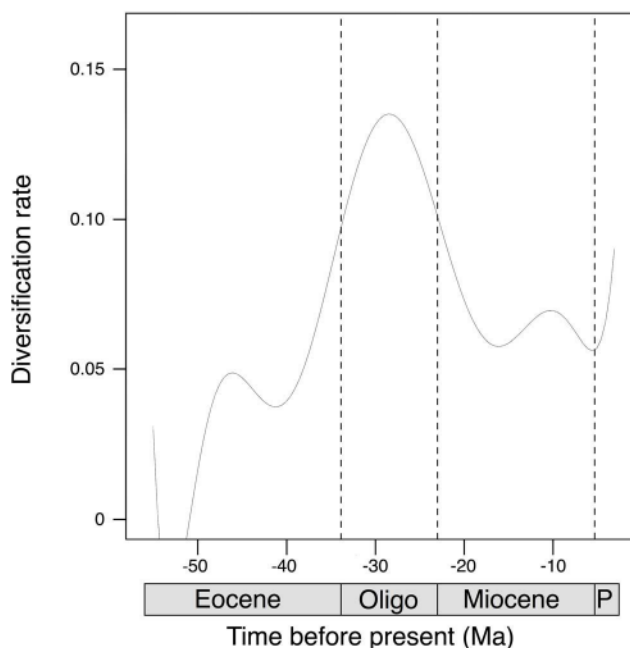


Figure 4. Sliding-window analysis of the net diversification rate of the genus *Nerita* through geological periods. Oligo: Oligocene; P: Pliocene.

doi:10.1371/journal.pone.0095040.g004

Evolution of Lineages and Tree Shape

The chronogram obtained with BEAST suggested imbalance in the diversification of *Nerita* as it is more imbalanced than expected under the Yule model ($\beta = -1.07$, 95% confidence interval: -1.43 to -0.56). The RC test highlighted an increase in diversification rate starting at 13.15 Ma (95% HPD: 11.39 to 15.83 Ma, $p = 0.0076$, $\alpha = 0.05$) and running all along the phylogeny to the *N. undata* species complex.

Studies of diversification rate shifts through time selected the Yule-3-rate model as the best fit model for the whole *Nerita*, but did not reject the Yule model ($\gamma = 0.63$; critical value $\gamma = 1.96$, $\alpha = 0.05$).

The *TreePar* analyses detected a reduction of diversification rates situated at 24 Ma, decreasing from 0.058 to 0.00013 (Table 2).

The LTT plot is consistent with the *TreePar* analyses, showing a faster accumulation of lineages during the Oligocene and a later slowdown (Figure 3, Table 3). However, the LTT plot remains within the 95% confidence interval of null distributions of LTT plots under the Yule model.

The sliding-window analysis is also consistent with previous results, showing that the diversification rate was higher during the Oligocene. It decreased during the Miocene and remained relatively constant for 10 Ma (Figure 4) to finally increase again during more recent geological times.

Discussion

Biogeography: Global Patterns and Timing of Diversification

Our results provide another example of extensive cryptic diversity in species with Indo-Pacific distribution ranges. *Nerita* species from IAA present numerous robust divergent clades within this region. This pattern has been interpreted as a consequence of intense diversification within this region, producing species that further disperse and colonize peripheral islands in the Indian and Pacific oceans [73]. Long distance colonization events may lead to allopatric and peripatric speciation with the modification of gene flow through time due to changes in biotic and abiotic conditions. Allopatry seems to be the most frequent speciation mechanism of marine species [28,33,37,74], but other processes like disruptive selection, habitat or resource choice, may occur at smaller geographic scales and lead to sympatric sister species, particularly in gastropods [75].

The first fossil record of *Nerita* is from the late Paleocene (56 Ma) [76] and the average genus diversification rate varied over time according to the *TreePar* analysis. Our results suggest that diversification was higher during the Oligocene and early Miocene compared to later geologic periods when net diversification rate decreased from 0.058 to 0.00013. During Oligo-Miocene, the oceanic circulation of the southern hemisphere was greatly modified by the northward movement of the Australian and South-American plates and the southward migration of the Antarctic plate [77]. These led to the formation of the circumpolar current, the formation of the Antarctic ice sheet [78–81] and global cooling, lowering sea levels and expanding emerged land masses and coastlines [82]. Furthermore, the collision of the Australian and Asian plates led to the emergence of new landmasses and tropical habitats suitable for colonization by shallow water species: the IAA [83]. The IAA formation modified equatorial currents, constraining seaways between the Pacific and Indian oceans. These changes in marine habitats induced massive species extinctions in many taxa and important changes in faunal compositions [84]. Based on our results, *Nerita* gastropods do not appear to have suffered from these global environmental changes

since their diversity increased rapidly during this period (Figure 4). Increased availability of suitable habitats and the high spatial and temporal heterogeneity of the environment during Oligocene and early Miocene have likely modified the distribution and connectivity of populations and boosted diversification by increasing the opportunities for allopatric and peripatric speciation. The pattern we found is congruent with that of three other intertidal or shallow marine gastropod genera: *Conus*, *Echinolittorina* and *Turbo* [15]. The observed slowdown of diversification in these genera during late Miocene and Pliocene was interpreted as a consequence of limited speciation opportunities, due to the progressive filling of newly created niches [15]. Diversification rates in *Nerita* have likewise decreased slightly since the end of the Oligo-Miocene period. Contrastingly, the *N. undata* complex (originating from the IAA) presents a higher probability of diversification as shown by the RC test ($p = 0.0076$, $\alpha = 0.05$). Originating during mid-Pliocene, this clade has diversified since this period in 11 robust genetic clades: 2 in the SWIO and 9 in the IAA. The detection of different geographically restricted lineages within species with Indo-Pacific distributions, like *N. albicilla* or *N. undata*, suggests that dispersal occurs at relatively small geographic scales, despite a high dispersal potential due to long-lived planktotrophic larvae. The spatial and temporal heterogeneity of the IAA region may enhance species diversification at small geographic scales by constantly modifying connectivity between populations for species with benthic adult and planktonic larval stages which are dependent on ocean currents and available habitats for settlement [85,86]. Our results, like in other gastropod genera, support the centre-of-origin hypothesis for *Nerita*, the IAA presenting significantly more diversification events during the Oligocene.

Isolation by Distance as a Driving Process of Diversification in the Indian Ocean

The genus *Nerita* being almost restricted to tropical rocky shores, its distribution is partly correlated to the existence of these particular habitats. Although the cryptic diversity of IAA *Nerita* can be explained by global climatic variations and environmental modifications over geological time, these factors do not explain the high proportion of endemic and cryptic lineages found within the SWIO. In this region, the volcanic activity (geological hotspot) started more than 65 Ma ago and created a North-South oriented chain of islands across the Indian Ocean: Laccadive islands (emergence: 65–60 Ma), Maldivian islands (60–50 Ma), Chagos archipelago (50–49 Ma), Mascarene plateau (48–31 Ma), Mauritius island (8 Ma) and finally Reunion Island (2 Ma) [87,88]. During sea level low stands, these islands represented large landmasses, particularly during the Miocene. Various terrestrial clades used those multiple islands as stepping-stones to colonize the SWIO, while subsequent sea level rises facilitated secondary isolation and speciation [24]. Thus, colonization events of SWIO by Asian and IAA species favoured terrestrial speciation due to the action of geologic/climatic events throughout this period.

