

## **Taxonomie, phylogénie et écogéographie des Peltigerales de la Réunion (archipel des Mascareignes)**

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du grade de **Master en biologie des organismes et écologie, à finalité approfondie**

Nicolas MAGAIN

Promoteur : Emmanuël SÉRUSIAUX

Août 2010



*Sticta macrophylla*

## Résumé

-Une mission sur le terrain à la Réunion en novembre 2009 a permis de récolter environ 450 échantillons de Peltigerales. Un stage d'un mois a été effectué à l'Université du Connecticut dans le laboratoire du Professeur Bernard Goffinet.

### Taxonomie

-Nous avons réalisé une checklist des Peltigerales de la Réunion présentant 69 espèces, dont 11 nouvelles pour la Réunion. Les genres *Collema* et *Leptogium* n'ont pas été étudiés.

-Nous avons identifié, provenant de la Réunion, du Rift Albertin et de Madagascar, pas moins de 27 espèces de *Sticta*. Parmi ces 27 espèces, 14 d'entre elles représentent probablement des nouvelles espèces pour lesquelles nous n'avons trouvé aucun épithète validement publié.

### Phylogénie

-Nous avons réalisé plusieurs études phylogénétiques sur l'ordre des Peltigerales par extraction d'ADN, amplification de trois loci (ITS nucléaire, LSU nucléaire et mtSSU mitochondrial), et analyses en maximum de parcimonie, maximum de vraisemblance et analyse bayésienne.

-La famille des Pannariaceae au sens large est monophylétique, tout comme le genre *Pannaria sensu stricto*, à condition de revoir le nom de certaines espèces. Le genre *Psoroma* est polyphylétique, tout comme le genre *Parmeliella*.

-Le genre *Erioderma* est monophylétique, et forme un groupe avec *Leioderma* et une partie des *Degelia*.

-La famille des Lobariaceae est monophylétique, tout comme les genres *Sticta* et *Lobaria*. Le genre *Pseudocyphellaria* est paraphylétique.

-La famille des Lobariaceae peut être divisée en un minimum de quatre genres, ou jusqu'à huit genres, selon le choix d'interprétation des données. *Lobaria* peut rester un seul genre, ou être séparé en deux ou trois entités. *Pseudocyphellaria* doit être séparé en deux ou en quatre genres.

### Photomorphes

-Deux paires de photomorphes ont été découvertes à la Réunion. L'une est composée de *Lobaria discolor*, chloromorphe foliacé et d'un *Dendriscoaulon*, cyanomorphe fruticuleux, se développant séparément. L'autre est composée de deux *Sticta*, l'un bleu et l'autre vert, dont les séquences d'ADN étudiées sont identiques, croissant l'un sur l'autre, et dont le chloromorphe seul est très abondant et correspond à *Sticta dichotoma*.

### TCS sur le groupe *Peltigera neckeri*

- Une analyse TCS sur le groupe *Peltigera neckeri* confirme l'identité des espèces *P. phyllidiosa* et *P. collina*, et met en évidence deux lignées distinctes pour cette dernière, mais l'information supplémentaire fournie par cette méthode montre bien que la confusion existant au sein du groupe *Peltigera neckeri* – *Peltigera polydactyloides* nécessite une étude plus approfondie.

### Etude des microsatellites dans le groupe *Peltigera dolichorhiza*

-Une étude menée sur des microsatellites, réalisée à partir de données issues de séquençage « 454 », a montré la faisabilité et l'intérêt de cette méthode chez les lichens. Des résultats très prometteurs ont été obtenus pour le groupe *Peltigera dolichorhiza*, révélant une très grande variabilité au sein des microsatellites dans ce groupes. Un article reprenant ces résultats a été soumis à *American Journal of Botany* et vient d'être accepté.

## Sommaire

page n°

<u>1. Introduction</u>	1
1.a Les Peltigerales	1
1.b Les photomorphes	3
1.c L'île de la Réunion	5
1.d Les gènes utilisés dans nos analyses phylogénétiques	6
1.e Le séquençage 454	7
1.f Les régions micosatellites	8
1.g Objectifs du mémoire	9
<u>2. Matériel et méthodes</u>	10
2.a Collecte	10
2.b Identification	10
2.c Extraction de l'ADN génomique	10
2.d Amplification de trois gènes	11
2.e Séquençage	12
2.f Edition-alignement des séquences	12
2.g Analyse phylogénétiques	12
<u>3. Taxonomie</u>	14
<u>4. Phylogénie</u>	23
4.a La famille des Pannariaceae	23
4.b Le genre <i>Erioderma</i>	26
4.c La famille des Lobariaceae	27
4.d Le genre <i>Lobaria</i>	31
4.f Le genre <i>Sticta</i>	33
4.g Le genre <i>Pseudocyphellaria</i>	36
<u>5. Résultats sur les photopaires</u>	38
<u>6. TCS sur le groupe <i>Peltigera neckeri</i></u>	40
6.a Phylogénie du groupe <i>Peltigera neckeri</i>	40
6.b TCS	41
<u>7. Etude des micosatellites dans le groupe <i>Peltigera dolichorhiza</i></u>	44
7.a Phylogénie du groupe <i>Peltigera dolichorhiza/Peltigera polydactylon</i>	44
7.b Matériel et méthodes	45
7.c Résultats et discussion	47
<u>Remerciements</u>	
<u>Bibliographie</u>	
<u>Annexes</u>	

## 1) Introduction

### 1.a. Les Peltigerales

Les lichens sont une association symbiotique dans laquelle un champignon constitue un thalle avec une algue ou une cyanobactérie. Cette symbiose concerne environ 50% des espèces d'ascomycètes (Wedin et al. 2009).

On rencontre des lichens formés d'un champignon associé à une cyanobactérie dans trois groupes phylogénétiquement distincts: les Lichinales, les Arctomiaceae et les Peltigerales (Wedin et al. 2007, Wedin et al. 2009). Cette caractéristique est donc apparue plusieurs fois dans l'évolution des lichens. Les lichens associés à une cyanobactérie représentent environ 8% des champignons lichénisés. Cependant, ils ont une grande importance écologique, notamment due à la fixation d'azote atmosphérique (Wedin et al. 2009).

L'ordre des Peltigerales appartient aux Lecanoromycètes, la plus grande classe au sein des Ascomycètes, Les Lecanoromycètes représentent environ 90% des espèces de champignons lichénisés. Le groupe sœur des Peltigerales est l'ordre des Lecideales, composé des familles des Lecidaceae et des Porpidiaceae (Miadlikowska et al. 2006). L'ordre des Peltigerales est monophylétique (Miadlikowska et Lutzoni 2004, Miadlikowska et al. 2006, Hofstetter et al. 2007, Wedin et al. 2009).

Cet ordre comprend beaucoup d'espèces qui ont une cyanobactérie comme photobionte principal (le photobionte est le nom donné à l'algue verte ou à la cyanobactérie avec lequel le champignon est associé dans un lichen ; le photobionte est appelé chlorobionte lorsqu'il s'agit d'une algue verte, et cyanobionte quand c'est une cyanobactérie). Certaines ont une algue verte comme photobionte principal, et parmi celles-ci, une partie ont des cyanobactéries comme photobionte secondaire (voir section 1.b les photomorphes) (Högnabba et al. 2009). Le photobionte est généralement plus ou moins organisé en une couche sous le cortex, mais il peut aussi se trouver de façon non-organisée au sein d'un thalle sans cortex, gélatineux. Les espèces gélatineuses sont principalement classées dans la famille des Collemataceae (Wedin et al. 2009). Le principal cyanobionte dans l'ordre est *Nostoc*. On rencontre également *Scytonema* et *Dichotrix*. Les chlorobiontes sont souvent *Coccomyxa*, *Dictyochloropsis* ou *Myrmecia* (Högnabba et al. 2009).

L'état ancestral de l'ordre est une association avec une cyanobactérie. L'acquisition et la perte de l'algue verte se sont produites plusieurs fois au cours de l'évolution (Miadlikowska et Lutzoni 2004, Högnabba et al. 2009).

L'ordre des Peltigerales est fréquemment subdivisé en deux sous-ordres : les Peltigerineae et les Collematineae (Miadlikowska et Lutzoni 2004, Miadlikowska et al. 2006, Hofstetter et al. 2007, Wedin et al. 2009).

Les **Peltigerineae** sont caractérisés par des thalles hétéromères, la présence fréquente d'associations tripartites (une association avec une algue verte comme photobionte principal et avec *Nostoc* comme photobionte secondaire, voir section 1.b Les photomorphes) et la présence d'associations bipartites avec des algues vertes, ainsi que la production de beaucoup de composés secondaires (principalement des triterpénoïdes) (Miadlikowska et al. 2006).

Les Peltigerineae sont composées de la famille des Lobariaceae et de ses groupes-sœurs : les familles Peltigeraceae et des Nephromataceae, ainsi que de la famille des Massalongiaceae, composée des genres *Massalongia*, *Polychidium* et *Leptochidium* (Wedin et al. 2007). Le sous-ordre des Peltigerineae est monophylétique (Miadlikowska et Lutzoni 2004). On peut distinguer ces groupes morphologiquement : les Lobariaceae et Peltigeraceae ont des thalles assez grands et foliacés ; et au niveau des asques, *Peltigera* a un tube apical très distinct, *Nephroma* n'a pas de structure amyloïde apicale, les Lobariaceae ont une couche amyloïde indistincte tandis que les Massalongiaceae ont des tuniques apicales amyloïdes (Wedin et al 2007).

Au sein de ce sous-ordre, la famille des Lobariaceae comprend trois genres : *Lobaria*, *Pseudocyphellaria* et *Sticta* (Högnabba et al. 2009, Miadlikowska et Lutzoni 2004). Cette famille est plus diversifiée dans l'hémisphère sud, surtout en ce qui concerne *Sticta* et *Pseudocyphellaria* (Högnabba et al. 2009, Miadlikowska et Lutzoni 2004).

Au niveau morphologique, on distingue *Lobaria* par ses taches maculées sur la face inférieure, *Pseudocyphellaria* par ses pseudocyphelles et *Sticta* par ses cyphelles. Le genre *Sticta* apparaît contenir beaucoup plus d'espèces que ce que l'on pensait initialement. McDonald et al. (2003) ont notamment démontré qu'aux USA il existait beaucoup plus d'espèces que ce qui avait été décrit auparavant. Certains épithètes très souvent utilisés comme *Sticta weigeli* ou *Sticta fuliginosa* contiennent en fait plusieurs espèces différentes.

Toutes les études récentes sur le sujet s'accordent pour dire que cette famille est monophylétique (Högnabba et al. 2009, Miadlikowska et Lutzoni 2004, ...). Le genre *Sticta* apparaît toujours monophylétique, sauf en ce qui concerne *Sticta oroborealis* et *Sticta wrightii* qui se retrouvent avec les *Lobaria* (Högnabba et al. 2009, Takahashi et al. 2006). *Lobaria* et *Pseudocyphellaria* apparaissent parfois monophylétiques et parfois polyphylétiques. *Lobaria* apparaît monophylétique pour Wiklund et Wedin (2003), Wedin et Wiklund (2004) et Miadlikowska et al. (2006) mais pas pour Stenroos et al. (2003), Miadlikowska et Lutzoni (2004) et Thomas et al. (2002). Dans ces trois derniers articles, *Pseudocyphellaria* est aussi considéré comme polyphylétique. L'étude la plus récente et la plus poussée (Högnabba et al. 2009) considère ces deux genres comme polyphylétiques. Le genre *Pseudocyphellaria* est résolu en trois groupes, l'un se positionnant avec *Sticta* (monophylétique) et les deux autres formant un clade. *Lobaria* se retrouve scindé en deux groupes, l'un formant le groupe sœur de (*Pseudocyphellaria*+*Sticta*) et l'autre formant un groupe sœur de l'ensemble. Cependant, cette topologie de *Lobaria* n'est pas très bien supportée. Aucune structure n'apparaît pour différencier les taxons associés à des algues vertes de ceux associés à des cyanobactéries.

Le genre *Peltigera* est extrêmement répandu autour du globe, mais principalement dans l'hémisphère nord (Miadlikowska et Lutzoni 2004). Il s'agit de lichens terricoles ou muscicoles, qui peuvent avoir soit une cyanobactérie comme photobionte, soit une algue verte comme photobionte principal et *Nostoc* comme photobionte secondaire localisé dans des structures appelées céphalodies (voir section photomorphe) (O'Brien et al. 2009). Ce genre compte un grand nombre d'espèces parfois difficiles à différencier. De plus, il existerait de l'hybridation entre espèces, ce qui rendrait l'identification encore plus complexe (O'Brien et al. 2009).

Le genre *Nephroma* est réparti dans le monde entier. Il s'agit de lichens épiphytes avec un thalle foliacé stratifié et un cortex bien développé sur les deux faces. La caractéristique principale est que les apothécies se forment sur la face inférieure. Les asques n'ont jamais un revêtement gélatineux ou un anneau apical positif à l'iode. Les ascospores sont allongées, septées transversalement et brunes (Lohtander et al. 2002). Le genre comprend également des associations bipartites à cyanobactéries et tripartites avec l'algue verte en photobionte principal et la cyanobactérie dans des céphalodies. Il existe aussi des *Nephroma* qui forment des photosymbiodemes (thalles composites formés d'un chloromorphe et d'un cyanomorphe, voir section 1.b Les photomorphes) (Lohtander et al. 2002).

Le sous-ordre des **Collematineae**, quant à lui, inclut les Collemataceae, les Pannariaceae, les Coccocarpiaceae et les Placynthiaceae (Miadlikowska et Lutzoni 2004, Miadlikowska et al. 2006).

La famille des Collemataceae contient principalement les espèces gélatineuses plus ou moins foliacées sans composés secondaires et avec des apothécies avec un excipulum fermé et cupulaire : *Collema* et *Leptogium*. La différence entre les deux genres est respectivement l'absence ou la présence d'un cortex. Cette différence n'est pas soutenue phylogénétiquement. Son groupe-sœur est non gélatineux et composé par la famille des Placynthiaceae (Wedin et al. 2009). Ces deux familles partagent la caractéristique d'avoir des asques entourés

par une couche fortement amyloïde. Les Coccocarpiaceae semblent être le groupe-sœur de ces deux familles, et tout ce groupe associé avec les Pannariaceae forme le sous-ordre monophylétique des Collematineae (Wedin et al. 2009). Plusieurs genres gélatineux anciennement classés comme Collemataceae, tels que *Physma*, ont été transférés récemment dans la famille des Pannariaceae (Wedin et al. 2009).

La famille des Pannariaceae reste encore assez mal définie, particulièrement au niveau des relations entre les genres qui la composent (Passo et al. 2008). La classification actuelle des Pannariaceae au sens traditionnel du mot sépare d'une part le groupe de *Pannaria sensu stricto* et des genres apparentés comme *Fuscopannaria* et *Protopannaria*, le plus souvent associés à une cyanobactérie, sans structure amyloïde apicale et possédant souvent des substances secondaires comme la pannarine ou la vicanicine, et d'autre part le groupe *Psoroma sensu stricto*, composé de lichens squamuleux contenant une algue verte comme photobionte principal et des structures apicales amyloïdes en forme de tubes, et n'ayant pas ou très peu de composés secondaires. Cette distinction est supportée d'un point de vue moléculaire. Toutefois, la position de certaines espèces n'est pas claire. Les genres *Pannaria* et *Psoroma* ne sont pas monophylétiques dans l'état actuel de la nomenclature, mais devraient l'être une fois que la révision de ces genres, en cours, aura été achevée (Passo et al. 2008). Le genre *Psoroma* a d'ailleurs été tout récemment séparé en trois genres monophylétiques distincts : *Psoroma sensu stricto*, *Xanthopsoroma* et *Psorophorus* (Elvebakk et al. 2010).

Cependant, des études phylogénétiques récentes (Wedin et al. 2009) ont élargi la famille des Pannariaceae, en y ajoutant des genres comme *Erioderma*, *Leioderma*, ou *Degelia*, plus foliacés, qui forment un groupe à la base des Pannariaceae avec *Parmeliella*, et des genres comme *Physma*, gélatineux. La famille des Pannariaceae dans ce sens plus large est assez difficile à décrire d'un point de vue morphologique. Cependant, toutes les espèces ont des ascospores d'une seule cellule, et la plupart ont un thalle bien défini, un cortex, et des apothécies ayant souvent un excipulum en forme d'anneau et des asques avec diverses structures amyloïdes internes (Wedin et al. 2009).

### 1.b. Les photomorphes

Nous avons donc vu qu'au sein des Peltigerales, le mycobionte pouvait s'associer soit uniquement avec une cyanobactérie (cyanobionte) ou avec une algue verte (chlorobionte), dans une association bipartite, soit à la fois avec une algue verte et une cyanobactérie.

Il existe plusieurs types d'associations impliquant à la fois un champignon lichénisé, une cyanobactérie et une algue verte. Ces associations sont apparues plusieurs fois au cours de l'évolution (Miadlikowska et Lutzoni 2004, Högnabba et al. 2009). On peut distinguer les catégories suivantes :

- Une association entre un mycobionte, une algue verte comme photobionte principal, et des cyanobactéries comme photobionte secondaire, localisées dans des structures appelées céphalodies, qui sont des nodules superficielles internes ou externes toujours situés sur ou dans le thalle vert. Dans la littérature, ces associations sont souvent nommées « associations tripartites ».

- Au sein du sous-ordre des Peltigerineae, on peut aussi voir un même champignon lichénisé (mycobionte) former un thalle avec soit une cyanobactérie, soit une algue verte. Ces différentes symbioses impliquant le même mycobionte sont appelées des photomorphes. Le thalle formé par l'association avec la cyanobactérie est appelé le cyanomorphe, et le thalle formé par l'association avec une algue verte est appelé chloromorphe. Le terme photopaire apparaît parfois dans la littérature pour désigner une paire de photomorphes. Il existe deux catégories distinctes de photomorphes :

-Soit le thalle bleu et le thalle vert ont la même morphologie, et la seule différence visible se situe au niveau de la nature du photobionte, et donc de la couleur du thalle.

- Soit, dans la famille des Lobariaceae, le cyanomorphe peut avoir une morphologie totalement différente de celle du chloromorphe. Dans ce cas, le cyanomorphe se présente sous la forme d'un thalle fruticuleux, formant des petits buissons, qui peut croître soit sur le thalle foliacé du chlorobionte, soit de façon indépendante. Dans ce cas, on donne le nom de genre « *Dendriscoaulon* » au cyanomorphe. On rencontre des *Dendriscoaulon* chez *Sticta* et chez *Lobaria* (Högnabba et al. 2009, Takahashi et al. 2006, Thomas et al. 2002 ...), et il n'y a donc pas de groupe monophylétique contenant les espèces où apparaît ce cyanomorphe.

Dans les deux cas, ces photomorphes peuvent se développer soit individuellement, auquel cas on peut retrouver un thalle vert (chloromorphe) et un thalle bleu (cyanomorphe) distincts, incluant le même mycobionte, soit former des thalles composites, appelés photosymbiodemes, où les thalles bleu et vert croissent ensemble et se développent l'un sur l'autre.

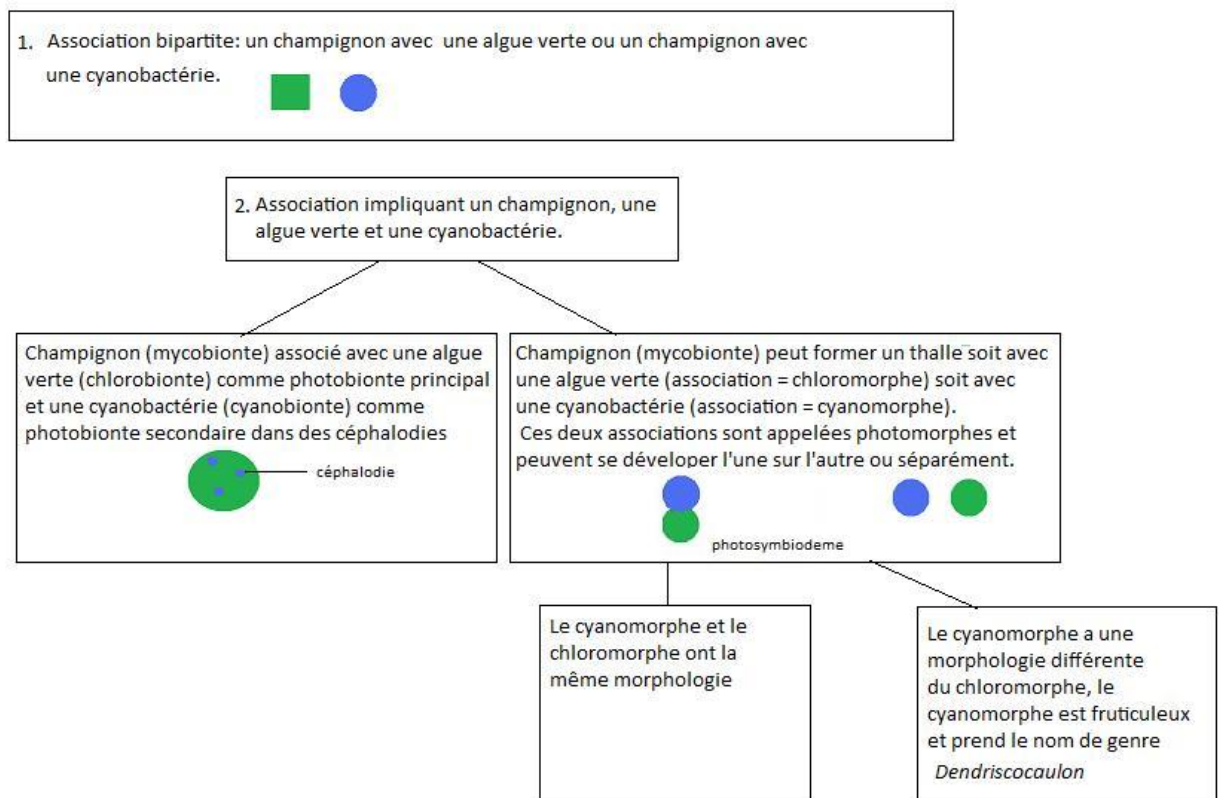


Figure 1. Tableau récapitulatif des différentes associations présentes chez les Peltigerales.

Plusieurs études traitent le cas de photomorphes.

Stenroos et al. (2003) ont décrit deux espèces de *Dendriscoaulon* se développant sur les thalles avec chlorobionte de *Lobaria amplissima* et *Lobaria fendleri*. Dans le cas de *Lobaria amplissima* le *Dendriscoaulon* a aussi été signalé comme se développant seul, sans être associé à un thalle vert. Takahashi et al. (2006) ont découvert un *Dendriscoaulon* se développant sur *Sticta wrightii*. Sanders (2001) a trouvé un photosymbiodeme composé de deux espèces de *Sticta* morphologiquement similaires et ne différant que par la cyanobactérie ou l'algue verte avec laquelle le mycobionte s'associe. Dans ce photosymbiodeme les deux espèces ne présentent pas de discontinuité morphologique, et le cyanomorphe est toujours le photomorphe attaché au substrat.

Des analyses moléculaires ont été réalisées pour vérifier si les différentes paires de photomorphes étaient en fait composées du même champignon. Stenroos et al. (2003) et Takahashi et al. (2006) ont démontré que leurs photomorphes étaient bien composés du même champignon.

La partie fongique du lichen pourrait trouver un avantage à se lier avec, soit une cyanobactérie, soit une algue verte. Green et al. (1993) ont étudié la photosynthèse de deux groupes de photosymbiotes composés d'espèces de *Pseudocyphellaria* en Nouvelle-Zélande [premier photosymbiote : *Pseudocyphellaria rufovirescens* (à algue verte) avec *P. murrayi* (à cyanobactérie), second photosymbiote : *P. lividofusca* (à algue verte) avec *P. knightii* (à cyanobactérie)] et suggèrent que le chloromorphe a un avantage photosynthétique important lorsque le thalle contient peu d'eau, tandis que le cyanomorphe a un avantage photosynthétique quand le contenu en eau est important. Les lieux dans lesquels on rencontre les deux photomorphes croissant l'un sur l'autre seraient des lieux où aucun des deux n'a un avantage significatif sur l'autre.

Pour des raisons historiques, on a souvent donné un nom différent à chacun des deux photomorphes, mais d'un point de vue taxonomique, puisque le nom d'espèce se rapporte au mycobionte, les deux photomorphes doivent avoir le même nom. Cependant, les deux noms sont souvent conservés par commodité, pour désigner précisément l'un ou l'autre des partenaires de l'association.

Par exemple, en ce qui concerne les photosymbiotes de *Pseudocyphellaria*, *P. coriaceae* est synonyme de *P. allanii*, et *P. rufovirescens* de *P. murrayi*. Thomas et al. (2002) ont confirmé par une approche moléculaire que ces paires d'espèces étaient composées du même champignon. La capacité d'un même mycobionte à s'associer avec une cyanobactérie ou une algue verte démontre bien la faible spécificité du photobionte puisqu'un même champignon peut s'associer avec des représentants de règnes biologiques totalement différents.

### 1.c. L'île de la Réunion

La Réunion est une île située dans l'Océan Indien, dans l'hémisphère Sud, à environ 700 km à l'Est de Madagascar et 200 km au Sud-Ouest de l'île Maurice. Ses coordonnées géographiques approximatives sont 21 degrés de latitude sud et 55 degrés de longitude est. Il s'agit d'une île volcanique, apparue il y a environ 2 millions d'années avec l'émergence du Piton des Neiges. La Réunion appartient à l'archipel des Mascareignes. Cet archipel contient 3 îles : Maurice, La Réunion et Rodrigues.

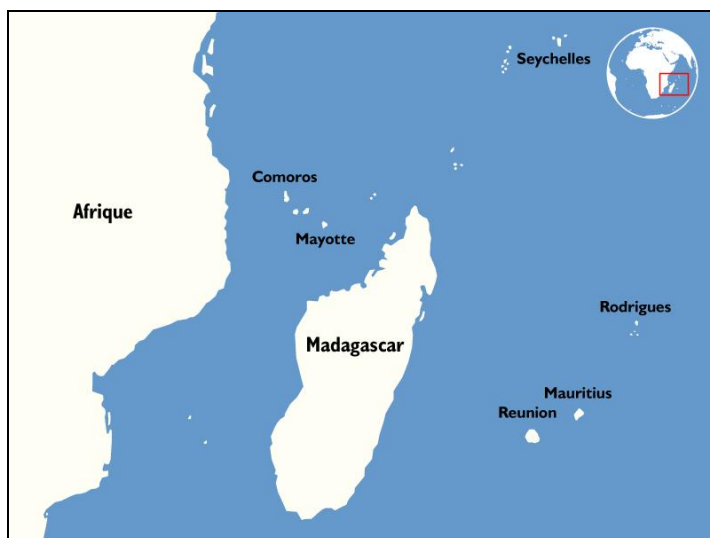


Figure 2. Carte présentant la situation géographique de Madagascar, de l'archipel des Mascareignes et des régions voisines.



Le climat est tropical. Le relief de l'île est très accidenté et le point culminant de l'île, le Piton des Neiges, se situe à 3071m d'altitude. L'île possède un volcan très actif : le Piton de la Fournaise. La surface de l'île est de 2512 km<sup>2</sup>. L'endémisme est très important. La grande différence d'altitude sur l'île induit une différence de température entre les zones hautes plus froides et les zones basses plus chaudes, et une différence de pluviosité entre la côte Est, dite « au vent », qui connaît des précipitations importantes, et la côte Ouest, dite « sous le vent », à la pluviosité plus faible. Les températures moyennes mensuelles oscillent généralement entre 21°C (août) et 32°C (janvier) le long des côtes et entre 12 et 22°C dans les parties plus élevées. La pluviosité varie énormément, avec une hauteur annuelle de précipitations variant de moins de 500mm à plus de 8000mm par an selon les endroits. L'île est soumise à une période de cyclones entre janvier et mars (Cheke et Hume 2008).

Outre les cultures, les principales formations végétales de l'île de la Réunion sont les suivantes :

- La forêt de bois de couleur des Bas, située à moins de 1000m d'altitude, est très dégradée et n'existe plus qu'en de très rares endroits, comme la forêt de Mare Longue, près de St-Philippe, dans le sud-est de l'île. Il s'agit d'une forêt riche en espèces de la famille des Sapotaceae.
- La forêt de bois de couleur des Hauts, la plus riche en espèces, dominée notamment par des espèces d'arbres telles que *Dombeya sp.*, *Monimia rotundifolia*, *Weinmannia tinctoria*, *Nuxia verticillata*, *Molinea alternifolia* et *Aphloia theiformis*. Cette forêt est en outre riche en épiphytes, mousses, orchidées et lichens. Elle se situe principalement entre 800 et 1500m d'altitude.
- La forêt de Tamarins des Hauts, dominée par l'espèce *Acacia heterophylla* (le Tamarin des Hauts), arbre au feuillage clair et au tronc imposant, souvent associé à *Nastus borbonicus* (le calumet, un bambou endémique). Cette forêt se situe entre 1200 et 1800m d'altitude.
- Entre 1800 et 2000m d'altitude, les fourrés à petit tamarins (*Sophora denudata*). On y trouve également beaucoup d'*Hypericum laceaolatum*.
- Au delà de 2000m d'altitude, une végétation éricoïde de haute altitude riche en *Erica montana*, *Phyllica sp.*, *Stoebe passerinoides* et *Hubertia tomenosa*.
- L'avoune, groupement végétal dominé par une espèce de bruyère arborescente, *Erica montana*. Le sol y est très acide et peu d'arbres et d'arbustes poussent dans ce milieu.
- Les fourrés très humides, dominés dans leur partie inférieure par le *Pandanus montanus* (le Pimpin), et dans leur étage supérieur par *Cyathea glauca* et *Acanthophoenix rubra*.

(références : Pailler et al. 1998, Lavaux et Autheman 1999)

L'intérêt principal d'étudier les Peltigerales à la Réunion est qu'il s'agit d'un endroit où un grand nombre de Peltigerales se développent et que cet endroit est très facile d'accès, en raison des sentiers de randonnée très bien entretenus et très bien renseignés qui permettent de se déplacer facilement dans l'île, contrairement à d'autres régions tropicales plus difficiles d'accès.

Dominic Francois Delise, cryptogamiste et major de l'armée française a publié en 1825 un ouvrage intitulé « Histoire des lichens » dans lequel il a décrit un bon nombre d'espèces de Peltigerales, et de nombreux types de ces genres sont décrits de la Réunion (Delise 1825). Cela est une raison supplémentaire pour étudier les Peltigerales sur cette île.

#### 1.d Les gènes utilisés dans nos analyses phylogénétiques

Dans notre étude, trois gènes ont été utilisés. Il s'agit de l'ITS nucléaire (ITS1, 5,8S et ITS2), du gène mitochondrial mtSSU et du gène nucléaire LSU. Ces trois gènes sont parmi les plus utilisés, combinés ou individuellement, dans les études phylogénétiques sur les lichens (Lutzoni et al. 2004). L'ITS donne de la

résolution à faible niveau taxonomique, pour régler les problèmes au niveau des espèces par exemple, mais est difficilement alignable entre espèces plus éloignées, par exemple appartenant à des familles différentes. Les gènes mtSSU et LSU présentent par contre moins de variation à faible niveau taxonomique mais permettent de donner de la résolution à plus haut niveau, celui du genre ou de la famille, même s'ils apparaissent moins efficaces que les gènes codant pour des protéines, comme RPB1 et RPB2, qui ne sont utilisés que depuis peu (Hofstetter et al. 2007).

#### 1.f. Le séquençage 454

Le séquençage classique de l'ADN, utilisant la méthode dite de Sanger, était jusqu'il y a peu quasiment la seule méthode disponible sur le marché. Cependant, depuis peu, on assiste à l'apparition de méthodes plus efficaces, dites de nouvelle génération, permettant d'obtenir une quantité beaucoup plus importante de données de façon beaucoup plus rapide et moins coûteuse (au niveau du coût par rapport à la quantité de séquences produites) (Metzker 2010).

Parmi celles-ci, la méthode du séquençage 454 (Margulies et al. 2005) est la première à avoir été développée et la plus répandue (Rothberg et Leamon 2008).

Cette méthode peut être divisée en trois parties : la préparation des « templates », le séquençage proprement dit, et l'analyse des données.

##### a) Préparation des templates

Dans le cadre du séquençage 454, un « template » est une molécule d'ADN recombinant, composée d'une région connue contenant un adaptateur (zone sur laquelle peut se fixer un primer universel), et de la séquence cible, que l'on désire séquencer, et qui est souvent inconnue (Metzker 2010). Cela permet donc d'amplifier n'importe quel fragment avec des primers communs et connus.

Une bibliothèque de fragments est créée en fractionnant de manière aléatoire le génome complet en petites parties de moins d'1kb.

La préparation des templates dans le séquençage 454 se base sur une méthode d'amplification par clonage, plus particulièrement par une PCR en émulsion (emPCR). Le grand avantage de cette méthode est de ne pas utiliser de bactéries pour l'amplification des fragments, ce qui implique souvent une perte ou un biais dans l'information.

On ajoute donc les adaptateurs aux fragments, puis on les fixe sur des billes en s'assurant qu'il n'y ait qu'un seul fragment par bille. Les billes sont placées dans une émulsion huile-eau, avec une bille et un fragment d'ADN encapsulés dans une gouttelette aqueuse, avec des primers, des dNTPs et de la polymérase. Une PCR est réalisée dans ces gouttelettes pour créer des billes qui contiennent des milliers de copies du même template (Metzker 2010). Cette étape est nécessaire car il n'est pas possible de détecter la lumière produite par une seule réaction (voir plus bas). Les billes sont ensuite placées dans des puits d'une plaque dite PicoTiterPlate (PTP) où le séquençage sera réalisé. Cette plaque a un revêtement en titane qui permet d'augmenter la longueur des séquences lues et la qualité des données, et de réduire le parasitage venant des puits voisins. Le séquençage 454 peut traiter jusqu'à 1 à 2 millions de billes (Metzker 2010). Cette plaque de millions de puits permettant de traiter des millions de réactions en parallèle est un des grands avantages de la méthode (Rothberg et Leamon 2008).

