

DÉLIMITATION MORPHOLOGIQUE ET MOLÉCULAIRE DE *RICCIA* L. (RICCIACEAE, MARCHANTIOPHYTA) PRÉSENTES DANS LES HAUTS PLATEAUX D'ETHIOPIE (MONT GUNA, VALLÉE DU NIL, MONT AMBAFARIT ET ABUNA YOUSSEF AU NORD ET DANS LES PLATEAUX DE SANETTI AU SUD) ET AU SUD-OUEST ET AU NORD-EST DE MADAGASCAR (MAKAY ET PARC NATIONAL DE MAROJEJY)

Djibril DIOP^{1,2*}, Sanou NDOUR, Jules DIÏOUF, Mamadou SIDIYBE, Khady NDIAYE, Mame Samba MBAYE et Kandjura NOBA

¹ Laboratoire de Botanique Biodiversité, Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta DIOP, B.P.5005 Dakar-Fann, Sénégal.

² Herbier Dakar, Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta DIOP, B.P.5005 Dakar-Fann, Sénégal.

*Auteur correspondant : Djibril DIOP, djibrildiop05@yahoo.fr

Résumé

Les *Riccia* constituent un groupe d'hépatiques à thalles très diversifié et présentent un fort taux d'endémisme, rare chez les bryophytes en zones tropicales surtout africaines plus particulièrement en Ethiopie et à Madagascar. L'identification de certaines espèces de bryophytes d'après leurs caractéristiques morphologiques reste encore aujourd'hui problématique en raison notamment d'une forte plasticité phénotypique ou de phénomènes de convergence. L'objectif est de caractériser et d'étudier la diversité génétique de plusieurs espèces de bryophytes du genre *Riccia*, de part et d'autre du canal du Mozambique, par une approche de taxonomie intégrative. Dans une première phase, nous avons élaboré avec les données morphologiques des hypothèses primaires de délimitation d'espèces et en seconde phase, nous avons testé ces hypothèses par des analyses moléculaires basées sur les gènes adaptés. Les résultats obtenus montrent, sur un ensemble de 13 hypothèses morphologiques, 10 groupes ont été confirmés par l'analyse d'ABGD. Nous discuterons de la congruence de ces résultats de délimitation moléculaire avec nos hypothèses morphologiques.

Mots-clés : *Riccia*, Marchantiophytes, Ethiopie, Madagascar, délimitation moléculaire, morphologie.

Morphological and molecular delimitation of *Riccia* (Ricciaceae, Marchantiophyta) present in Ethiopia and Madagascar (East Africa)

Abstract

Riccia constitute a very diverse group of liverworts with thalli and exhibit a high rate of endemism, rare in bryophytes in tropical areas, especially in Africa, more particularly in Ethiopia and Madagascar. The identification of certain species of bryophytes based on their

morphological characteristics still remains problematic today, in particular due to high phenotypic plasticity or convergence phenomena. The objective is to characterize and study the genetic diversity of several species of bryophytes of the genus *Riccia*, on both sides of the Mozambique Channel, through an integrative taxonomic approach. In a first phase, we developed with the morphological data primary hypotheses for delineating species and in the second part, we tested these hypotheses by molecular analyzes based on the adapted genes. The results obtained show, out of a set of 13 morphological hypotheses, 10 groups were confirmed by the ABGD analysis. We will discuss the congruence of these molecular delineation results with our morphological hypotheses.

Keywords : *Riccia*, Marchantiophytes, Ethiopia, Madagascar, molecular delineation, morphology.