This model seems to apply to Indian Ocean *Nerita* species as well. Our hypothesis is supported by the old asynchronous divergence, ranging from 21 to 5 Ma (the Mascarene plateau emerged during this period) of three endemic species from their closest parent species living in the IAA region: *N. aterrima*, *N. magdalenae*, *N. umlaasiana*. Nowadays, there is little connectivity between the western and eastern Indian Ocean populations for a wide range of marine taxa [34,89]. However, throughout the Miocene and assuming no major changes in ocean currents compared to nowadays, the intermittent emergence of volcanic landmasses and new rocky shores in SWIO may have permitted larval colonization from IAA *Nerita* populations. Without constant

larval input due to sea level variations changing distances between populations of IAA and SWIO, newly settled populations diverged and formed new species by allopatry or peripatry. Ecological transition has not played a role in the formation of SWIO *Nerita* species as all sister species-pairs occupy the same ecological niches: lower littoral for *N. albicilla*-*N. sanguinolenta*; mid-littoral for *N. textilis*-*N. exuvia*; upper littoral for the pairs *N. magdalenae*-*N. costata* and *N. quadricolor*-*N. spengleriana*; supra-littoral for *N. insculpta*-*N. umlaasiana* [16]. Ecological conservatism have been identified in other intertidal gastropods, e.g., sister species of *Echinolittorina* remain allopatric for millions of years without changing their habitat preferences [33]. Ecological conservatism during diversification has also been documented in other taxa, such as coral reef fishes [90]. For a temperate terrestrial gastropod (*Arion subfuscus*), the habitat fidelity over time (as evidenced by the persistence of allopatry) has even contributed to the increase of lineage accumulation during the past glacial maximum [91].

Therefore SWIO *Nerita* endemics followed a “terrestrial” diversification pattern in the region and formed due to the synergy of several abiotic factors: the presence of an active geological hotspot and sea level variations, favouring colonization of *Nerita* populations from the IAA and subsequent genetic isolation. Changes in ocean circulation may have also played a role, but modelling currents at small geographical scale through geological time seems presently not feasible.

Conclusions

This study joins the increasing number of publications linking geological history and diversification processes to explore biogeographic patterns. It brings attention to the role of geologic events and climatic variations modifying colonization opportunities. It further highlights the strong influence of allopatric and peripatric speciation processes in establishing intertidal gastropods diversity patterns, depending on the presence of islands to maintain their presence across oceanic basins and thus exhibiting a “terrestrial diversification pattern”. The link between the IAA and SWIO

intertidal biodiversity is here evidence and it would be interesting to compare this pattern with other SWIO rocky shore taxa, in order to assess the prevalence of our results among a wider variety of organisms.

Supporting Information

Table S1 List of species used in this study, sampling zone, biogeographic region and Genbank accession numbers for COI and 16S genes. CPO: Central Pacific Ocean; EAO: East Atlantic Ocean; EPO: East Pacific Ocean; IAA: Indo-Australian archipelago; NIO: North Indian Ocean; RS: Red Sea; SEIO: Southeast Indian Ocean; SWIO: Southwest Indian Ocean; SWPO: Southwest Pacific Ocean; WPO: West Pacific Ocean; WAO: West Atlantic Ocean; (XLSX)

Table S2 Tests used on the final chronogram with assumptions and alternative hypotheses. (XLSX)

Table S3 Diversification models tested with corresponding lineage-through-time plots. (XLSX)

Acknowledgments

Computations have been performed on the supercomputer facilities of Université de la Réunion. We would like to thank Matthieu Bober, Guy Hoarau and late Maurice Jay for their taxonomic work on the collections of the Université de la Réunion.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BP JHB HM BF. Performed the experiments: BP JHB HM BF. Analyzed the data: BP JHB HM BF. Contributed reagents/materials/analysis tools: BP JHB HM BF. Wrote the paper: BP JHB HM BF.

References

- Barnes RSK (2010) Regional and latitudinal variation in the diversity, dominance and abundance of microphagous microgastropods and other benthos in intertidal beds of dwarf eelgrass, *Nanozostera* spp. *Mar Biodiv* 40: 95–106. doi:10.1007/s12526-010-0036-1.
- Roberts CM, McClean CJ, Veron JEN, Hawkins JP, Allen GR, et al. (2002) Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science* 295: 1280–1284. doi:10.1126/science.1067728.
- Mittermeier RA, Hawkins F, Rajaobelina S, Langrand O (2005) Wilderness Conservation in a Biodiversity Hotspot. *International Journal of Wilderness* 11: 42–45.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GA, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858. doi:10.1038/35002501.
- Lohman DJ, de Bruyn M, Page T, Rintelen von K, Hall R, et al. (2011) Biogeography of the Indo-Australian Archipelago. *Annu Rev Ecol Syst* 42: 205–226. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102710-145001.
- Hughes TP, Bellwood DR, Connolly SR (2002) Biodiversity hotspots, centres of endemism, and the conservation of coral reefs. *Ecology Letters* 5: 775–784.
- Hoeksema BW (2007) Delineation of the Indo-Malayan centre of maximum marine biodiversity: the Coral Triangle. *Biogeography, Time, and Place: Distributions, Barriers, and Islands*. Biogeography. 117–178.
- Hubert N, Meyer CP, Bruggemann JH, Guérin F, Komeno RJL, et al. (2012) Cryptic diversity in Indo-Pacific coral-reef fishes revealed by DNA-barcoding provides new support to the centre-of-overlap hypothesis. *PLoS ONE* 7: e28987. doi:10.1371/journal.pone.0028987.
- Briggs JC, Bowen BW (2013) Marine shelf habitat: biogeography and evolution. *Journal of Biogeography* 40: 1023–1035. doi:10.1111/jbi.12082.
- Paulay G, Meyer C (2002) Diversification in the tropical Pacific: comparisons between marine and terrestrial systems and the importance of founder speciation. *Integrative and Comparative Biology* 42: 922–934.
- DiBattista JD, Berumen ML, Gaiher MR, Rocha LA, Eble JA, et al. (2013) After continents divide: comparative phylogeography of reef fishes from the Red Sea and Indian Ocean. *Journal of Biogeography* 40: 1170–1181. doi:10.1111/jbi.12068.
- Santini F, Winterbottom R (2002) Historical biogeography of Indo-western Pacific coral reef biota: is the Indonesian region a centre of origin? *Journal of Biogeography* 29: 189–205.
- Benzie JAH, Williams ST (1997) Genetic Structure of Giant Clam (*Tridacna maxima*) Populations in the West Pacific is Not Consistent with Dispersal by Present-Day Ocean Currents. *Evolution* 51: 768–783.
- Alfaro ME, Santini F, Brock CD (2007) Do Reefs Drive Diversification in Marine Teleosts? Evidence from the Pufferfish and their Allies (Order Tetraodontiformes). *Evolution* 61: 2104–2126. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00182.x.
- Williams ST, Duda TF Jr (2008) Did Tectonic Activity Stimulate Oligomiocene Speciation in the Indo-West Pacific. *Evolution* 62: 1618–1634. doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00399.x.
- Frey MA (2010) The relative importance of geography and ecology in species diversification: evidence from a tropical marine intertidal snail (*Nerita*). *Journal of Biogeography* 37: 1515–1528. doi:10.1111/j.1365-2699.2010.02283.x.
- Cowman PF, Bellwood DR (2011) Coral reefs as drivers of cladogenesis: expanding coral reefs, cryptic extinction events, and the development of biodiversity hotspots. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 2543–2562. doi:10.1111/j.1420-9101.2011.02391.x.
- Cabezas P, Sanmartín I, Paulay G, Macpherson E, Machordom A (2012) Deep Under the Sea: Unraveling the Evolutionary History of the Deep-Sea Squat Lobster Paramunida (Decapoda, Munididae). *Evolution* 66: 1878–1896. doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01560.x.
- Cowman PF, Bellwood DR (2013) The historical biogeography of coral reef fishes: global patterns of origination and dispersal. *Journal of Biogeography* 40: 209–224. doi:10.1111/jbi.12003.
- Spalding MD, Fox HE, Allen GR, Davidson N, Ferdaña ZA, et al. (2007) Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* 57: 573–583. doi:10.1641/B570707.