## b) Séquençage

Il s'agit de pyroséquençage. Dans cette méthode, le séquençage n'est pas réalisé (comme dans la plupart des méthodes) par la détection d'une sonde fluorescente attachée aux nucléotides. Ici, on repère au moyen d'une caméra CCD la lumière produite par une cascade de réactions enzymatiques. La bille se trouve donc dans un puits, dans lequel ont été ajoutées des billes sur lesquelles sont attachées de la sulfurylase et de la luciférase, et un flux de réactifs passe par le puits (Metzker 2010). Cela permet à la fois d'amener les nouveaux réactifs au bon moment, mais aussi d'éliminer des produits de réaction et des bases non incorporées (Rothberg et Leamon 2008). Les nucléotides passent un par un, et lorsque le nucléotide dont la polymérase a besoin pour continuer à amplifier le fragment passe, il est incorporé, et un pyrophosphate est relâché (Metzker 2010). Ce dernier est transformé en ATP par la sulfurylase, puis l'ATP est utilisé pour transformer de la luciférine en oxyluciférine par la luciférase, et de la lumière est produite (Rothberg et Leamon 2008). Cette lumière est captée par la caméra CCD et on va obtenir un pic, dont l'intensité sera proportionnelle au nombre de nucléotides de ce type incorporés (on obtiendra un pic trois fois plus élevé pour une séquence de trois nucléotides que pour un seul nucléotide). Les nucléotides passent chacun à leur tour et on va obtenir un diagramme de pics, qui donne la séquence du fragment (Metzker 2010).

## c) Analyse de données

Comme un très grand nombre de séquences sont produites, il est possible d'éditer des contigs en alignant ensemble les différents exemplaires contenant une même séquence, et ainsi d'obtenir une séquence consensus, laquelle sera utilisée dans les analyses. On peut lui associer un indice de qualité en fonction du pourcentage de positions identiques observé dans la production du consensus (Margulies et al. 2005).

### 1.g. Les régions microsatellites

Les régions microsatellites figurent parmi les marqueurs moléculaires les plus utilisés actuellement, grâce à leur polymorphisme élevé et la facilité pour compter leurs répétitions (Zane et al. 2002). Les applications sur les régions microsatellites sont nombreuses, notamment en génétique des populations, pour étudier les flux de gènes ou la dispersion, par exemple (Widmer et al. 2010).

Il s'agit de régions d'une à six bases répétées en tandem (dans le même sens). On en trouve partout dans le génome, aussi bien dans les régions codantes que non codantes, chez les procaryotes comme chez les eucaryotes. Leur origine résulterait d'événements de « glissement » pendant la réplication de l'ADN, lorsque le brin nouvellement formé glisse, se sépare du brin codant et se rattache au mauvais endroit. On les rencontre plus souvent dans des régions non-codantes où le taux de substitution est plus élevé. Il est donc plus compliqué de développer des primers universels pour ces régions (Zane et al. 2002). On définit un microsatellite par la séquence de répétitions en tandem et par deux régions flanquantes, qui doivent être identiques d'un individu à un autre, afin de s'assurer qu'il s'agit bien de la même région microsatellite et non de deux régions analogues différentes, puisqu'il existe plusieurs microsatellites avec la même répétition au sein d'un génome.

Le développement du séquençage en masse, comme le 454, permet de localiser les régions microsatellites via des programmes informatiques qui les détectent automatiquement à partir des séquences produites par le 454, au lieu de devoir les rechercher par des méthodes plus complexes de clonage à l'aide de bactéries (voir Zane et al. 2002 pour une description de ces méthodes). Cela permet de développer plus facilement et rapidement des primers pour l'étude des microsatellites.

Un problème reste cependant commun à l'une et l'autre approche du problème. Il n'est en effet pas toujours possible de développer des primers qui amplifieront la région microsatellite, ce qui réduit le nombre de microsatellites exploitables. L'impossibilité de développer un primer peut provenir soit de la position du microsatellite, qui se trouve trop proche de la fin de la séquence disponible ou de la zone flanquante, soit de la composition en bases de la séquence qui ne se prête pas au développement du primer. Même lorsque la région microsatellite semble optimale pour le développement de primers, il arrive aussi que les primers ne fournissent aucun produit lors de la PCR. Pour que le microsatellite soit exploitable pour des analyses, il faut aussi qu'un polymorphisme existe au sein des populations, ce qui réduit encore le nombre de microsatellites utilisables dans des études de type génétique des populations (Squirrell et al. 2003).

Il n'existe à ce jour qu'une seule étude développant des primers pour des microsatellites de lichens, en l'occurrence pour *Lobaria pulmonaria* (Walser et al. 2003, Widmer et al. 2010), et aucune utilisant des données issues d'un séquençage de nouvelle génération.

### 1.h Objectifs du mémoire

Les objectifs de ce mémoire furent multiples.

Le premier objectif était de réaliser une checklist, ou inventaire, de l'ensemble des espèces de Peltigerales présentes sur le sol réunionnais.

Ensuite, plusieurs des objectifs de ce mémoire étaient d'exploiter les espèces récoltées à la Réunion pour éclaircir certains points dans la phylogénie de cet ordre. Les points que nous avons souhaité éclaircir sont les suivants.

-Les relations phylogénétiques au sein de la famille des Pannariaceae, avec notamment la position des différents genres entre eux, la position des espèces au sein de ces genres, et la monophylie de la famille et des genres qui la composent. Il s'agissait principalement de recouper nos données avec des données déjà existantes afin de vérifier les résultats publiés précédemment, notamment ceux de Wedin et al. (2009) et de Passo et al. (2008), et d'essayer d'apporter des réponses aux interrogations qui subsistaient dans ces études.

-Les relations phylogénétiques au sein du genre *Erioderma*, très peu étudiées jusqu'à présent. Réaliser une phylogénie du genre avec les espèces récoltées et les autres données existantes. Tester la monophylie du genre, vérifier ses relations avec les genres *Leioderma* et *Degelia*, assez proches. Etudier la monophylie des espèces récoltées, au sein du genre, et leurs relations les unes par rapport aux autres.

-Etudier les relations au sein de la famille des Lobariaceae dans son ensemble, puis genre par genre en ce qui concerne *Sticta*, *Pseudocyphellaria* et *Lobaria*. Utiliser les données fournies par les récoltes effectuées pour clarifier les relations, notamment entre les genres, et vérifier leur monophylie. Etudier la position des espèces récoltées par rapport à la topologie générale de la famille. Voir si nos résultats vérifient les travaux déjà effectués sur le sujet, notamment le plus récent d'entre eux (Högnabba et al. 2009).

Ensuite, un objectif était de chercher pendant la mission de terrain des paires de photomorphes, et de les étudier.

Un autre objectif a été d'exploiter d'autres méthodes pour tenter de différencier des espèces pour lesquelles une analyse phylogénétique classique n'a pas permis d'établir les relations entre elles.

Pour ce faire, nous avons réalisé une analyse TCS sur le groupe *Peltigera neckeri* pour obtenir la structure en réseau du groupe et ne pas perdre l'information jugée ambiguë dans les analyses phylogénétiques classiques.

Nous avons aussi développé des primers pour étudier la variation du nombre de répétitions au sein de régions microsatellites chez des espèces du groupe *Peltigera dolichorhiza*, pour étudier la variation génétique au sein de ce groupe. Cette étude se base sur des données du séquençage 454, qui ont permis de développer de nouveaux primers pour amplifier ces régions microsatellites. Il s'agit du premier travail de ce type réalisé sur des lichens.

## 2) Matériel et méthodes

### 2.a Collecte

Les échantillons ont été récoltés sur l'île de la Réunion du 3 au 14 novembre 2009 avec le Prof. Emmanuël Sérusiaux. L'échantillonnage a été réalisé en 24 localités réparties sur l'île afin d'obtenir le plus grand nombre possible d'espèces de Peltigerales. Un exemplaire de chaque espèce de Peltigerales rencontrée a été récolté dans chaque localité. La liste des 24 localités ainsi que leurs coordonnées géographiques, leur altitude et le type de végétation rencontré est fournie dans le tableau en annexe (annexe 1).

Du matériel provenant de récoltes effectuées par Emmanuël Sérusiaux, Maarten Brand et Pieter van den Boom à la Réunion en 2008 a aussi été exploité, ainsi que du matériel en provenance de Madagascar récolté en 2008 par E. Sérusiaux et du matériel en provenance du rift albertin (Rwanda et République Démocratique du Congo) par E. Sérusiaux en 2009.

### 2.b Identification

Les lichens ont été identifiés selon leurs caractéristiques morphologiques. Une première étape a été de déterminer dans la mesure du possible les lichens récoltés à l'aide de deux flores : la flore australienne (McCarthy 2001) et la flore des macrolichens d'Afrique de l'est (Swinscow et Krog 1988). Lorsque ces flores ne donnaient pas un résultat satisfaisant, les lichens ont été déterminés à partir de la littérature existante sur le sujet. Les références supplémentaires utilisées pour déterminer les espèces seront fournies au cas par cas dans la partie 3 (Taxonomie).

### 2.c Extraction de l'ADN génomique

L'ADN a été extrait à partir d'un morceau d'apothécie ou de thalle des spécimens récoltés à la Réunion, pour chaque espèce morphologiquement distincte dans les genres *Peltigera*, *Lobaria*, *Sticta*, *Pseudocyphellaria*, *Pannaria*, *Fuscopannaria*, *Parmeliella*, *Solorina*, *Erioderma* et *Leioderma*. Des extractions d'ADN ont aussi été réalisées à partir d'échantillons provenant d'Afrique centrale (se référer au tableau de l'annexe 2 pour les détails et la liste complète).

L'extraction de l'ADN a été réalisée selon le procédé suivant : un extrait de lichen de 3 à 100 mg est placé dans un tube de 2 ml contenant une bille métallique stérile, lui-même placé dans de l'azote liquide pendant 5 à 10 minutes. Les échantillons sont placés dans un broyeur et broyés à froid.

Après cela, 0.5ml de tampon d'extraction (1% w/v CTAB ; 1M NaCl ; 100mM Tris ; 20mM EDTA ; 1% w/v polyvinyl polypyrrolidone) est ajouté au matériel. Les tubes sont placés dans un bain marie à 70°C pendant 30 minutes et agités régulièrement. Un volume de chloroforme : isoamylalcool 24/1 est ajouté, mélangé vigoureusement et le tube est centrifugé 5 minutes à 10 000g à température ambiante. La phase aqueuse supérieure est récupérée dans un tube neuf et le reste est jeté. Deux volumes de tampon de précipitation (1% w/v CTAB ; 50mM Tris-HCl ; 10mM EDTA ; 40mM NaCl) sont ajoutés au surnageant et le tout est mélangé par inversion pendant 2 minutes. Le mélange est centrifugé à 13 000g pendant 15 minutes à température ambiante et le précipité est collecté. Puis il est resuspendu dans 350 µl de NaCl 1.2 M auquel est ajouté un volume de chloroforme : isoamylalcool (24 :1). Le tout est mélangé avec vigueur et centrifugé 5 minutes à 10 000g à température ambiante. La phase supérieure est récupérée dans un nouveau tube dans lequel 0.6 volume d'isopropanol est ajouté.

Le tube est ensuite mélangé par inversion et est placé 15 minutes à -20°C. Puis le précipité final est collecté par centrifugation à 13 000g à 4°C pendant 20 minutes. L'échantillon est lavé avec 1ml d'éthanol 70% et re-collecté

par centrifugation pendant 3 minutes à 13 000g à 4°C. Le précipité est séché à 50°C avant d'être re-suspendu dans de l'eau (Cubero et al. 1999).

Un numéro de collection est donné à tous les échantillons, dans l'ordre dans lequel ils sont extraits, et à la suite des autres extraits d'ADN de lichen produits par le service. Ce numéro associé à chaque extrait d'ADN sera le numéro utilisé pour qualifier l'échantillon tout au long de cette étude.

## 2.d Amplification de 3 gènes

Trois gènes ont été amplifiés à partir de l'ADN extrait : les ITS nucléaires (ITS1 + 5.8S + ITS2), le gène mitochondrial mtSSU et le gène nucléaire LSU. Ces gènes ont été amplifiés par PCR selon le procédé suivant :

Pour ITS et LSU:

On ajoute à 1 µl d'ADN extrait les quantités de réactifs suivantes : 12.5µl d'un master mix composé d'une enzyme polymérase, de dNTP, de MgCl<sub>2</sub> et d'un tampon, 1.25µl du primer forward 10 mM, 1.25µl du primer reverse 10 mM, 0.5µl de BSA 10 mg/ml, 0.5µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM et 8.5µl de H<sub>2</sub>O.

Ces composés sont fournis par la société Promega ([www.promega.com](http://www.promega.com) , référence produit : M7502 PCR Master Mix).

Les caractéristiques de la PCR sont les suivantes :

Une phase de dénaturation à 95°C d'une minute, puis 25 cycles constitués d'une phase de dénaturation à 95°C de 45 secondes, puis d'une phase d'hybridation à 52°C de 45 secondes, puis une phase d'élongation à 72°C pendant une minute et demi. Ensuite, 15 cycles sont réalisés, ces cycles ont les mêmes caractéristiques que les précédents, sauf pour la phase d'élongation qui est allongée de 5 secondes à chaque cycle. Ensuite, il y a une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes puis les échantillons sont placés à 4°C pour conservation.

Pour mtSSU :

On ajoute à 1µl d'ADN extrait les quantités de réactifs suivantes : 5µl de Kappa enhancer, 5µl de 5x Kappa buffer A avec MgCl<sub>2</sub>, 1µl de primer forward 20 mM, 1µl de primer reverse 20 mM, 0.5µl de dNTP 2.5 mM, 0.5µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 11.4µl d'H<sub>2</sub>O et 0.1µl d'enzyme Kappa2G robust (la Kappa robust est une enzyme taq polymérase mutante qui possède, entre autres, une meilleure résistance aux inhibiteurs)

Ces composés sont fournis par la société Sopachem ([www.sopachem.com](http://www.sopachem.com), référence produit : KK 5517 5518 Kapa2G Robust HotStart)

Les caractéristiques de la PCR sont les suivantes :

Une phase de dénaturation à 95°C pendant 3 minutes puis 25 cycles composés d'une phase de dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, puis une phase d'hybridation à 57°C pendant 15 secondes, puis une phase d'élongation à 72°C pendant 15 secondes. Ensuite, le matériel est placé à 4°C pour conservation.

Les primers utilisés sont les suivants :

Tableau 1. Primers utilisés. Référence : <http://www.lutzonilab.net/primers/>

Gène	Nom du primer	Séquence
ITS Forward	ITS1F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A
	Reverse	ITS4
LSU Forward	LROR	ACC CGC TGA ACT TAA GC
	Reverse	LIC2044
mtSSU Forward	SSU1	AGC AGT GAG GAA TAT TGG TC
	Reverse	SSU3R

Les amplifications sont vérifiées par migration des produits de la PCR dans un gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium, dans un champ électrique de 100 V pendant 25 minutes, dans du TAE. Les bandes positives sont visionnées sous lumière UV.

## 2.e Séquençage

Les produits PCR positifs sont purifiés selon le procédé suivant :

A 25 µl de produit PCR sont ajoutés 3 µl d'un mélange composé de 0.2 µl d'ExoSap et 0.2 µl de Skrimp phosphatase alcaline (SAP) et 2.6 µl d'eau. Ce mélange est placé 15 minutes à 37°C puis 15 minutes à 80°C. Les deux enzymes sont fournies par la société USB ([www.usbweb.com](http://www.usbweb.com), références produits 78201 et 70092Y).

Les produits sont ensuite envoyés pour séquençage à la société Macrogen (<http://www.macrogen.com>) avec les primers correspondants. Trois primers supplémentaires sont envoyés avec les séquences de LSU, afin de s'assurer de disposer de la séquence dans toute sa longueur et avec la meilleure qualité possible. Ces primers sont LR3 (GGT CCG TGT TTC AAG AC), LR3R (GTC TTG AAA CAC GGA CC) et LR6 (CGC CAG TTC TGC TTA CC) (Référence : <http://www.lutzonilab.net/primers/>).

## 2.f Edition – alignement des séquences

Les séquences ont été vérifiées par BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) pour détecter les contaminations et éditées grâce au programme Sequencher version 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan).

Les séquences ont été alignées dans des matrices grâce au programme MacClade (Maddison et Maddison 2002).

A nos séquences de la Réunion ont été ajoutées des séquences d'échantillons récoltés au Rwanda et au Congo (Rift albertin) ainsi qu'à Madagascar, et des séquences provenant de GenBank. La liste complète des séquences utilisées est reprise dans deux tableaux en annexe. Le premier tableau (annexe 2) reprend les échantillons provenant des collections de l'herbarium de Liège, récoltés à la Réunion, en Afrique centrale, à Madagascar ou ailleurs. Le second (annexe 3) reprend les séquences provenant de GenBank.

Le programme MAFFT (Katoh et al. 2002) a été utilisé comme aide à l'alignement, et le programme GBLOCKS version 0.91 (Castresana 2000) pour éliminer les zones ambiguës des matrices. Les paramètres utilisés pour GBLOCKS étaient : « allow smaller final blocks », « allow gap positions within the final blocks » et « allow less strict flanking positions ».

## 2.g Analyses phylogénétiques

Pour chaque étude phylogénétique effectuée dans ce mémoire, sauf indication du contraire, une analyse en maximum de parcimonie et une analyse en maximum de vraisemblance ont été réalisées. Les paramètres des analyses sont les suivants :

L'analyse de parcimonie (Maximum Parsimony) est menée avec PAUP 4.0 (Swofford 2002), en traitant les caractères de façon strictement égale et en traitant les délétions en information manquante. Une première analyse heuristique de branch swapping est menée par NNI (Nearest Neighbor Interchange), avec 1000 réplicats, et en ne retenant que 10 arbres à chaque étape. Les fonctions Steepest descent et MulTrees sont activées. Sur base des arbres conservés, et formant ainsi un ensemble d'îles des arbres les plus parcimonieux, une deuxième analyse est menée par TBR (Tree Branch Swapping), cette fois sans limite au nombre des arbres conservés à chaque étape. L'arbre de 50% consensus est ensuite produit, et soumis à une recherche de support de branches par un bootstrap de 500 pseudoréplicats, toutes les autres options restant en fonction (Steepest descent et MulTrees).

Le modèle de substitution pour le maximum de vraisemblance a été sélectionné selon le critère d'information d'Akaike (Pasada et Buckley 2004) comme implémenté dans Mr. Modeltest v2.3 (Nylander 2004). Le modèle sélectionné pour toutes les analyses correspond à un modèle GTR+G+I (Rodriguez et al. 1990) avec une distribution gamma et une proportion de sites invariables, et 6 taux de substitution différents. Les données produites par Mr. Modeltest pour chaque analyse sont fournies en annexe 4.

Une analyse en maximum de vraisemblance (ML) a été réalisée avec le programme GARLI version 0.951 (Zwickl 2006) et un seul arbre, le plus vraisemblable, a été sélectionné. Une recherche de support de branches par bootstrap a été réalisée, avec un nombre de pseudoréplicats variable selon les analyses et précisé au cas par cas, les autres paramètres étant les mêmes que ceux de l'analyse en ML.

Sauf mention du contraire, l'arbre présenté est toujours le meilleur arbre obtenu par GARLI, et les valeurs de bootstrap de MP et ML sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures ou égales à 70. Certaines valeurs de MP inférieures à 70 ont été indiquées entre parenthèses lorsque cela nous a semblé intéressant.

Les arbres phylogénétiques, après leur création, étaient visualisés avec FigTree (Rambaut 2009). Lorsque l'étude se focalisait principalement sur un genre, le nom du genre en question n'est pas présent dans l'arbre avant le nom de l'espèce, pour ne pas surcharger. Le numéro de récolte est ajouté après le nom de l'espèce lorsqu'il s'agit d'un échantillon récolté par nos soins. Les échantillons sans numéro proviennent de GenBank. Leur numéro d'accession est ajouté sur l'arbre lorsqu'une confusion est possible. Leur provenance a été précisée sauf lorsque nous ne possédons pas l'information.



### 3) Taxonomie

#### Checklist des Peltigerales de la Réunion

Dans cette section, la liste de toutes les espèces de Peltigerales récoltées à la Réunion est présentée, genre par genre, par ordre alphabétique, avec pour chacune la méthodologie d'identification, les sources utilisées ainsi que des renseignements complémentaires, le cas échéant. Les espèces non récoltées mais décrites de la Réunion sont également mentionnées.

La liste des genres inclus dans les Peltigerales est établie au départ de Myconet, journal électronique dédié à la classification des champignons (<http://www.fieldmuseum.org/myconet/>). La dernière livraison de l' « Outline of Ascomycota » remonte au 31 décembre 2007, et est utilisée ici. La classification en familles n'est pas reprise, dans la mesure où elle n'est pas soutenue par la phylogénie récente publiée par Wedin et al. (2009). Seuls les genres détectés sur l'île de La Réunion sont cités, même s'ils n'ont pas été étudiés en détail.

#### ***Coccocarpia* Pers.**

Pour ce genre, la monographie de Arvidsson (1982) fait autorité et a été utilisée. Cinq espèces sont d'ailleurs citées de La Réunion dans cette monographie, et sont considérées comme acceptées. La diversité de ce genre est probablement plus importante, comme le montre une étude plus détaillée de ce genre au Costa Rica (Lücking et al. 2007) dans laquelle quatre espèces nouvelles sont décrites. Les extraits ADN effectués n'ont pas été exploités, mais les séquences ITS montrent une très grande variation dans l'ITS1 et l'ITS2 (au point de quasiment empêcher tout alignement non ambigu).

- *C. erythroxyli* (Spreng.) Swinscow et Krog. Espèce pantropicale, débordant largement dans les régions tempérées chaudes.
- *C. palmicola* (Spreng.) Swinscow et Krog. Espèce pantropicale, débordant largement dans les régions tempérées chaudes.
- *C. pellita* (Ach.) Müll. Arg. Espèce pantropicale.
- *C. pruinosa* L. Arvidss. Type de La Réunion. Également connue de Nouvelle-Calédonie, et probablement plus largement répandue dans les Paléotropiques.
- *C. smaragdina* Pers. Espèce pantropicale.
- *C. stellata* Tuck., espèce nouvelle pour La Réunion, abondante dans les Néotropiques mais également connue d'Ouganda, du Kenya et de Maurice (Swinscow et Krog 1988).

#### ***Collema* F.H. Wigg.**

Non étudié. Peu de matériel disponible : des récoltes ramenées des deux missions de 2008 et 2009, il apparaît que ce genre est peu présent sur l'île. A noter que la distinction classique entre *Collema* et *Leptogium* (absence de cortex pour le premier, et présence pour le second) n'est pas supportée par les récentes analyses phylogénétiques (Wedin et al. 2009 ; Otálora et al. 2010).

#### ***Dendriscoaulon* Nyl.**

Il s'agit du nom de genre donné au cyanomorphe de *Lobaria* et *Sticta* lorsqu'il a un thalle fruticuleux, formant des petits buissons. Notamment décrit comme photomorphe de *Sticta wrightii* en Chine (Takahashi et al. 2006) et comme photomorphe de *Sticta oroborealis* sur la côte pacifique d'Amérique du Nord (Tonsberg et Goward 2001). Également décrit comme photomorphe de *Lobaria amplissima* et *Lobaria fendleri* (Stenroos et al. 2003). Considéré comme synonyme des noms des chlorobiontes, mais conservé par commodité (Jørgensen 1998).

Récolté à la Réunion, se développant seul, et cyanomorphe de *Lobaria discolor* (déterminé sur base de la séquence ITS). Peut donc être considéré comme synonyme de *Lobaria discolor*.

#### ***Erioderma* Fée**

La littérature pour ce genre, a priori bien délimité, est à la fois fragmentée et confuse ; heureusement une étude taxonomique et nomenclaturale des épithètes disponibles a été publiée par Jørgensen (2001). Le genre est fort

diversifié, en particulier dans les Andes (Jørgensen et Arvidsson 2002) et dans le sud-est de l'Asie (Jørgensen et Sipman 2002). Une synthèse des données disponibles a été effectuée tout récemment par Jørgensen et al. (2009) pour La Réunion, comprenant notamment la description d'une espèce nouvelle *E. borbonicum*, à ce jour considérée comme endémique de l'île. L'identification de notre matériel a été faite sur cette base, en s'appuyant également sur l'ensemble de la littérature (Jørgensen et Arvidsson 2001, Jørgensen et James 2001) puisque le matériel disponible en provenance du Congo RDC (Kivu), du Rwanda et des Açores (île de Pico) a également été intégré dans l'analyse phylogénétique.

- *E. papyraceum* P. M. Jørg. et L. Arvidss. Espèce présente en Amérique du Sud et à la Réunion.
- *E. solediatum* P. M. Jørg. et D. J. Galloway. L'espèce est mentionnée de Maurice par David et Hawksworth (1995). Espèce pantropicale, facile à confondre avec *Leioderma solediatum* D. Galloway et P. M. Jørg., qui se distingue de *Erioderma solediatum* par sa face supérieure arachnoïde (et non avec des poils dressés) et sa réaction Pd- (et non Pd+, dû à l'ériodermine) (Galloway et Jørgensen 1987).
- *E. borbonicum* P. M. Jørg. et van den Boom, espèce récemment décrite et seulement connue de La Réunion (Jørgensen et al., 2009).
- *E. groendaliana* (Ach.) Vain. Type de La Réunion (Jørgensen 2001), mais repris comme décrit de Maurice (Jørgensen et al. 2009) = *E. polycarpum* Fée. Espèce de distribution concentrée sur l'hémisphère Sud : partie méridionale de l'Amérique du Sud, atteignant le Sud du Brésil et les îles de Juan Fernandez, l'Atlantique Sud (Tristan da Cunha) et les Mascareignes.
- *E. unguigerum* (Bory) Nyl. Type de La Réunion (voir Jørgensen 2001), espèce pantropicale.
- *E. leylandii* (Taylor) Müll. Arg. Non récolté lors des missions de 2008 et 2009, espèce pantropicale.

#### ***Fuscopannaria* P.M. Jørg.**

Taxon reconnu au rang de genre par Jørgensen (1994) avec comme espèce-type *F. leucosticta* (Tuck.) P. M. Jørg., essentiellement connu dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord, et surtout différencié dans le nord-ouest Américain (Jørgensen 2001). Il se reconnaît à son thalle crustacé à squamuleux, de couleur orange-brun à brun, ses asques avec des structures amyloïdes dans l'apex, un hyménium I+ bleu-vert, devenant rouge-brun, et ses spores à parois lisses ou quasiment, mais jamais verruqueuses.

Dans notre matériel de La Réunion, deux espèces ont été facilement identifiées, en l'occurrence *F. leucosticta* et *F. praetermissa* — les séquences obtenues ont d'ailleurs confirmé ces identifications. Deux autres espèces ont été rapportées à ce genre sur base de la consultation des descriptions disponibles dans la littérature ; ces identifications doivent être confirmées par confrontation avec les types. Il s'agit de *F. siamensis* P. M. Jørg. et P. Wolseley, espèce distinctement lobée et formant des rosettes de couleur grise (en cela, elle ne se conforme donc guère aux critères distinctifs du genre), avec de nombreuses phyllidies laminales, facilement érodées (Jørgensen 2002a), et de *F. subimmixta* (C. Knight) P. M. Jørg., de morphologie générale assez voisine, et également avec des phyllidies mais davantage marginales et cylindriques et donc pratiquement identiques à des isidies (Jørgensen 2002b).

A noter que l'espèce bien connue dans les régions tempérées *Fuscopannaria leucophaea* a été transférée dans le genre *Vahliella* P. M. Jørg (Jørgensen 2008), lequel occupe la position de groupe-sœur de toutes les espèces des Peltigerineae (comprenant les Massalongiaceae, les Peltigeraceae, les Lobariaceae et les Nephromataceae), et n'appartient donc pas aux Pannariaceae (Wedin et al. 2009). Sept autres espèces sont assignées à ce genre, et aucune n'a été détectée dans notre matériel.

- *F. leucosticta* (Tuck) P. M. Jørg. Espèce très largement répandue dans le monde mais surtout abondante dans les forêts tempérées de l'Est Américain et en Orient (Japon, Corée, Chine et Philippines). Espèce nouvelle pour La Réunion où elle abonde dans les fourrés humides d'altitude (avoues). Distribution globale dans Jørgensen et Sipman (2007).
- *F. praetermissa* (Nyl.) P. M. Jørg. Découverte étonnante de cette espèce au Col de Taïbit à La Réunion, alors que cette espèce est connue comme arctique-alpine et également connue de l'Antarctique (Smith et al. 2009) ; elle est cependant connue du Mt Kenya et du Karisimbi au Rwanda (spécimen à LG).
- *F. siamensis* P. M. Jørg. et P. Wolseley. Espèce connue de Corée, d'Inde et de Thaïlande ; si l'identification est confirmée, l'espèce est nouvelle pour La Réunion (Jørgensen 2002a).

- *F. subimmixta* (C. Knight) P. M. Jørg. Espèce connue de Nouvelle-Zélande, du sud-est de l'Australie (y compris la Tasmanie), de la région du Cap en Afrique du Sud et des îles Magellan au Chili ; si l'identification est confirmée, l'espèce est nouvelle pour La Réunion (Jørgensen 2002b). Cette espèce apparaît en tout cas comme de répartition typiquement australe.

***Kroswia*** P.M. Jørg.

Genre récemment décrit pour deux espèces des Paléotropiques (Jørgensen 2002c ; Jørgensen 2007), dont une est connue de La Réunion. Sa position phylogénétique n'est pas connue (Wedin et al. 2009) et n'a pas été étudiée dans le cadre de ce travail.

- *K. crystallifera* P. M. Jørg. Espèce paléotropicale.

***Leioderma*** Nyl.

Genre circonscrit une première fois par Galloway et Jørgensen (1987) et dont le sous-genre *Fuscoderma* a ensuite été élevé au rang de genre (Jørgensen et Galloway 1989).

- *L. erythrocarpum* (Delise ex Nyl.) D. Galloway et P. M. Jørg. Type de La Réunion. Espèce présente dans les îles du Pacifique Sud, en Nouvelle-Zélande, en Asie du sud-est, dans les Mascareignes et à Madagascar.
- *L. sorediatum* D. Galloway et P. M. Jørg. Nouveau pour La Réunion, la distribution de l'espèce est vaste puisqu'elle comprend toute la ceinture du Pacifique, l'Indonésie, l'Inde, le Sri Lanka et la Thaïlande (Jørgensen et Wolseley 2009). Espèce facilement confondue avec *Erioderma sorediatum* (voir sous cette espèce).

***Leptogium*** (Ach.) Gray

Non étudié. Matériel disponible abondant et comprenant environ une dizaine d'espèces. Voir commentaire complémentaire dans le paragraphe sur *Collema*.

***Lobaria*** (Schreb.) Hoffm.

Quatre espèces ont été observées, dont une seule (*L. retigera*) est lichénisée avec des cyanobactéries. L'identification suit la clé de Swinscow et Krog (1988) pour l'Afrique de l'Est, et les données de Sipman (2004) ont été attentivement consultées. A noter que le gr. de *Lobaria pulmonaria* a fait l'objet d'une étude phylogénétique récente pour la Macaronésie par C. Scheidegger et son équipe (Werth et al. 2010) qui distinguent trois espèces (*L. immixta* Vain., *L. macaronesica* ined. et *L. pulmonaria*). Dans le matériel de La Réunion et d'Afrique continentale, seul *L. pulmonaria* a été détecté.

- *L. discolor* (Delise) Hue. Type de La Réunion. Espèce paléotropicale.
- *L. patinifera* (Taylor) Hue. Espèce pantropicale.
- *L. pulmonaria* (L.) Hoffm. Espèce largement répandue dans tout l'hémisphère Nord (y compris zones boréales) et localement présente dans les zones tropicales.
- *L. retigera* (Bory) Trev. Type de La Réunion. Espèce paléotropicale, également présente en Australie et en Nouvelle-Zélande ; également mentionnée de la côte nord-ouest de l'Amérique.

***Nephroma*** Ach.

Deux taxons appartenant au gr. de *N. helveticum* (James et White 1987, White et James 1988) ont été identifiés au sein du matériel de La Réunion. Le premier semble proche de *N. rufum* (Church. Bab.) P. James (espèce connue de Nouvelle-Zélande, Australie et Papouasie Nouvelle-Guinée), tandis que le deuxième a toujours un haplotype identique à celui des populations échantillonnées dans le Rift Albertin, et qui n'est pas connu ailleurs dans le monde. Le complexe de *N. helveticum*, cosmopolite (absent seulement en Antarctique), est en cours d'étude au sein du laboratoire et semble contenir au moins cinq espèces distinctes, avec une importante diversité dans l'Himalaya, non encore élucidée. Le matériel de La Réunion n'est pas étudié plus en détail dans le cadre de ce travail et donc rapporté à *N. helveticum* Ach. s. l. (incl. *N. tropicum* Müll. Arg.)

- *N. helveticum* Ach. s. l.

### **Pannaria** Del. ex Bory

Le genre *Pannaria*, dans sa circonscription actuelle (Jørgensen 2003), est caractérisé par un thalle squamuleux, parfois presque crustacé, à foliacé, généralement gris bleuté, des apothécies avec marges thallines, un hyménium l+bleu, des asques sans structures apicales amyloïdes, et des spores à paroi lisse ou presque. Ainsi délimité, le genre est quasi cosmopolite et très riche en espèces. Il est proche du genre *Psoroma* qui se distingue par la présence de structures apicales amyloïdes dans les asques, et des spores à paroi verruqueuse.