Introduction

Les hépatiques ou Marchantiophytes, cosmopolites, forment la lignée divergeant le plus précocement chez les plantes terrestres datant probablement de l'époque du Silurien (Schljakov, 1972; Schuster, 1984; Kenrick & Crane, 1997 ; Qiu et al., 1998; Wellmann et al., 2003 ; Graham et al., 2004, Crandall-Stotler & Stotler, 2000; Gradstein et al., 2001) avec une monophylie (Lewis et al., 1997 ; Mishler et al., 1994 ; Capesuis, 1995 ; Goffinet, 2000). Cette divergence morphologique est soutenue par la plupart des analyses moléculaires en utilisant, par exemple, le gène mitochondrial *rbcL* (Beckert et al., 1999), mitochondrial 18S ADNr (Duff et Nickrent, 1999), les gènes chloroplastiques (Nishiyama et Kato, 1999) ou des séquences de cpITS (Samigullin et al., 1998). Le genre *Riccia* (Ricciaceae ; Marchantiopsida) est représenté par environ 200 espèces au niveau mondial (Wheeler, 2000), dont 88 pour l'Afrique australe, incluant l'Océan Indien (Wigginton, 2004). Seuls les *Riccia* d'Afrique du Nord méditerranéenne (Jovet-Ast, 1986) et d'Afrique du Sud ont été explorés et décrits assez précisément (Perold, 1996). Les *Riccia* sont très diversifiés en Afrique du Sud (environ 80 espèces) avec un fort taux d'endémisme, rare chez les bryophytes qui soulève plusieurs questions d'ordre taxonomie ou endémicité en utilisant les intégratifs actuels de délimitation d'espèces (Rabeau, 2019).

Au sein de la systématique, deux grandes tâches peuvent être distinguées : la définition des taxons terminaux c'est-à-dire la délimitation des espèces et la classification de ces taxons selon un système de classification prédéfini (David et Samadi, 2011). La délimitation des espèces continue d'attirer une attention considérable afin de délimiter et d'identifier aussi objectivement que possible les taxons au niveau spécifique (Savage, 1995, Sites et al., 2003 et Wiens, 2007). L'existence d'espèces cryptiques (Pfenninger & Schwenk, 2007) posent des problèmes dans les études écologiques, physiologiques et génétiques (Knowlton, 1993; Bickford et al., 2007; Pfenninger et Schwenk, 2007; Jackson et al., 2014). Le terme « espèces cryptiques » désigne deux ou plusieurs espèces qui sont traditionnellement confondues en raison de leurs morphologies similaires mais

pour lesquelles des différences génétiques importantes existent et suggèrent leur statut d'espèces distinctes (Sáez et Lozano, 2005; Bickford et al., 2007). Bien souvent, les espèces cryptiques sont des espèces qui sont, ou ont été classées comme une seule espèce nominale sur la base de critères morphologiques divergent souvent dans leur habitat ou dans leur histoire de vie (Mayr, 1964; Sáez et Lozano, 2005 ; Bickford et al., 2007 ; Dourdaïne, 2014; Dionne, 2015). Les espèces cryptiques peuvent correspondre à des espèces apparentées qui se sont différenciées récemment (auquel cas on pourra les appeler aussi « espèces sœurs », du terme anglais sibling species), mais ce n'est pas nécessairement le cas (Bickford et al., 2007). Les approches moléculaires de délimitation des espèces se sont développées rapidement au cours des vingt dernières années, générant une grande diversité de méthodes et de données. A l'heure actuelle, on préconise l'utilisation et la comparaison de plusieurs approches moléculaires (Fontaneto et al., 2015). L'objectif de ce travail est, grâce à des approches morphologiques et moléculaires de proposer des hypothèses d'espèces pour les taxons éthiopiens et malgaches, puis de mettre en évidence les relations éventuelles entre ces deux flores mal connues et avec la flore africaine déjà décrite à d'une approche moléculaire et morphologique.

Matériels et méthodes

Caractérisation morpho-anatomique du groupe d'étude: Riccia (Ricciaceae, Marchantiales, Marchantiophyta)

Caractères communs à tous les Riccia

La morphologie très constante du thalle se développe en lobes ou rosettes plus ou moins complètes, une à quatre fois ramifiées dichotomiquement. Le thalle contient des anthéridies et des archégonies en forme de bouteille et à croissance acropétale, puis un sporogone réduit (sans pédicelle, enfoui dans le thalle) dépourvu de pièces protectrices. La masse sporale entoure le ventre de l'archégonie avec une absence d'oléocorps et d'élatères (Jovet-Ast, 1987). Chez les Riccia, leur absence est due sans doute à une perte secondaire, ces caractères ont eu tendance à se simplifier au cours de l'évolution des Marchantiidae. On note que l'absence des élatères associée à l'enfouissement du sporophyte et à la grande taille des spores, entraînent une diminution du pouvoir dispersif chez les Riccia.