21. Peng ZX, Mahoney JJ (1995) Drillhole lavas from the northwestern Deccan Traps, and the evolution of Reunion hotspot mantle. *Earth and Planetary Science Letters* 134: 169–185.
22. Bellard C, Leclerc C, Courchamp F (2013) Impact of sea level rise on the 10 insular biodiversity hotspots. *Global Ecology and Biogeography* 23: 203–212. doi:10.1111/geb.12093.
23. Masters JC, de Wit MJ, Asher RJ (2006) Reconciling the Origins of Africa, India and Madagascar with Vertebrate Dispersal Scenarios. *Folia Primatol* 77: 399–418. doi:10.1159/000095388.
24. Warren BH, Strasberg D, Bruggemann JH, Prys-Jones RP, Thébaud C (2010) Why does the biota of the Madagascar region have such a strong Asiatic flavour? *Cladistics* 26: 526–538. doi:10.1111/j.1096-0031.2009.00300.x.
25. Agnarsson I, Kuntner M (2012) The generation of a biodiversity hotspot: biogeography and phylogeography of the western Indian Ocean islands. *Current Topics in Phylogenetics and Phylogeography of Terrestrial and Aquatic Systems*. 33–82.
26. Yoder AD, Nowak MD (2006) Has Vicariance or Dispersal Been the Predominant Biogeographic Force in Madagascar? Only Time Will Tell. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37: 405–431. doi:10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110239.
27. Vences M, Wollenberg KC, Vieites DR, Lees DC (2009) Madagascar as a model region of species diversification. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 456–465. doi:10.1016/j.tree.2009.03.011.
28. Malay MC, Paulay G (2010) Peripatric Speciation Drives Diversification and Distributional Pattern of Reef Hermit Crabs (Decapoda: Diogenidae: *Calcinus*). *Evolution* 64: 634–662. doi:10.1111/j.1558-5646.2009.00848.x.
29. Hoareau TB, Boissin E, Paulay G (2013) The Southwestern Indian Ocean as a potential marine evolutionary hotspot: perspectives from comparative phylogeography of reef brittle-stars. *Journal of Biogeography* 40: 2167–2179.
30. Obura DO (2012) Evolutionary mechanisms and diversity in a western Indian Ocean center of diversity. *Proceedings of the 12th International Coral Reef Symposium*.
31. Wafar M, Venkataraman K, Ingole B, Ajmal Khan S, LokaBharathi P (2011) State of Knowledge of Coastal and Marine Biodiversity of Indian Ocean Countries. *PLoS ONE* 6: e14613. doi:10.1371/journal.pone.0014613.
32. Lubchenco J (1980) Algal Zonation in the New England Rocky Intertidal Community: An Experimental Analysis. *Ecology* 61: 333–344.
33. Williams ST, Reid DG (2004) Speciation and diversity on tropical rocky shores: a global phylogeny of snails of the genus *Echinolittorina*. *Evolution* 58: 2227–2251.
34. Kirkendale LA, Meyer CP (2004) Phylogeography of the *Patelloida profunda* group (Gastropoda: Littoridae): diversification in a dispersal-driven marine system. *Mol Ecol* 13: 2749–2762. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02284.x.
35. Waters JM, King TM, O'Loughlin PM, Spencer HG (2005) Phylogeographical disjunction in abundant high-dispersal littoral gastropods. *Mol Ecol* 14: 2789–2802. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02635.x.
36. Bohonak AJ (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review of Biology* 74: 21–45.
37. Paulay G (2006) Dispersal and divergence across the greatest ocean region: Do larvae matter? *Integrative and Comparative Biology* 46: 269–281. doi:10.1093/icb/ijc027.
38. Weersing K, Toonen RJ (2009) Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Mar Ecol Prog Ser* 393: 1–12. doi:10.3354/meps08287.
39. Bouchet P, Rocroi JP (2005) Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia* 47: 397.
40. Frey MA, Vermeij GJ (2008) Molecular phylogenies and historical biogeography of a circumtropical group of gastropods (Genus: *Nerita*): Implications for regional diversity patterns in the marine tropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 1067–1086. doi:10.1016/j.ympev.2008.05.009.
41. Castro LR, Colgan DJ (2010) The phylogenetic position of *Neritimorpha* based on the mitochondrial genome of *Nerita melanotragus* (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 918–923. doi:10.1016/j.ympev.2010.08.030.
42. Underwood AJ (1975) Comparative studies on the biology of *Nerita atramentosa* Reeve, *Bembicium nanum* (Lamarck) and *Cellana tramoserica* (Sowerby) (gastropoda: Prosobranchia) in S.E. Australia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 18: 153–172.
43. Lewis JB (1960) The fauna of rocky shores of Barbados, West Indies. *Can J Zool* 38: 391–435. doi:10.1139/z60-043.
44. Antonelli A, Sanmartín I (2011) Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60: 403–414.
45. Condamine F, Silva-Brandão K (2012) Biogeographic and diversification patterns of Neotropical Troidini butterflies (Papilionidae) support a museum model of diversity dynamics for Amazonia. *BMC Evol Biol* 12. doi:10.1186/1471-2148-12-82.
46. Drivas J, Jay M (1988) Coquillages de La Réunion et de l'île Maurice. *Times Editions/Les Editions de Pacifique*. 159 pp.
47. Jay M, Drivas J, Hoareau G, Martin J-C (2014) Mollusques de l'île de la Réunion. <http://vieocean.free.fr/mollusques>.
48. Folmer O, Black M, Hoch W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Marine Biol Biotechnol* 3: 294–299.
49. Palumbi SR (1996) Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. *Molecular Systematics*. 205–247.
50. Posada D, Buckley TR (2004) Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. *Systematic Biology* 53: 793–808. doi:10.1080/10635150490522304.
51. Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
52. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, et al. (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307–321. doi:10.1093/sysbio/syq010.
53. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, et al. (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61: 539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029.
54. Aktipis SW, Giribet G (2010) A phylogeny of Vetigastropoda and other “archaeogastropods”: re-organizing old gastropod clades. *Invertebrate Biology* 129: 220–240. doi:10.1111/j.1744-7410.2010.00198.x.
55. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973. doi:10.1093/molbev/mss075.
56. Nee S (2006) Birth-Death Models in Macroevolution. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37: 1–17. doi:10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110035.
57. Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer 1.5. University of Edinburgh, Edinburgh, UK Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
58. Rambaut A, Drummond AJ (2007) TreeAnnotator v1.7.5. University of Edinburgh, Edinburgh, UK Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/treeannotator>.
59. Rambaut A (2012) FigTree v1.4. University of Edinburgh, Edinburgh, UK Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
60. Aldous DJ (2001) Stochastic models and descriptive statistics for phylogenetic trees, from Yule to today. *Statistical Science*: 23–34.
61. Bortolussi N, Durand E, Blum M, Francois O (2006) apTreeshape: statistical analysis of phylogenetic tree shape. *Bioinformatics* 22: 363–364. doi:10.1093/bioinformatics/bti798.
62. Team RC (2013) R: A language and environment for statistical computing. Available: <http://www.R-project.org>.
63. Pybus OG, Harvey PH (2000) Testing macro-evolutionary models using incomplete molecular phylogenies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267: 2267–2272. doi:10.1098/rspb.2000.1278.
64. Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289–290. doi:10.1093/bioinformatics/btg412.
65. Harmon LJ, Weir JT, Brock CD, Glor RE, Challenger W (2007) GEIGER: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics* 24: 129–131. doi:10.1093/bioinformatics/btm538.
66. Nee S, Mooers AO, Harvey PH (1992) Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies. *PNAS USA* 89: 8322–8326.
67. Rabosky DL (2006) Likelihood methods for detecting temporal shifts in diversification rates. *Evolution* 60: 1152–1164.
68. Rabosky DL (2006) LASER: a maximum likelihood toolkit for detecting temporal shifts in diversification rates from molecular phylogenies. *Evolutionary bioinformatics online*: 247–250.
69. Rabosky DL, Lovette IJ (2009) Problems detecting density-dependent diversification on phylogenies: reply to Bokma. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276: 995–997.
70. Stadler T (2011) Mammalian phylogeny reveals recent diversification rate shifts. *PNAS* 108: 6187–6192. doi:10.1073/pnas.1016876108.
71. Meredith RW, Janecka JE, Gates J, Ryder OA, Fisher CA, et al. (2011) Impacts of the Cretaceous Terrestrial Revolution and KPg extinction on mammal diversification. *Science* 334: 521–524. doi:10.1126/science.1211028.
72. Nagalingum NS, Marshall CR, Quental TB, Rai HS, Little DP, et al. (2011) Recent synchronous radiation of a living fossil. *Science* 334: 796–799. doi:10.1126/science.1209926.
73. Briggs JC (1999) Coincident biogeographic patterns: Indo-west Pacific ocean. *Evolution*: 326–335.
74. Palumbi SR (1994) Genetic Divergence, Reproductive Isolation, and Marine Speciation. *Annu Rev Ecol Syst* 25: 547–572.
75. Krug PJ (2011) Patterns of Speciation in Marine Gastropods: A Review of the Phylogenetic Evidence for Localized Radiations in the Sea. *American Malacological Bulletin* 29: 169–186. doi:10.4003/006.029.0210.
76. Woods AJC, Saul LR (1986) New Neritidae from southwestern north America. *Journal of Paleontology*: 636–655.
77. Potter PE, Szatmari P (2009) Global Miocene tectonics and the modern world. *Earth-Science Reviews* 96: 279–295.
78. Kennett JP, Houtz RE, Andrews AR, Gostin VA, et al. (1975) 44. Cenozoic Paleogeography in the Southwest Pacific Ocean, Antarctic Glaciation, and the Development of the Circum-Antarctic Current. *Deep Sea Drilling Project Reports and Publications* 29: 1155–1169.
79. Lawver LA, Gahagan LM (2003) Evolution of Cenozoic seaways in the circum-Antarctic region. *Palaeogeography* 198 : 11–37. doi:10.1016/S0031-0182(03)00392-4.
80. Huber M, Brinkhuis H, Stöckley CE, Döös K, Sluijs A, et al. (2004) Eocene circulation of the Southern Ocean: Was Antarctica kept warm by subtropical waters? *Paleogeography* 19: 12. doi:10.1029/2004PA001014.