Plusieurs espèces sont présentes à La Réunion, et leur identification s'est faite sur base morphologique et chimique (en particulier la réaction à la paraphénylènediamine) en exploitant la littérature suivante : Jørgensen (2000, 2001d, 2001e, 2003b, 2003c), Jørgensen et Kashiwadani (2001). Le groupe de *P. rubiginosa* comprend, pour La Réunion, cette espèce, *P. complanata* et *P. planiuscula* ; le groupe de *P. lurida* comprend cette espèce et *P. elatior* (dont la distinction d'avec *P. ramosii* Vain. — décrite des Philippines et citée de Tanzanie et des Mascareignes — ne nous apparaît pas claire) et *P. multifida*.

- *P. complanata* P. M. Jørg. Espèce connue de Java, du Sri Lanka, de l'Inde et d'Afrique de l'Est. Cité de La Réunion par Schumm et Aptroot (2010).
- *P. elatior* Stirt. Espèce connue d'Afrique du Sud et du Sud-Est des USA, appartenant au gr. *lurida*, particulièrement confus, et probablement confondue avec *P. ramosii*.
- *P. multifida* P. M. Jørg. Type de La Réunion, espèce également connue à Maurice.
- *P. planiuscula* P. M. Jørg. Connue du Kenya et d'Afrique du Sud. Nouveau pour La Réunion.
- *P. rubiginosa* (Ach.) Bory. Espèce souvent citée de diverses régions du monde, et parfois même décrite comme cosmopolite.
- *P. sp.* Espèce à thalle très mince et apprimé mais distinctement lobé, avec un hypothalle noir très net, pour laquelle aucun épithète pertinent n'a pu être trouvé.

### **Parmeliella** Müll. Arg.

Dans le Conspectus des représentants des Pannariaceae (Jørgensen 2003a), le genre *Parmeliella* est constitué de deux entités distinctes : *Parmeliella s. str.* dont le type est *P. triptophylla* (Ach.) Müll. Arg. et du groupe de *P. mariana*.

Une espèce, identifiée sur le terrain comme *P. triptophylla*, s'est en fait révélée légèrement différente et est rapportée à *P. triptophylloides* P. M. Jørg., récemment décrite du Mt Kenya (Jørgensen 2003b) — sous réserve de comparaison avec la collection-type.

Le groupe de *Parmeliella mariana* est très caractéristique : thalle à rosettes généralement circulaires et pouvant atteindre de grandes tailles, avec un prothalle noir très développé et dépassant largement les lobes eux-mêmes (donnant ainsi l'impression d'un véritable « coussinet mousseux »), surface des lobes typiquement maculée, apothécies avec un bord thallin très net et asques avec des structures tubulaires amyloïdes à l'apex. Malgré cet ensemble de caractères, le groupe n'est pas reconnu au niveau du genre (Jørgensen 2003), et reste taxonomiquement très embrouillé, notamment du fait de la description récente et mal documentée de plusieurs espèces en Inde (Jørgensen 2009). Nos déterminations suivent les indications de Schumm et Aptroot (2010) et reconnaissent trois espèces à La Réunion : *P. brisbanensis* (C. Knight) P. M. Jørg. et Galloway, *P. mariana* (Fr.) P. M. Jørg. et Galloway, et *P. stylophora* (Vain.) P. M. Jørg. Il semble que ces trois taxons soient pantropicaux.

- *P. brisbanensis* (C. Knight) P. M. Jørg. et Galloway
- *P. mariana* (Fr.) P. M. Jørg. et Galloway
- *P. stylophora* (Vain.) P. M. Jørg.
- *P. triptophylloides* P. M. Jørg. Connue uniquement du Mt Kenya. Nouvelle pour La Réunion

### **Peltigera** Willd.

Genre étudié depuis de nombreuses années dans le laboratoire et pour lequel une littérature bien structurée existe (p. ex. Vitikainen 1994, Sérusiaux et al. 2009). Le genre n'en est pas moins difficile, tant la variation

détectée dans les marqueurs moléculaires est grande (O'Brien et al. 2009), laissant percevoir l'existence de nombreuses espèces cryptiques. C'est d'ailleurs sur ce genre que la recherche de marqueurs nouveaux avec la nouvelle génération de séquençage du 454 a été menée. Par ailleurs, depuis que Miadlikowska et al. (2003) ont montré qu'une région hypervariable de l'ITS1 constituait une véritable signature spécifique, il est utile de vérifier les déterminations effectuées sur base morphologique et chimique, avec une séquence ITS — et ainsi effectuer une identification de type « bar-coding ». Cela a été fait en particulier pour *P. praetextata* et *P. sorediifera*, tous les deux nouveaux pour La Réunion. *P. sorediifera* est maintenant connu d'Afrique du Sud (région du Cap), du Rift Albertin et du Mt Kenya, de La Réunion, d'Australie et de Nouvelle-Zélande (Vitikainen 2008 ; Louwoff 2009) ; on peut donc considérer que cette espèce est essentiellement centrée sur l'hémisphère Sud dans l'Ancien Monde.

- *P. praetextata* (Flörke ex Sommerf.) Zopf. Espèce subcosmopolite.
- *P. sorediifera* (Nyl.) Vitik. (= *P. lambinonii* Goffinet ; Vitikainen 2008). Nouvelle pour La Réunion.
- *P. polydactyloides* Nyl. Espèce jusqu'ici connue uniquement des montagnes d'Afrique continentale, essentiellement en Afrique de l'Est. Nouvelle pour La Réunion.
- *P. ulcerata* Müll. Arg. Espèce pantropicale, connue également des zones tempérées de l'hémisphère Sud.
- *P. dolichorhiza* (Nyl.) Nyl. Espèce pantropicale, très mal délimitée par rapport à *P. neopolydactyla*, et abordée plus en détail dans le cadre de ce travail.

#### ***Physma* A. Massal.**

Genre classiquement placé dans les Collemataceae, mais intégré dans les Pannariaceae par les récentes analyses phylogénétiques (Wedin et al. 2009 ; Otálora et al. 2010).

- *P. byrsaemum* (Ach.) Tuck. Espèce pantropicale.

#### ***Pseudocyphellaria* Vain.**

Genre bien connu des Peltigerales et aisément reconnu par la présence de pseudocyphelles à la face inférieure du thalle. Dans cette circonscription, le genre est quasi cosmopolite mais est essentiellement diversifié dans l'hémisphère Sud, et plus particulièrement encore dans les zones tempérées (p. ex. 53 espèces sont reconnues au-dessous de 30° de latitude Sud en Amérique du Sud : Galloway et Arvidsson 1990). Dès la publication des premières phylogénies moléculaires de Peltigerales (Thomas et al. 2002), il est apparu que *Pseudocyphellaria* était polyphylétique, ce qui est encore récemment confirmé par l'étude détaillée des Lobariaceae par Högnabba et al. (2009). Cette question est à nouveau abordée dans ce travail, de même que le statut d'une des espèces les plus connues, *P. crocata* (L.) Vain. dont la diversité a déjà été détectée par Miadlikowska et al. (2002) pour le Nord-Ouest américain.

La liste d'espèces ci-après est établie sur base des caractères morphologiques classiques de Galloway (1988) pour les espèces de Nouvelle-Zélande, Swinscow et Krog (1988) pour l'Afrique de l'Est, Galloway et Arvidsson (1990) pour les espèces d'Equateur, et Galloway et al. (2001) dans la Flora of Australia. Notons tout particulièrement les critères distinctifs dans le gr. *crocata* : *crocata* a des sorédies, *desfontainii* a des sorédies grossières à verruqueuses, presque isidiées, et *dozyana* a une face supérieure fovéolée et des sorédies marginales gris bleu mais jaunâtres sur leur côté inférieur.

- *P. argyracea* (Delise) Vain. Type de La Réunion. Espèce pantropicale, débordant largement dans les régions tempérées chaudes des deux hémisphères.
- *P. aurata* (Ach.) Vain. Espèce pantropicale, débordant largement dans les régions tempérées chaudes des deux hémisphères.
- *P. clathrata* (De Not.) Malme. Espèce connue dans les régions tropicales d'Amérique du Sud et d'Afrique continentale. Connue de La Réunion d'une seule récolte effectuée par J. L. De Sloover en 1973 (LG).
- *P. crocata* (L.) Vain. Espèce pantropicale, débordant largement dans les régions tempérées chaudes des deux hémisphères.
- *P. desfontainii* (Delise) Vain. Type de La Réunion. Répartition mal connue, peut-être pantropicale.

- *P. dozyana* (Mont. et Bosch) D. Galloway. Répartition mal connue, peut-être pantropicale.

#### ***Psoroma*** Ach. ex Michaux

La délimitation entre ce genre et *Pannaria* est restée très peu étudiée jusqu'au travail récent de Passo et al. (2008) qui, sur base d'une phylogénie moléculaire, démontre son extrême hétérogénéité. Ces auteurs montrent d'une part que la très forte isolation de l'espèce *Psoroma cephalodinum* pour laquelle ils décrivent le nouveau genre *Joergensenia*, et d'autre part qu'une part importante des espèces de l'hémisphère Sud qui lui sont rapportées sont en fait des *Pannaria*.

Une seule espèce est détectée dans notre matériel de La Réunion et est rapportée à *P. subhispidulum* Nyl., espèce décrite de l'île. Cette détermination doit être considérée comme provisoire puisqu'elle n'est pas basée sur une étude critique du matériel originel et que cette espèce n'est pas signalée par ailleurs. Une autre espèce est signalée dans la checklist de l'île (Feuerer 2010) : *P. sphinctrinum* (Mont.) Nyl.

- *P. subhispidulum* Nyl. Type de La Réunion.

#### ***Solorina*** Ach.

Une seule espèce observée et déterminée en suivant Krog et Swinscow (1986). L'espèce est d'ailleurs citée du Rift Albertin (RDC, Mt Mikeno) et une collection du Rwanda, Mt Bisoke récoltée en oct. 2009 (matériel à LG) est identique.

- *S. sinensis* Jatta. Espèce connue d'Afrique et d'Asie tropicales.

#### ***Sticta*** (Schreb.) Ach.

Genre très caractéristique de par ses cyphelles corticées et formant de petits cratères bien nets à la face inférieure du thalle, *Sticta* est un genre quasi cosmopolite et très caractéristique des forêts tropicales de montagnes et tempérées humides. Incontestablement riche en espèces, le genre reste mal connu. La détermination des espèces récoltées à La Réunion nous a posé de nombreux problèmes, laissant plusieurs espèces bien caractéristiques sans épithète connu et bouleversant quelques concepts spécifiques jusqu'ici bien arrêtés (la présence de *S. fuliginosa* et de *S. limbata* en régions tropicales p. ex.). Pour mieux appréhender la diversité du genre, nous avons inclus dans notre travail le matériel récemment récolté par E. Sérusiaux à Madagascar (2008) et dans le Rift Albertin (2009). Ce sont ainsi pas moins de 27 taxons qui peuvent être reconnus. La détermination du matériel s'est basée sur Swinscow & Krog (1988 ; Flora of East Africa) et Galloway (1998 et 2001 ; Flora of Australia) ; nous n'avons pas investigué la littérature du Nouveau Monde, partant de l'observation qu'il y a tellement d'hétérogénéité dans les données (voir p. ex. les accessions de *S. fuliginosa* et *S. weigeli* dans GenBank) qu'une telle démarche serait, en l'état actuel des connaissances sur le genre, assez vaine.

Lorsque le photobionte n'est pas mentionné dans la liste ci-après, cela signifie qu'il s'agit d'une cyanobactérie (*Nostoc*) ; les espèces lichénisées avec une algue verte sont donc indiquées comme telles.

- *S. afrofuliginosa* ad. int. Sont rapportées à cet épithète provisoire les collections du Rift Albertin, de Madagascar et de la Réunion que la clé de Swinscow & Krog (1988) nomme *S. fuliginosa* : elles sont pourtant bien différenciées par des thalles de grande taille, monophylles, très fins et fort fragiles, avec une face inférieure très pâle, orangée à rose à l'état frais. D'après nos observations, il est donc fort probable que *S. fuliginosa* n'existe pas en Afrique tropicale. Voir également sous *S. fuliginosa*.
- *S. ambavillaria* (Bory) Ach. Type de La Réunion. Etant donné la distinction établie ici avec deux taxons morphologiquement proches (*S. foveolata* et *S. tomentosa* ; voir sous ces épithètes), la répartition exacte de *S. ambavillaria* ne peut pas être établie. L'espèce est jusqu'ici considérée comme pantropicale, mais n'a pas été détectée dans notre matériel du Rift Albertin et de Madagascar.
- *S. arbusculoides* ad. int. Espèce très caractéristique avec son thalle de taille moyenne (lobes < 2 cm de large), produisant quelques apothécies laminales à marge ciliée, et avec des lobes très découpés produisant de petits arbuscules boursofflés de petites isidies très délicates. Aucun épithète n'a été détecté pour cette espèce, connue d'une seule récolte à La Réunion.

- *S. borbonica* ad. int. Espèce de petite taille, typiquement bleu assez clair, avec une surface marbrée, des isidies laminales et marginales, peu abondantes, se transformant parfois en petits lobules, et avec une face inférieure beige clair à presque blanche, avec de minuscules cyphelles au bord des lobes. Cette espèce ne peut être rapportée à *S. diversa*, détectée par ailleurs et dont la médulle réagit K+jaune (ici sans réaction). Uniquement trouvée à La Réunion, et aucun épithète valide ne semble s'y rapporter.
- *S. caperata* (Nyl.) Nyl. Type de La Réunion. Grande espèce à lobes arrondis et généralement fertile, à algue verte, et généralement abondamment fertile. Espèce connue de Madagascar, des Comores, de La Réunion, d'Australie et des îles du Pacifique occidental (Galloway 1998).
- *S. cyphellulata* (Müll. Ag.) Hue. Espèce bien caractéristique par sa petite taille (thalle < 3-4 cm), son thalle palmé avec un pied court mais distinct, ses isidies marginales, souvent abondantes et coralloïdes, et ses grandes cyphelles. Uniquement observé dans le matériel de La Réunion. Espèce considérée comme paléotropicale.
- *S. dichotoma* Delise. Type de La Réunion. Grande espèce à lobes très allongés, dichotomiquement ramifiés, et à extrémités tronquées, et abondamment pourvus d'apothécies ; espèce à algue verte. Connue des Mascareignes (Maurice et La Réunion) et de Tanzanie.
- *S. diversa* (Stirt.) Zahlbr. Espèce uniquement détectée dans le matériel de La Réunion, et assez classique dans le sens où elle a un thalle de taille moyenne (lobes < 2 cm de large) avec des isidies marginales. La surface du thalle est cependant maculée-marbrée et la médulle réagit K+ jaune-orange. *S. diversa* était jusqu'ici considérée comme une endémique australienne (Galloway 2001).
- *S. diversa* 2. Espèce morphologiquement voisine de *S. diversa* mais s'en distinguant par la couleur jaune à orangé d'une partie des cyphelles (bord et/ou fond de la cyphelle), et que nous avons dès lors isolée. Aucun épithète n'a été trouvé pour cette espèce, uniquement détectée dans les collections de La Réunion.
- *S. duplolibata* (Hue) Vain. Espèce à thalle de taille moyenne (lobes < 2 cm de large) et produisant abondamment des isidies plus ou moins coralloïdes à la marge et à la surface du thalle, typiquement entremêlées de cils plus ou moins foncés dans les jeunes lobes. Espèce détectée dans le Rift Albertin et à La Réunion, précédemment uniquement connue du Queensland (Australie), et en Asie du Japon au Sri Lanka), nouvelle pour l'Afrique.
- *S. foveolata* ad. int. Espèce formant de grands lobes arrondis (jusqu'à 3-4 cm de diam.), avec apothécies laminales et ressemblant donc à *S. ambavillaria*, et très caractéristique par sa surface fovéolée. Aucune description ne semble correspondre à cette espèce, connue uniquement dans le Rift Albertin. Espèce très proche de *S. pustulata* dont elle se distingue par l'absence de dactyles se résolvant en sorédies.
- *S. fuliginosa* (Hoffm.) Ach. Cette espèce est considérée comme subcosmopolite mais est assurément très hétérogène comme le démontrent les différentes accessions de GenBank. Le type provient du Pays de Galles, et nous considérons donc notre matériel en provenance des Vosges (France) comme représentatif de l'espèce. Ainsi délimitée, cette espèce n'est pas représentée dans notre matériel : ce qui est décrit comme *S. fuliginosa* dans Swinscow & Krog (1988) est rapporté à *S. afrofuliginosa* (voir sous cette espèce). Une seule collection a un haplotype voisin et est ici provisoirement rapportée à *S. fuliginosa* bien qu'elle en diffère par son thalle palmé, avec des lobes allongés (une seule récolte du Rift Albertin).
- *S. macrophylla* Delise. Type de Maurice. Espèce de grande taille avec des lobes atteignant 4 cm, à consistance de cuir, et quasiment noir à l'état frais. Détectée dans notre matériel de La Réunion. Galloway (1995) recense les mentions de cette espèce : Comores, région du Cap en Afrique du Sud et Panama.
- *S. orbicularis* (Braun) Hue 1 et 2. Espèce avec un thalle plus ou moins palmé, parfois courtement stipité, lobes de taille moyenne (< 2 cm de large) avec une marge découpée-laciniée et munie de minuscules phyllidies très découpées et fragiles, face inférieure brun orangé, parfois assez claire. Deux haplotypes étant distincts, nous avons cherché à les distinguer morphologiquement, sans succès. Ils sont cependant notés *S. orbicularis* 1 et 2. Identification faite en suivant Swinscow & Krog (1988) et espèce uniquement observée dans les collections du Rift Albertin.
- *S. paleoweigeli* ad. int. Tout comme *S. fuliginosa*, et dans une certaine mesure *S. limbata* (voir sous ces noms), l'épithète *weigeli* (Ach.) Vain. fonctionne « par défaut » dans la littérature portant détermination des *Sticta* : dès qu'un thalle contient une cyanobactérie, a des lobes plus ou moins palmés et des isidies laminales et marginales, et aucune autre caractéristique, cet épithète lui est attribué. Comme le montrent les accessions de GenBank, cette espèce est tout à fait hétérogène. Celle de la République Dominicaine dans les Antilles peut être

considérée comme représentative du type, provenant de Martinique. Notre matériel de la Réunion qui peut morphologiquement être tout à fait assimilé à *weigeli* est quasi identique à une accession de Taïwan, mettant ainsi l'accent sur un éventuel taxon à distinguer dans les Paléotropiques. Nous l'avons dès lors appelé provisoirement *paleoweigeli*. Notons combien le groupe reste complexe, même dans le Nouveau Monde (McDonald et al. 2003). Une note récente sur l'identité du type et la nomenclature de l'espèce a d'ailleurs rajouté à la confusion générale (Galloway 2006).

- *S. plumbea* Delise 1 et 2. Type de La Réunion. Egalement connue de Maurice. Espèce à lobes allongés, assez grands (2-6 cm de long) et plus ou moins tronqués aux extrémités, typiquement bleus. Dans la mesure où deux haplotypes distincts ont été détectés, deux taxons sont reconnus sous *S. plumbea* 1 et 2. Il n'est pas possible, avec les éléments disponibles, de savoir auquel des deux le type appartient.
- *S. pustulata* ad. int. Espèce formant de grands lobes arrondis (jusqu'à 3-4 cm de diam.), souvent découpés à la marge, sans apothécies, avec une surface plus ou moins distinctement fovéolée ; production laminaire et souvent marginale de dactyles typiques, finissant par éclater et par se résoudre en masses sorédiées. Swinscow & Krog (1988) décrivent correctement les dactyles caractéristiques de cette espèce, qu'ils rapportent à *S. limbata*, espèce sorédiée des régions tempérées et qui se différencie facilement par ses soralies typiques (même si elles sont bordées par le cortex qu'elles ont brisé), bien différentes des dactyles produits par *S. pustulata*. Il nous semble certain que la description de *S. limbata* de Swinscow & Krog (1988) dans leur Flore d'Afrique de l'Est se rapporte à des populations de *S. pustulata*.
- *S. sorediata* ad. int. Le matériel rapporté à ce taxon a d'abord été identifié comme *S. sublimbata*, mais sa marge sorédiée est cependant plus fine, et ne prolifère pas en isidies. Uniquement détectée dans le matériel de La Réunion où elle est rare. Aucun épithète validement publié ne semble s'y rapporter.
- *S. sublimbata* (Steiner) Swinscow & Krog. Le matériel rapporté à cette espèce, en provenance du Rift Albertin et de La Réunion, correspond bien à la description de Swinscow & Krog (1988) : thalle de taille moyenne (lobes < 2cm de large) avec marges sorédiées avec prolifération d'isidies coralloïdes. Espèce décrite comme pantropicale par Swinscow & Krog (1988).
- *S. tomentosa* (Sw.) Ach. Espèce morphologiquement voisine de *S. ambavillaria*, s'en distinguant par son thalle plus palmé qu'arrondi, avec des lobes plus ou moins allongés et ses marges souvent abondamment pourvues de cils touffus. Espèce considérée comme pantropicale, détectée dans le matériel du Rift Albertin, de Madagascar et de La Réunion. Identification effectuée en suivant Swinscow & Krog (1988). L'espèce n'est pas citée dans la Flore d'Australie (Galloway 2001) où elle semble être remplacée par *S. subtomentella* (C. Knight ex Shirley) Zahlbr, mais, dans son commentaire explicatif des différences entre les deux espèces, Galloway (1998) semble bien décrire *S. ambavillaria* sous le nom de *S. tomentosa*. Si l'application de l'épithète est évidente dans notre matériel (le type vient de La Réunion), celle de *S. tomentosa* l'est beaucoup moins. En effet, l'étude de ces épithètes par Galloway (1994, 1995) n'aborde pas les (éventuelles) différences entre *S. tomentosa* (type de la Jamaïque) et *S. ambavillaria*.
- *S. variabilis* Ach. Type de La Réunion. (= *S. papyracea* Delise ; type de La Réunion). Grande espèce à algue verte, bien caractérisée par des lobes longs, linéaires et à extrémités tronquées, une marge très découpée et produisant des phyllidies très divisées et d'assez grande taille ; apothécies généralement présentes. Une espèce voisine est rapportée à *S. sp. 2*. Avec la documentation disponible (Galloway 1995), il n'est pas possible de savoir auquel des deux taxons détectés à La Réunion (et partageant les deux caractéristiques d'avoir des phyllidies et une algue verte) se rapportent les épithètes validement publiés *variabilis* et *papyracea* ; dans l'attente d'un examen direct des collections-types, nous avons choisi de maintenir l'option prise par Swinscow & Krog (1988) et Galloway (1995), à savoir de maintenir les deux épithètes en synonymie et d'utiliser le plus ancien (*variabilis*) pour l'espèce la plus commune. Par ailleurs, *S. baileyi* D. J. Galloway, endémique australienne (Galloway 1998), pourrait bien se rapporter à l'une d'entre elles. *S. variabilis* est considéré comme une espèce paléotropicale.
- *S. xanthotropa* (Krempelh.) Galloway. Sans discussion, Galloway & Thomas (2004) élèvent ce taxon au rang d'espèce alors qu'il était jusqu'ici généralement traité comme variété de *S. weigeli* (Swinscow & Krog 1988). Ce taxon se distingue facilement par ses phyllidies marginales très abondantes versus des isidies vraies chez *S. weigeli* s. l. Connu d'une seule récolte à La Réunion.
- *S. sp. 1*. Espèce uniquement détectée dans les collections de Madagascar, et caractérisée par un thalle à algue verte, des lobes assez courts mais allongés et tronqués, dichotomiquement branchés, et avec de petites



phyllidies latérales, arrondies ou allongées, parfois absentes. Les marges des jeunes lobes et des phyllidies sont généralement munis de cils courts, hyalins ou brunâtres. A noter que cette espèce est identifiée *S. papyracea* Delise par le site <http://www.tropicallichens.net/3153.html>

- *S. sp. 2.* Espèce uniquement détectée dans les collections de La Réunion, et morphologiquement proche de *S. variabilis*, dont elle diffère par des lobes plus courts et arrondis, des phyllidies généralement plus étroites et moins divisées, et par des apothécies absentes ou peu nombreuses. Voir commentaires supplémentaires sur *S. variabilis*.
- *S. sp. 3.* Espèce uniquement détectée dans les collections de Madagascar, et caractérisée par un thalle à algue verte, des lobes arrondis, à surface typiquement pruineuse à la marge, avec de petites phyllidies latérales, arrondies ou allongées, parfois absentes. Aucun épithète validement publié ne semble s'y rapporter.
- *S. sp. 4.* Espèce à algue verte, et à thalle à lobes allongés et dichotomiquement ramifiés, mais se différenciant de *S. dichotoma* par sa couleur brune et des extrémités plus arrondies. Une seule récolte de La Réunion.

## 4) Phylogénie

### 4.a Pannariaceae

#### 4.a.1 Méthode et résultats

Nous avons réalisé une étude phylogénétique au niveau de la famille des Pannariaceae (*sensu* Passo et al. 2008). L'objectif était de déterminer la position de toutes les espèces de Pannariaceae rencontrées à la Réunion. Nous avons donc exclu de cette étude les genres qui occupent une position basale dans la famille des Pannariaceae *sensu* Wedin et al. (2009) comme les espèces d'*Erioderma* et de *Leioderma*, qui font l'objet d'une autre étude, ainsi que d'autres genres comme *Physma*, récemment transféré des Collemataceae vers les Pannariaceae.

Nous avons repris de GenBank les séquences de beaucoup de taxons utilisés dans l'étude de Passo et al. (2008) pour constituer l'arborescence de base de l'arbre et comparer nos résultats avec les leurs. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser pour cette étude les gènes 5.8S et mtSSU afin de nous accorder avec leurs séquences (les séquences ITS ont été produites dans leur intégralité mais seule la région 5.8S a été conservée dans la matrice car les ITS1 et ITS2 n'étaient pas alignables d'un genre à l'autre).

Nous avons sélectionné comme outgroup l'espèce *Porpidia albocaerulescens*.

La matrice de l'ITS 5.8S suivi du mtSSU a été réalisée comme indiqué dans la section 2.d (cf. plus haut). Un intron a été retiré dans la séquence du gène mtSSU. Cette matrice était longue de 1116 caractères. Le programme GBLOCKS en a exclu 255.

Une analyse en maximum de parcimonie (MP) a été réalisée selon la méthode décrite dans la section 2.g, ainsi qu'un calcul de bootstrap. Sur les 861 caractères inclus, 512 caractères étaient constants, 97 ne présentaient pas d'information au niveau de la parcimonie, et 252 caractères étaient informatifs.

Une analyse en maximum de vraisemblance (ML) a été réalisée selon la méthode décrite dans la section 2.g et un seul arbre, le plus vraisemblable, a été sélectionné. Un bootstrap a été calculé, avec 100 pseudoréplicats. Le meilleur arbre obtenu en ML est présenté ci-dessous.

#### 4.a.2 Discussion

Tout d'abord, on remarque que le support en ML est plus important qu'en MP, et plusieurs branches sont soutenues en ML, alors qu'elles ne le sont pas en MP.

Ensuite, on voit que *Vahliella leucophaea* (Jørgensen 2008), anciennement *Fuscopannaria leucophaea*, est confirmé comme n'étant pas une Pannariaceae, mais va se grouper de façon bien soutenue avec le sous-ordre des Peltigerineae (au sens par exemple de Miadlikowska et Lutzoni 2004), c'est-à-dire dans notre cas *Lobarina*, *Nephroma*, *Massalongia* et *Polychidium*. *Fuscopannaria leucophaea* a été pour cette raison renommé *Vahliella leucophaea*.

Nous avons aussi la confirmation que *Polychidium* forme un groupe avec *Massalongia*, ce qui correspond aux conclusions de l'article de Wedin (Wedin et al. 2007) qui les groupe au sein d'une même famille : les Massalongiaceae.

Mis à part le cas de *Vahliella/Fuscopannaria leucophaea*, déjà révélé par l'article de Passo et al. (2008), la famille des Pannariaceae peut apparaître monophylétique, mais sans support. En revanche, ce que nous avons identifié, parmi les récoltes de la Réunion, comme un *Polychidium* n'en est vraisemblablement pas un au vu de

Figure 3. Meilleur arbre obtenu en maximum de vraisemblance pour l'analyse des Pannariaceae sur le 5.8S et le mtSSU. Ln= -7745.1033. Le premier chiffre correspond à la valeur du bootstrap obtenu en MP et le deuxième la valeur du bootstrap obtenu en ML. Les valeurs de bootstrap sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures ou égales à 70. Les barres plus épaisses sont celles qui ont un support de bootstrap en ML supérieur à 70.

sa position dans l'arbre au sein des Pannariaceae (alors que le type *Polychidium muscicola* est une Massalongiaceae, cf. plus haut).

Un groupe bien supporté regroupe trois *Fuscopannaria* (parmi les espèces *F. siamensis* et *F. subimmixta*) et un autre également bien supporté en ML regroupe les *Fuscopannaria leucosticta* et *F. praetermissa* à un autre noeud de l'arbre. Ce genre est donc visiblement polyphylétique, et regroupe en fait plusieurs entités. *Fuscopannaria sensu stricto* devrait être le groupe de *F. leucosticta* car cette espèce est le type du genre. Il faudrait toutefois vérifier, avec une analyse plus approfondie, que ces deux groupes distincts bien supportés ne pourraient pas se grouper ensemble, car les branches profondes de l'arbre ne sont pas soutenues. Il faut aussi noter que *F. siamensis* et *F. subimmixta* ont été déterminés sur base de littérature et non par comparaison avec du matériel d'herbier, et leur identification n'est donc pas certaine (cf. partie taxonomie).

Les identifications de *F. leucosticta* et *F. praetermissa* récoltés à la Réunion sont quant à elles confirmées par des séquences GenBank. Il est particulièrement intéressant de noter la présence de *F. praetermissa* à la Réunion, car il s'agit d'une espèce arctique-alpine de l'hémisphère nord, toutefois également présente au Mont Kenya et en Antarctique.

Deux espèces de *Parmeliella* se retrouvent à des positions voisines dans l'arbre (*Parmeliella triptophylla* et *Parmeliella triptophylloides*) mais sans support. Un autre groupe de *Parmeliella* (groupe *Parmeliella mariana*), soutenu quant à lui, se trouve à un endroit différent dans l'arbre. Ce groupe d'espèces récoltées à la Réunion pourrait être un genre distinct. Il faut savoir que le groupe *Parmeliella mariana* est déjà considéré, morphologiquement, comme un sous-genre (Jørgensen 2003a) et sa position à part n'est donc pas surprenante. Deux espèces identifiées comme un *Pannaria* et un *Psoroma*, de la Réunion, se trouvent groupées de façon soutenue avec les *Parmeliella mariana*. Cela est assez surprenant vu leur morphologie, et une analyse plus poussée à ce niveau serait nécessaire.

Le groupe bien soutenu contenant *Psoroma hypnorum* (type du genre) pourrait représenter le genre *Psoroma*. Cependant, certains *Psoroma* se retrouvent à différents endroits dans l'arbre.

Une étude très récente sur le genre *Psoroma* le sépare d'ailleurs en plusieurs genres : *Psoroma s. str.*, *Psorophorus* et *Xanthopsoroma* (Elvebakk et al. 2010). Dans cette étude, *Psoroma s. str.* englobe les espèces *Psoroma hypnorum* et *Psoroma palaceum* présents dans notre étude, alors que *Psorophorus* contient *Psoroma pholidotum* et que *Xanthopsoroma* contient *Psoroma soccatum* et *Psoroma pholidotoides*. Ces résultats sont totalement en accord avec les nôtres, puisque nous trouvons également *Psoroma* polyphylétique, avec les groupes correspondant à *Psoroma* et *Xanthopsoroma* bien soutenus. Celui de *Psorophorus* n'est représenté que par une seule espèce dans notre analyse, mais se retrouve à un endroit bien séparé de ces deux groupes.

Enfin, un groupe bien supporté (bootstrap MP/ML de 71/81) correspond au genre *Pannaria* au sens strict. Beaucoup d'espèces récoltées à la Réunion se retrouvent dans ce groupe. Ce groupe est monophylétique et les espèces qui le composent pourraient prendre le nom de genre *Pannaria*, alors que les espèces de *Pannaria* qui n'y sont pas devraient sans doute changer de nom de genre. Au sein de ce groupe, la plupart des espèces se retrouvent dans un râteau, sans support pour les différentes branches entre elles, à part le groupe de *Pannaria lurida* qui est bien soutenu, et un groupe de deux espèces argentines avec *P. sphinctrina* et *P. microphyllizans*. Certains résultats sont en désaccord avec l'article de Passo et al (2008). Notamment la position de *Pannaria isabellina* et *Psoroma hispidulum* qui apparaissent chez Passo dans le groupe *Pannaria sensu stricto*, et en dehors dans notre analyse. On remarque aussi que le groupe *Pannaria rubiginosa* ne semble pas monophylétique. Cependant, cette partie de l'arbre n'a pas de support.

D'autres gènes seraient sans doute nécessaires pour éclaircir les doutes laissés par cet arbre. L'ajout de LSU + RPB1 ou RPB2 à l'analyse pourrait amener plus de support dans les parties plus profondes. Il pourrait aussi être intéressant de faire une analyse séparée genre par genre afin de conserver une plus grande partie de ITS1 et ITS2, qui sont considérées comme zones ambiguës dans leur quasi intégralité car non alignables d'un genre à l'autre dans cette analyse.

#### 4.b Erioderma

##### 4.b.1 Méthode et résultats

Nous avons réalisé une étude phylogénétique sur tous les échantillons d'*Erioderma* récoltés à la Réunion et dans le Rift Albertin, ainsi que des échantillons des Açores, afin de tester la monophylie de ce genre et de déterminer la position respective de chaque espèce en son sein. Nous avons également ajouté à cette analyse deux espèces de *Leioderma* et *Degelia durietzii* pour vérifier leur position à la fois par rapport à *Erioderma* et entre eux, et *Degelia plumbea* comme outgroup.