Des caractères physiologiques caractérisent les Riccia, notamment la reviviscence du thalle et la capacité à rester déshydraté notamment sur une longue durée (plusieurs mois voire des années) (Mac Glimme, 2006).

Caractères différenciant les espèces et/ou groupes d'espèces

Tissu dorsal et pores : formé de cellules disposées en files ménageant entre elles des canaux filiformes ouverts sur l'extérieur par des perforations souvent triangulaires apparaissant entre les cellules épidermiques (Riccia congoana, Riccia atropurpurea)

(Jovet-Ast, 1987). Les Riccia aquatiques ou de vases mouillées en permanence renferment dans leur tissu dorsal soit des cavités très irrégulières ouvertes largement sur l'extérieur (section Spongodes) soit des chambres aérifères (lacunes allongées) s'ouvrant par de simples perforations (pores) ou par des ostioles entourées de petites cellules bien organisées rappelant des stomates (Riccia fluitans).

Ornementation du thalle : Chez certains Riccia, la face dorsale du thalle peut être bordée de cils courts ou longs (Riccia microciliata). Elle peut porter des papilles sur la marge, au sommet des faces latérales (ex. Riccia papillosa, Riccia atromarginata) ou en être couverte (Riccia section Pilifer).

Les parois des cellules épidermiques et sous-épidermiques peuvent s'épaissir (Riccia sorocarpa et Riccia sommieri).

Écailles ventrales : sont parfois bien développées jusqu'à recouvrir les faces dorsales lorsque le thalle est sec (Riccia lamellosa). Les écailles sont parfois pigmentées en rose, violet clair, violet noir (Riccia nigrella) ou orangé (R. macrocarpa).

Position de la capsule : Chez les espèces terrestres, la capsule est saillante à la face dorsale du thalle. Elle se déchire à maturité, abandonnant les spores qui se répandent sur le sol. Par contre, chez les espèces aquatiques ou hydrophiles, la capsule fait saillie sur la face ventrale du thalle, se déchire, libère les spores qui s'accumulent sous le thalle et qui sont emportées par le courant d'eau (Jovet-Ast, 1987).

Caractères sporaux

Soudure des spores : Les spores se forment au sein d'une tétrade, résultat des phénomènes de méiose. En général, elles sont libérées individuellement sauf chez un petit nombre d'espèces, Riccia personii, Riccia curtisii (Jovet-Ast 1975a, b). Chez ces dernières, elles restent enfermées dans une exine commune à l'ensemble des 4 spores qui restent sous forme de tétrade. Les spores libres sont considérées comme plus récentes et plus dérivées que les spores soudées en tétrade (Jovet-Ast, 1999).

Ornementation du sporoderme: La micromorphologie de la surface du sporoderme est très variable entre espèces ou groupe d'espèces mais très constante au sein d'une même espèce. Sa description permet de disposer de caractères solides pour l'identification des taxons. 7 types principaux d'ornementation ont été décrits dont le type alvéolé, le plus fréquent. La face distale et, très souvent, les deux faces sont ornées d'alvéoles petites ou grandes qui portent (ou non) des tubercules aux angles des murets, et dont les parois sont lisses ou granuleuses (Riccia trichocarpa, R. atromarginata, R. sorocarpa).

Acquisition des données

Echantillonnage

Sites de récoltes : Dans notre présente étude, les échantillons ont été récoltés entre 2011 et 2013 dans deux pays d'Afrique de l'Est et de l'Océan Indien : dans les hauts plateaux d'Ethiopie (Mont Guna, Vallée du Nil, Mont Ambafarit et Abuna Youssef au Nord et dans les plateaux de Sanetti au Sud) et au Sud-Ouest et au Nord-Est de Madagascar (Makay et Parc national de Marojejy).