81. Barker PF, Thomas E (2004) Origin, signature and palaeoclimatic influence of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth-Science Reviews* 66: 143–162. doi:10.1016/j.earscirev.2003.10.003.
82. Haq BU, Hardenbol J, Vail PR (1987) Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science* 235: 1156–1167.
83. Wilford GE, Brown PJ (1994) Maps of late Mesozoic-Cenozoic Gondwana break-up: some palaeogeographical implications. *History of the Australian vegetation Cretaceous to recent*. Cambridge University Press. 5–13.
84. Ivany LC, Patterson WP, Lohmann KC (2000) Cooler winters as a possible cause of mass extinctions at the Eocene/Oligocene boundary. *Nature* 407: 887–890.
85. Meyer CP, Geller JB, Paulay G (2005) Fine scale endemism on coral reefs: archipelagic differentiation in turbinid gastropods. *Evolution* 59: 113–125.
86. Claremont M, Williams ST, Barraclough TG, Reid DG (2011) The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. *Journal of Biogeography* 38: 1016–1032. doi:10.1111/j.1365-2699.2011.02482.x.
87. Duncan RA, Hargraves RB (1990) $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$ geochronology of basement rocks from the Mascarene Plateau, the Chagos Bank, and the Maldives Ridge. *Proceedings of the Ocean Drilling Program* 115: 43–52.
88. Duncan RA, Storey M (1992) The life cycle of Indian Ocean hotspots. *Synthesis of Results from Scientific Drilling in the Indian Ocean* 70: 91–103.
89. Ridgway T, Riginos C, Davis J, Hoegh-Guldberg O (2008) Genetic connectivity patterns of *Pocillopora verrucosa* in southern African Marine Protected Areas. *Mar Ecol Prog Ser* 354: 161–168. doi:10.3354/meps07245.
90. Hubert N, Paradis E, Bruggemann H, Planes S (2011) Community assembly and diversification in Indo-Pacific coral reef fishes. *Ecology and Evolution* 1: 229–277. doi:10.1002/ece3.19.
91. Pinceel J, Jordaens K, van Houtte N, De Winter AJ, Backeljau T (2004) Molecular and morphological data reveal cryptic taxonomic diversity in the terrestrial slug complex *Arion subfuscus/fuscus* (Mollusca, Pulmonata, Arionidae) in continental north-west Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 83: 23–38.

Annexe 4

Nombre d'individus par morpho-espèces utilisés lors de cette thèse. Le site d'échantillonnage est indiqué, ainsi que les numéros d'accessions GenBank. Les séquences publiées lors de cette thèse sont identifiées en gras. Le deuxième chapitre de cette thèse utilise tous les individus dont les trois marqueurs sont séquencés, ainsi que toutes les séquences du 16S disponibles sur GenBank (numéros d'accessions ne commençant pas par KM). Le troisième chapitre utilise les séquences du 16S de tous les individus du tableau, dont certaines n'ont pas encore été publiées (individus où seul le numéro d'échantillon est indiqué).