Une matrice a été réalisée avec les séquences mtSSU et LSU de ces échantillons, selon la procédure définie dans la section 2.d.

Les deux seules séquences d'*Erioderma* disponibles sur GenBank ont été ajoutées à cette matrice.

La matrice était longue de 1990 caractères. 41 ont été exclus.

Sur les 1949 restants, 1634 étaient constants, 144 étaient variables mais non-informatifs et 171 présentaient de l'information. Une analyse en MP a été réalisée, ainsi qu'un calcul de bootstrap, selon la méthode décrite dans la section 2.g.

Une analyse en ML a été réalisée selon la méthode décrite en 2.g et un bootstrap a été calculé avec 120 réplicats. Le meilleur arbre obtenu en ML est présenté ci-dessous.

##### 4.b.2 Discussion

Tout d'abord, on peut voir que le genre *Degelia* n'est pas monophylétique, tout comme *Leioderma*. Le groupe formé par *Degelia durietzii* et les deux espèces de *Leioderma* est très bien supporté. Il y a donc matière à approfondir ici. Ces genres sont mal définis, et devraient être révisés. Il existe déjà une séparation de *Degelia* en deux sous-genres (Voir Jørgensen et James 1990), la section *Degelia* regroupant les spécimens de l'hémisphère sud et la section *Amphiloma* ceux de l'hémisphère nord. Le type de *Degelia* est *Degelia gayana*, espèce du sous-genre de l'hémisphère sud comme *D. durietzii* (section *Degelia*), contrairement à *D. plumbea*, espèce bien connue de l'hémisphère Nord et qui appartient au sous-genre de *Degelia* (section *Amphiloma*). On pourrait donc séparer ce genre en deux et le genre *Degelia* serait donc *D. durietzii*, dans cette analyse.

Ensuite, le groupe composé de tous les *Erioderma* est monophylétique, et ce résultat est très bien supporté en vraisemblance (valeur de bootstrap de 94). Au sein de ce genre, certaines espèces apparaissent monophylétiques, comme *E. borbonicum* et *E. unguigerum*, bien soutenues, et *E. papyraceum* (bootstrap de 71 en ML). Par contre l'espèce *E. leylandii* n'apparaît pas monophylétique, mais cela n'est pas surprenant puisque ce nom d'espèce est souvent donné par défaut lorsque l'individu n'a pas les caractéristiques morphologiques des autres espèces. Les résultats sont cohérents avec ceux de l'article de Wedin et al. (2009).

L'espèce *Erioderma solediatum*, présente à la Réunion, n'a pu être intégrée dans notre analyse.

Cette étude est particulièrement intéressante dans la mesure où il s'agit de la première analyse moléculaire intégrant plus de deux espèces d'*Erioderma*.

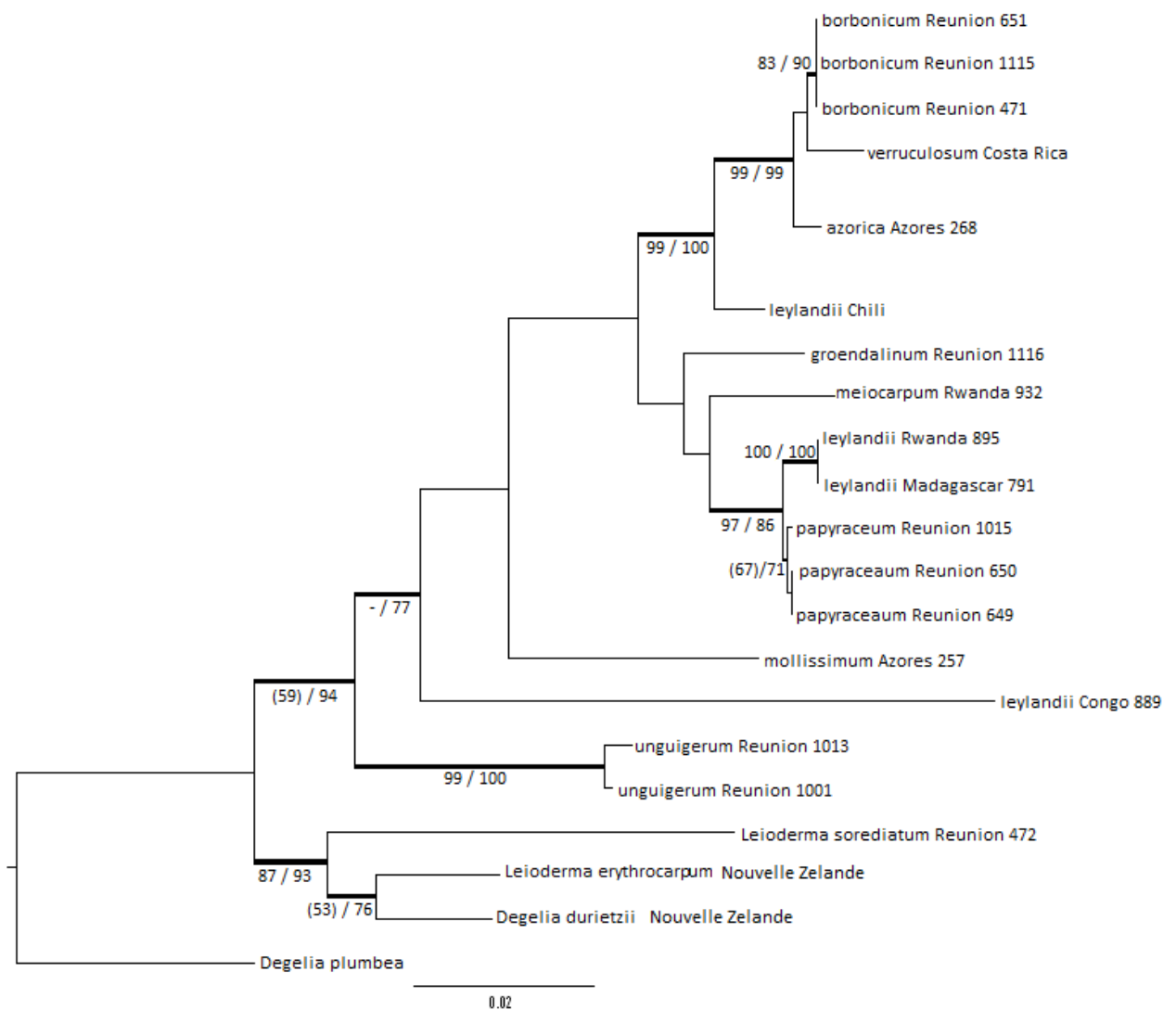


Figure 4. Meilleur arbre obtenu en maximum de vraisemblance pour l'analyse sur *Erioderma* (LSU + mtSSU)  $L_n = -5854,468$ . Le premier chiffre correspond à la valeur du bootstrap obtenu en MP et le deuxième la valeur du bootstrap obtenu en ML. Les valeurs de bootstrap sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures ou égales à 70. Les branches épaissies ont un bootstrap en ML supérieur à 70.

#### 4.c Lobariaceae

##### 4.c.1 Méthode et résultats

Une étude phylogénétique a été réalisée sur les Lobariaceae, afin de vérifier la monophylie de la famille et des genres qui la composent. Cette analyse se base sur les gènes ITS, LSU et mtSSU et reprend certaines séquences utilisées par l'article d'Högnabba et al. (2009) afin de comparer nos résultats aux leurs et d'ajouter plus d'espèces à l'analyse. Il s'agit de notre analyse la plus poussée. En effet, elle est la seule à contenir 3 gènes différents, et la seule à inclure une analyse bayésienne.

Cette étude reprend une séquence de chaque espèce de *Pseudocyphellaria*, *Sticta* et *Lobaria* récoltées à la Réunion ainsi que des séquences de GenBank. *Nephroma arcticum* et *Massalongia carnosa* ont été ajoutés comme outgroup. La matrice a été réalisée suivant la procédure décrite dans la section 2.d. Les introns contenus dans mtSSU ont été supprimés. La matrice était longue de 2206 positions. GBlocks a éliminé une partie de ces positions, jugées ambiguës, et en a conservé 1925 soit environ 87% du total.

Une analyse en maximum de parcimonie (MP) a été réalisée avec PAUP, ainsi qu'un calcul de bootstrap, selon la méthode décrite dans la section 2.g. 1279 caractères étaient constants, 214 étaient variables mais non-informatifs et 438 présentaient de l'information.

Une analyse en maximum de vraisemblance (ML) a été réalisée avec GARLI selon la méthode décrite en section 2.g. Un bootstrap a été calculé, avec 100 pseudoréplicats.

Une analyse bayésienne a également été effectuée pour cette matrice. Il s'agit de la seule analyse bayésienne de ce travail. Nous avons choisi de consacrer le temps de calcul à notre disposition sur plusieurs analyses plutôt que de tout focaliser sur un ou deux travaux ; et des analyses bayésiennes pourront être réalisées sur les autres matrices ultérieurement. Notre analyse a donc utilisé la méthode de Monte Carlo des chaînes de Markov Metropolis-coupled (MCMCMC) dans MrBayes v3.1.2 (Ronquist et Huelsenbeck 2003, Altekar et al. 2004). Aucune valeur de prior n'a été attribuée. Quatre runs parallèles ont été réalisés, chacun utilisant quatre chaînes indépendantes (trois chaînes chauffées et une chaîne froide) avec un seul arbre sauvé chaque centième génération pour un total de 4 000 000 de générations. Le schéma de chauffe incrémenté était mis par défaut. Nous avons utilisé TRACER v1.4.1 (Rambaut et Drummond 2007) pour associer les valeurs de log de vraisemblance des points de l'échantillon par rapport au temps de génération, et déterminer quand l'état stationnaire était atteint. En conséquence, les 400 000 premières générations ont été supprimées comme burn-in. Un arbre consensus à la majorité avec une longueur de branche moyenne a été construit pour les arbres restants en utilisant l'option sumt de MrBayes. Les probabilités postérieures (PP) ont été calculées.

Le meilleur arbre obtenu en ML est présenté dans la figure 5.

#### 4.c.2 Discussion

La famille des Lobariaceae apparaît bien monophylétique, tout comme les genres *Sticta* et *Lobaria*. Le genre *Pseudocyphellaria*, quant à lui, apparaît polyphylétique. Ces résultats sont en accord avec la plupart des travaux réalisés sur la famille (voir introduction : Les Peltigerales).

Cependant, dans notre analyse, le groupe d'espèces comprenant *P. aurata*, *P. obvoluta* etc. se groupe avec le reste des *Pseudocyphellaria*, plutôt qu'avec *P. endochrysea*, *P. berberina* et *P. scabrosa* dans l'étude d'Högnabba et al. (2009). Cela dit, le soutien pour le placement du groupe *P. aurata* et du groupe *P. berberina* ensemble dans l'article d'Högnabba et al. est assez faible, et nos résultats sont en fait en accord avec les siens en ce qui concerne la composition des différents clades au sein de *Pseudocyphellaria*.

En effet, ils obtiennent aussi 4 clades bien soutenus (comme nous, un groupe avec *P. berberina*, un groupe avec *P. argyracea*, un groupe avec *P. crocata* et un groupe avec *P. aurata*). La différence est dans la façon de les grouper, ils décident en effet de grouper le groupe *P. berberina* et le groupe *P. aurata* en un seul clade (clade C dans l'article), alors que ce groupement est peu soutenu dans leur analyse, et est totalement non-soutenu dans la nôtre.

Le genre *Pseudocyphellaria* pourrait être divisé en 2 ou 4 genres : le groupe *P. berberina* doit devenir un nouveau genre, tandis que le reste des espèces de *Pseudocyphellaria* peut rester un seul genre ou être séparé en trois groupes, l'un qui contient l'espèce type du genre (*P. aurata*), le second, le groupe *P. crocata*, qui pourrait devenir « *Stictina* », nom autrefois utilisé pour certaines espèces de ce groupe et le troisième avec les espèces *P. argyracea* et *P. intricata*. Il y a du soutien pour les deux hypothèses. *Pseudocyphellaria freycinetii* occupe une position non résolue au sein de l'arbre, et sa position en cas de séparation en plusieurs genres devra être approfondie. Toutefois, bien que non supportée en ML et en MP, la branche groupant *P. freycinetii* avec le groupe *P. intricata-argyracea* a une PP en bayésien de 0.95.

Figure 5. Meilleur arbre obtenu en maximum de vraisemblance pour l'analyse sur la famille des Lobariaceae (ITS+LSU+mtSSU). Ln=-17950.89. Le premier chiffre correspond à la valeur du bootstrap obtenu en MP, le deuxième à la valeur du bootstrap obtenu en ML et le 3<sup>ème</sup> aux probabilités postérieures de l'analyse bayésienne. Les bootstraps sont indiqués lorsque leur valeur est supérieure ou égale à 70 et celles de PP lorsqu'elles sont supérieures ou égales à 0.95. Les branches épaissies ont un bootstrap en ML supérieur à 70.



Dans notre analyse, contrairement à l'analyse du genre *Lobaria* seul (voir plus bas), deux groupes de *Lobaria* apparaissent distincts, et sont bien soutenus. Ces deux groupes correspondent aux clades A et B de l'article d'Högnabba et al. (2009). La différence avec l'article est que l'ensemble de ces deux groupes est monophylétique dans notre analyse alors que, chez eux, le clade B est sœur de *Sticta* et *Pseudocyphellaria* alors que le clade A a une position plus basale. Cependant, leur support n'est pas très élevé. Ces deux groupes pourraient représenter deux genres. D'un point de vue morphologique, on pourrait encore séparer le groupe de *Lobaria retigera*-*L. pulmonaria* en deux genres, l'un avec *L. scrobiculata* seul et l'autre avec le reste du groupe. En cas de séparation de *Lobaria* en plusieurs genres, le nom *Lobaria* devra rester au sein du groupe *Lobaria pulmonaria*, qui contient le type du genre. L'autre groupe inclut à la fois le genre *Lobariella* (la partie avec *D. subexornata* notamment) et le groupe *Ricasolia*, qui est un sous-groupe de *Lobaria*, avec notamment *L. amplissima* et *L. discolor*. Il est donc difficile dans l'état actuel des données de trancher quant au nom de genre que pourrait prendre ce clade. *Lobaria scrobiculata* pourrait quant à lui prendre le nom *Lobarina* (voir Yoshimura 1998 et Yoshimura 2002 pour les détails sur les noms de genres dérivés de *Lobaria*).

Dans le genre *Sticta*, on retrouve, comme dans l'analyse ITS du genre seul (voir plus bas), un grand râteau de huit branches principales bien soutenues, mais sans support pour les ordonner les unes par rapport aux autres. Le groupe composé de toutes les espèces à thalles verts et à grands thalles bleus est bien supporté (bootstrap MP-ML 97-97).

Une discussion plus approfondie genre par genre se trouve dans ce travail.

La famille des Lobariaceae pourrait être composée de quatre, cinq, six, sept ou huit genres. Les figures ci-dessous présentent la famille des Lobariaceae avec un minimum de quatre genres ou un maximum de huit genres. Des cas intermédiaires avec cinq, six ou sept genres sont possibles. On voit donc que le genre *Sticta* est bien monophylétique, que *Pseudocyphellaria* peut être séparé en deux ou quatre genres et *Lobaria* peut être séparé en deux ou trois genres ou rester en une seule entité.

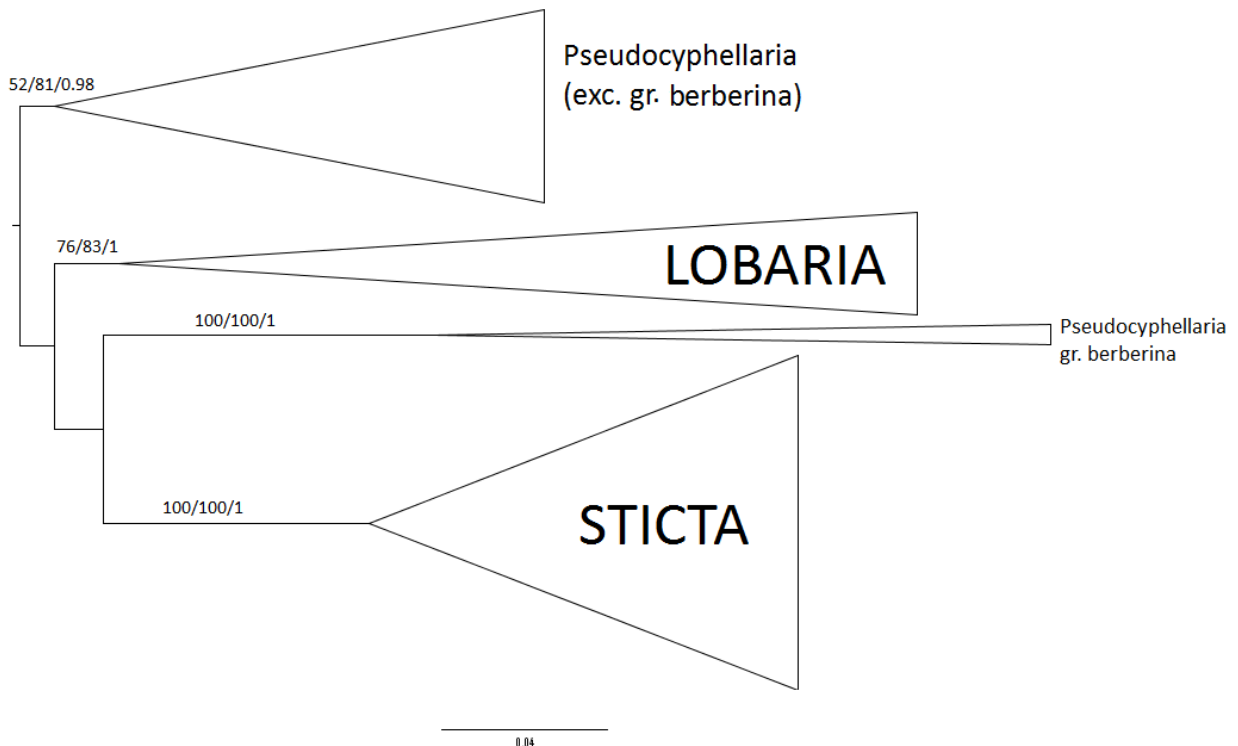


Figure 6 présentant la famille des Lobariaceae séparée en quatre genres.

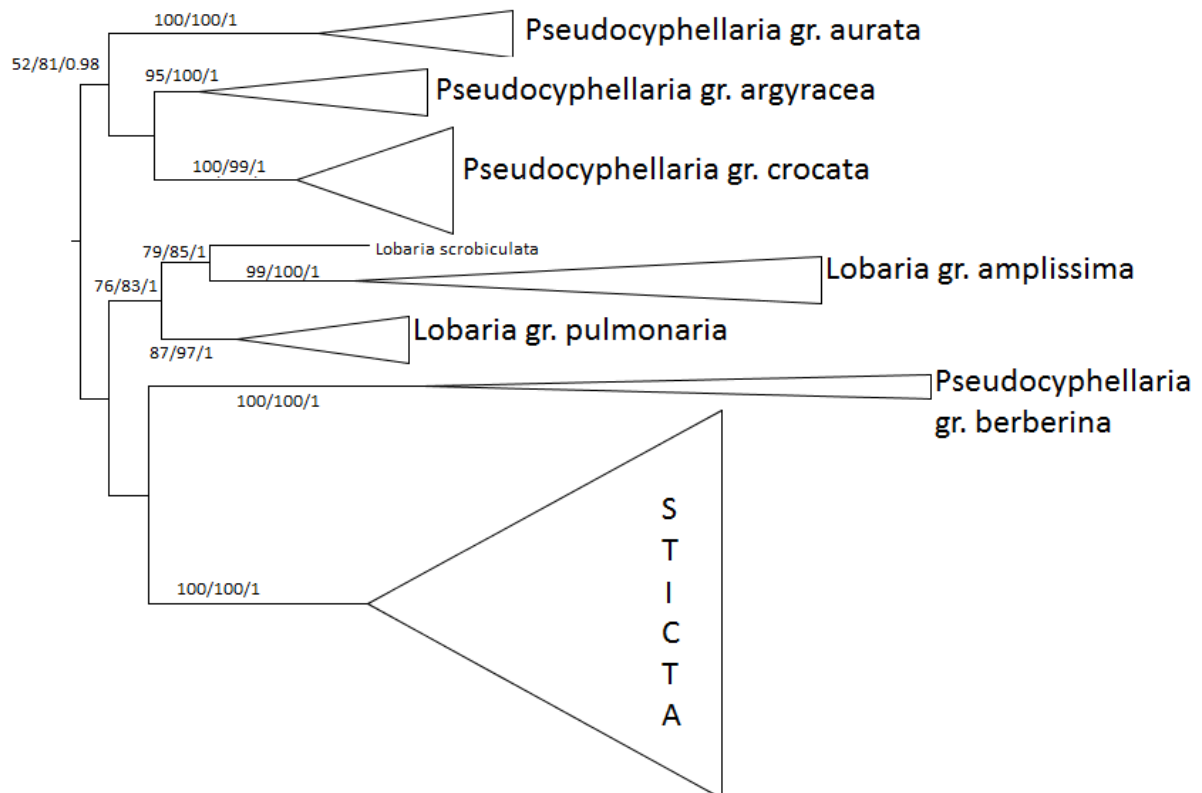


Figure 7 présentant la famille des Lobariaceae séparée en huit genres. *P. freycinetii* a été considéré comme appartenant au groupe *argyracea-intricata*, en tenant compte de la  $PP=0.95$ , mais les valeurs indiquées sur la branche correspondent au groupe *argyracea-intricata* sans *freycinetii*.

#### 4.d. *Lobaria*

##### 4.d.1 Méthode et résultats

Nous avons réalisé une étude phylogénétique sur le genre *Lobaria*, basée sur les ITS. L'avantage de n'utiliser que l'ITS est d'avoir à notre disposition un plus grand nombre de séquences, notamment de GenBank, et donc que l'étude tienne compte d'un plus grand nombre d'espèces pour définir la topologie de l'arbre pour ce genre. L'inconvénient est qu'il y a moins de support pour les branches profondes.

Cette étude se concentre sur le genre *Lobaria* et une plus grande partie des ITS sont conservées pour l'analyse, alors que ces régions étaient jugées ambiguës et donc exclues pour l'analyse sur la famille des Lobariaceae. Les séquences ITS de toutes les espèces de *Lobaria* récoltées à la Réunion ainsi que les espèces de *Lobaria* de GenBank ont été assemblées en une matrice selon la méthode décrite dans la section 2.d. *Nephroma antarcticum* a été sélectionné comme outgroup. GBlocks a ensuite éliminé les régions ambiguës.

Ensuite une analyse de maximum de parcimonie a été réalisée, ainsi qu'un calcul de bootstrap, selon la méthode décrite en 2.g. Pour cette analyse, 98 caractères ont été exclus. Sur les 444 caractères restants, 252 étaient constants, 41 variables mais non informatifs et 151 étaient informatifs pour la parcimonie.

Une analyse en maximum de vraisemblance a été réalisée selon la méthode décrite dans la section 2.g. Le bootstrap a aussi été calculé, avec 300 pseudoréplicats. Le meilleur arbre obtenu en maximum de vraisemblance est présenté ci-dessous.

##### 4.d.2 Discussion

Les deux groupes de *Lobaria* reconnus dans l'article de Högnabba et al. (2009) n'apparaissent pas dans cette analyse. L'ITS ne semble donc pas suffisant pour voir apparaître ces deux groupes, et l'analyse avec les mtSSU et LSU apporte plus d'informations à ce niveau.

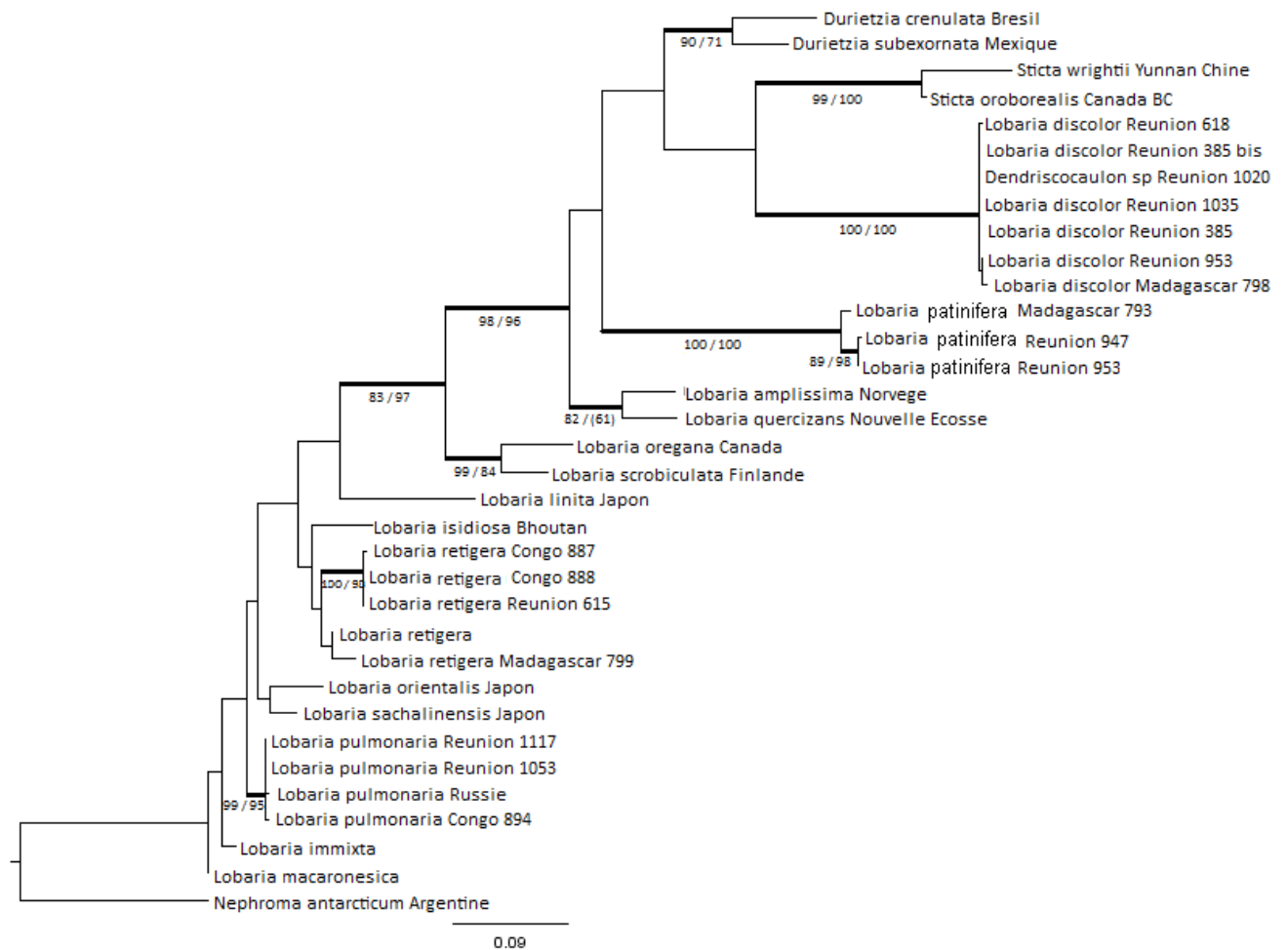


Figure 8. Meilleur arbre obtenu en maximum de vraisemblance pour cette analyse sur le genre *Lobaria* (ITS).  $L_n = -3586.2368$ . Le premier chiffre correspond à la valeur du bootstrap obtenu en MP et le deuxième à la valeur du bootstrap obtenu en ML. Les bootstraps sont indiqués lorsque leur valeur est supérieure ou égale à 70. Les branches épaisses représentent celles ayant un bootstrap en ML supérieur à 70.

On voit qu'un groupe très bien soutenu correspondant au groupe A de l'article d'Högnabba et al. existe. Cependant, à ce groupe s'ajoutent *L. oregana* et *L. scrobiculata*, alors qu'ils apparaissent dans le groupe B dans l'article de Högnabba et al. (2009). Au sein de ce groupe « *amplissima* » se trouvent deux espèces récoltées à la Réunion : *Lobaria discolor*, l'espèce à laquelle le *Dendriscoaulon* récolté appartient également, et *Lobaria patinifera*. Ces deux espèces apparaissent très bien supportées.

Dans ce groupe se trouvent aussi d'autres espèces pour lesquelles on rencontre des photomorphes, comme *L. amplissima* ou les *Sticta wrightii* et *S. oroborealis*. Ces deux espèces décrites comme des *Sticta* apparaissent dans les *Lobaria*, comme dans l'article d'Högnabba et al. (2009) et celui de Takahashi et al. (2006), et sont en fait probablement des *Lobaria*. *Lobaria patinifera* a aussi été décrit comme présentant une forme avec *Dendriscoaulon* (Swinscow et Krog 1988) mais nous ne l'avons pas trouvé sous cette forme à la Réunion. Les deux autres espèces de *Lobaria* récoltées à la Réunion, *Lobaria retigera* et *Lobaria pulmonaria*, se retrouvent avec d'autres spécimens de cette même espèce et dans le cas de *Lobaria pulmonaria* ce groupe est très bien supporté, ce qui confirme leur identification. Le nom de genre *Durietzia* apparaît au sein de *Lobaria*, comme dans les autres articles traitant de la question.

Plus de gènes apporteraient plus de soutien à l'analyse, en particulier au niveau des branches plus profondes. Le problème est leur faible disponibilité sur GenBank. Il faudrait produire des données pour d'autres gènes sur un large panel d'espèces.

#### 4.e *Sticta*

##### 4.e.1 Méthode et résultats

Une étude phylogénétique a été réalisée sur les ITS pour le genre *Sticta*, et les remarques faites pour l'étude sur le genre *Lobaria*, notamment concernant les avantages et les inconvénients de l'analyse sur la famille par rapport aux analyses genre par genre sont valables pour cette étude également.

Une matrice a été réalisée avec les séquences ITS de toutes les espèces rencontrées à la Réunion ainsi que du matériel de Madagascar et du Rift Albertin, et toutes les séquences disponibles sur GenBank. *Pseudocyphellaria aurata* a été ajouté comme outgroup. La matrice a été réalisée selon la méthode décrite dans la section 2.d. GBLOCKS a éliminé 113 caractères jugés ambigus sur un total de 576 positions. Il reste donc 463 caractères, soit 80% du total.

Une analyse de MP a été réalisée, ainsi qu'un calcul de bootstrap, selon la méthode décrite dans la section 2.g. 261 de ces caractères sont constants, 39 non-informatifs et 163 étaient informatifs pour la parcimonie.

Une analyse de ML a été réalisée selon la méthode décrite dans la section 2.g. Un bootstrap a été calculé, avec 200 pseudoréplicats. Le meilleur arbre obtenu en maximum de vraisemblance est présenté dans la figure 9.

##### 4.e.2 Discussion

Il s'agit du premier arbre jamais réalisé comportant une aussi grande diversité d'espèces de *Sticta*.

Le genre *Sticta* apparaît monophylétique. Cependant, il se divise en un grand nombre de branches généralement bien supportées qui forment un grand râteau non résolu à la base du genre.

Un groupe apparaît, qui contient tous les *Sticta* à algue verte ainsi que les *Sticta* bleus à grand thalle, auxquels s'ajoute *S. xanthotropa*. Ce groupe est cependant peu supporté (mais il est bien supporté dans l'analyse sur la famille des Lobariaceae, avec LSU et mtSSU en plus, voir plus haut), mais est divisé en deux groupes bien soutenus, l'un avec les espèces *S. dichotoma* et *S. diversa*<sup>1</sup>, et l'autre avec notamment *S. caperata* et *S. variabilis*.

Un *S. limbata* du Japon, de GenBank, se trouve avec les *S. sublimbata* et il s'agit probablement d'une erreur d'identification.

On peut constater que les espèces *S. weigeli* et *S. fuliginosa* ne sont pas monophylétiques et se retrouvent à plusieurs noeuds dans l'arbre. Pour *S. fuliginosa*, on retrouve par exemple deux groupes distincts et bien soutenus, l'un avec des échantillons d'Europe et Amérique du Nord, l'autre avec des échantillons d'Afrique et d'Asie. Comme indiqué dans le paragraphe taxonomie, un échantillon africain est résolu au sein du groupe mais il n'est pas identique morphologiquement aux autres échantillons que celui-ci contient.

Les *Sticta* bleus à apothécies *S. ambavillaria* et *S. tomentosa* apparaissent bien comme deux espèces totalement distinctes dans l'arbre, alors que la flore africaine (Swinscow et Krog 1988) les décrit de façon presque similaire. De même, l'épithète *weigeli*, qui est généralement donné à tous les *Sticta* bleus de taille moyenne (lobes de moins de 2 cm de large), à lobes plus ou moins palmés et isidiés, ne correspond pas du tout à une seule espèce au niveau phylogénétique. On voit donc bien qu'il existe en fait plus d'espèces que celles qui ont été décrites, qu'il y a probablement un phénomène de spéciation cryptique et que certains épithètes sont utilisés pour décrire plusieurs espèces qui ont des similitudes morphologiques mais qui sont bien distinctes d'un point de vue phylogénétique.

Figure 9. Meilleur arbre obtenu en maximum de vraisemblance pour cette analyse sur le genre *Sticta* (ITS). Ln= -5066.6813. Le premier chiffre correspond à la valeur du bootstrap obtenu en MP et le deuxième la valeur du bootstrap obtenu en ML. Les bootstraps sont indiqués lorsque leur valeur est supérieure ou égale à 70. Les branches épaisses sont celles ayant un bootstrap supérieur à 70 en ML. Par souci de lisibilité, la partie la plus profonde de l'arbre, avec la base de la branche de l'outgroup a été coupée, mais est visible en annexe (annexe 5).