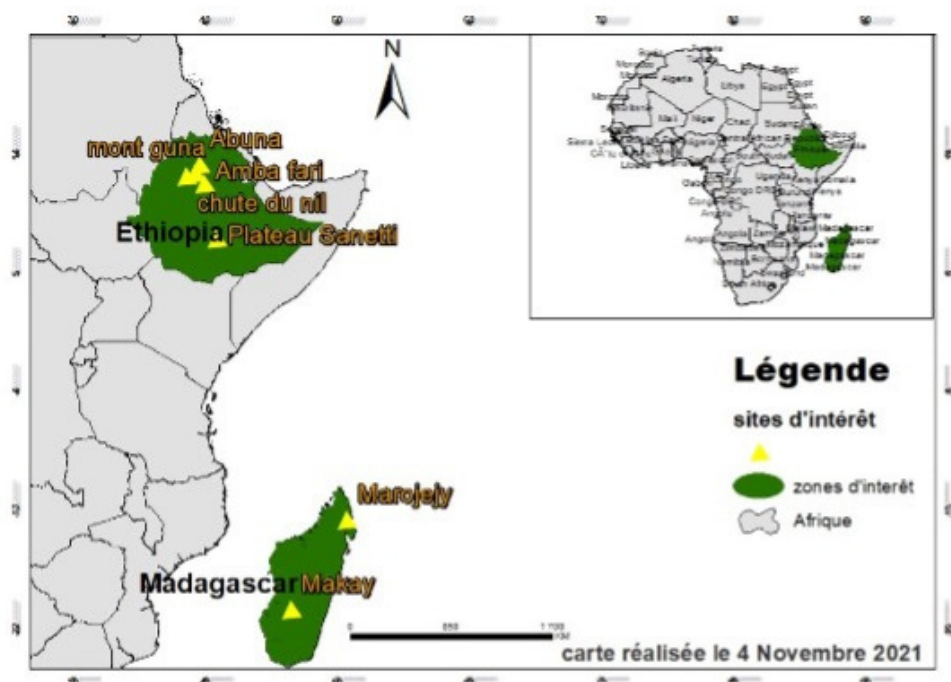


Figure 1 : Localisation des différents sites de récolte en Ethiopie et en Madagascar

Sélection des spécimens : Les spécimens ont été sélectionnés de manière à retenir un à cinq individus de chaque morphotype repéré (selon le nombre disponible). 73 spécimens ont été sélectionnés. Afin de compléter l'échantillonnage et de tester la qualité de l'ADN pour des spécimens plus anciens conservés en herbier, 17 échantillons des collections du MNHN provenant des deux pays ont été ajoutés. Au total 90 échantillons ont été analysés, extraits et amplifiés.

Identification et préparation des échantillons

Identification des spécimens: Pour ceux qui n'ont pu être assignés à des espèces décrites dans les flores, des hypothèses primaires de morpho-espèces regroupant des individus qui nous semblent morphologiquement similaires ont été proposées. Sur la base de la

description morphologique de l'aspect externe du thalle, un tableau des différentes hypothèses morphologiques rencontrées a été établi. Les caractères étudiés sont les suivants : 1) la forme d'insertion du thalle (voir s'il est rosette ou non) ; 2) les formes des branches(ou ramifications) du thalle : en ovales, en lanières ou en courtes et larges.3) La couleur des parties jeunes et âgées et de la marge du thalle. 4) Le recouvrement ou non de la face dorsale du thalle par les flans à sec. 5) L'aspect externe de la surface du thalle (aspect spongieux ou lisse). 6) L'aspect ventral ou dorsal de l'écaille recouvrant la marge du thalle s'il est présent et la couleur des écailles. 7) Présence et l'apparence de la gouttière. 8) Présence ou absence des cils ou papilles sur la face externe du thalle ; 9)l'ornementation des spores (diamètre, la structure externe, les motifs de la face proximale et distale et la marquetriradiée soit forte ou moins forte dans certains cas). Pour compléter le tout un ensemble de séries d'images a été pris pour chaque espèce sous différents angles (Tableau 1).