Genre	Morpho-espèce	Site d'échant.	Num. d'accession 16S	Num. d'accession calmoduline	Num. d'accession ITS	Code pour la Figure 3 du chapitre 2	Num d'échant.
<i>Aglaophenia</i>	<i>cupressina</i>	Europa Island	KM587399	KM587258	KM587117	1	EUR11-019
<i>Aglaophenia</i>	<i>cupressina</i>	Europa Island	KM587400	KM587259	KM587118	2	EUR11-115
<i>Aglaophenia</i>	<i>cupressina</i>	Europa Island	KM587401	KM587260	KM587119	3	EUR11-135
<i>Aglaophenia</i>	<i>cupressina</i>	Geyser bank	KM587403	KM587263	KM587125	4	GEY08-026
<i>Aglaophenia</i>	<i>cupressina</i>	Geyser bank	KM587404	KM587262	KM587121	5	GEY08-007
<i>Aglaophenia</i>	<i>cupressina</i>	Geyser bank	KM587405	KM587264	KM587122	6	GEY08-076
<i>Aglaophenia</i>	<i>cupressina</i>	Glorieuse Island	KM587406	KM587265	KM587123	7	GLO08-001
<i>Aglaophenia</i>	<i>cupressina</i>	Mayotte	KM587402	KM587261	KM587120	8	MAY09-095
<i>Aglaophenia</i>	<i>cupressina</i>	Mayotte	KM587407	KM587266	KM587124	9	MAY09-635
<i>Aglaophenia</i>	<i>kirchenpaueri</i>	Lundy Island	AM887982				
<i>Aglaophenia</i>	<i>kirchenpaueri</i>	Plymouth	AM887983				
<i>Aglaophenia</i>	<i>kirchenpaueri</i>	Gorringe seamount	JN560124				
<i>Aglaophenia</i>	<i>kirchenpaueri</i>	Gorringe seamount	JN560125				
<i>Aglaophenia</i>	<i>kirchenpaueri</i>	Gorringe seamount	JN560126				
<i>Aglaophenia</i>	<i>kirchenpaueri</i>	Gorringe seamount	JN560127				
<i>Aglaophenia</i>	<i>kirchenpaueri</i>	Berlenga Island	JN560128				
<i>Aglaophenia</i>	<i>latecarinata</i>	Brazil	DQ855936				
<i>Aglaophenia</i>	<i>lophocarpa</i>	Gulf of Cadiz	AM887984				
<i>Aglaophenia</i>	<i>lophocarpa</i>	Gulf of Cadiz	AM887985				
<i>Aglaophenia</i>	<i>lophocarpa</i>	Gulf of Cadiz	AM887986				
<i>Aglaophenia</i>	<i>lophocarpa</i>	Gulf of Cadiz	AM887987				
<i>Aglaophenia</i>	<i>lophocarpa</i>	Gulf of Cadiz	AM887988				
<i>Aglaophenia</i>	<i>lophocarpa</i>	Azores	JN560112				
<i>Aglaophenia</i>	<i>lophocarpa</i>	Gulf of Cadiz	JN560113				
<i>Aglaophenia</i>	<i>lophocarpa</i>	Gulf of Cadiz	JN560114				
<i>Aglaophenia</i>	<i>lophocarpa</i>	Alboran sea	JN560116				
<i>Aglaophenia</i>	<i>octodonta</i>	Portugal	AM887989				
<i>Aglaophenia</i>	<i>octodonta</i>	France	DQ855915				
<i>Aglaophenia</i>	<i>parvula</i>	South Africa	DQ855914				
<i>Aglaophenia</i>	<i>parvula</i>	Portugal	JN560097				
<i>Aglaophenia</i>	<i>parvula</i>	Portugal	JN560098				
<i>Aglaophenia</i>	<i>parvula</i>	Portugal	JN560099				
<i>Aglaophenia</i>	<i>parvula</i>	Portugal	JN560100				
<i>Aglaophenia</i>	<i>picardi</i>	Mallorca	AY787891				
<i>Aglaophenia</i>	<i>picardi</i>	Azores	JN560105				
<i>Aglaophenia</i>	<i>picardi</i>	Azores	JN560106				
<i>Aglaophenia</i>	<i>picardi</i>	Madeira	JN560107				
<i>Aglaophenia</i>	<i>picardi</i>	Azores	JN560108				
<i>Aglaophenia</i>	<i>picardi</i>	Azores	JN560109				
<i>Aglaophenia</i>	<i>picardi</i>	Azores	JN560110				
<i>Aglaophenia</i>	<i>picardi</i>	Azores	JN560111				
<i>Aglaophenia</i>	<i>phuma</i>	France	DQ855916				

<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Azores	JN560129					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Azores	JN560130					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Azores	JN560131					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Azores	JN560132					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Azores	JN560133					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Azores	JN560134					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Madeira	JN560135					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Portugal	JN560136					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Portugal	JN560137					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Portugal	JN560138					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Portugal	JN560139					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Plymouth	JN560140					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Portugal	JN560141					
<i>Aglaophenia</i>	<i>pluma</i>	Portugal	JN560142					
<i>Aglaophenia</i>	<i>postdentata</i>	Mayotte	KM587410	KM587269	KM587127	10		MAY09-033
<i>Aglaophenia</i>	<i>postdentata</i>	Reunion Island	KM587408	KM587267	KM587126	11		BIO11-078
<i>Aglaophenia</i>	<i>postdentata</i>	Reunion Island	KM587409	KM587268	KM587128	12		BIO11-137
<i>Aglaophenia</i>	<i>sinuosa</i>	New Caledonia	KM587411	KM587270	KM587129	13		NC-LB-032
<i>Aglaophenia</i>	<i>sinuosa</i>	New Caledonia	KM587412	KM587273	KM587132	14		NC-LB-206
<i>Aglaophenia</i>	<i>sinuosa</i>	New Caledonia	KM587413	KM587272	KM587131	15		NC-LB-110
<i>Aglaophenia</i>	<i>sinuosa</i>	New Caledonia	KM587414	KM587271	KM587130	16		NC-LB-068
<i>Aglaophenia</i>	sp. 1	Azores	JN560094					
<i>Aglaophenia</i>	sp. 1	Azores	JN560095					
<i>Aglaophenia</i>	sp. 1	Azores	JN560096					
<i>Aglaophenia</i>	sp. 2	Madeira	JN560101					
<i>Aglaophenia</i>	sp. 2	Madeira	JN560102					
<i>Aglaophenia</i>	sp. 2	Madeira	JN560103					
<i>Aglaophenia</i>	sp. 2	Madeira	JN560104					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubiformis</i>	Lundy Island	AM887990					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubiformis</i>	France	AY787914					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubiformis</i>	France	DQ855917					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubulifera</i>	Gulf of Cadiz	AM887991					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubulifera</i>	Lundy Island	AM887992					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubulifera</i>	Portugal	JN560117					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubulifera</i>	Portugal	JN560118					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubulifera</i>	Portugal	JN560119					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubulifera</i>	Azores	JN560120					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubulifera</i>	Azores	JN560121					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubulifera</i>	Azores	JN560122					
<i>Aglaophenia</i>	<i>tubulifera</i>	Azores	JN560123					
<i>Aglaopheniidae</i>	sp.	Portugal	JN560079					
<i>Cladocarpus</i>	<i>cartieri</i>	Azores	JN560085					
<i>Cladocarpus</i>	<i>cartieri</i>	Azores	JN560086					
<i>Cladocarpus</i>	<i>integer</i>	Norway	FJ550512					
<i>Cladocarpus</i>	<i>paraformosus</i>	Greenland	AM887993					
<i>Gymnangium</i>	<i>allmani</i>	New Caledonia	KM587415	KM587274	KM587133	17		NC-LB-048