Nous avons considéré que le *S. weigeli* de GenBank provenant de la République Dominicaine était le plus proche du type de l'espèce, qui provient de Martinique. Comme aucun de nos « *weigeli* » ne se groupent avec lui, nous les avons donc nommés *paleoweigeli* (se reporter à la partie taxonomie pour plus d'informations) pour le groupe qui se retrouve associé avec le *S. weigeli* de Taiwan.

Les taxonomistes classiques avaient tendance à donner un nom provenant d'une espèce décrite en Europe ou en Amérique du nord à tous les *Sticta* qui leur ressemblaient morphologiquement ailleurs dans le monde. Nous avons vu que pour *S. weigeli* ou *S. fuliginosa*, la situation est plus complexe et que plusieurs espèces se cachent en fait sous ces épithètes.

Par ailleurs, on peut noter un support important pour des partitions géographiques caractéristiques : par exemple le placement de *S. hypochroa*, *S. gaudichaudia* et *S. caulescens*, toutes trois provenant d'Argentine, dans un groupe très bien soutenu à elles seules. De même, *S. latifrons*, *S. subcaperata*, *S. martinii* et *S. squamata*, 4 espèces connues d'Australasie ou endémiques de Nouvelle-Zélande, forment un groupe monophylétique bien soutenu. Nos espèces de la Réunion et d'Afrique, quant à elles, se groupent parfois avec des espèces asiatiques (comme dans le cas où notre *afrofuliginosa* se groupe avec des *fuliginosa* asiatiques, et *paleoweigeli* avec des *weigeli* asiatiques également) ou américaines, mais jamais avec des espèces d'Argentine ou de Nouvelle-Zélande.

Ce type de partition géographique se rencontre également à l'intérieur de notre propre matériel. En effet, par exemple, le groupe *orbicularis* ou le groupe *foveolata-pustulata* ne sont constitués que de matériel provenant du Rift Albertin.

De même, *Sticta sp1* n'est rencontré qu'à Madagascar. Cela suggère donc qu'il y a une structure géographique au niveau des espèces de *Sticta*, et que la taxonomie de ce groupe doit en tenir compte, en vérifiant d'un point de vue moléculaire si des espèces morphologiquement similaires mais provenant d'endroits éloignés correspondent à une même espèce ou pas.

On peut aussi remarquer, et c'est particulièrement bien visible par rapport à nos autres analyses, par exemple celles sur *Pseudocyphellaria* ou *Lobaria*, que les espèces de *Sticta* sont particulièrement bien soutenues, et se trouvent sur des longues branches. On peut citer le cas de *cyphellulata* ou le groupe *dichotoma-diversa* ou encore *sorediata*, ou *tomentosa*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette situation. Soit il manque des espèces le long de ces branches, par exemple à cause d'extinctions, ou parce que notre échantillonnage n'est pas assez étendu. Soit il s'agit d'espèces anciennes, particulièrement bien isolées. Enfin, une autre hypothèse, développée par Lumbsch et al. (2008) dans une étude sur les Parmeliaceae, est que les lichens se développant dans des forêts humides et tropicales ont un taux de mutation plus rapide que les autres. Les *Sticta* se développent dans un tel milieu, et cette théorie mériterait d'être approfondie. Cependant, les genres *Pseudocyphellaria* et *Lobaria* se développent également dans ce type de milieu et nous n'observons pas ce phénomène à leur niveau.

L'ITS seul, ici encore, ne permet pas de clarifier la position des branches profondes les unes par rapport aux autres. L'ajout de mtSSU et LSU (voir analyse Lobariaceae), dans le cas de *Sticta*, n'est pas suffisant pour régler ces questions. L'ajout d'autres gènes, codant pour des protéines par exemple, comme RPB1 ou RPB2 pourrait être envisagé.

#### 4.f *Pseudocyphellaria*

##### 4.f.1 Méthode et résultats

Une étude phylogénétique a été réalisée sur les ITS du genre *Pseudocyphellaria* pour les mêmes raisons que les deux analyses précédentes et les remarques faites plus haut sont donc d'application. Une matrice a été réalisée avec les ITS des différentes espèces récoltées et présentes sur GenBank. Cette matrice a été réalisée suivant la procédure décrite dans la section 2.d. GBlocks a ensuite retiré les positions ambiguës.

Une analyse en MP a été réalisée, ainsi qu'un calcul de bootstrap, selon la méthode décrite dans la section 2.g. Sur 487 caractères, 271 étaient constants, 76 variables mais non-informatifs et 140 portaient de l'information pour la parcimonie.

Une analyse de ML a été réalisée, selon la méthode décrite dans la section 2.g. Un bootstrap a été calculé, avec 300 pseudoréplicats. Le meilleur arbre obtenu en maximum de vraisemblance est présenté ci-dessous.

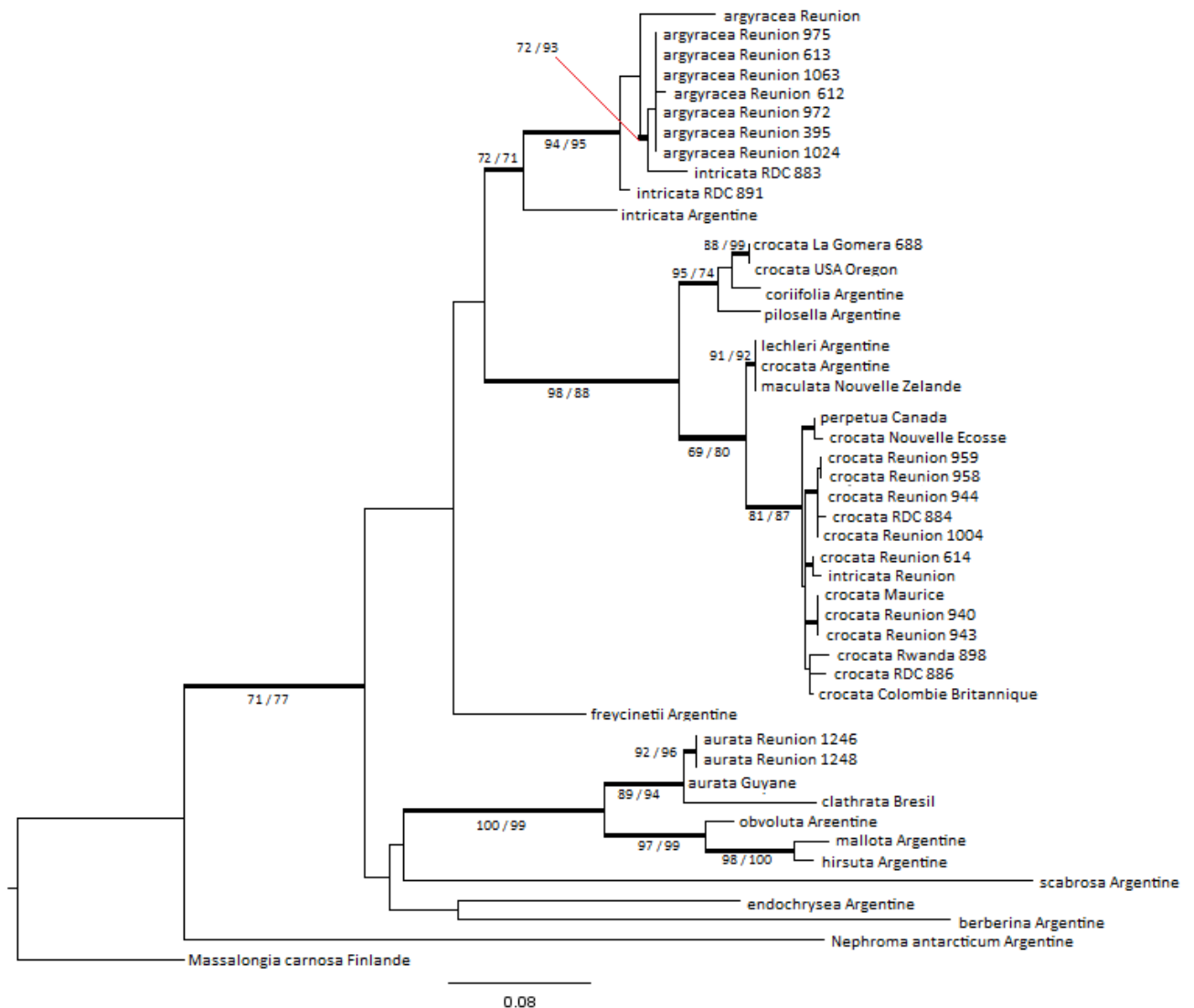


Figure 10. Meilleur arbre obtenu en maximum de vraisemblance pour cette analyse sur le genre *Pseudocyphellaria* (ITS). Ln= -3823.0751. Le premier chiffre correspond à la valeur du bootstrap obtenu en MP et le deuxième la valeur du bootstrap obtenu en ML. Les bootstraps sont indiqués lorsque leur valeur est supérieure ou égale à 70. Les branches épaisses sont celles ayant un bootstrap en ML supérieur à 70.

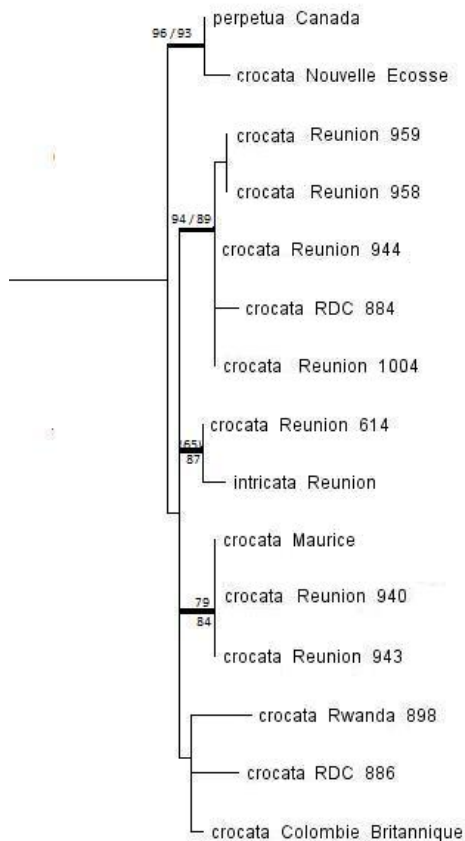


Figure 11. Agrandissement de la figure précédente au niveau du groupe *P. crocata*, pour une meilleure lecture (à noter que certains *P. crocata* ne se placent pas dans ce groupe).

#### 4.f.2 Discussion

Dans cette analyse, on retrouve les 3 groupes présents dans l'article de Högnabba et al. (2009). Cependant, le groupe C, qu'ils reconnaissent comme composé de *P. aurata*, *P. clathrata*, *P. obvoluta*, *P. mallota*, *P. hirsuta*, *P. scabrosa*, *P. endochrysea* et *P. berberina* est peu supporté. Nous avons vu dans notre étude sur la famille des Lobariaceae que l'ajout d'espèces de *Sticta* et des loci mtSSU et LSU fait disparaître ce groupe. La partie du groupe avec notamment *P. aurata*, qui correspond au type du genre *Pseudocyphellaria*, est très bien supportée, si l'on ne considère pas les trois espèces *P. berberina*, *P. endochrysea* et *P. scabrosa* qui appartiennent à l'autre partie du clade C. Nous avons déjà discuté ce problème de placement faiblement soutenu dans l'étude consacrée au Lobariaceae (voir plus haut).

Notre échantillon de *Pseudocyphellaria aurata* récolté à la Réunion se trouve bien avec le *P. aurata* de la Guyane, au sein d'un groupe bien soutenu, ce qui confirme son identification.

Nous obtenons un groupe correspondant au clade E de l'article de Högnabba et al. (2009), bien supporté, représenté dans notre analyse par les espèces *P. argyracea* et *P. intricata*. La délimitation entre ces deux espèces semble floue car ils ne forment pas deux groupes distincts dans l'analyse. Nos échantillons de *P. argyracea* récoltés à la Réunion se retrouvent tous dans ce groupe, mais pas au sein d'un groupe monophylétique. Ils s'y retrouvent avec des échantillons de *P. intricata* récoltés au Congo.

Enfin, le groupe correspondant au clade F, bien supporté lui aussi, compte notamment nos échantillons de *P. crocata*, *P. desfontainii* et *P. dozyana* récoltés à la Réunion. L'espèce *P. crocata* apparaît polyphylétique, et se retrouve dans trois groupes différents, tous bien supportés, au sein de ce clade. La délimitation morphologique dans les identifications entre les espèces *P. crocata*, *P. desfontainii* et *P. dozyana* n'apparaît pas dans l'arbre, et



nous avons donc décidé de donner le nom *P. crocata* à tous les échantillons identifiés comme l'une de ces trois espèces. Une séquence de *P. intricata* provenant de GenBank tombe aussi dans ce groupe. Il s'agit sans doute d'une erreur d'identification. L'espèce *P. perpetua* se retrouve dans le groupe *P. crocata* et il faudrait vérifier que le *P. crocata* provenant de Nouvelle Ecosse n'est pas en fait *P. perpetua*, auquel cas *P. perpetua* serait monophylétique comme suggéré par Miadlikowska et al. (2002), contrairement à l'étude de Summerfield et Eaton-Rye (2006) où *P. perpetua* se retrouve à plusieurs endroits dans le groupe *P. crocata*, et ne forme donc pas un groupe monophylétique alors que des variations morphologiques séparent les espèces.

## 5) Résultats sur les photopaires

Nous avons récolté à la Réunion deux exemples de photopaires.

Nous avons tout d'abord récolté un spécimen de *Dendriscoaulon sp.*

*Dendriscoaulon* est le nom de genre donné lorsque le mycobionte d'une Peltigérale s'associe avec une cyanobactérie et forme un thalle fruticuleux, sous forme de petits buissons, très différent morphologiquement de la forme foliacée que prend ce même lichen lorsqu'il est associé à une algue verte. Ce *Dendriscoaulon* se développait seul, indépendamment de tout lichen à algue verte. Après séquençage, il s'avère que ce *Dendriscoaulon* correspond en fait à *Lobaria discolor*, également récolté à la Réunion sous sa forme foliacée, associée avec l'algue verte. Les deux formes peuvent donc vivre indépendamment l'une de l'autre. Il est possible que des spécimens de *Dendriscoaulon* se développent sur le thalle vert de *Lobaria discolor* mais nous n'en avons pas rencontrés.

Le deuxième cas de photopaires que nous avons rencontré concernait un montage constitué d'un lichen à algue verte et d'un lichen à cyanobactérie qui croissaient ensemble, l'un sur l'autre, et formaient donc un photosymbiodème. La partie verte et la partie bleue étaient toutes deux foliacées, et le thalle était similaire du point de vue morphologique, hormis au niveau de la nature du photobionte. Après séquençage, il s'avère qu'il s'agit bien d'un seul et même lichen. En effet, la partie bleue et la partie verte du photopaire ont exactement la même séquence ITS. De plus, cette séquence est également la même que celle de *Sticta dichotoma*, un grand lichen foliacé à algue verte que nous avons également récolté à la Réunion. Nous n'avons rencontré aucun lichen à cyanobactérie se développant seul qui avait une séquence correspondante. Ce photosymbiodème correspond donc à *Sticta dichotoma*, et présente des lobes moins étroits et plus courts lorsqu'il est sous la forme verte+bleue unis. Une étude plus approfondie pourrait permettre de déterminer dans quelles conditions un *Sticta dichotoma* développe un photosymbiodème, et quelles variations morphologiques ou physiologiques une telle association implique.

Des photos des photopaires, à savoir des montages de *Sticta dichotoma*, de *Dendriscoaulon sp.* et de *Lobaria discolor* sont fournies en annexe 6. La position respective de nos deux photopaires au sein des Lobariaceae est illustrée dans la figure ci-dessous.

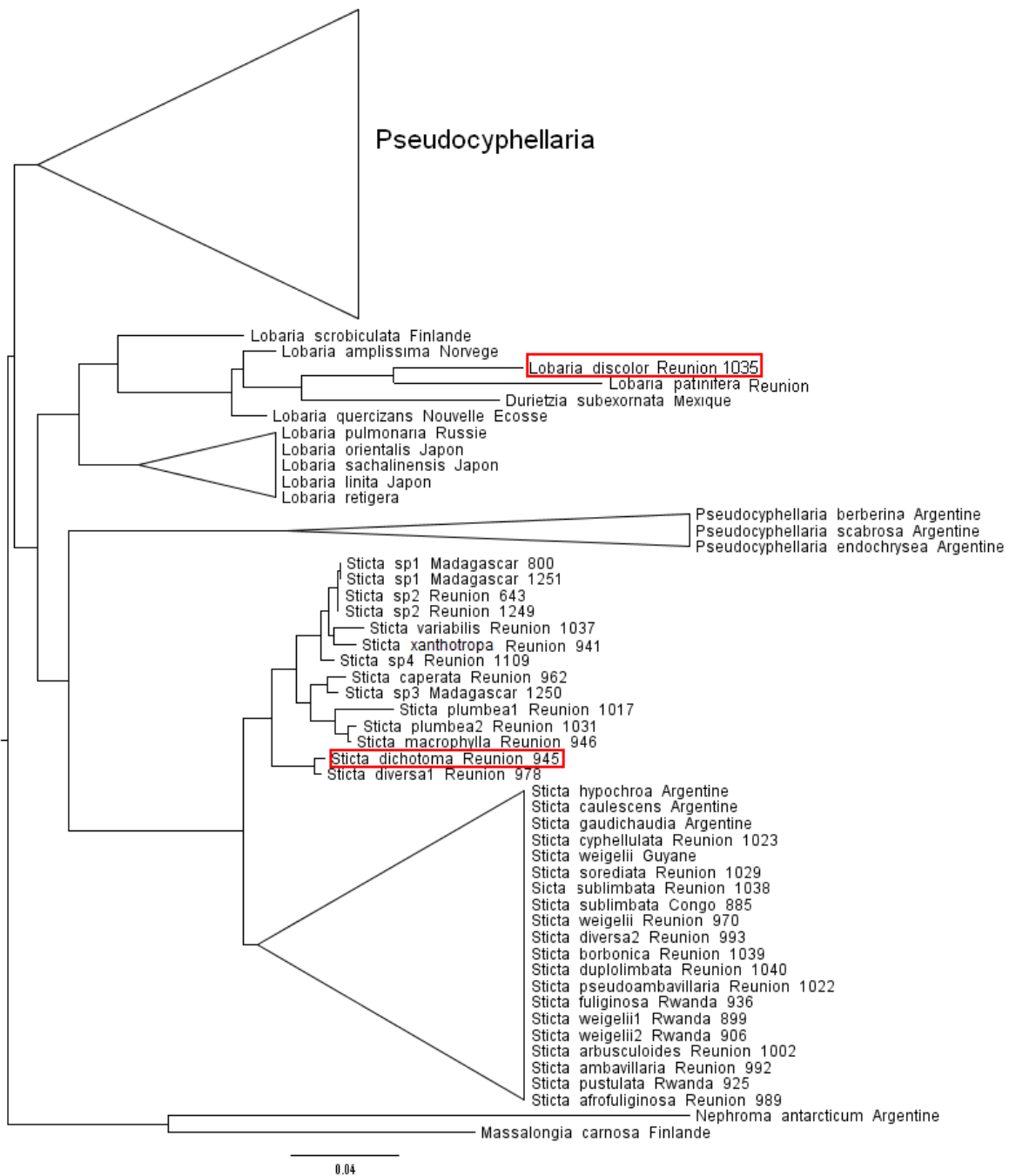


Figure 12. Arbre illustrant la position des photopaires observées à la Réunion (encadrées en rouge) au sein de la famille des Lobariaceae.

## 6) TCS sur le groupe *Peltigera neckeri*

### 6.1 Phylogénie du groupe *Peltigera neckeri*

Le genre *Peltigera* est divisé en deux clades principaux : le clade *Peltigera canina* et le clade *Peltigera polydactylon s.lat.* (Sérusiaux et al. 2009). Au sein de ce deuxième groupe, on distingue encore deux lignées principales : la section *polydactylon* et la section *horizontales*. La section *horizontales* contient notamment *P. horizontalis*, *P. elizabethae* et un groupe appelé « groupe *neckeri* » composé des espèces *P. neckeri*, *P. polydactyloides*, *P. collina* et *P. phyllidiosa*.

Nous avons effectué une analyse phylogénétique sur le groupe *Peltigera neckeri*. Une matrice a été réalisée, contenant les séquences ITS d'exemplaires de *P. polydactyloides*, *P. neckeri*, *P. collina* et *P. phyllidiosa*. Des séquences de GenBank ont été ajoutées aux séquences provenant de récoltes africaines et de la Réunion. *P. horizontalis* a été choisi comme outgroup. GBlocks a éliminé une partie des caractères, passant de 751 positions à 593, et conservant donc environ 78% de la matrice.

Une analyse en MP a été réalisée, ainsi qu'un calcul de bootstrap, selon la méthodologie décrite dans la section 2.g. 507 caractères étaient constants, 56 non-informatifs et 30 caractères étaient informatifs.

Une analyse en ML a été réalisée selon la méthode décrite dans la section 2.g. Un bootstrap a été calculé, avec 100 pseudoréplicats. Le meilleur arbre en ML est présenté ci-dessous.

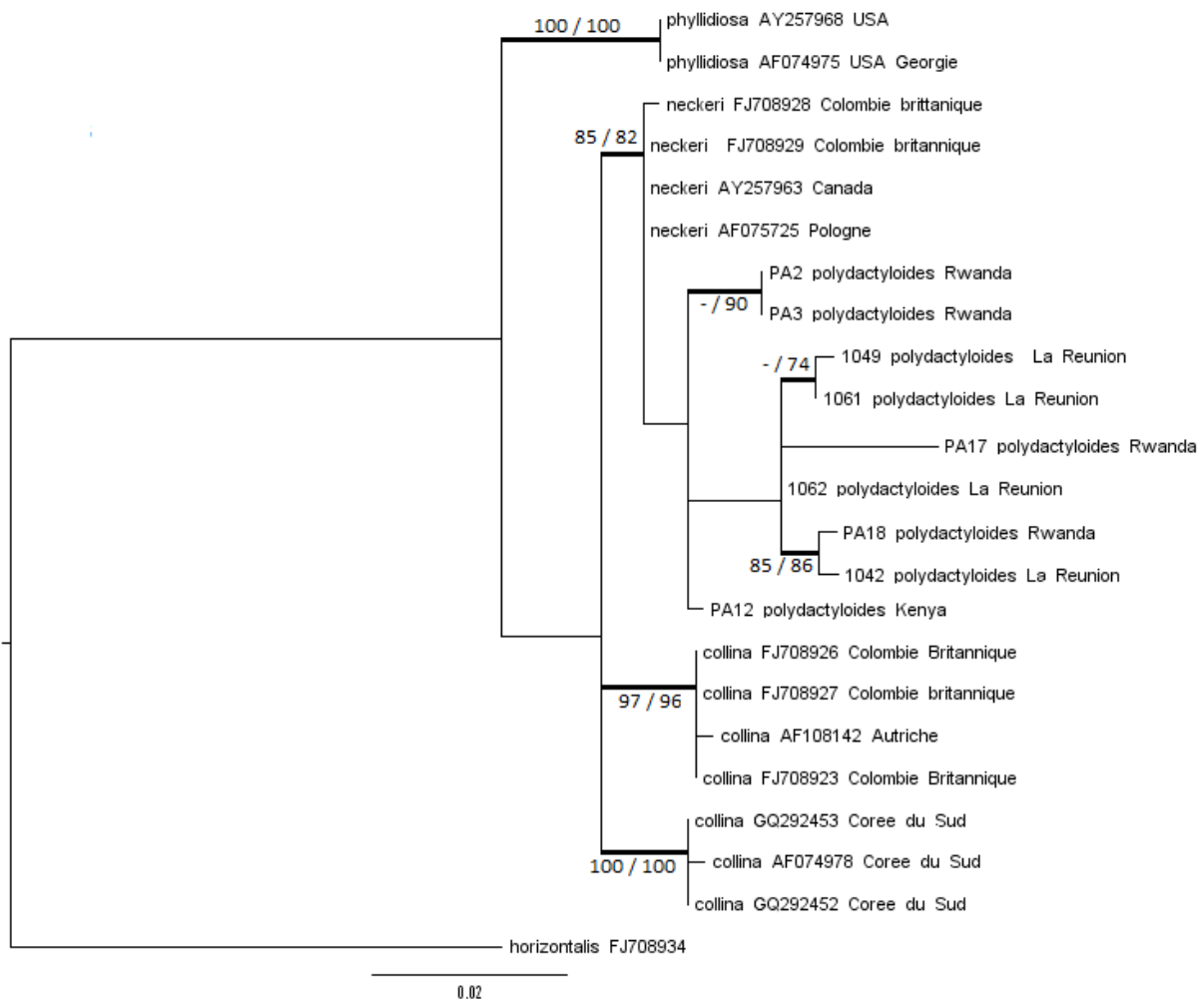


Figure 13. Meilleur arbre obtenu en ML pour l'analyse du groupe *Peltigera neckeri* (ITS). Ln= -1706.5905. La première valeur sur les branches est le bootstrap en MP, la seconde le bootstrap en ML. Les valeurs de bootstrap sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures ou égales à 70. Les branches épaissies sont celles qui ont un bootstrap en ML supérieur ou égal à 70.

Cette analyse montre bien que l'espèce *P. phyllidiosa* existe et est bien soutenue. L'espèce *P. collina* est séparée en deux lignées, toutes deux bien soutenues, l'une avec les représentants européens et nord-américains et l'autre avec ceux de Corée du Sud, et qui représentent vraisemblablement deux espèces différentes.

En revanche, il existe une grande incertitude dans le groupe constitué de *P. polydactyloides* et *P. neckeri*. Ce groupe est bien soutenu mais les relations en son sein sont peu résolues, et il serait intéressant de tenter de clarifier cette situation, pour voir si *P. neckeri*, européen et nord-américain, et *P. polydactyloides*, africain, sont différents sur le plan moléculaire, car il existe des différences morphologiques.

Les zones non ambiguës conservées par GBlocks ne permettent pas de clarifier les relations au sein de ce groupe (par exemple, seuls 30 caractères informatifs conservés en MP). Une solution serait de trouver des loci qui traitent l'information à plus bas niveau taxonomique ou qui s'alignent sans ambiguïtés. Cependant, nous n'en disposons pas actuellement.

C'est pourquoi, puisqu'une analyse phylogénétique classique ne permet pas de résoudre le râteau à la base de ce groupe, nous avons décidé de réaliser une analyse TCS sur ce groupe. En effet, comme nous allons l'expliquer ci-dessous, l'analyse TCS n'exclut aucun caractère et conserve donc plus d'informations.

## 6.2 TCS

Le TCS est une analyse en réseau qui permet d'estimer les relations généalogiques entre séquences selon la méthode de Templeton et al. (1992). Cette analyse se fait sur des fichiers contenant des séquences de nucléotides. Le programme groupe les séquences identiques en haplotypes et calcule leur fréquence dans l'échantillonnage. Une matrice de distances absolues est ensuite calculée, avec les comparaisons deux par deux de tous les haplotypes (Clement et al. 2000). Entre tous les réseaux possibles, le programme établit ensuite le réseau le plus parcimonieux. Si la différence de parcimonie entre deux liens n'est pas significativement différente, l'analyse présentera les deux liens (Templeton et al. 1992 ; pour les formules précises consulter cet article).

Le réseau obtenu donc une représentation la plus parcimonieuse des liens possibles entre les différents haplotypes observés. Les petits ronds représentent le nombre d'étapes requises en parcimonie pour passer d'un individu à l'autre. Un petit rond représente donc un haplotype manquant, intermédiaire entre les deux individus en question et le réseau représente les transitions possibles d'un haplotype à l'autre, selon le principe de la parcimonie, c'est-à-dire du nombre minimal d'étapes requises pour passer d'un haplotype à un autre. On a donc une représentation possible des liens entre les différents haplotypes. L'avantage de cette méthode par rapport aux analyses phylogénétiques classiques, dans le cas qui nous intéresse, est qu'elle n'exclut pas de zones jugées ambiguës, mais calcule cette valeur de parcimonie à partir des séquences dans leur intégralité. On ne perd donc pas d'information, ce qui permet d'établir des liens entre les individus, ce que les autres analyses n'ont pas permis.

Le TCS a été réalisé sur une matrice contenant la séquence ITS de 22 échantillons.

Le graphique obtenu est présenté dans la figure 14. Les numéros de 1 à 9 représentent des *P. polydactyloides*, de 10 à 13 des *P. neckeri*, de 14 à 20 des *P. collina* et de 21 à 22 des *P. phyllidiosa*. Le tableau avec la provenance et la référence des échantillons est fourni en annexe (annexe 7).

On voit que la délimitation entre les espèces est bien respectée, avec 4 groupes correspondant aux 4 espèces. L'espèce *P. phyllidiosa* apparaît très distante des autres, très différente. L'espèce *P. collina* est constituée de deux lignées bien distinctes, l'une correspondant aux échantillons d'Europe et d'Amérique du Nord, et l'autre aux échantillons de Corée. Il y a certainement une différence suffisante pour séparer cette espèce en deux, et cela confirme les résultats obtenus par l'analyse phylogénétique classique (voir plus haut). Cela confirme à nouveau, comme dans le cas des *Sticta* (voir partie consacrée) que des spécimens ayant le même type de

morphologie mais présents dans des endroits très différents semblent à nouveau pouvoir constituer des espèces différentes.

L'espèce *P. neckeri* semble occuper une position assez centrale dans le réseau. On voit une structure en étoile au niveau de *P. polydactyloides*, ce qui indique une grande variation dans les haplotypes, chacun étant très semblable à l'haplotype central, mais différents les uns par rapport aux autres. Cette topologie montre que tous les *P. polydactyloides* ont une structure cohérente à la notion d'espèce, étant proches les uns des autres, indistinctement répartis sans ségrégation en plusieurs groupes, tous plus ou moins équidistants d'un haplotype central.

On peut aussi noter que les espèces *P. polydactyloides* et *P. neckeri* sont très proches, l'haplotype 4 de *P. dactyloides* se trouvant à la même distance de 10-11-13 de *P. neckeri* que, par exemple, de l'haplotype 5-6 de *P. polydactyloides*. Cela indique donc que ces deux espèces sont très proches d'un point de vue moléculaire. La séparation entre les deux espèces n'apparaît pas évidente et il faudrait encore approfondir l'analyse. Il n'est donc pas possible de trancher cette question avec les données disponibles. Une solution serait d'ajouter d'autres loci à l'étude. Une autre hypothèse est que les espèces ne sont pas encore totalement séparées, isolées, d'un point de vue moléculaire, ce qui expliquerait la relative confusion au niveau de ce groupe *P. neckeri-P. polydactyloides*.

L'approche TCS confirme donc bien les résultats de l'analyse classique, et l'information supplémentaire qu'elle traite n'est pas suffisante pour faire disparaître la confusion existante dans ce groupe.

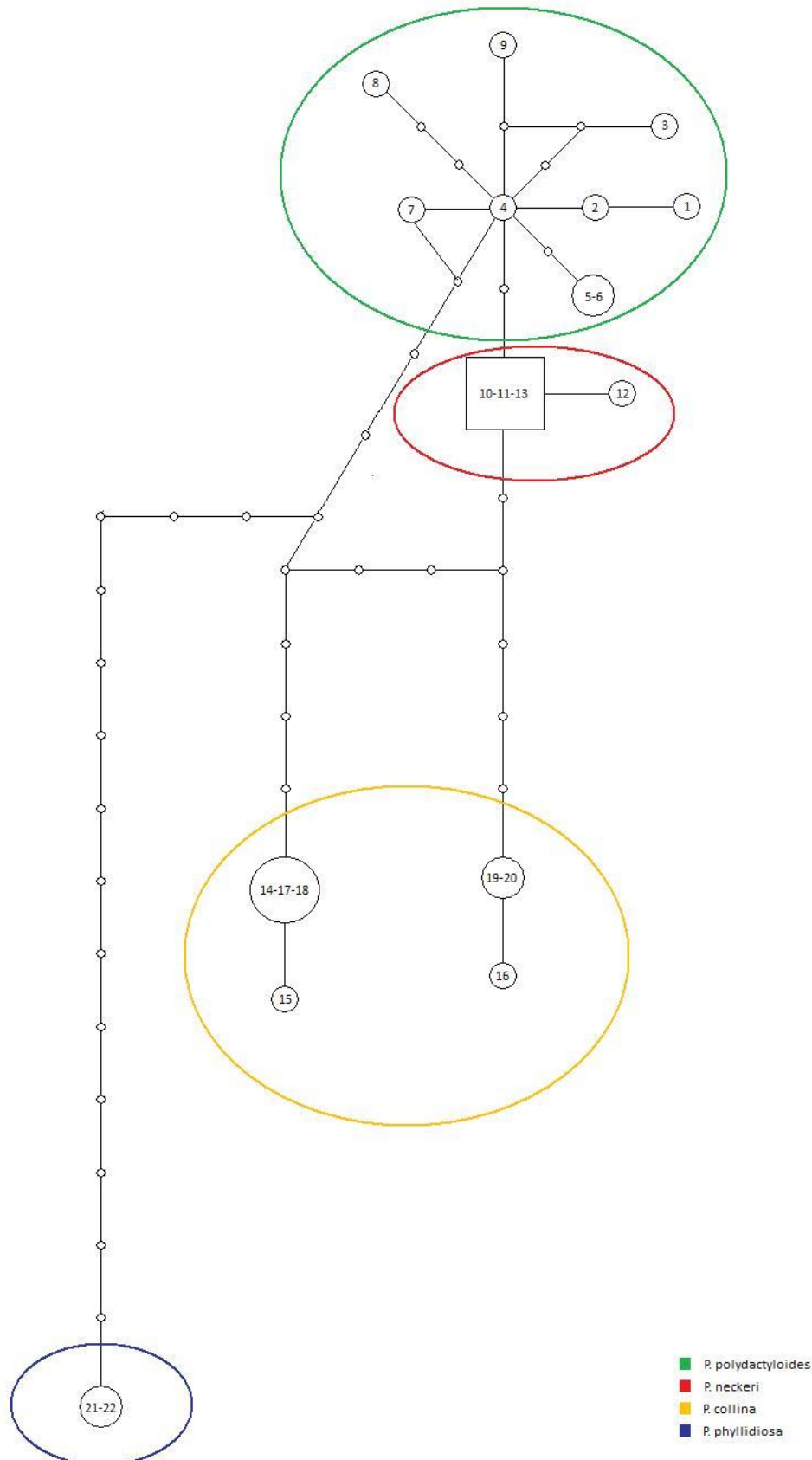


Figure 14. Analyse en réseau TCS réalisée sur le groupe *Peltigera neckeri*. Un rond avec numéro représente un haplotype, un petit rond un haplotype intermédiaire non-présent dans l'échantillonnage. Les numéros se reportent au tableau 4. Les cercles de couleur correspondent au nom donné aux échantillons lors de leur identification et ont été ajoutés après l'analyse. Le carré représente l'haplotype que l'analyse a calculé comme étant l'outgroup le plus probab

## 7) Etude des microsatellites dans le groupe *Peltigera dolichorhiza*

### 7.a Phylogénie du groupe *Peltigera polydactylon*

Comme nous l'avons dit plus haut, le genre *Peltigera* est divisé en deux clades principaux : le clade *Peltigera canina* et le clade *Peltigera polydactylon s.lat.* (Sérusiaux et al. 2009). Au sein de ce deuxième groupe, on distingue encore deux lignées principales : la section *polydactylon* et la section *horizontales*. La section *polydactylon* contient 2 clades principaux, l'un contenant la majorité des espèces de *P. dolichorhiza* et *P. neopolydactyla*, et l'autre contenant quelques *P. dolichorhiza* (vraisemblablement mal identifiés) ainsi que les espèces *P. polydactylon*, *P. nana*, *P. oceanica* ou *P. sumatrana*.

La distinction entre les *P. dolichorhiza* et *P. neopolydactyla* n'est pas claire et on nomme généralement *P. dolichorhiza* les échantillons en provenance des régions tropicales et de l'hémisphère sud, tandis que *P. neopolydactyla* désigne les échantillons des régions tempérées de l'hémisphère nord.

Une matrice a été réalisée avec les ITS des *Peltigera* du groupe *polydactylon*, englobant le groupe *Peltigera dolichorhiza*. *Peltigera hymenina* et *P. dissecta* ont été ajoutés comme outgroup.

Une analyse en maximum de vraisemblance a été réalisée sur cette matrice selon la méthode décrite dans la section 2.g. L'arbre le plus vraisemblable est présenté ci-dessous.

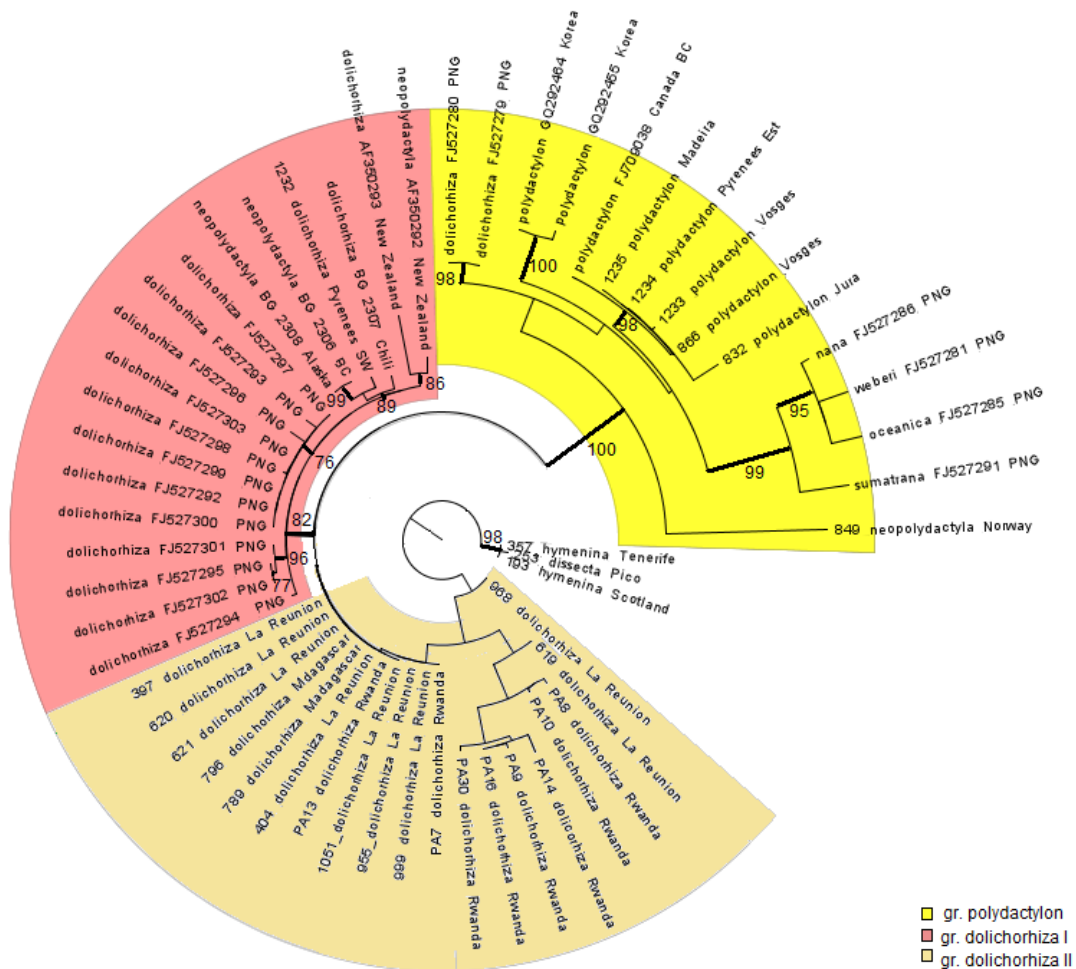


Figure 15. Meilleur arbre obtenu en ML au sein du groupe *Peltigera polydactylon* (ITS). Ln=-3010.2438. Les branches épaissies ont un bootstrap en ML supérieur à 70. Les valeurs de bootstrap en dessous de 70 ne sont pas indiquées.

Cet arbre montre bien l'irrésolution au sein du groupe *P. dolichorhiza*.

On voit ainsi bien dans l'arbre qu'il y a (en jaune sur la figure) un groupe « *polydactylon* » bien soutenu, avec notamment *P. polydactylon*, un groupe avec *P. nana*, *P. weberii*, *P. oceanica* et *P. sumatrana* ainsi que deux *dolichorhiza*, qui n'en sont donc vraisemblablement pas.

Nous avons ensuite (en rouge sur la figure) un groupe avec les *P. dolichorhiza* de Papouasie et d'Amérique, ainsi que *P. neopolydactyla*, bien soutenu, puis un troisième groupe, sans support, avec tous les *P. dolichorhiza* d'Afrique et de la Réunion.

Le groupe *P. dolichorhiza-P. neopolydactyla* englobe des espèces cosmopolites. Il est possible que l'ajout de nouveaux loci ou un alignement différent dans la matrice permettent de clarifier les positions au sein de ce groupe. Il est également possible qu'il y ait un phénomène de spéciation cryptique au sein de ce groupe. Il pourrait aussi y avoir de l'« incomplete lineage sorting » avec des espèces pas encore totalement isolées et différenciées. Il existe des variations morphologiques et chimiques au sein de ce groupe *P. dolichorhiza-P. neopolydactyla* (Sérusiaux et al. 2009), que l'analyse phylogénétique ne reflète pas.

Il nous a donc paru d'un grand intérêt de développer une étude sur les microsatellites au sein de ce groupe, et d'en étudier la variation, afin d'étudier les relations au niveau du complexe *P. dolichorhiza-P. neopolydactyla* (groupe *dolichorhiza* I et II). Cette étude a été réalisée lors du stage à l'Université du Connecticut, dans le service du Professeur Bernard Goffinet.

## 7.b Matériel et méthodes

### 7.b.1 Extraction de l'ADN et 454.

L'ADN génomique total a été extrait à partir de 0.02g de *Peltigera dolichorhiza* provenant de l'île de la Réunion avec un pilon et un mortier dans de l'azote liquide. La poudre obtenue a été incubée pendant 1h à 70°C dans 3ml de tampon d'extraction (1.21g Tris-HCl, 0.74g EDTA, 8.18g NaCl, 2g CTAB and 1g PEG8000 dans 100ml d'eau) avec 30 µl de β-mercaptoéthanol. Puis deux étapes d'extraction avec chloroforme:isoamyl alcool (24 :1) sont réalisées. Ensuite, les échantillons ont été précipités dans de l'isopropanol durant la nuit et centrifugés. Le précipité a été lavé à l'éthanol 70% et suspendu dans un tampon d'élution NE (Macherey-Nagel – 5mM Tris/HCl, pH 8.5). Puis une deuxième étape de précipitation utilisant 1/10 volume d'Acétate de Sodium 3M (pH 7.0) et 2.5 volumes d'éthanol 100% réfrigéré a été réalisée pour maximiser la pureté de l'ADN. Le précipité obtenu a été suspendu dans 120µl de tampon d'élution NE. La qualité de l'ADN a été vérifiée en utilisant un Nanodrop pour obtenir le rapport des densités optiques à 260:280 nm et a aussi été vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose 0.8% coloré avec SYBRsafe, et utilisant une échelle « Invitrogen's High Molecular Weight DNA mass ladder », pour détecter la présence d'ADN de haut poids moléculaire, et ainsi vérifier qu'il n'était pas dégradé. La quantité d'ADN a été estimée en utilisant le « Invitrogen's Qubit fluorometer system with a Quant-iT™ dsDNA BR Assay ». Le ADN a été envoyé au IGSP Sequencing Core Facility (119 Biological Sciences Building, Science Drive, Durham, NC 27708) à la Duke University pour préparer la bibliothèque « shotgun » pour le Roche FLX 454 RL en utilisant le système Titanium. La bibliothèque a été groupée avec 5 autres bibliothèques taggées MID et placés sur une plaque « PicoTitre Plate » dans un Séquenceur de génome FLX. On a ajouté aux séquences générées un adaptateur et des régions de faible qualité, et elles ont été assemblées en contigs en utilisant l'Assembleur Roche GS De novo sur le cluster de l'ordinateur de Biotechnologie d'UConn, en utilisant les paramètres par défaut pour un génome large ou complexe, à l'exception du pourcentage minimal de recouvrement qui a été fixé à 95%.

Il y avait 467 027 lectures de sequences (sequence reads) (185.606.677 bases) générées à partir de la bibliothèque de *Peltigera*. Elles furent assemblées en 64.460 contigs, variant en longueur de 250 à 10.186 bases. L'assemblage a utilisé 367.378 des lectures de l'input (c. 80%), comprenant 140.646.606 bases. L'assembleur a estimé une erreur de lecture de l'ordre de 0.7%.

### 7.b.2 Localisation des microsatellites et design des primers

Pour identifier les régions des séquences contenant des microsatellites, les contigs résultantes ont été soumises au programme msatCommander 0.8.2 (Faircloth 2008). Ce programme a développé des primers automatiquement en utilisant primer3 (Rozen et Skaletsky 2000) comme outil de design de primer, en acceptant



les dinucléotides à partir de 9 répétitions, les trinucleotides à partir de 7 répétitions, les tétranucleotides à partir de 6 répétitions et les penta- et hexa-nucleotides à partir de 5 répétitions.

Il y a un total de 653 zones répétées trouvées dans les 64 460 contigs observées (environ 1.01% des contigs contenaient des microsatellites – bien que plusieurs contigs présentaient plusieurs microsatellites), comprenant: 291 répétitions de plus de 8 dinucleotides ; 272 répétitions de plus de 6 trinucleotides ; 43 répétitions de plus de 5 tetranucleotides ; 15 répétitions de plus de 4 pentanucleotides ; 32 répétitions de plus de 4 hexanucleotides. Des séquences de primers ont été conçues avec succès pour 331 de ces zones. 11 paires de primers, représentant les plus longues répétitions de di-, tri- et tetranucleotides pour lesquels des primers ont été développés avec succès ont été sélectionnés pour le screening initial et commandés (Fisher Scientific). Puis 10 autres primers ont été sélectionnés, avec les plus longues répétitions d'hexa- et penta-nucleotides, ainsi que les plus longs des tri- et tetra-nucleotides restants. Ces primers ont été testés par PCR sur l'ADN original du *Peltigera* utilisé pour générer la bibliothèque 454.

### 7.b.3 Amplification et séquençage des microsatellites

Vingt et un microsatellites ont donc été sélectionnés parmi la liste générée informatiquement, sur base du nombre de répétitions, de la taille du produit à amplifier et de la proximité du primer avec le microsatellite, pour optimiser la qualité des séquences produites. Les primers sélectionnés ont été commandés à la société Eurofins (mwg operon) ([www.eurofins.com/](http://www.eurofins.com/)). La liste complète des microsatellites et des primers est fournie en annexe (annexe 8).

Ces primers ont été testés sur l'échantillon de *Peltigera dolichorhiza* de la Réunion utilisé lors du séquençage 454. Parmi ces paires de primers, les 13 qui donnaient les meilleurs résultats lors de l'amplification ont été sélectionnés, et ont été utilisés pour amplifier ces régions microsatellites chez des individus d'autres populations du groupe *Peltigera dolichorhiza-Peltigera neopolydactyla* (16 autres individus en tout). 11 de ces primers ont amplifié de façon satisfaisante les microsatellites chez ces autres individus et le nombre de répétitions des régions microsatellites a été compté chez chaque échantillon dans les onze loci considérés.

L'amplification et le séquençage des régions microsatellites s'est déroulée selon le protocole suivant :

La première étape était une PCR pour amplifier la région microsatellite en question. Les quantités d'ADN et de réactifs pour la PCR ainsi que les paramètres de température, de durée des étapes et de nombre de cycles a été adapté pour chaque région microsatellite et chaque spécimen, afin d'optimiser les résultats.

Le programme de base pour la PCR était le suivant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 2 minutes, puis 5 cycles composés d'une phase de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes puis une phase d'hybridation à 55°C pendant 45 secondes, puis d'une phase d'élongation à 65°C pendant 2 minutes 30 secondes. Ensuite 35 cycles composés d'une phase de dénaturation à 94°C, puis une phase d'hybridation à 58°C pendant 45 secondes, puis une phase d'élongation à 60°C pendant 2 minutes. Ce programme a été ajusté notamment au niveau de la phase d'hybridation qui a varié entre 52 et 58°C.

Les quantités de réactifs ajoutés étaient basées sur l'un des 2 protocoles suivants. Les 2 protocoles ont été testés sur chaque région microsatellite et celui qui fournissait les meilleurs résultats était sélectionné et optimisé.

Protocole 1 :

17.8 µl H<sub>2</sub>O, 2.5 µl Hot Master Buffer, 0.5 µl dNTP, 1.5 µl primer forward, 1.5 µl primer reverse, 0.2 µl Hot Master Taq, avec une quantité d'ADN variant entre 0.5 µl et 2µl selon les échantillons.

Protocole 2

11 µl H<sub>2</sub>O, 2.5 µl Buffer, 2µl dNTP, 0.5 µl MgCl<sub>2</sub>, 1µl BSA, 1 µl Primer forward, 1 µl Primer reverse, 0.15 µl Taq avec une quantité d'ADN variant entre 0.5 et 2 µl selon les échantillons.

Les quantités d'H<sub>2</sub>O, de MgCl<sub>2</sub>, de primers, de BSA, de dNTP pouvaient varier, afin d'optimiser le résultat. Du DMSO a été ajouté lors de certaines amplifications.

Après la PCR, les échantillons étaient mis sur un gel d'agarose 1% coloré au SYBRsafe et migraient une demi-heure, soumis à une différence de potentiel de 100V. Le gel était visionné sous UV. Les amplifications positives étaient purifiées selon le protocole suivant :

7.5 µl de produit PCR était ajoutés à un mélange composé de 0.5 µl de SAP, 0.075 µl d'ExoI et 0.675 µl de SAP Buffer. La SAP retire le groupe phosphate des dNTP en excès, l'ExoI digère les primers simple-brin en dNTP. Ce mélange était placé à 37°C pendant 40 minutes pour faire agir les enzymes, puis à 80°C pendant 15 minutes pour les dénaturer.

Après cette purification, les produits étaient soumis à une réaction de séquençage pour les préparer à passer dans le séquenceur. 0.75 µl de produit PCR était ajouté à un mélange composé de 6.17 µl d'H<sub>2</sub>O, 2µl de buffer, 0.5µl de primer forward, 0.5µl de primer reverse et 0.85 µl de big dye qui contient des dNTP, des ddNTP marqués, du tampon et du MgCl<sub>2</sub>. Cette big dye permet de fixer sur les dNTP un ddNTP couplé avec une sonde fluorescente. Ces sondes fluorescentes émettent à des longueurs d'onde différentes ce qui permettra de différencier les nucléotides pendant le séquençage.

S'ensuit une étape de nettoyage pour obtenir l'ADN le plus pur possible. 500 µl de Sephadex, un gel de dextrane utilisé pour la filtration en colonne, sont placés dans un puits d'une plaque de filtration 96 puits. La plaque est posée sur une plaque de collection et est centrifugée pendant 5 minutes à 3000 tours par minute. L'eau est vidée de la plaque de collection. Ensuite la plaque de Sephadex est posée sur une plaque de séquençage. 10 µl d'eau sont ajoutés aux produits de la réaction de séquençage. Puis 15 µl de ce mélange sont ajoutés dans un puits de la plaque de Sephadex et cette plaque est centrifugée à 2500 tours par minute pendant 5 minutes. La plaque de séquençage est récupérée et placée dans le séquenceur. Cette étape permet d'éliminer les résidus non-souhaités de la réaction de séquençage, afin qu'il ne reste plus que nos séquences à analyser dans le séquenceur.

Le séquençage était réalisé par séquençage de Sanger sur une machine ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, U.S.A.).

Les séquences obtenues étaient éditées avec Sequencher, et le nombre de répétitions de la région microsatellite était compté à l'œil, à partir des séquences éditées.

### 7.c Résultats et discussion

Il s'agit de la première étude développant des primers pour des régions microsatellites de lichens utilisant des données issues d'un séquençage nouvelle génération. Il s'agit également de la première étude présentant une variation allélique pour des microsatellites de lichens.

Les analyses ont été réalisées sur 17 échantillons répertoriés dans le tableau ci-dessous (un tableau plus complet avec notamment les références complètes de chaque échantillon est fourni dans l'annexe 9), provenant d'espèces du groupe *Peltigera dolichorhiza*. L'échantillon « R » est celui originaire de la Réunion qui a été soumis au 454 et il sert de contrôle, pour vérifier que les données du 454 sont en accord avec les amplifications, c'est-à-dire que le nombre de répétitions dans la région microsatellite compté dans la séquence contig du 454 est le même que celui compté dans celle issue du séquençage Sanger après PCR.

Tableau 2. Numéros et origines des échantillons.

N° échantillon	Origine	N° échantillon	Origine
R	Réunion	47	Papouasie Nouvelle-Guinée
PA7	Rwanda	52	Papouasie Nouvelle-Guinée
PA8	Rwanda	91	Papouasie Nouvelle-Guinée
PA9	Rwanda	93	Papouasie Nouvelle-Guinée
PA10	Rwanda	98	Papouasie Nouvelle-Guinée
PA13	Rwanda	2306	Canada
PA14	Rwanda	2307	Chili
PA15	Rwanda	2308	USA
PA16	Rwanda		

Le nombre de répétitions a été comptabilisé pour chaque locus et chaque spécimen. Le tableau ci-dessous en présente les résultats, par locus, avec les séquences des primers utilisés pour amplifier les loci, la séquence microsatellite, la variation dans le nombre de répétitions, la taille du produit d'amplification, le nombre d'échantillons amplifiés, le nombre d'allèles différents par locus, une évaluation de l'hétérozygotie (cf. plus bas) et la séquence GenBank de la région microsatellite de l'échantillon de référence. Le tableau avec le détail du nombre de répétitions pour chaque échantillon et chaque locus est joint en annexe 10.

Tableau 3. Loci microsatellites identifiés et screenés pour les échantillons de *Peltigera dolichorhiza*.

Ce tableau montre pour chaque locus les paires de primers, le type de répétition et leur variation dans l'échantillonnage, la taille du fragment original (pb), le nombre d'individus comptabilisés, le nombre d'allèles observés, l'hétérozygotie (Het) et la séquence GenBank du locus pour l'échantillon de la Réunion (données du 454).

	Primers forward/reverse	répétition	taille	n	alleles	Het.	Genbank #
Peltdol 1	AGTGGCATAGTAGTTCTCGAATTTATC GAGGTAGTGGGTCAGCGG	(ACAT) <sub>5-11</sub>	184	17	4	0.394	HM542469
Peltdol 2	AAATCGGTGCATGCCAAGG TGAGCCATGTCCGGTAAGC	(AATG) <sub>3-8</sub>	371	16	5	0.641	HM542470
Peltdol 5	CCGCTGCCGTTCCATTG ACCGACGAACCTCTGAACG	(CTT) <sub>6-15</sub>	350	17	6	0.768	HM542471
Peltdol 7	CTGCCGTTTACCACCGAAG AGATCTCAATCGGGAGAAGGC	(GTT) <sub>4-19</sub>	301	16	6	0.734	HM542472
Peltdol 10	TTCCGCCAACCAATCTTCG GGTTTCTGCTTGAGGTCGC	(AAC) <sub>7-20</sub>	326	16	8	0.805	HM542473
Peltdol 9	TCTCCCTGCTTGGCTAGTG CTGCATGAGGGCGAAAGTC	(GTT) <sub>8-31</sub>	273	17	8	0.803	HM542474
Peltdol 12	GTCGTTCCGCGAGTATTATGG GAAAGAGCACACAGCTCCG	(AAGTAC) <sub>1-7</sub>	145	15	5	0.658	HM542475
Peltdol 15	ATCGTCCGGCATCTACTGC TGACTGGGATAACATTAAGCAAGG	(GGCATT) <sub>3-6</sub>	321	17	3	0.547	HM542476
Peltdol 17	TAAGCATCCAGCCTGACGG GCTTCTTGCCTTGGCACC	(ATGT) <sub>7-13</sub>	392	14	4	0.541	HM542477
Peltdol 19	AGTCGCGTCAACAACTGC CTGTTGGCATATGACCTGGG	(AAC) <sub>4-10</sub>	387	16	3	0.508	HM542478
Peltdol 20	GGAAGTTGGTGTGAATTGTAGC GAGCGACTCAAACCTTCG	(AAG) <sub>3-9</sub>	123	17	4	0.561	HM542479

On peut voir la très grande variation dans le nombre de répétitions et le nombre très important d'allèles. Chaque spécimen était unique et aucun ne présentait le même set de répétitions (cf. annexe 10), même lorsqu'il s'agissait d'échantillons sympatriques, provenant du même endroit. Cela suggère un fort taux de recombinaison dans les populations. *Peltigera dolichorhiza* se reproduit de façon sexuée et présente un grand nombre d'apothécies, ce qui rend possible cette forte recombinaison. Le nombre de répétitions était très variables, avec au moins 3 allèles différents par locus. On peut observer un pattern géographique dans le nombre de répétitions dans les régions microsatellites (cf. ci-dessous). Certains loci étaient extrêmement variables, avec des variations variant de 8 à 31 répétitions pour « Peltdol 9 » ou de 7 à 20 répétitions pour « Peltdol 10 » et sont sans doute trop polymorphes pour pouvoir être exploités de façon vraiment efficace. D'autres en revanche, par exemple le 1, le 2, le 19 ou le 20 semblent très clairement exprimer un pattern géographique, particulièrement bien visible entre les individus papous et africains (voir annexe 10).

Nous avons également calculé l'hétérozygotie, représentée dans le tableau ci-dessus. Les champignons sont haploïdes et ne présentent donc pas de spécimens hétérozygotes mais il est possible de calculer un taux d'hétérozygotie selon la formule de Nei (1978) :  $Het = 1 - \sum x_i^2$  avec  $x_i$  la fréquence de l'allèle  $i$ .

Ce taux d'hétérozygotie tient compte à la fois du nombre d'allèles et de leurs fréquences respectives dans l'échantillonnage. Un taux proche de 1 représente une population très « hétérozygote » avec de nombreux allèles assez faiblement représentés, alors qu'une valeur faible représente plutôt un plus petit nombre d'allèles ou une population avec un ou des allèles très dominants. Nos valeurs d'hétérozygotie très élevées (jusqu'à 0.805) montrent bien la grande variabilité au sein de notre échantillonnage.

La grande variation dans le nombre de répétitions devrait permettre de l'exploiter ultérieurement pour des études phylogénétiques, phylogéographiques ou de génétique des populations. Il s'agit de la première étude sur des microsatellites de lichens obtenus grâce à des données du 454.

Nous avons réalisé un Neighbour-Joining, en nous basant sur le nombre de répétitions dans les régions microsatellites, en définissant comme un état de caractère le nombre de répétitions, et en attribuant un état de caractère différent pour chaque nombre de répétitions différents (avec un nombre de caractères égal au nombre d'allèles existants pour chaque locus). Une matrice de 17 taxons et 11 caractères a donc été créée et un Neighbour-Joining calculé avec PAUP. Un bootstrap avec 500 pseudoréplicats a été calculé. Le résultat est présenté dans la figure 16.

Ce résultat est intéressant car il suggère que le nombre de répétitions reflète un pattern géographique. En effet, on voit que tous les échantillons africains se retrouvent dans un groupe à part, et que les deux *P. neopolydactyla* (de l'hémisphère Nord) forment un groupe à part niché au sein du groupe de Papouasie+Chili+*Neopolydactyla*. On voit aussi que tous les échantillons africains sont ensemble, sans support pour les séparer en différents groupes, et donc que les distances entre eux sont similaires de telle sorte qu'aucune ségrégation entre eux n'est soutenue. Ces résultats sur les microsatellites concordent avec ceux de l'analyse ITS. Cela démontre que l'analyse des microsatellites a un sens du point de vue phylogénétique en ce qui concerne ce groupe. Ainsi, ce Neighbour-Joining n'apporte pas d'information supplémentaire par rapport à l'analyse ITS, mais il ne s'agit ici que d'un calcul de distance. Son intérêt est avant tout de montrer que le nombre de répétitions dans les régions microsatellites, bien que très variable, n'est pas le fruit du hasard mais a un sens, qui pourra sans doute être exploité ultérieurement.

On voit donc bien la grande variabilité dans le nombre de répétitions dans les régions microsatellites au sein du groupe *P. dolichorhiza*. Les microsatellites sont donc un marqueur préférentiel pour exprimer la diversité au sein de populations, vu leur grande variation, et ces résultats le confirment, par rapport à l'analyse sur les ITS (voir plus haut). Il sera intéressant de voir si cette variation est exploitable pour des analyses ultérieures, par exemple en génétique des populations ou en biogéographie. Il serait également utile de voir si ces régions microsatellites existent chez d'autres espèces de *Peltigera*, si les primers les amplifient, et si une variation y existe. Si oui, il serait également intéressant de voir si ces régions existent dans d'autres genres, par exemple chez *Nephroma*, *Solorina* ou au sein de la famille des Lobariaceae. Vu la grande variation dans nos régions microsatellites, il

pourrait aussi être utile de chercher d'autres régions microsatellites ou d'autres loci avec une moins grande variation, dans l'optique d'obtenir un signal phylogénétique à plus haut niveau taxonomique. L'étude des microsatellites au sein des Peltigerales paraît prometteuse, et devrait donc être approfondie.

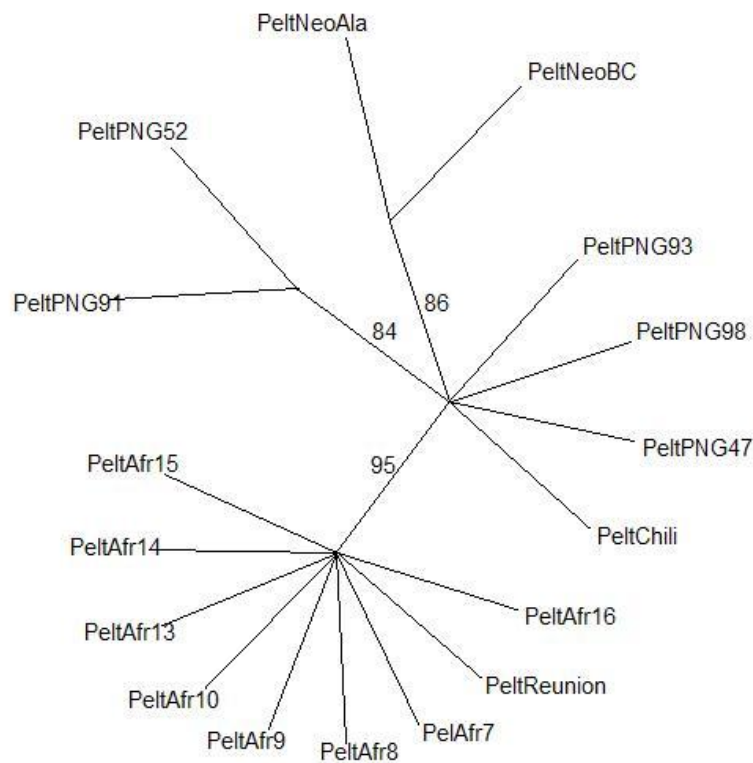


Figure 16. Neighbour-Joining calculé à partir des répétitions microsatellites. Les branches soutenues sont celles qui ont un bootstrap d'au moins 70, les autres apparaissent comme polytomiques.

Il s'agit de la première étude sur des lichens qui exploitent des données de séquençage de nouvelle génération pour localiser des microsatellites, et il est beaucoup plus aisé de les localiser par cette méthode que par la méthode classique (voir introduction, partie microsatellites). Notre étude confirme ce fait.

Les données du séquençage 454 se sont révélées très utiles et efficaces pour révéler les zones microsatellites dans le génome du lichen. Cependant, de nombreuses autres applications semblent possibles. Par exemple, elles pourraient permettre la localisation de nouvelles zones à amplifier, qui pourraient servir dans des analyses phylogénétiques classiques. Dans ce sens, le génome mitochondrial du lichen a été reconstitué dans sa quasi-totalité, et nous avons essayé d'amplifier des régions inter-géniques susceptibles de présenter de la variation exploitable en phylogénie. Nous avons développé des primers pour cinq de ces régions, et réussi à amplifier deux de ces régions pour différents spécimens de Peltigerales. Cependant, si une variation existait, elle ne nous a pas semblé significative, ni suivre un pattern phylogénétique. Toutefois, continuer dans cette voie pourrait permettre de développer de nouveaux marqueurs moléculaires qui pourraient être utilisés, selon la variation existante, à haut ou à bas niveau taxonomique.

D'autres applications devraient aussi être possibles à partir des données 454.

Un article reprenant une partie des résultats de cette étude a été soumis à *American Journal of Botany* et vient d'être accepté. Une copie du manuscrit est fournie en annexe 11.