<i>Gymnangium</i>	<i>allmani</i>	Europa Island	KM587416	KM587275	KM587134	18	EUR11-180
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Europa Island	KM587432	KM587291	KM587203	19	EUR09-057
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Europa Island	KM587422	KM587277	KM587201	20	EUR09-058
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Europa Island	KM587424	KM587284	KM587202	21	EUR11-084
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Europa Island	KM587423	KM587276	KM587200	22	EUR11-240
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Geyser bank	KM587426	KM587285	KM587206	23	GEY08-009
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Geyser bank	KM587427	KM587286	KM587208	24	GEY08-013
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Geyser bank	KM587429	KM587288	KM587207	25	GEY08-022
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Geyser bank	KM587428	KM587287	KM587209	26	GEY08-095
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Juan de Nova Island	KM587433	KM587292	KM587213	27	JUA09-030
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Juan de Nova Island	KM587434	KM587293	KM587204	28	JUA09-062
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Juan de Nova Island	KM587435	KM587294	KM587205	29	JUA09-063
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Juan de Nova Island	KM587436	KM587295	KM587214	30	JUA09-064
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Juan de Nova Island	KM587437	KM587296	KM587215	31	JUA09-065
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Mayotte	KM587430	KM587289	KM587210	32	MAY09-038
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Mayotte	KM587421	KM587283	KM587198	33	MAY09-090
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Mayotte	KM587431	KM587290	KM587211	34	MAY09-148
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Reunion Island	KM587425	KM587282	KM587197	35	BIO11-374
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Moorea	KM587418	KM587279	KM587193	36	HY-TH-09
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Moorea	KM587419	KM587280	KM587194	37	HY-TH-10
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Moorea	KM587420	KM587281	KM587195	38	HY-TH-17
<i>Gymnangium</i>	<i>eximium</i>	Moorea	KM587417	KM587278	KM587192	39	HY-TH-18
<i>Gymnangium</i>	<i>gracilicaule</i>	Europa Island	KM587439	KM587297	KM587216	40	EUR09-052
<i>Gymnangium</i>	<i>gracilicaule</i>	Europa Island	KM587440	KM587299	KM587217	41	EUR09-106
<i>Gymnangium</i>	<i>gracilicaule</i>	Europa Island	KM587441	KM587300	KM587212	42	EUR09-107
<i>Gymnangium</i>	<i>gracilicaule</i>	Europa Island	KM587442	KM587301	KM587218	43	EUR11-089
<i>Gymnangium</i>	<i>gracilicaule</i>	Glorieuses Islands	KM587445	KM587304	KM587199	44	GLO08-025
<i>Gymnangium</i>	<i>gracilicaule</i>	Juan de Nova Island	KM587443	KM587302	KM587219	45	JUA09-011
<i>Gymnangium</i>	<i>gracilicaule</i>	Juan de Nova Island	KM587444	KM587303	KM587220	46	JUA09-017
<i>Gymnangium</i>	<i>gracilicaule</i>	Reunion Island	KM587438	KM587298	KM587196	47	BIO11-153
<i>Gymnangium</i>	<i>gracilicaule</i>	Madagascar	DQ855934				
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Europa Island	KM587452	KM587311	KM587137	48	EUR11-090
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Europa Island	KM587456	KM587315	KM587146	49	EUR11-130
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Europa Island	KM587453	KM587312	KM587142	50	EUR11-158
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Europa Island	KM587458	KM587317	KM587147	51	EUR11-231
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Geyser bank	KM587459	KM587318	KM587148	52	GEY08-085
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Geyser bank	KM587455	KM587314	KM587144	53	GEY08-113
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Mayotte	KM587446	KM587305	KM587141	54	MAY09-010
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Mayotte	KM587454	KM587313	KM587143	55	MAY09-104
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Mayotte	KM587451	KM587310	KM587136	56	MAY09-147
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Mayotte	KM587450	KM587309	KM587135	57	MAY09-241
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	New Caledonia	KM587449	KM587308	KM587140	58	NC-LB-005
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	New Caledonia	KM587448	KM587307	KM587139	59	NC-LB-008

<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	New Caledonia	KM587447	KM587306	KM587138	60	NC-LB-187
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Reunion Island	KM587457	KM587316	KM587145	61	BIO11-325
<i>Gymnangium</i>	<i>hians</i>	Thailand	AY787922				
<i>Gymnangium</i>	<i>insigne</i>	Moorea	KM587460	KM587319	KM587149	62	HY-TH-12
<i>Gymnangium</i>	<i>insigne</i>	Moorea	KM587461	KM587320	KM587150	63	HY-TH-63
<i>Gymnangium</i>	<i>montagui</i>	Lundy Island	AM888313				
<i>Gymnangium</i>	<i>montagui</i>	Portugal	JN560075				
<i>Gymnangium</i>	<i>montagui</i>	Portugal	JN560076				
<i>Gymnangium</i>	<i>montagui</i>	Portugal	JN560077				
<i>Gymnangium</i>	<i>montagui</i>	Portugal	JN560078				
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Europa Island	KM587462	KM587321	KM587151	64	EUR09-017
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Europa Island	KM587471	KM587332	KM587161	65	EUR09-080
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Europa Island	KM587463	KM587322	KM587152	66	EUR09-119
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Europa Island	KM587473	KM587331	KM587160	67	EUR11-028
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Europa Island	KM587464	KM587323	KM587154	68	EUR11-074
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Europa Island	KM587472	KM587330	KM587162	69	EUR11-164
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Europa Island	KM587465	KM587324	KM587153	70	EUR11-168
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Geyser bank	KM587475	KM587333	KM587170	71	GEY08-048
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Geyser bank	KM587466	KM587325	KM587155	72	GEY08-084
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Geyser bank	KM587476	KM587334	KM587168	73	GEY08-088
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Glorieuse Island	KM587467	KM587326	KM587156	74	GLO08-010
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Mayotte	KM587477	KM587335	KM587169	75	MAY09-007
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	KM587468	KM587327	KM587157	76	NC-LB-021
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	KM587469	KM587328	KM587158	77	NC-LB-022
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	KM587470	KM587329	KM587159	78	NC-LB-276
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	KM587480	KM587339	KM587166	79	CHS14
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	KM587481	KM587340	KM587167	80	CHS15
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	KM587474	KM587337	KM587164	81	MAP025
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	KM587478	KM587336	KM587163	82	MAP024
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	KM587479	KM587338	KM587165	83	MAP026
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU01-006
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU01-008
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU01-012
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU01-015
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU01-043
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU01-047
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU02-002
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU02-010
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU02-022
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU02-027
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU02-036
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island					LB-JU02-048

Island			
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island	LB-JU02-059
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island	LB-JU02-060
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island	LB-JU03-005
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island	LB-JU03-007
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island	LB-JU03-015
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island	LB-JU03-018
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island	LB-JU03-048
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island	LB-JU04-009
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island	LB-JU04-012
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Juan de Nova Island	LB-JU04-13
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Madagascar	LB-MD1-001
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB_NC02-008
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB_NC12-019
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB_NC12-026
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB_NC12-030
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB_NC12-031
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB_NC12-052
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB-NC02-045
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB-NC03-005
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB-NC04-015
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB-NC04-028
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB-NC11-037
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB-NC12-046
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	New Caledonia	LB-NC18-007
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	LB-RUN1-081
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	LB-RUN2-045
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	LB-RUN2-049
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	LB-RUN2-051
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	LB-RUN5-054
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	LB-RUN6-074
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	LB-RUN7-015
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	LB-RUN7-017
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	LB-RUN7-038
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Reunion Island	LB-RUN2-050
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Rodrigues	LB-ROD2-005
<i>Lytocarpia</i>	<i>brevirostris</i>	Rodrigues	LB-ROD2-049
<i>Lytocarpia</i>	<i>myriophyllum</i>	Alboran sea	JN560089
<i>Lytocarpia</i>	<i>myriophyllum</i>	Gulf of Cadiz	JN560090
<i>Lytocarpia</i>	<i>myriophyllum</i>	Madeira	JN560091
<i>Lytocarpia</i>	<i>myriophyllum</i>	Azores	JN560092
<i>Lytocarpia</i>	<i>myriophyllum</i>	Azores	JN560093