## Bibliographie

- ALTEKAR, G., AITOKALLIO, T., HUELSENBECK, J.P. and RONQUIST, F. 2004. Parallel Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20 : 407-415.
- ARVIDSSON, L. 1982. A monograph of the lichen genus *Coccocarpia*. *Opera Botanica* 67: 1-96.
- CASTRESANA, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology et Evolution* 17 : 540-552.
- CHEKE, A. and HUME, J. (2008) *Lost land of the Dodo*. TetA D POYSER, London, UK.
- CORNEJO, C., CHABANENKO, S. and SCHEIDEGGER, C. 2009. Phylogenetic analysis indicates transitions from vegetative to sexual reproduction in the *Lobaria retigera* group (Lecanoromycetidae, Ascomycota). *Lichenologist* 41(5) : 275-284.
- CUBERO, O.F., CRESPO, A., FATEHI, J. and BRIDGE, P.D. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Systematics and evolution* 216(3-4): 243-249.
- DAVID, J.C. and HAWKSWORTH, D.L. 1995. Lichens of Mauritius I: some new species and records. - In: KNOPH, J.G., SCHRUFER, K. and SIPMAN, H.J.M. (eds.): *Studies in Lichenology with Emphasis on Chemotaxonomy, Geography and Phytochemistry*. Festschrift Christian Leuckert. Bibliotheca Lichenologica, J. Cramer, Berlin, Stuttgart, pp. 93-111.
- DELISE, D. (1825) *Histoire des lichens. Genre Sticta*. Chalopin fils, imprimeur de la société linnéenne. Caen.
- ELVEBAKK, A., ROBERTSEN, E.H., PARK, C.H. and HONG, S.G. 2010. *Psorophorus* and *Xanthopsoroma*, two new genera for yellow-green, corticolous and squamulose lichen species previously in *Psoroma*. *Lichenologist* 42(5) : 563-585.
- FAIRCLOTH, B.C. 2008. MSATCOMMANDER: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources* 8: 92-94.
- FEUERER, T. 2010. [http://www.biologie.uni-hamburg.de/checklists/lichens/africa/france\\_Réunion\\_I.htm](http://www.biologie.uni-hamburg.de/checklists/lichens/africa/france_Réunion_I.htm) [Visité le 16/8/2010].
- GALLOWAY, D.J. 1988. Studies in *Pseudocyphellaria* (lichens). I. The New Zealand species. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series* 17: 1-267.
- GALLOWAY, D.J. 1994. Studies on the lichen genus *Sticta* (Schreber) Ach.: II. Typification of taxa from Swartz's Prodrum of 1788. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany* 24(1): 35-48.
- GALLOWAY, D. J. 1995. Studies on the lichen genus *Sticta* (Schreber) Ach. : III. Notes on species described by Bory de St-Vincent, William Hooker, and Delise, between 1804 et 1825. *Nova Hedwigia* 61 : 147-188.
- GALLOWAY, D.J. 1998. Studies on the lichen genus *Sticta* (Schreber) Ach.: V. Australian species. *Tropical Bryology* 15: 117-160.
- GALLOWAY, D.J. 2001: *Sticta*. In: MCCARTHY, PM (ed.): *Flora of Australia. Volume 58A, Lichens 3*. ABR/CSIRO Australia, Melbourne, pp. 78-97.
- GALLOWAY, D. J. 2006. Notes on the holotype of *Sticta damaecornis*  $\beta$  *weigeli* Ach. (= *Sticta weigeli*). *Lichenologist* 38(1): 89-92.
- GALLOWAY, D.J. and THOMAS, M.A. 2004. *Sticta*. In: NASH, T.H., III, RYAN, B.D., DIEDERICH, P., GRIES, C. and BUNGARTZ, F. (eds.): *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region, Vol. 2. Lichens Unlimited*, Arizona State University, Tempe, Arizona, pp. 513-524.
- GALLOWAY, D.J. and ARVIDSSON, L. 1990. Studies in *Pseudocyphellaria* (lichens) II. Ecuadorean species. *Lichenologist* 22(2): 103-135.
- GALLOWAY, D.J. and JØRGENSEN, P.M. 1987. Studies in the lichen family Pannariaceae II. The genus *Leioderma* Nyl. - *Lichenologist* 19: 345-400.
- GALLOWAY, D.J., KANTVILAS, G. and ELIX, J.A. 2001. *Pseudocyphellaria*. In: MCCARTHY, P.M. (ed.): *Flora of Australia. Volume 58A, Lichens 3*. ABR/CSIRO Australia, Melbourne, pp. 47-77.
- GOFFINET, B. and BAYER, R.J. 1997. Characterization of mycobionts of photomorph pairs in the Peltigerineae (lichenized ascomycetes) based on internal transcribed spacer sequences of the nuclear ribosomal DNA *Fungal Genetics and Biology* 21(2) : 228-237.
- GOFFINET, B. and MIADLIKOWSKA, J. 1999. *Peltigera phyllidiosa* (Peltigeraceae, Ascomycotina), a new species from the Southern Appalachians corroborated by its sequences *Lichenologist* 31 : 247-256.

- GREEN, T.G.A., BUDEL, B., HEBER, U., MEYER, A., ZELLNER, H. and LANGE, O. 1993. Photosynthetic performance between cyanobacterial and green algal components of lichen photosymbiodemes measured in the field. *New Phytologist* 125(4): 723-731.
- HOFSTETTER, V., MIADLIKOWSKA, J., KAUFF, F. and LUTZONI, F. 2007. Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: a case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Mol Phylogenet Evol* 44: 412-426.
- HÖGNABBA, F., STENROOS, S. and THELL, A. 2009. Phylogenetic relationships and evolution of photobiont associations in the Lobariaceae (Peltigerales, Lecanoromycetes, Ascomycota). *Bibliotheca Lichenologica* 100: 157-187.
- JAMES, P.W. and WHITE, F.J. 1987. Studies on the genus *Nephroma* I. The European and Macaronesian species. - *Lichenologist* 19: 215-268.
- JØRGENSEN, P.M. 1994. Studies in the lichen family Pannariaceae VI: the taxonomy and phytogeography of *Pannaria* Del. s. lat. - *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 76: 197-206.
- JØRGENSEN, P.M. 1998. What shall we do with the blue-green counterparts? *Lichenologist* 30 : 351-356
- JØRGENSEN, P.M. 2000 [2001]. Survey of the lichen family Pannariaceae on the American continent, north of Mexico. *Bryologist* 103(4): 670-704.
- JØRGENSEN, P.M. 2001a. The lichen genus *Erioderma* (Pannariaceae) in China and Japan. *Annales Botanici Fennici* 38: 259-264.
- JØRGENSEN, P.M. 2001b. Two remarkable additions to the Pannariaceous flora of South America. *Bryologist* 104(2): 260-262.
- JØRGENSEN, P.M. 2001c. The present status of the names applicable to species and infraspecific taxa of *Erioderma* (lichenised ascomycetes) included in Zahlbruckner's Catalogus. *Taxon* 50(2): 525-541.
- JØRGENSEN, P.M. 2001d. Four new Asian species in the lichen genus *Pannaria*. *Lichenologist* 33(4): 297-302.
- JØRGENSEN, P.M. 2001e. New species and records of the lichen family Pannariaceae from Australia. - In: MCCARTHY, P.M., KANTVILAS, G. and LOUWHOFF, S.H.J.J. (eds.): *Lichenological Contributions in Honour of Jack Elix*. Bibliotheca Lichenologica, J. Cramer, Berlin, Stuttgart, pp. 109-139.
- JØRGENSEN, P.M. 2002a. Further notes on Asian species of the lichen genus *Fuscopannaria*. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 92: 225-229.
- JØRGENSEN, P.M. 2002b. Two species of Pannariaceae (lichenised ascomycetes) from New Zealand with a wider Southern Hemisphere distribution. *New Zealand Journal of Botany* 40: 327-329.
- JØRGENSEN, P.M. 2002c. *Kroswia*, a new genus in the Pannariaceae (lichenized ascomycetes). *Lichenologist* 34(4): 297-303.
- JØRGENSEN, P.M. 2003a. Conspectus familiae Pannariaceae (Ascomycetes lichenosae). - *Ilicifolia* 4: 1-78.
- JØRGENSEN, P.M. 2003b. Notes on African Pannariaceae (lichenized ascomycetes). - *Lichenologist* 35(1): 11-20.
- JØRGENSEN, P.M. 2003c. Studies in the lichen family Pannariaceae XI. The isidiate species of the genus *Pannaria* Del. - *Nova Hedwigia* 76(1-2): 245-255.
- JØRGENSEN, P. M. 2007. New discoveries in Asian pannariaceous lichens. *Lichenologist* 39(3): 235-243.
- JØRGENSEN, P. M. 2008. *Vahliella*, a new lichen genus. *Lichenologist* 40(3): 221-225.
- JØRGENSEN, P.M. 2009. A new, Asian species in the *Parmeliella marinana* complex (Pannariaceae). *Lichenologist* 41(3): 257-259.
- JØRGENSEN, P.M. and ARVIDSSON, L. 2001. The sorediate species of the lichen genus *Erioderma* Fée. *Nova Hedwigia* 73(3-4): 497-512.
- JØRGENSEN, P.M. and ARVIDSSON, L. 2002. The lichen genus *Erioderma* (Pannariaceae) in Ecuador and neighbouring countries. *Nordic Journal of Botany* 22: 87-114.
- JØRGENSEN, P.M. and GALLOWAY, D.J. 1989. Studies in the lichen family Pannariaceae. 3. The genus *Fuscoderma*, with additional notes and a revised key to *Leioderma*. *Lichenologist* 21 : 295-301.
- JØRGENSEN, P.M. and JAMES, P.W. 1990. Studies in the lichen family Pannariaceae IV : The genus *Degelia*. *Bibliotheca lichenologica* 38 : 253-276.
- JØRGENSEN, P.M. and JAMES, P.W. 2001. A new *Erioderma* taxon from the Azores. *Lichenologist* 33(6) :483-485.
- JØRGENSEN, P.M. and KASHIWADANI, H. 2001. New and misunderstood species of Japanese *Pannaria* (Lichenes). *Journal of Japanese Botany* 76(1): 1-10.

- JØRGENSEN, P.M. and SIPMAN, H.J.M. 2002. The lichen genus *Erioderma* in southeast Asia. *Annales Botanici Fennici* 39: 201-211.
- JØRGENSEN, P. M. and SIPMAN, H. 2007. The lichen *Fuscopannaria leucosticta* (Tuck.) P. M. Jørg. found in the tropics. *Lichenologist* 39(3): 305-307.
- JØRGENSEN, P. M., VAN DEN BOOM, P. P. G. and SÉRUSIAUX, E. 2009. Notes on the lichen genus *Erioderma* in La Réunion. *Cryptogamie, Mycologie* 30 : 263-268.
- JØRGENSEN P. M. and WOLSELEY P. A. 2009. *Leioderma solediatum* D. J. Galloway et P. M. Jørg. discovered in Thailand, with a note on the world distribution of *Erioderma mollissimum* (Sampaio) Du Rietz. *Lichenologist* 41 : 315-316.
- KATOH, K., MISAWA, K., KUMA, K. and MYATA, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30(14): 3059-3066.
- KROG, H. and SWINSCOW, T.D.V. 1986. *Solorina simensis* and *S. saccata*. *Lichenologist* 18: 57-62.
- LAVAUX, S. and AUTHEMAN, M. (1999). *La Réunion, Le Piton de la Fournaise. Histoire naturelle et évolution des espèces*. Editions cormorans. Paris.
- LOUWOFF S. H. J. J. 2009. Peltigeraceae. in : *Flora of Australia 57 Lichens 5*, Melbourne: ABRS/CSIRO Australia pp. 428-446.
- LOHTANDER, K., I. OKSANEN, and J. RIKKINEN. 2002. A phylogenetic study of *Nephroma* (lichen-forming Ascomycota). *Mycological Research* 106: 777-787.
- LÜCKING, R., APTROOT, A., CHAVES, J. L., SIPMAN, H. J. M. and UMAÑA, L. 2007. A first assessment of the TICOLICHEN biodiversity inventory in Costa Rica: the genus *Coccocarpia* (Peltigerales: Coccocarpiaceae). - In: KÄRNEFELT, I.; THELL, A.: *Lichenological Contributions in Honour of David Galloway. Bibliotheca Lichenologica* 95. J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Berlin-Stuttgart, pp. 429-457.
- LUMBSCH, H.T., HIPPEL, A.L., DIVAKAR, P.K., BLANCO, O. and CRESPO, A. 2008. Accelerated evolutionary rates in tropical and oceanic parmelioid lichens (Ascomycota). *BMC Evolutionary Biology* 8 :257-269
- LUTZONI, F., KAUFF, F., COX, C.J., MCLAUGHLIN, D., CELIO, G., DENTIGER, B., PADAMSEE, M., HIBBETT, D., JAMES, T.Y., BALOCH, E., GRUBE, M., REEB, V., HOFSTETTER, V., SCHOCH, C., ARNOLD, A.E., MIADLIKOWSKA, J., SPATAFORA, J., JOHNSON, D., HAMBLETON, S., CROCKETT, M., SHOEMAKER, R., SUNG, G.-H., LÜCKING, R., LUMBSCH, T., O'DONNELL, K., BINDER, M., DIEDERICH, P., ERTZ, D., GUEIDAN, C., HANSEN, K., HARRIS, R.C., HOSAKA, K., LIM, Y-W., MATHENY, B., NISHIDA, H., PFISTER, D., ROGERS, J., ROSSMAN, A., SCHMITT, I., SIPMAN, H., STONE, J., SUGIYAMA, J., YAHR, R. and VILGALYS, R. 2004. Assembling the fungal tree of life, progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am. J. Bot.* 91 : 1446–1480.
- MADDISON, D. and MADDISON, W. 2002. *MacCladeVersion 4.03PPC: analysis of phylogeny and character evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA
- MARGULIES, M., EGHOLM, M., ALTMAN, W.E., ATTIYA, S., BADER, J.S., BEMBEN, L.A., BERKA, J., BRAVERMAN, M.S., CHEN, Y.J., CHEN, Z.T., DEWELL, S.B., DU, L., FIERRO, J.M., GOMES, X.V., GODWIN, B.C., HE, W., HELGESEN, S., HO, C.H., IRZYK, G.P., JANDO, S.C., ALLENQUER, M.L.I., JARVIE, T.P., JIRAGE, K.B., KIM, J.B., KNIGHT, J.R., LANZA, J.R., LEAMON, J.H., LEFKOWITZ, S.M., LEI, M., LI, J., LOHAMN, K.L., LU, H., MAHKIJANI, V.B., MCDADE, K.E., MCKENNA, M.P., MYERS, E.W., NICKERSON, E., NOBILE, J.R., PLANT, R., PUC, B.P., RONAN, M.T., ROTH, G.T., SARKIS, G.J., SIMONS, J.F., SIMPSON, J.W., SRINIVASAN, M., TARTARO, K.R., TOMASZ, A., VOGT, K.A, VOLKMER, G.A., WANG, S.H., WANG, Y., WEINER, M.P., YU, P.G., BEGLEY, R.F. and ROTHBERG, J.M. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437(7057) : 376-380.
- MCCARTHY, P.M. (2001): *Flora of Australia. Volume 58A, Lichens 3*. ABRS/CSIRO Australia, Melbourne.
- MCDONALD, T., MIADLIKOWSKA, J. and LUTZONI, F. 2003. The lichen genus *Sticta* in the Great Smoky Mountains: A phylogenetic study of morphological, chemical, and molecular data. *Bryologist* 106: 61-79.
- METZKER, M.L. 2010. Applications of next-generation sequencing. Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11(1) : 31-46.
- MIADLIKOWSKA, J., KAUFF, F., HOFSTETTER, V., FRAKER, F., GRUBE, M., HAFELLNER, J., REEB, V. et al. 2006. New insights into classification and evolution of the Lecanoromycetes (Pezizomycotina, Ascomycota) from phylogenetic analyses of three ribosomal RNA- and two protein-coding genes. *Mycologia* 98: 1088-1103.
- MIADLIKOWSKA, J., and LUTZONI, F. 2000. Phylogenetic revision of the genus *Peltigera* (lichen-forming Ascomycota) based on morphological, chemical, and large subunit nuclear ribosomal DNA data. *International Journal of Plant Sciences* 161: 925-958.



- MIADLIKOWSKA, J. and LUTZONI, F. 2004. Phylogenetic classification of peltigerean fungi (Peltigerales, Ascomycota) based on ribosomal RNA small and large subunits. *American Journal of Botany* 91: 449-464.
- MIADLIKOWSKA, J., LUTZONI, F., GOWARD, T., ZOLLER, S., and POSADA, D. 2003. New approach to an old problem: incorporating signal from gap-rich regions of ITS and rDNA large subunit into phylogenetic analyses to resolve the *Peltigera canina* species complex. *Mycologia* 95(6): 1181-1203.
- MIADLIKOWSKA, J., MCCUNE, B. and LUTZONI, F. 2002. *Pseudocyphellaria perpetua*, a new lichen from Western North America. *Bryologist* 105(1): 1-10.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NYLANDER, J.A.A 2004. *Mr ModelTest –version 2* Available from the author (Evolutionary Biology Centre, Uppsala University) <http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>
- O'BRIEN, H., MIADLIKOWSKA, J. and LUTZONI, F. 2009. Assessing reproductive isolation in highly diverse communities of the lichen-forming fungal genus *Peltigera*. *Evolution* 63(8) : 2076-2086.
- OTÁLORA, M.A.G, ARAGÓN, G., MOLINA, M.C., MARTÍNEZ, I. and LUTZONI, F. 2010. Disentangling the *Collema-Leptogium* complex through a molecular phylogenetic study of the Collemataceae (Peltigerales, lichen-forming Ascomycota). *Mycologia* 102: 279-290.
- PAILLER, T., HUMEAU, L. and FIGIER, J. (1998) *Flore pratique des forêts de montagne de l'île de La Réunion*. Azalées Editions, Sainte Marie, La Réunion.
- PASSO, A., STENROOS, S. and CALVELO S. 2008. *Joergensenia*, a new genus to accommodate *Psoroma cephalodinum* (lichenized Ascomycota). *Mycological Research* 112 : 1465-1474.
- POSADA, D. and BUCKLEY, T. 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.
- RAMBAUT, A. 2009. *FigTree v1.2.3* Available from : <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- RAMBAUT A. and DRUMMOND, A.J. 2007. *Tracer v1.4* Disponible sur : <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- RODRIGUEZ, F., OLIVER, J.L., MARIN, A. and MEDINA, J.R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142 : 485-501.
- RONQUIST, F. and HUELSENBECK, J.P. 2003. MRBAYES 3 : Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19 :1572-1574.
- ROTHBERG, J.M. and Leamon, J.H. 2008. The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnology* 26(10) :1117-1124.
- ROZEN, S. and SKALETSKY, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, eds Krawetz S, Misener S. Humana Press, Totowa, NJ.
- SCHUMM, F. and APTROOT, A. 2010. Seychelles Lichen Guide. Published by the authors, 405 pp.
- SERUSIAUX, E., GOFFINET, B., MIADLIKOWSKA, J. and VITIKAINEN, O. 2009. Taxonomy, phylogeny and biogeography of the lichen genus *Peltigera* in Papua New Guinea. *Fungal Diversity* 38: 185-224.
- SIPMAN, H. 2004. The species of *Lobaria* (lichenized Ascomycetes) in New Guinea. In: DÖBBELER, P. and RAMBOLD, G. (eds.): *Contributions to Lichenology. Festschrift in Honour of Hannes Hertel. Bibliotheca Lichenologica*, J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, pp. 573-606.
- SMITH, C.W., APTROOT, A., COPPINS, B.J., FLETCHER, A., GILBERT, O.L., JAMES P.W. and WOLSELEY P.A.(ed.) (2009) *The Lichens of Great Britain and Ireland*.
- SQUIRRELL, J., HOLLINGSWORTH, M., WOODHEAD, M., RUSSELL, J., LOWE, A.J., GIBBY, M., and POWELL, W. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology* 12 : 1339-1348.
- STENROOS, S., E. STOCKER-WORGOTTER, I. YOSHIMURA, L. MYLLYS, A. THELL, and HYVONEN, J. 2003. Culture experiments and DNA sequence data confirm the identity of *Lobaria* photomorphs. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique* 81: 232-247.
- SUMMERFIELD, T.C. and EATON-RYE, J.J. 2006. *Pseudocyphellaria crocata*, *P-neglecta* and *P-perpetua* from the Northern and Southern Hemispheres are a phylogenetic species and share cyanobionts. *New Phytologist* 170(3) : 597-607.
- SWINSCOW, T.D.V. and KROG, H. (1988) *Macrolichens of East Africa*. British Museum (Natural History), London.

- SWOFFORD, DL. 2002. *PAUP\* : phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAKAHASHI, K., WANG, L. S., TSUBOTA, H. and DEGUCHI, H. 2006. Photosymbiodemes *Sticta wrightii* and *Dendriscoaulon* sp (lichenized Ascomycota) from Yunnan, China. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 100: 783-796.
- THOMAS, M., RYAN, D. and GALLOWAY, D. 2002. Observations on phylogenetic relationships within Lobariaceae Chevall. (Lecanorales, Ascomycota) in New Zealand, based on ITS-5.8S molecular sequence data. In : LLIMONA, X., LUMBSCH, H.T. and OTT, S. [eds.], *Progress and problems in lichenology at the turn of the millennium—IAL4. Bibliotheca Lichenologica* 82: 123–138.
- TONSBERG, T. and GOWARD, T. 2001. *Sticta oroborealis* sp nov., and other Pacific North American lichens forming dendriscoauloid cyanotypes. *Bryologist* 104(1): 12-23.
- VITIKAINEN, O. 1994. Taxonomic revision of *Peltigera* (lichenized Ascomycotina) in Europe. *Acta Botanica Fennica* 152: 1-96.
- VITIKAINEN, O. 2008. *Peltigera sorediifera* supersedes *P. lambinonii*. *Graphis Scripta* 20(2): 56-57.
- WALSER, J.C., SPERISEN, C., SOLIVA, M. and SCHEIDEGGER, C. 2003. Fungus-specific microsatellite primers of lichens: application for the assessment of genetic variation on different spatial scales in *Lobaria pulmonaria*. *Fungal Genetics and Biology* 40: 72-82.
- WEDIN, M., JØRGENSEN, P. M., and WIKLUND, E. 2007. Massalongiaceae fam. nov., an overlooked monophyletic group among the cyanobacterial lichens (Peltigerales, Lecanoromycetes, Ascomycota). *Lichenologist* 39: 61-67.
- WEDIN, M., WIKLUND, E., JØRGENSEN, P.M. and EKMAN, S. 2009. Slippery when wet: Phylogeny and character evolution in the gelatinous cyanobacterial lichens (Peltigerales, Ascomycetes). *Mol Phylogenet Evol.* 53 : 862-871
- WERTH, S., CORNEJO, C. and SCHEIDEGGER, C. 2010 A species-specific real-time PCR assay for identification of three lichen-forming fungi, *Lobaria pulmonaria*, *Lobaria immixta* and *Lobaria macaronesica*. *Molecular Ecology Resources* 10(2) : 401-403.
- WHITE, F.J. and JAMES, P.W. 1988. Studies on the genus *Nephroma* II. The southern temperate species. *Lichenologist* 20(2): 103-166.
- WIDMER, I., DAL GRANDE, F., CORNEJO, C. and SCHEIDEGGER, C. 2010. Highly variable microsatellite markers for the fungal and algal symbionts of the lichen *Lobaria pulmonaria* and challenges in developing biont-specific molecular markers for fungal associations. *Fungal Biology* 114 : 538-544.
- WIKLUND, E., and M. WEDIN. 2003. The phylogenetic relationships of the cyanobacterial lichens in the Lecanorales suborder Peltigerineae. *Cladistics* 19: 419-431.
- YOSHIMURA, I. 1988. Vainio and *Lobaria* : old and modern concepts. In : MARCELLI, M.P. and AHTI, T. (Eds) *Recollecting Edvard August Vainio*. Sao Paulo, CETESB. pp 85-94.
- YOSHIMURA, I. 2002. *Lobariella*. In: NASH, T.H.III., RYAN, B.D., GRIES, C. and BUNGARTZ, F. (eds.): *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region. I. Lichens Unlimited*, Arizona State University, Tempe, Arizona, pp. 270-272.
- ZANE, L., BARGELLONI, L. and PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11 : 1-16.
- ZWICKL, D.J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

# Annexes

## Annexe 1.

Localités de récolte de la Réunion, avec le nom du lieu, les coordonnées géographiques, l'altitude et le type de végétation rencontré

N°	Nom du lieu	Coordonnées géographiques	Altitude	Type de végétation
1	Réserve naturelle de la Roche Ecrite	20°57'8''S 55°26'12''E	1210-1230 m	Plantation de <i>Cryptomeria</i> et fourrés de la forêt de Bois de Couleurs des Hauts
2	Réserve naturelle de la Roche Ecrite	20°58'6''S 55°26'26''E	1500 m	Forêt de Bois de Couleurs des Hauts et forêt à <i>Acacia heterophylla</i>
3	Versant Ouest de la Plaine d'Affouches	20°58'10''S 55°24'22''E	1200-1400 m	Forêt de Bois de Couleurs des Hauts, assez humide et fortement perturbée
4	Versant Ouest de la Plaine d'Affouches	20°58'10''S 55°24'22''E	1400-1500 m	Fourrés de crête assez secs et dominés par les bruyères arborescentes
5	Contre-bas de Grand Etang, rive nord-est	21°5'37''S 55°39'6''E	520 m	Arbres isolés près de l'aire de pique-nique et fourrés dégradés à proximité
6	Haut de Grand Etang, au pied des cascades du Bras d'Annette	21°5'45''S 55°38'25''E	700 m	Fourrés très humides en bord de rivière
7	Rive Sud-Ouest de Grand Etang	21°5'52''S 55°38'2''E	500 m	Faciès dégradé de la forêt de montagne (Forêt de Bois de Couleurs des Hauts)
8	Route vers Takamaka, le long de la Rivière des Marsouins	21°4'22''S 55°38'2''E	620-680 m	Fourrés secondaires et plantations en bord de route
9	Forêt de Bébour, chemin vers Takamaka	21°7'41''S 55°34'55''E	1370-1380 m	Forêt de montagne très humide (Forêt de Bois de Couleurs des Hauts)
10	Forêt de Bébour, intersection route – rivière des marsouins	21°7'18''S 55°33'58''E	1390 m	Forêt de Bois de Couleurs des Hauts : fourrés de bord de rivière
11	Forêt de Bébour	21°5'18''S 55°33'10''E	1460 m	Fourrés de crête (Forêt de Bois de Couleurs des Hauts)
12	Forêt de Bébour, chemin vers le Pic Mazerin	21°4'44''S 55°32'22''E	1600-1610 m	Forêt de Bois de Couleurs des Hauts
13	Chemin vers le Piton des Neiges	21°4'49''S 55°31'24''E	1800-1850 m	Fourrés humides à fougères arborescentes
14	Chemin vers le Piton des Neiges	21°5'31''S 55°30'41''E	1910-2000 m	Fourrés humides à fougères arborescentes
15	Chemin montant vers la réserve naturelle de Mare Longue	21°21'26''S 55°44'49''E	150 m	Plantation de sapotaceae
16	Au-dessus de la réserve naturelle de Mare Longue	21°20'23''S 55°41'55''E	650 m	Plantations et fourrés secondaires

17	Réserve naturelle de Mare Longue	21°20'54''S 55°45'1''E	325 m	Forêt de basse altitude, peu perturbée et riche en Sapotaceae
18	Au-dessus de la réserve naturelle de Mare Longue	21°20'15''S 55°41'51''E	680-700 m	Plantations et fourrés secondaires
19	Cirque de Cilaos, chemin vers le Grand Matarum	21°7'13''S 55°29'13''E	1540 m	Forêt de Bois de Couleurs des Hauts
20	Cirque de Cilaos, chemin vers le Grand Matarum	21°7'11''S 55°29'15''E	1570 m	Affleurement rocheux au sein de la forêt de Bois de Couleurs des Hauts
21	Cirque de Cilaos, chemin vers le col de Taibit	21°6'55''S 55°27'1''E	1260-1600 m	Forêt de Bois de Couleurs des Hauts
22	Cirque de Cilaos, chemin vers le col de Taibit	21°6'50''S 55°26'28''E	1600-2000 m	Fourrés à <i>Hypericum lanceolatum</i> et <i>Sophora denudata</i>
23	Cirque de Cilaos, chemin vers le col de Taibit	21°6'48''S 55°25'59''E	2000-2080 m	Fourrés et affleurements rocheux près du col
24	Cirque de Cilaos, Roche Merveilleuse	21°7'33''S 55°28'47''E	1430m	Forêt de Bois de Couleurs des Hauts

## Annexe 2.

Liste de tous les échantillons utilisés dans ce travail et récoltés par le service. La première colonne reprend le nom de l'espèce, la seconde son numéro de collection, la troisième et la quatrième respectivement le lieu et l'année de récolte. Dans la cinquième colonne, « oui » signifie que le nom d'espèce donné est un nom déjà existant, alors que « non » concerne les espèces pour lesquelles aucun nom n'a été trouvé et pour lesquelles nous avons donné un nom provisoire. La sixième colonne signale la ou les étude(s) dans laquelle(lesquelles) intervient(interviennent) l'espèce en question. Pseu=Pseudocyphellaria, Pann=Pannariaceae, Erio=Erioderma, Lob=Lobaria, PeltNeck=Peltigera gr. Neckeri., PeltDoli=Peltigera gr. dolichorhiza.

nom espèce	numéro de collection	provenance	Epithète validement publié	analyse concernée
<i>Dendriscoaulon sp.</i>	1020	Réunion	Oui	Lob lobariaceae
<i>Erioderma azorica</i>	268	Açores	Oui	Erio
<i>Erioderma borbonicum</i>	651	Réunion	Oui	Erio
<i>Erioderma borbonicum</i>	1115	Réunion	Oui	Erio
<i>Erioderma borbonicum</i>	471	Réunion	Oui	Erio
<i>Erioderma groendalinum</i>	1116	Réunion	Oui	Erio
<i>Erioderma leylandii</i>	791	Madagascar	Oui	Erio
<i>Erioderma leylandii</i>	895	Rwanda	Oui	Erio
<i>Erioderma leylandii</i>	889	Congo	Oui	Erio
<i>Erioderma meiocarpum</i>	932	Rwanda	Oui	Erio
<i>Erioderma molissimum</i>	257	Açores	Oui	Erio
<i>Erioderma papyraceum</i>	1015	Réunion	Oui	Erio
<i>Erioderma papyraceum</i>	650	Réunion	Oui	Erio
<i>Erioderma papyraceum</i>	649	Réunion	Oui	Erio
<i>Erioderma unguigerum</i>	1001	Réunion	Oui	Erio
<i>Erioderma unguigerum</i>	1013	Réunion	Oui	Erio
<i>Fuscopannaria leucosticta</i>	1009	Réunion	Oui	Pann

<i>Fuscopannaria leucosticta</i>	1124	Réunion	Oui	Pann
<i>Fuscopannaria leucosticta</i>	1123	Réunion	Oui	Pann
<i>Fuscopannaria praetermissa</i>	1060	Réunion	Oui	Pann
<i>Fuscopannaria siamensis</i>	1021	Réunion	Oui	Pann
<i>Fuscopannaria siamensis</i>	1120	Réunion	Oui	Pann
<i>Fuscopannaria subimmixta</i>	1058	Réunion	Oui	Pann
<i>Leioderma solediatum</i>	472	Réunion	Oui	Erio
<i>Lobaria discolor</i>	1035	Réunion	Oui	Lob lobariaceae
<i>Lobaria discolor</i>	385	Réunion	Oui	Lob
<i>Lobaria discolor</i>	385bis	Réunion	Oui	Lob
<i>Lobaria discolor</i>	618	Réunion	Oui	Lob
<i>Lobaria discolor</i>	798	Madagascar	Oui	Lob
<i>Lobaria patinifera</i>	793	Madagascar	Oui	Lob
<i>Lobaria patinifera</i>	954	Réunion	Oui	Lob
<i>Lobaria patinifera</i>	947	Réunion	Oui	Lob lobariaceae
<i>Lobaria pulmonaria</i>	894	Congo	Oui	Lob
<i>Lobaria retigera</i>	615	Réunion	Oui	Lob
<i>Lobaria retigera</i>	888	Congo	Oui	Lob
<i>Lobaria retigera</i>	887	Congo	Oui	Lob
<i>Lobaria retigera</i>	799	Madagascar	Oui	Lob
<i>Pannaria complanata</i>	1126	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria complanata</i>	1011	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria elatior</i>	964	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria elatior</i>	1125	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria lurida</i>	1012	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria lurida</i>	1033	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria lurida</i>	786	Madagascar	Oui	Pann
<i>Pannaria multifida</i>	961	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria multifida</i>	942	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria multifida</i>	960	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria planiuscula</i>	951	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria rubiginosa</i>	1008	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria rubiginosa</i>	996	Réunion	Oui	Pann
<i>Pannaria rubiginosa</i>	1245	Rwanda	Oui	Pann
<i>Pannaria sp.</i>	1122	Réunion	non	Pann
<i>Parmeliella brisbanensis</i>	1019	Réunion	Oui	Pann
<i>Parmeliella mariana</i>	974	Réunion	Oui	Pann
<i>Parmeliella mariana</i>	979	Réunion	Oui	Pann
<i>Parmeliella stylophora</i>	1247	Réunion	Oui	Pann
<i>Parmeliella triptophylloides</i>	965	Réunion	Oui	Pann
<i>Peltigera dissecta</i>	253	Pico	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	968	Réunion	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	1051	Réunion	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	999	Réunion	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	955	Réunion	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	397	Réunion	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	404	Réunion	Oui	Peltdoli

<i>Peltigera dolichorhiza</i>	619	Réunion	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	620	Réunion	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	621	Réunion	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	789	Madagascar	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	796	Madagascar	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	PA7	Rwanda	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	PA8	Rwanda	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	PA10	Rwanda	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	PA30	Rwanda	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	PA9	Rwanda	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	PA13	Rwanda	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	PA14	Rwanda	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	PA16	Rwanda	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	1232	Pyrenees	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	2307	Chili	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera hymenina</i>	193	Ecosse	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera hymenina</i>	357	Tenerife	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera neopolydactyla</i>	2306	Colombie britannique	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera neopolydactyla</i>	2308	Alaska	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera neopolydactyla</i>	849	Norvege	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera polydactyloides</i>	1049	Réunion	Oui	PeltNeck
<i>Peltigera polydactyloides</i>	1061	Réunion	Oui	PeltNeck
<i>Peltigera polydactyloides</i>	1042	Réunion	Oui	PeltNeck
<i>Peltigera polydactyloides</i>	1062	Réunion	Oui	PeltNeck
<i>Peltigera polydactyloides</i>	PA18	Rwanda	Oui	PeltNeck
<i>Peltigera polydactyloides</i>	PA2	Rwanda	Oui	PeltNeck
<i>Peltigera polydactyloides</i>	PA3	Rwanda	Oui	PeltNeck
<i>Peltigera polydactyloides</i>	PA17	Rwanda	Oui	PeltNeck
<i>Peltigera polydactyloides</i>	PA12	Kenya	Oui	PeltNeck
<i>Peltigera polydactylon</i>	1232	Pyrenees	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera polydactylon</i>	1233	Vosges	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera polydactylon</i>	1234	Pyrenees	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera polydactylon</i>	1235	Madere	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera polydactylon</i>	832	Jura	Oui	Peltdoli
<i>Peltigera polydactylon</i>	836	Vosges	Oui	Peltdoli
<i>Polychidium sp</i>	1014	Réunion	non	Pann
<i>Pseudocyphellaria argyracea</i>	395	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria argyracea</i>	1024	Réunion	oui	Pseu lobariaceae
<i>Pseudocyphellaria argyracea</i>	1063	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria argyracea</i>	975	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria argyracea</i>	612	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria argyracea</i>	613	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria argyracea</i>	972	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria aurata</i>	1246	Réunion	oui	Pseu lobariaceae
<i>Pseudocyphellaria aurata</i>	1248	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	943	Réunion	oui	Pseu