<i>Lytocarpia</i>	<i>nigra</i>	Europa Island	KM587485	KM587344	KM587230	84	EUR11-125
<i>Lytocarpia</i>	<i>nigra</i>	Europa Island	KM587486	KM587345	KM587231	85	EUR11-126
<i>Lytocarpia</i>	<i>nigra</i>	Europa Island	KM587487	KM587346	KM587232	86	EUR11-230
<i>Lytocarpia</i>	<i>nigra</i>	Juan de Nova Island	KM587482	KM587341	KM587227	87	JUA09-078
<i>Lytocarpia</i>	<i>nigra</i>	Juan de Nova Island	KM587483	KM587342	KM587228	88	JUA09-079
<i>Lytocarpia</i>	<i>nigra</i>	Juan de Nova Island	KM587484	KM587343	KM587229	89	JUA09-080
<i>Lytocarpia</i>	<i>nigra</i>	New Caledonia	KM587488	KM587347	KM587233	90	NC-LB-284
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Europa Island	KM587503	KM587362	KM587186	91	EUR11-027
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Europa Island	KM587504	KM587363	KM587187	92	EUR11-067
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Europa Island	KM587502	KM587361	KM587185	93	EUR11-097
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Geyser bank	KM587505	KM587364	KM587188	94	GEY08-046
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Geyser bank	KM587508	KM587367	KM587191	95	GEY08-049
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Geyser bank	KM587501	KM587360	KM587184	96	GEY08-105
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Juan de Nova Island	KM587506	KM587365	KM587189	97	JUA09-119
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Mayotte	KM587498	KM587357	KM587181	98	MAY07-022
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Mayotte	KM587499	KM587358	KM587182	99	MAY09-050
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Mayotte	KM587507	KM587366	KM587190	100	MAY09-080
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Mayotte	KM587500	KM587359	KM587183	101	MAY09-146
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	New Caledonia	KM587489	KM587348	KM587172	102	NC-LB-001
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	New Caledonia	KM587490	KM587349	KM587173	103	NC-LB-004
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	New Caledonia	KM587491	KM587350	KM587174	104	NC-LB-006
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Moorea	KM587494	KM587353	KM587177	105	HY-TH-02
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Moorea	KM587492	KM587351	KM587175	106	HY-TH-15
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Moorea	KM587493	KM587352	KM587176	107	HY-TH-27
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Moorea	KM587496	KM587355	KM587178	108	HY-TH-33
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Moorea	KM587497	KM587356	KM587180	109	HY-TH-44
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Moorea	KM587495	KM587354	KM587179	110	HY-TH-59
<i>Lytocarpia</i>	<i>phyteuma</i>	Thailand	AY787921				
<i>Lytocarpia</i>	sp.	Madagascar	FJ550505				
<i>Lytocarpia</i>	sp. 1	Mayotte	KM587509	KM587368	KM587171	111	MAY07-189
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Europa Island	KM587521	KM587380	KM587239	118	EUR09-001
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Europa Island	KM587522	KM587381	KM587240	119	EUR09-002
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Europa Island	KM587523	KM587382	KM587241	120	EUR09-003
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Europa Island	KM587524	KM587383	KM587242	121	EUR11-053
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Europa Island	KM587525	KM587384	KM587243	122	EUR11-057
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Europa Island	KM587516	KM587375	KM587234	123	EUR11-226
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Juan de Nova Island	KM587517	KM587376	KM587238	124	JUA09-107
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Moorea	KM587518	KM587377	KM587235	125	HY-TH-40
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Moorea	KM587519	KM587378	KM587236	126	HY-TH-41
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Moorea	KM587520	KM587379	KM587237	127	HY-TH-46
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Brazil	DQ855937				
<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Madeira	JN560087				

<i>Macrorhynchia</i>	<i>philippina</i>	Madeira	JN560088				
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>bicolor</i> »	New Caledonia	KM587527	KM587386	KM587245	135	NC-MP-001
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>bicolor</i> »	New Caledonia	KM587526	KM587385	KM587244	136	NC-MP008
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>bicolor</i> »	New Caledonia	KM587528	KM587387	KM587246	137	NC-MP076
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>bicolor</i> »	Reunion Island					MP-RUN8-044
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>bicolor</i> »	Madagascar					MP-MD01-001
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>bicolor</i> »	Madagascar					MP-MD01-023
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>bicolor</i> »	Madagascar					MP-MD01-041
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>gracile</i> »	Europa Island	KM587533	KM587392	KM587250	128	EUR09-012
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>gracile</i> »	Europa Island	KM587534	KM587393	KM587251	129	EUR09-013
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>gracile</i> »	Europa Island	KM587535	KM587394	KM587252	130	EUR09-014
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>gracile</i> »	Juan de Nova Island	KM587530	KM587389	KM587247	131	JUA09-111
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>gracile</i> »	Mayotte	KM587532	KM587391	KM587249	132	MAY07-120
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>gracile</i> »	Mayotte	KM587536	KM587395	KM587253	133	MAY07-278
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>gracile</i> »	Mayotte	KM587529	KM587388	KM587255	134	MAY07-172
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>gracile</i> »	Reunion Island	KM587531	KM587390	KM587248	138	BIO11-004
<i>Macrorhynchia</i>	<i>phoenicea</i> « <i>gracile</i> »	Madagascar	DQ855935				
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sibogae</i>	Mayotte	KM587537	KM587396	KM587254	139	MAY07-023
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sibogae</i>	Madagascar	FJ550500				
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sp. 1</i>	Mayotte	KM587538	KM587397	KM587256	141	MAY09-076
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sp. nov.</i>	Europa Island	KM587511	KM587370	KM587224	112	EUR11-175
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sp. nov.</i>	Europa Island	KM587512	KM587371	KM587222	113	EUR11-228
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sp. nov.</i>	Geyser bank	KM587514	KM587373	KM587225	114	GEY08-086
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sp. nov.</i>	Geyser bank	KM587515	KM587374	KM587226	115	GEY08-094
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sp. nov.</i>	Glorieuse Island	KM587513	KM587372	KM587223	116	GLO08-009
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sp. nov.</i>	Mayotte	KM587510	KM587369	KM587221	117	MAY07-388
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sp. nov.</i>	Rodrigues					MP-ROD2-104
<i>Macrorhynchia</i>	<i>sp. nov.</i>	Rodrigues					MP-ROD2-105
<i>Macrorhynchia</i>	<i>spectabilis</i>	Glorieuse Island	KM587539	KM587398	KM587257	140	GLO08-022
<i>Streptocaulus</i>	<i>dollfusi</i>	Gulf of Cadiz	JN560081				
<i>Streptocaulus</i>	<i>dollfusi</i>	Alboran sea	JN560082				
<i>Streptocaulus</i>	<i>dollfusi</i>	Gulf of Cadiz	JN560083				
<i>Streptocaulus</i>	<i>dollfusi</i>	Alboran sea	JN560084				
<i>Streptocaulus</i>	<i>multiseptatus</i>	Gulf of Cadiz	JN560080				

Annexe 5

Arbres phylogénétiques des morpho-espèces tropicales échantillonnées lors de cette thèse, reconstruits à partir des séquences d'un fragment du marqueur mitochondrial 16S, du premier exon de la calmoduline et de l'ITS. La figure 1 représente la phylogénie reconstruite à partir de la séquence du 16S, la figure celle reconstruite à partir de la séquence du premier exon de la calmoduline et la figure correspond à celle reconstruit à partir de la séquence de l'ITS (comprend un fragment du 18S, l'ITS1, le 5.8S, l'ITS2 et un fragment du 28S).

Figure 1. Molecular phylogeny of 18 tropical Aglaopheniidae species generated by PhyML from 16S sequences. Black thick vertical lines indicate positions of genera. Support values of nodes are indicated: black dots indicate PP superior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood superior to 75%; grey dots indicate PP superior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood inferior to 75%; white dots indicate PP inferior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood superior to 75%. Nodes with PP inferior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood inferior to 75% are not indicated. Distances are expressed in number of substitution per site. Uppercase letters and colour codes delineate lineages referred to Table 1 and congruent with Fig. 2 (chapitre 2).

Figure 2. Molecular phylogeny of 18 tropical Aglaopheniidae species generated by PhyML from CAM sequences. Black thick vertical lines indicate positions of genera. Support values of nodes are indicated: black dots indicate PP superior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood superior to 75%; grey dots indicate PP superior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood inferior to 75%; white dots indicate PP inferior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood superior to 75%. Nodes with PP inferior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood inferior to 75% are not indicated. Distances are expressed in number of substitution per site. Uppercase letters and colour codes delineate lineages referred to Table 1 and congruent with Fig. 2 (chapitre 2).