<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	898	Rwanda	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	614	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	944	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	884	Congo	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	688	La Gomera	oui	Pseu lobariaceae
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	886	Congo	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	940	Réunion	oui	Pseu lobariaceae
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	959	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	958	Réunion	oui	Pseu
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	1004	Réunion	oui	Pseu lobariaceae
<i>Pseudocyphellaria intricata</i>	883	Congo	oui	Pseu lobariaceae
<i>Pseudocyphellaria intricata</i>	891	Congo	oui	Pseu lobariaceae
<i>Psoroma subhispidulum</i>	969	Réunion	oui	Pann
<i>Sticta afrofuliginosa</i>	989	Réunion	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta afrofuliginosa</i>	795	Madagascar	non	Sticta
<i>Sticta afrofuliginosa</i>	901	Rwanda	non	Sticta
<i>Sticta ambavillaria</i>	986	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta ambavillaria</i>	638	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta ambavillaria</i>	992	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta ambavillaria</i>	987	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta ambavillaria</i>	645	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta arbusculoides</i>	1002	Réunion	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta borbonica</i>	1113	Réunion	non	Sticta
<i>Sticta borbonica</i>	1039	Réunion	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta caperata</i>	386	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta caperata</i>	994	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta caperata</i>	625	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta caperata</i>	627	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta caperata</i>	626	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta caperata</i>	962	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta caperata</i>	624	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta caperata</i>	957	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta cyphellulata</i>	629	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta cyphellulata</i>	633	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta cyphellulata</i>	630	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta cyphellulata</i>	981	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta cyphellulata</i>	971	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta cyphellulata</i>	1023	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta dichotoma</i>	945	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta dichotoma</i>	647	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta dichotoma</i>	1005	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta dichotoma</i>	1050	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta dichotoma</i>	1110	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta dichotoma</i>	963	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta dichotoma</i>	389	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta dichotoma</i>	632	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta dichotoma</i>	646	Réunion	oui	Sticta

<i>Sticta dichotoma photopair bleu</i>	1252	Réunion	oui	Lobariaceae
<i>Sticta dichotoma photopaire bleu</i>	985	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta dichotoma photopaire bleu</i>	998	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta dichotoma photopaire vert</i>	984	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta dichotoma photopaire vert</i>	997	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta diversa1</i>	639	Réunion	non	Sticta
<i>Sticta diversa1</i>	978	Réunion	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta diversa2</i>	635	Réunion	non	Sticta
<i>Sticta diversa2</i>	993	Réunion	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta duplolibata</i>	1040	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta duplolibata</i>	1111	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta duplolibata</i>	919	Rwanda	oui	Sticta
<i>Sticta duplolibata</i>	1054	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta duplolibata</i>	1112	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta duplolibata</i>	634	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta duplolibata</i>	1108	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta foveolata</i>	921	Rwanda	non	Sticta
<i>Sticta foveolata</i>	923	Rwanda	non	Sticta
<i>Sticta fuliginosa</i>	865	Vosges	oui	Sticta
<i>Sticta fuliginosa</i>	936	Rwanda	oui	Sticta
<i>Sticta macrophylla</i>	946	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta macrophylla</i>	648	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta orbicularis1</i>	899	Rwanda	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta orbicularis1</i>	893	Congo	oui	Sticta
<i>Sticta orbicularis1</i>	902	Rwanda	oui	Sticta
<i>Sticta orbicularis1</i>	904	Rwanda	oui	Sticta
<i>Sticta orbicularis1</i>	905	Rwanda	Oui	Sticta
<i>Sticta orbicularis2</i>	906	Rwanda	Oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta orbicularis2</i>	920	Rwanda	Oui	Sticta
<i>Sticta orbicularis2</i>	933	Rwanda	Oui	Sticta
<i>Sticta paleoweigeli</i>	970	Réunion	Non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta paleoweigeli</i>	1027	Réunion	Non	Sticta
<i>Sticta paleoweigeli</i>	1028	Réunion	Non	Sticta
<i>Sticta paleoweigeli</i>	1030	Réunion	Non	Sticta
<i>Sticta plumbea1</i>	1017	Réunion	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta plumbea2</i>	1031	Réunion	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta pustulata</i>	922	Rwanda	non	Sticta
<i>Sticta pustulata</i>	925	Rwanda	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta sorediata</i>	642	Réunion	non	Sticta
<i>Sticta sorediata</i>	973	Réunion	non	Sticta
<i>Sticta sorediata</i>	1029	Réunion	non	Lobariaceae
<i>Sticta sp1</i>	797	Madagascar	non	Sticta
<i>Sticta sp1</i>	802	Madagascar	non	Sticta
<i>Sticta sp1</i>	800	Madagascar	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta sp1</i>	1251	Madagascar	non	Lobariaceae
<i>Sticta sp2</i>	643	Réunion	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta sp2</i>	641	Réunion	non	Sticta



<i>Sticta sp2</i>	991	Réunion	non	Sticta
<i>Sticta sp2</i>	640	Réunion	non	Sticta
<i>Sticta sp2</i>	1249	Réunion	non	Lobariaceae
<i>Sticta sp3</i>	801	Madagascar	non	Sticta
<i>Sticta sp3</i>	1250	Madagascar	non	Lobariaceae
<i>Sticta sp4</i>	1109	Réunion	non	Sticta lobariaceae
<i>Sticta sublimbata</i>	885	Congo	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta sublimbata</i>	896	Rwanda	oui	Sticta
<i>Sticta sublimbata</i>	903	Rwanda	oui	Sticta
<i>Sticta sublimbata</i>	1038	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta sublimbata</i>	1052	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta sublimbata</i>	1036	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta tomentosa</i>	950	Réunion	Oui	Sticta
<i>Sticta tomentosa</i>	976	Réunion	Oui	Sticta
<i>Sticta tomentosa</i>	628	Réunion	Oui	Sticta
<i>Sticta tomentosa</i>	949	Réunion	Oui	Sticta
<i>Sticta tomentosa</i>	1022	Réunion	Oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta tomentosa</i>	794	Madagascar	Oui	Sticta
<i>Sticta tomentosa</i>	897	Rwanda	Oui	Sticta
<i>Sticta tomentosa</i>	892	Congo	Oui	Sticta
<i>Sticta variabilis</i>	1037	Réunion	oui	Sticta lobariaceae
<i>Sticta variabilis</i>	636	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta variabilis</i>	1114	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta variabilis</i>	637	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta variabilis</i>	388	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta variabilis</i>	977	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta variabilis</i>	644	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta variabilis</i>	631	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta variabilis</i>	387	Réunion	oui	Sticta
<i>Sticta xanthotropa</i>	941	Réunion	Oui	Sticta lobariaceae

### Annexe 3.

Liste des séquences provenant de GenBank. La première colonne reprend le nom de l'espèce, la deuxième sa provenance lorsqu'elle est signalée, les troisième, quatrième et cinquième le n° GenBank de la séquence pour les gènes ITS, LSU et mtSSU respectivement, la 4<sup>ème</sup> la où les études dans laquelle/lesquelles cette séquence intervient. *Sti*=*Sticta*, *Lob*=*Lobaria*, *Pseud*=*Pseudocyphellaria*, *Pann*=*Pannariaceae*, *Erio*=*Erioderma*, *PeltNeck*=*Peltigera gr. neckeri*, *Peltdoli*=*Peltigera gr. dolichorhiza*. La dernière colonne précise de quel article de référence les séquences sont issues, lorsque c'est le cas.

nom espèce	Provenance	n° ITS	n° LSU	n° mtSSU	analyse concernée	article de référence
<i>Degelia durietzii</i>	Nouvelle Zelande		GQ258992	GQ259022	Erio	Wedin et al. 2009
<i>Degelia plumbea</i>	Norvege	AF429265		AY340491	Pann	Passo et al. 2008
<i>Degelia plumbea</i>			DQ912348	DQ912300	Erio	Miadlikowska et al. 2006

<i>Durietza crenulata</i>	Bresil	AF524922				Högnabba et al. 2009
<i>Durietza subexornata</i>	Mexique	AF524902	EU558770	EU558804	Lob Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Erioderma leylandii</i>	Chili		DQ900639	AY340492	Erio	Wedin et al. 2007
<i>Erioderma verruculosum</i>			DQ973041	DQ972990	Erio	Miadlikowska et al. 2006
<i>Fuscopannaria leucophea</i>	Norvege/Suede	AF429266		AY652621	Pann	Passo et al. 2008
<i>Fuscopannaria leucosticta</i>	USA	AF429277		DQ900630	Pann	Passo et al. 2008
<i>Fuscopannaria praetermissa</i>	Suede	GQ259026			Pann	Wedin et al. 2009
<i>Joergensenia cephalodina</i>	Argentine	EU885307		EU885329	Pann	Passo et al. 2008
<i>Leioderma erythrocarpum</i>	Nouvelle Zelande			GQ259031	Erio	Wedin et al. 2009
<i>Leptochidium albociliatum</i>	Espagne			DQ900633	Pann	Wedin et al. 2007
<i>Lobaria amplissima</i>	Norvege	AF524924	EU558749	EU558805	Lob Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Lobaria immixta</i>		FJ649597			Lob	Werth et al. 2010
<i>Lobaria isidiosa</i>	Bhoutan	EU627001			Lob	Cornejo et al. 2009
<i>Lobaria linita</i>	Japon	AF524914	EU558800	EU558809	Lob Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Lobaria macaronesica</i>		FJ649596			Lob	Werth et al. 2010
<i>Lobaria oregana</i>	Canada	EF605270			Lob	Högnabba et al. 2009
<i>Lobaria orientalis</i>	Japon	AF524907	EU558796	EU558810	Lob Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Lobaria pulmonaria</i>	Suède	AY340504			Pann	Wiklund et Wedin 2003
<i>Lobaria pulmonaria</i>	Russie	AF524910	EU558797	EU558811	Lob Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Lobaria quercizans</i>	Nouvelle Ecosse	AF524921	EU558747	EU558814	Lob Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Lobaria retigera</i>	Inconnu	AY124094			Lob	Högnabba et al. 2009
<i>Lobaria sachalinensis</i>	Japon	AF524906	EU558795	EU558815	Lob Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Lobaria scrobiculata</i>	Finlande	AF524913	EU58787	EU558816	Lob Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Massalongia carnosa</i>	Finlande	EU558742	EU558697	EU558817	Pseud, Lobariaceae	Högnabba et al. 2009

<i>Massalongia carnosa</i>	Norvège			DQ900635	Pann	Wedin et al. 2007
<i>Nephroma antarcticum</i>	Argentine	AF524897	EU558743	EU558818	Pseud, Lob, Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Nephroma arcticum</i>		AY124172		AY124114	Pann	Lohtander et al. 2002
<i>Pannaria athroophylla</i>	Argentine	EU885315		EU885325	Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria calophylla</i>	Argentine	EU885296		EU885318	Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria conoplea</i>	Norvege	AF429281			Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria contorta</i>	Argentine	EU885297		EU885319	Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria farinosa</i>	Argentine	EU885299		EU885321	Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria hookeri</i>	Norvege	AF429282			Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria isabellina</i>	Argentine	EU885298		EU885320	Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria microphyllizans</i>	Argentine	EU885300		EU885322	Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria pallida</i>	Argentine	EU885301		EU885323	Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria rubiginosa</i>	Norvege/Portugal	AF429280		AY340513	Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria sphinctrina</i>	Argentine	EU885302		EU885324	Pann	Passo et al. 2008
<i>Pannaria tavaresii</i>	Argentine	EU885294		EU885316	Pann	Passo et al. 2008
<i>Parmeliella triptophylla</i>	Norvege/Suede	AF429265		AY652623	Pann	Passo et al. 2008
<i>Peltigera collina</i>	Colombie Britannique	FJ708923			PeltNeck	O'Brien et al. 2009
<i>Peltigera collina</i>	Autriche	AF108142			PeltNeck	Goffinet et Miadlikowska 1999
<i>Peltigera collina</i>	Colombie Britannique	FJ708927			PeltNeck	O'Brien et al. 2009
<i>Peltigera collina</i>	Colombie Britannique	FJ708926			PeltNeck	O'Brien et al. 2009
<i>Peltigera collina</i>	Corée du sud	AF074978			PeltNeck	Goffinet et Miadlikowska 1999
<i>Peltigera collina</i>	Corée du sud	GQ292453			PeltNeck	Non publié
<i>Peltigera collina</i>	Corée du sud	GQ292452			PeltNeck	Non publié
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527302			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009

<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527295			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527301			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527303			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527300			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527299			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527298			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527297			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527296			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527294			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527293			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527292			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Nouvelle Zelande	AF350293			Peltdoli	Thomas et al. 2002
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527280			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527279			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera horizontalis</i>	Colombie britannique	FJ708934			PeltNeck	O'Brien et al. 2009
<i>Peltigera neckeri</i>	Colombie britannique	FJ708929			PeltNeck	O'Brien et al. 2009
<i>Peltigera neckeri</i>	Pologne	AF075725			PeltNeck	Goffinet et Miadlikowska 1999
<i>Peltigera neckeri</i>	Colombie britannique	FJ708928			PeltNeck	O'Brien et al. 2009
<i>Peltigera neckeri</i>	Canada	AY257963			PeltNeck	Miadlikowska et al. 2003
<i>Peltigera neopolydactyla</i>	Nouvelle Zelande	AF350292			Peltdoli	Thomas et al. 2002
<i>Peltigera oceanica</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527285			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera phyllidiosa</i>	USA	AY257968			PeltNeck	Miadlikowska et al. 2003
<i>Peltigera phyllidiosa</i>	USA	AF074975			PeltNeck	Goffinet et Miadlikowska 1999
<i>Peltigera polydactylon</i>	Colombie Britannique	FJ709038			Peltdoli	O'Brien et al. 2009

<i>Peltigera polydactylon</i>	Corée	GQ292464			Peltdoli	Non-publié
<i>Peltigera polydactylon</i>	Corée	GQ292455			Peltdoli	Non-publié
<i>Peltigera sumatrana</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527291			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Peltigera weberi</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée	FJ527281			Peltdoli	Sérusiaux et al. 2009
<i>Polychidium muscicola</i>	Autriche			DQ900634	Pann	Wedin et al. 2007
<i>Porpidia albocaerulescens</i>		AY584718			Pann	Lutzoni et al. 2004
<i>Protopannaria pezizoides</i>	Norvege	AF429271		AY340519	Pann	Passo et al. 2008
<i>Pseudocyphellaria argyracea</i>	Réunion	EU558727	EU558781	EU558821	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria aurata</i>	Guyane	AF524901			Pseud	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria aurata</i>		FJ349102			Sti	non publié
<i>Pseudocyphellaria berberina</i>	Argentine	EU558721	EU558775	EU558824	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria clathrata</i>	Bresil	EU558729	EU558784	EU558828	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria coriifolia</i>	Argentine	EU558706	EU558759	EU558829	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	Colombie Britannique	AJ888209			Pseud	Summerfield et al. 2006
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	Nouvelle Ecosse	AF524900			Pseud	Stenroos et al. 2003
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	Maurice	EU558699	EU558751	EU558833	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	Oregon/Thaïlande/Argentine	AF401979	EU58752	EU558838	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria crocata</i>	Argentine	EU558702	EU558755	EU558839	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria endochrysea</i>	Argentine	EU558725	EU558779	EU558842	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria freycinetii</i>	Argentine	EU558717	EU558771	EU558843	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria hirsuta</i>	Argentine	EU558710	EU558763	EU558844	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria intricata</i>	Argentine	EU558713	EU558766	EU558847	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria intricata</i>	Réunion	EU558848			Pseud	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria lechleri</i>	Argentine	EU558716	EU558769	EU558849	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009

<i>Pseudocyphellaria maculata</i>	Nouvelle Zelande	AF351147			Pseud	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria mallota</i>	Argentine	EU558715	EU558768	EU558850	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria obvolvata</i>	Argentine	EU558730	EU558785	EU558852	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria perpetua</i>	Canada	EU558741	EU558803	EU558835	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria pilosella</i>	Argentine	EU558740	EU558802	EU558854	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Pseudocyphellaria scabrosa</i>	Argentine	EU558720	EU558774	EU558855	Pseud Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Psoroma aphotosum</i>	Argentine	EU885306		EU885328	Pann	Passo et al. 2008
<i>Psoroma euphyllum</i>	Nouvelle Zelande	AF350291			Pann	Passo et al. 2008
<i>Psoroma hispidulum</i>	Argentine	EU885304		EU885326	Pann	Passo et al. 2008
<i>Psoroma hypnorum</i>	Argentine	EU885309		EU885331	Pann	Passo et al. 2008
<i>Psoroma implexum</i>	Argentine	EU885311		EU885333	Pann	Passo et al. 2008
<i>Psoroma paleaceum</i>	Argentine	EU885305		EU885327	Pann	Passo et al. 2008
<i>Psoroma pholidoites</i>	Argentine	EU885313		EU885335	Pann	Passo et al. 2008
<i>Psoroma pholidotum</i>	Argentine	EU885314		EU885336	Pann	Passo et al. 2008
<i>Psoroma soccatum</i>	Argentine	EU885315		EU885337	Pann	Passo et al. 2008
<i>Sticta beauvoisii</i>	USA	AY173376			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta canariensis</i>	Grande Bretagne	DQ419944			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta carolinensis</i>	USA	AY173381			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta caulescens</i>	Argentine	EU558737	EU558793	EU558858	Sti Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta cinereoglauca</i>	Nouvelle Zelande	AF350309			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta damicornis</i>	Argentine	EU558731			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta duplolibata</i>	Taiwan	AB245117			Sti	non publié
<i>Sticta duplolibata</i>	Japon	AB245116			Sti	non publié
<i>Sticta filix</i>	Nouvelle Zelande	AF350304			Sti	Högnabba et al. 2009

<i>Sticta fragilinata</i>	USA	AY173384			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta fuliginosa</i>	USA	AY173389			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta fuliginosa</i>	Chine	AY124095			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta fuliginosa</i>	Colombie Britannique	DQ419943			Sti	Cornejo et al. 2009
<i>Sticta fuliginosa</i>	Japon	AB239345			Sti	Takahashi et al. 2006
<i>Sticta fuliginosa</i>	Nouvelle Zelande	AF350310			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta gaudichaudia</i>	Argentine	EU558736	EU558792	EU558860	Sti Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta gracilis</i>	Japon	AB239346			Sti	Takahashi et al. 2006
<i>Sticta hypochroa</i>	Argentine	EU558714	EU558767	EU558861	Sti Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta lacera</i>	Nouvelle Zelande	AF350305			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta latifrons</i>	Nouvelle Zelande	AF359307			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta limbata</i>	USA	AY173391			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta limbata</i>	USA	AY173390			Sti	McDonald et al. 2003
<i>Sticta limbata</i>	Japon	AB245118			Sti	non publié
<i>Sticta martinii</i>	Nouvelle Zelande	AF351155			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta oroborealis</i>	Amérique Nord Ouest	AF208014			Lob	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta squamata</i>	Nouvelle Zelande	AF350306			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta subcaperata</i>	Nouvelle Zelande	AF350308			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta sublimbata</i>	Japon	AB245123			Sti	non publié
<i>Sticta weigelia</i>	Guyane	AF524905	EU558794	EU558865	Sti Lobariaceae	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta weigelia</i>	République Dominicaine	AY173392			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta weigelia</i>	Taiwan	AB245124			Sti	non publié
<i>Sticta weigelia sl</i>	Guyane	EU558738			Sti	Högnabba et al. 2009
<i>Sticta wrightii</i>	Yunnan, Chine	AB239343			Lob	Takahashi et al. 2006

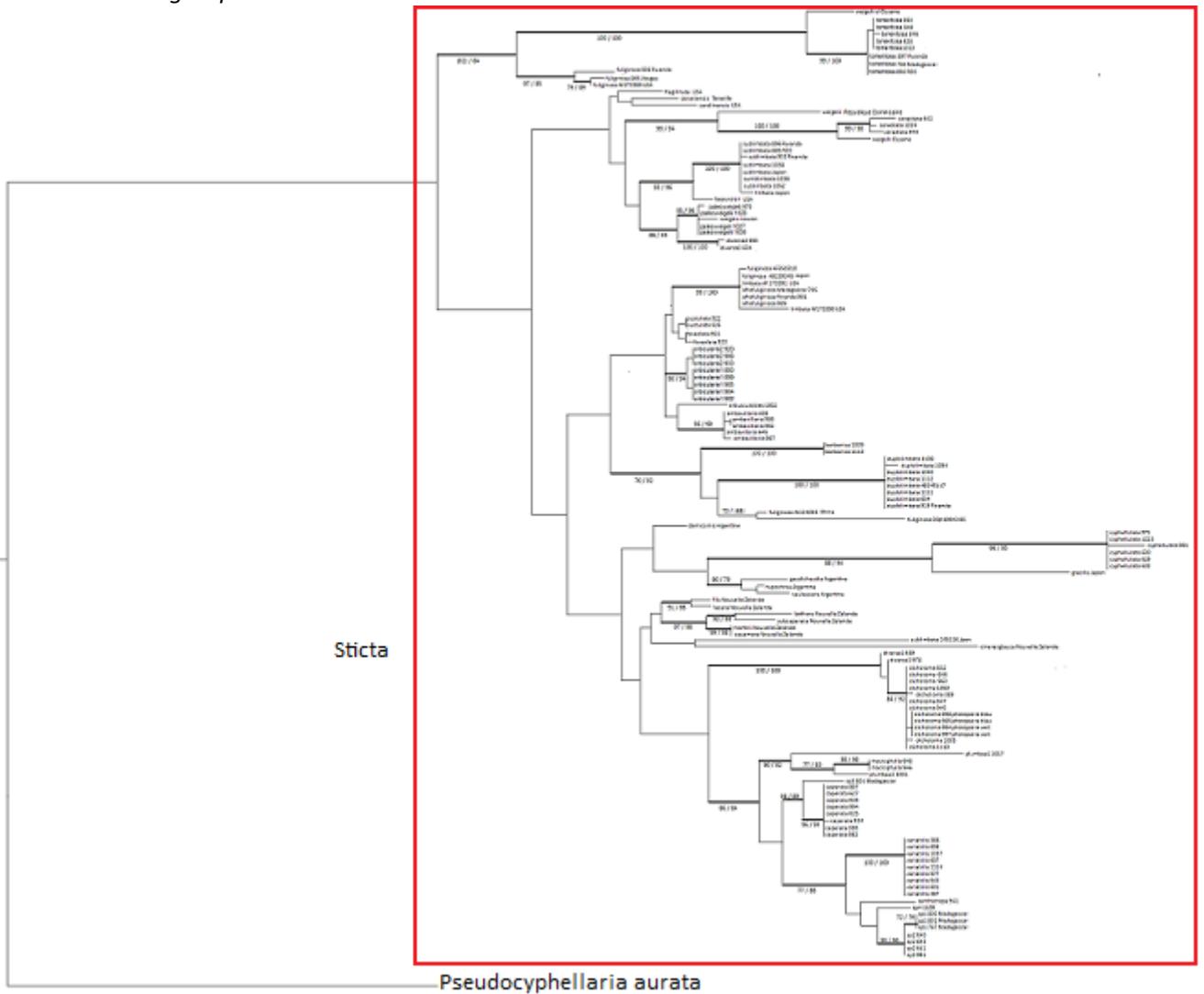
**Annexe 4.**

Tableau avec les paramètres calculés par Mr ModelTest, par analyse, avec le logarithme de la vraisemblance, les fréquences (freq) des bases, les taux de substitution (R), la proportion de sites invariables (Pinv) et la forme de la distribution gamma (gamma shape).

	-Ln L	freq A	freq C	freq G	freq T	R(AC)	R(AG)	R(AT)	R(CG)	R(CT)	Pinv	gamma shape
Pannariaceae	6805,2137 7526	0,33542 946	0,14186 578	0,18807 805	0,33462 67	1,45096 488	4,17965 965	1,89901 899	1,02121 07	4,69348 828	0,48161 975	1,000 153
Erioderma	5668,0320 48	0,24847 631	0,25441 84	0,22296 441	0,27414 089	0,91708 253	4,95418 872	1,59883 815	1,21152 175	1,90848 283	0,59462 802	0,568 627
Lobariaceae	15091,369 54	0,26688 993	0,22401 594	0,27622 134	0,23287 278	0,95309 95	1,80611 964	1,02512 714	0,77181 498	4,29588 317	0,51038 502	0,583 339
Lobaria	2857,2722 88	0,18245 84	0,31417 327	0,29329 102	0,21007 73	1,48076 552	2,62426 952	0,99334 021	0,86711 44	4,40928 469	0,33112 507	0,844 878
Sticta	4068,3599 86	0,19793 455	0,31053 15	0,29234 825	0,19918 57	2,08593 735	3,22645 833	1,08189 819	1,37225 871	7,41180 565	0,30666 087	0,614 455
Pseudocyphellaria	3092,8428 93	0,19630 795	0,31517 517	0,28328 774	0,20522 914	1,37590 009	2,56576 497	1,86839 205	0,92973 543	6,65486 39	0,22529 291	0,462 175

**Annexe 5**

Position de l'outgroup dans l'arbre des Sticta





Annexe 6 : photos



Photo 1. Montage de deux photomorphes de *Sticta dichotoma* se développant l'un sur l'autre sur un tronc d'arbre, avec le chloromorphe en vert et le cyanomorphe en gris foncé.



Photo 2. Détail d'un montage des deux photomorphes de *Sticta dichotoma* croissant l'un sur l'autre, avec le chloromorphe en vert et le photomorphe en gris foncé.



*Photo 3. Dendriscoaulon sp., soit le cyanomorphe fruticuleux de Lobaria discolor.*



*Photo 4. Lobaria discolor, sous sa forme foliacée à algue verte, présentant de nombreuses apothécies.*

**Annexe 7.**

Données concernant les spécimens repris dans l'analyse TCS, avec le n° utilisé dans l'analyse, le nom de l'espèce, leur origine et le n° de collection (pour les échantillons de 1 à 9) ou le numéro d'accèsion GenBank (pour les échantillons 10 à 22).

N°	Espèce	Provenance	Séquence GB/N° collection
1	<i>Peltigera polydactyloides</i>	Réunion	1049
2	<i>Peltigera polydactyloides</i>	Réunion	1061
3	<i>Peltigera polydactyloides</i>	Réunion	1042
4	<i>Peltigera polydactyloides</i>	Réunion	1062
5	<i>Peltigera polydactyloides</i>	Rwanda	PA2
6	<i>Peltigera polydactyloides</i>	Rwanda	PA3
7	<i>Peltigera polydactyloides</i>	Kenya	PA12
8	<i>Peltigera polydactyloides</i>	Rwanda	PA17
9	<i>Peltigera polydactyloides</i>	Rwanda	PA18
10	<i>Peltigera neckeri</i>	Pologne	AF075725
11	<i>Peltigera neckeri</i>	Colombie Britannique	FJ708929
12	<i>Peltigera neckeri</i>	Colombie Britannique	FJ708928
13	<i>Peltigera neckeri</i>	Canada	AY257963
14	<i>Peltigera collina</i>	Colombie Britannique	FJ708923
15	<i>Peltigera collina</i>	Autriche	AF108142
16	<i>Peltigera collina</i>	Corée du Sud	AF074978
17	<i>Peltigera collina</i>	Colombie Britannique	FJ708927
18	<i>Peltigera collina</i>	Colombie Britannique	FJ708926
19	<i>Peltigera collina</i>	Corée du Sud	GQ292453
20	<i>Peltigera collina</i>	Corée du Sud	GQ292452
21	<i>Peltigera phyllidiosa</i>	USA	AY257968
22	<i>Peltigera phyllidiosa</i>	USA	AF074975

**Annexe 8.**

Tableau reprenant l'ensemble des primers développés, avec dans la première colonne leur nom; dans la seconde s'ils ont été sélectionné dans les résultats finaux ou non; dans la troisième et la quatrième respectivement la séquence du primer forward et la séquence du primer reverse; dans la cinquième le motif répété dans la région microsatellite; et dans la sixième le nombre de répétitions chez l'échantillon de référence (P. dolichorhiza de la Réunion, données 454)

Nom	Sélection	Séquence Forward	Séquence Reverse	Répétition	Nombre répétitions
Peltdol 1	Oui	AGTGGCATAGTAGTTCTGAATTTAT C	GAGGTAGTGGGTCAGCGG	ACAT	9
Peltdol 2	Oui	AAATCGGTGCATGCCAAGG	TGAGCCATGTCCGGTAAGC	AATG	8
Peltdol 3	Non	ATGTAGGTGCGCAAGAACG	AACGTGGGAGTTGGTCAGG	ATGT	8
Peltdol 4	Non	CTTCTGCTTTGGTCCGTG	TGCCAATCTTACAACGGC	ATC	15
Peltdol 5	Oui	CCGCTGCCGTTCCATTTG	ACCGACGAACCTCTGAACG	CTT	15
Peltdol 6	Non	GCAATACGGAGTAATTGGTACATA AC	CCTCGTGGCTGACGGAG	GAT	15
Peltdol 7	Oui	CTGCCGTTTACCACCGAAG	AGATCTCAATCGGGAGAAGGC	GTT	16
Peltdol 8	Non	TCCTTCCTCAGTGGGATTGTC	ACCAAACCCAGAGCCGTC	GTT	16
Peltdol 9	Oui	TCTCCCTGCTTGGCTAGTG	CTGCATGAGGGCGAAAGTC	GTT	17
Peltdol 10	Oui	TTCCGCCAACCAATCTTCG	GGTTTCTGCTTGAGGTCGC	AAC	14
Peltdol 11	Non	AGACAGAAATTGACGCTCGG	GGGAGGGCAGTTTGGTTAAG	CT	19
Peltdol 12	Oui	GTCGTTCCGCGAGTATTATGG	GAAAGAGCACACAGCTCCG	AAGTAC	6
Peltdol 13	Non	CCTAAGTAACCCATATGCTTCCC	ATTGCGCTATTCGGCAACG	ATCCCC	7
Peltdol 14	Non	TCAGTGTCTCACCATCGAC	TTAGTGCGGCGGTTAGGG	CCTGGT	6
Peltdol 15	Oui	ATCGTCCGGCATCTACTGC	TGACTGGGATAACATTAAGCAAG G	GGCATT	6
Peltdol 16	Non	GCATAATCGGCCTGCTCAC	GGCGCGGAGTTTATATGG	CGGGG	8
Peltdol 17	Oui	TAAGCATCCAGCCTGACCG	GCTTCTTGCCTTGGCACC	ATGT	7
Peltdol 18	Non	CTTTCTCCTCTGCACGAAGC	TGATTTAGTTCAGGCGACC	CTTT	7
Peltdol 19	Oui	AGTCGCGTCAACAACTGC	CTGTTGGCATATGACCTGGG	AAC	8
Peltdol 20	Oui	GGAAGTTGGTGTGAATTGTAGC	GAGCGACTCAAACCCTTCG	AAG	9
Peltdol 21	Non	GTTCGATATGTCCAATCGTCCC	TTCAAAGGCAACACTGGC	ACG	9

**Annexe 9.**

Informations sur les échantillons du groupe *Peltigera dolichorhiza* screenés pour les onze loci. Les échantillons se trouvent à Liège sauf indication contraire. Parc Nat. = Parc National. Conn=Connecticut, B=Berlin, H=Helsinki

Echantillon	Espèce	Pays et localité	Collection
1	<i>P. dolichorhiza</i>	La Réunion	<i>Magain et Sérusiaux</i> Nov. 2009
2	<i>P. dolichorhiza</i>	Rwanda, Nyungwe Parc Nat.	<i>Sérusiaux</i> Sept. 2006
3	<i>P. dolichorhiza</i>	Rwanda, Nyungwe Parc Nat.	<i>Sérusiaux</i> Sept. 2006 (conn)
4	<i>P. dolichorhiza</i>	Rwanda, Volcanoes Parc Nat.	<i>Sérusiaux</i> Apr. 2005
5	<i>P. dolichorhiza</i>	Rwanda, Nyungwe Parc Nat.	<i>Sérusiaux</i> Apr. 2005
6	<i>P. dolichorhiza</i>	Rwanda, Volcanoes Parc Nat.	<i>Sérusiaux</i> Sept. 2006
7	<i>P. dolichorhiza</i>	Rwanda, Volcanoes Parc Nat.	<i>Sérusiaux</i> Sept. 2006 (conn)
8	<i>P. dolichorhiza</i>	Rwanda, Volcanoes Parc Nat.	<i>Sérusiaux</i> Sept. 2006
9	<i>P. dolichorhiza</i>	Rwanda, Nyungwe Parc Nat.	<i>Sérusiaux</i> Sept. 2006
10	<i>P. dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée, Gahavisuka	<i>Sérusiaux</i> Oct. 1995
11	<i>P. dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée, Myola	<i>Sipman</i> 38261 (b)
12	<i>P. dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée, Gahavisuka	<i>Sipman</i> 22199 (b)
13	<i>P. dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée, Myola	<i>Sérusiaux</i> Oct. 1995
14	<i>P. dolichorhiza</i>	Papouasie Nouvelle-Guinée, Teptep	<i>Koponen</i> 34738 (h)
15	<i>P. neopolydactyla</i>	Canada, Colombie Britannique	<i>Goffinet</i> 3568 (conn)
16	<i>P. dolichorhiza</i>	Chili, XII region	<i>Goffinet</i> 8493 (conn)
17	<i>P. neopolydactyla</i>	USA, Alaska	<i>Goffinet</i> 9381 (conn)

Annexe 10. Tableau complet des résultats microsats (format paysage donc non repris ici)

Annexe 11: manuscrit AJB