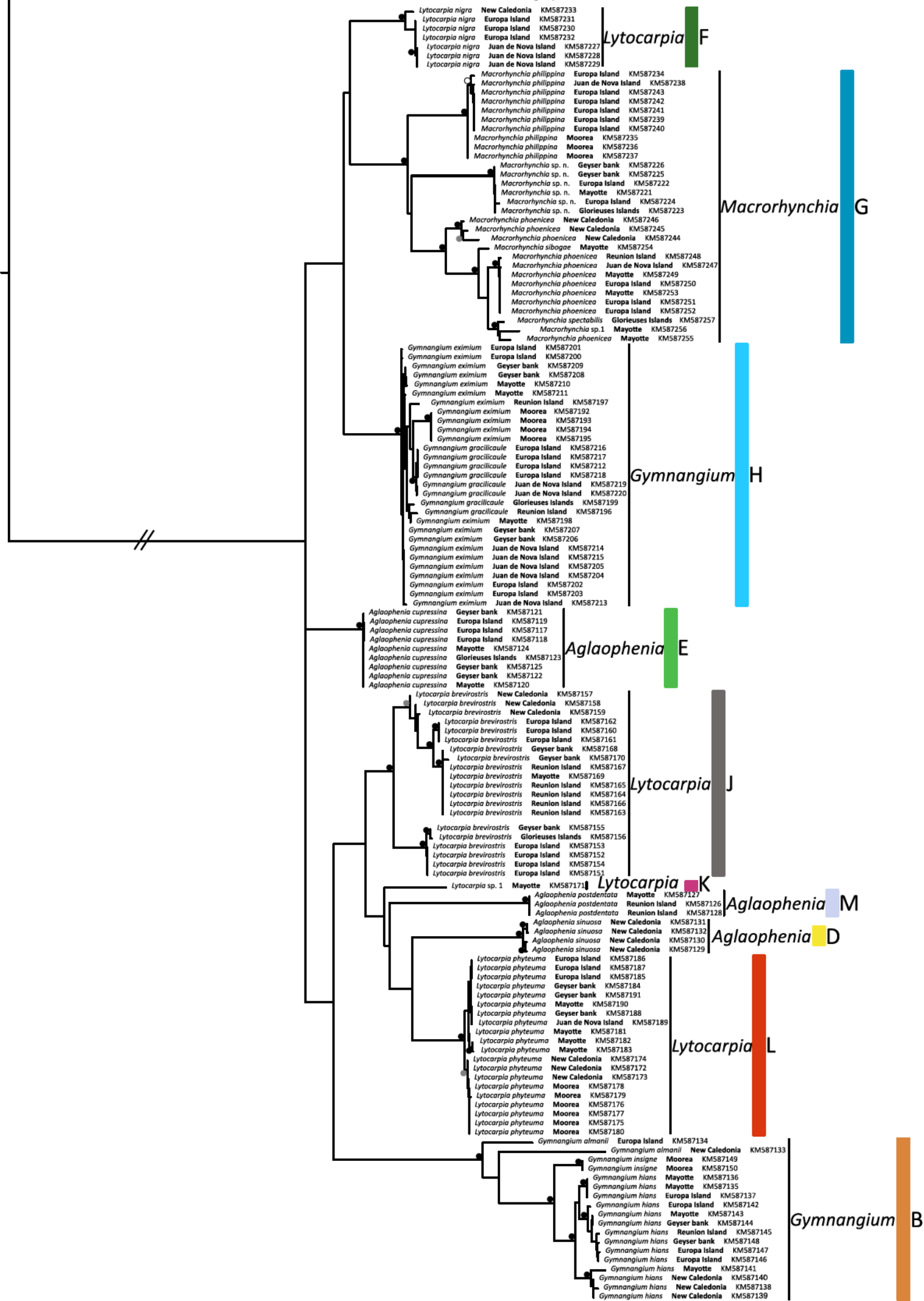


Figure 3. Molecular phylogeny of 18 tropical Aglaopheniidae species generated by PhyML from ITS sequences. Black thick vertical lines indicate positions of genera. Support values of nodes are indicated: black dots indicate PP superior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood superior to 75%; grey dots indicate PP superior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood inferior to 75%; white dots indicate PP inferior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood superior to 75%. Nodes with PP inferior to 0.95 and bootstrap values of maximum likelihood inferior to 75% are not indicated. Distances are expressed in number of substitution per site. Uppercase letters and colour codes delineate lineages referred to Table 1 and congruent with Fig. 2 (chapitre 2).

Connectivité et endémisme d'espèces marines dans le Sud-Ouest de l'océan Indien : le cas des Aglaopheniidae (Marktanner-Turneretscher, 1890)

La conservation et la gestion sur le long terme de la biodiversité nécessitent une connaissance de la répartition des taxons, mais également une estimation précise de leur diversité spécifique ainsi que des processus de spéciation ayant permis leur formation. Cependant, la mesure de la richesse phylétique peut être biaisée par l'utilisation de caractères taxinomiques ne permettant pas de délimiter les espèces de manière appropriée.

Ce travail de thèse propose d'explorer la diversité phylétique à plusieurs niveaux taxinomiques (générique, spécifique et intra-spécifique) des Aglaopheniidae, une famille d'hydrozoaires, notamment présente dans le Sud-Ouest de l'océan Indien. Dans un premier temps, en utilisant des phylogénies basées sur plusieurs marqueurs (mitochondriaux et nucléaires), ce travail démontre que la diversité phylétique de cette famille est, au minimum, sous-estimée de moitié: tous les genres de la famille sont polyphylétiques ou présentent un statut monophylétique restant à confirmer. Dans un deuxième temps, l'utilisation de méthodes de délimitation d'espèces basées sur des données moléculaires met en évidence la diversité cryptique très élevée des morpho-espèces étudiées, révélant l'intérêt potentiel des protocoles de taxinomie intégrative chez les organismes morphologiquement simples. Enfin, l'étude de génétique des populations d'une espèce incubatrice d'Aglaopheniidae révèle l'importance de la structuration des populations et de l'isolement par la distance chez cette espèce à plusieurs échelles géographiques (de quelques kilomètres à plusieurs milliers), impliquant une potentielle diversité cryptique extrêmement élevée chez cette famille.

L'ensemble des connaissances acquises lors de ce travail de thèse fournit un nouveau regard sur la diversité de la famille des Aglaopheniidae, soulignant le potentiel impact du cycle de reproduction sur la diversité phylétique et les processus de spéciation des hydrozoaires incubateurs. Cette thèse met en évidence la pertinence de l'utilisation de plusieurs procédures complémentaires de délimitation d'espèces pour étudier la diversité des organismes morphologiquement simples.

Populations connectivity and endemism of marine species in the South-Western Indian Ocean : a focus on the Aglaopheniidae (Marktanner-Turneretscher, 1890)

Designing biodiversity conservation plans requires knowledge on the biogeographic distribution of taxa but also accurate estimates of species richness and diversification processes. However, measuring the phyletic richness can be biased by the use of inappropriate taxonomical characters, leading to erroneous species delimitation and diversity estimates.

This work explores the phyletic richness at several taxonomic levels (generic, specific and intraspecific) of the hydrozoan family Aglaopheniidae (Marktanner-Turneretscher, 1890), with a particular focus on the South-Western Indian Ocean. Firstly, using several newly constructed phylogenies based on mitochondrial and nuclear markers, this study reveals that the phyletic diversity of this family is underestimated by at least 50%: all studied genera are polyphyletic or with doubtful monophyletic status. Then, using several species delimitation methods based on molecular markers, it sheds light on the richness of cryptic diversity of this family, enlightening the potential of using an integrative taxonomic approach on these morphologically simple organisms. Finally, the population genetics of an Aglaopheniidae brooding species shows a high populations structuring with pervasive pattern of isolation by distance at several geographic scales (several to thousands of kilometres), implying a potentially high cryptic diversity existing in this family.

The results of this work provide new insights on Aglaopheniidae diversity, underlining the potential influence of reproductive mode on the phyletic diversity and diversification processes of brooding hydrozoan brooders. This thesis further highlights the relevance of using several complementary species delimitation procedures to study the diversity of morphologically simple organisms.