Préparation des échantillons : L'échantillon doit être nettoyé afin de se débarrasser l'espèce de tous les débris (laterre, les racines et autres espèces collées sur elle, notamment de nombreuses cyanobactéries) et d'éviter toutecontamination de l'ADN lors des étapes suivantes. A la fin, les échantillons propres sont mis dans des tubes Eppendorf et séchés à 65°C dans un étuve afin d'éviter le développement des champignons sur les échantillons humides surtout.

Extraction de l'ADN: Trois séances d'extraction ont été nécessaires. Le protocole s'inspire d'une méthode couramment employé chez les plantes (Doyle & Doyle, 1987).

Broyage : Deux billes de tungstène sont ajoutées dans chaque tube de 2ml, ainsi qu'une pincée de sable de Fontainebleau à l'aide du tissu Lyser II Qiagen à 30 000 rpm répété 1 à 3 fois.

Extraction : Le DNeasy Plant Mini Kit adapté à de très faibles quantités de tissus a été utilisé après un traitement préalable de lyse cellulaire, de libération d'ADN et élimination des protéines. Ensuite, le protocole est suiviconformément aux indications du fabricant du DNeasy Plant Mini Kit QIAGEN pour tous les échantillons.

Choix des marqueurs : La caractéristique la plus importante d'un marqueur ADN approprié est sa variabilité au niveau taxonomique considéré (Fontaneto et al., 2015). D'autres propriétés doivent être retenues, notamment la facilité d'amplification, l'indépendance ou non et la propension d'un marqueur à l'évolution convergente. Pour le choix des marqueurs, des essais préliminaires ont étéeffectués sur des échantillons à partir de 5 marqueurs usuellement utilisés en délimitation moléculaire des bryophytes(rps4, matK, rbcL, trnL-F, ITS2) (Stech & Quandt, 2010). Le trnL-F (marqueur chloroplastique) et ITS2 (marqueurnucléaire) sont apparus comme les plus régulièrement amplifiés.

Choix des amorces : Une propriété importante d'une amorce est son universalité (Fontaneto et al., 2015) pour le groupe d'intérêt. Ce qui est le cas des amorces utilisées qui sont variables et universelles au sein des bryophytes. Des amorces trop spécifiques risqueraient de ne pas amplifier certaines espèces du genre (Tableau 2). Pour le gène *trnL-F*, un couple d'amorce externes cf a été utilisé en premier, puis deux couples internes (cd et ef) lorsqu'il y avait une amplification longue était négative (Tableau 2).

Protocole d'amplification : Les amplifications ont été réalisées dans les thermocycleurs Eppendorf avec un Mix PCR de tampon Taq polymérase, désoxynucléotide triphosphate (dNTP), diméthyl sulfoxyde (DMSO), Bovine Serum Albumin (BSA 0,2 à 0,8 µg/µl), les amorces pour le marqueur considéré. Les conditions de PCR comprenaient une étape de dénaturation initiale de 7 minutes à 94°C, suivi par 40 ou 45 cycles (une minute de dénaturation à 94°C, une minute de l'hybridation à une température optimale en fonction de l'amorce utilisée, une minute d'élongation à 72°C) et une dernière étape d'élongation 10 min à 72°C.

Electrophorèse : Afin de vérifier si les amplifications sont potentiellement à séquencer, les PCR ont été visualisées avec le gel de l'agarose solidifié avec TAE, de l'agarose et du Bromure d'Ethidium (BET).

TAE : Tris (2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol), d'acide Acétique et acide Ethylènediaminetétraacétique (C₁₀H₁₆N₂O₈).

Traitement des données

Séquençage : trois plaques sont préparées, la première P1 contenant produits PCR retenues et les plaques P2 et P3 respectivement les amorces Forward et Reverse.

Nettoyage et alignement des séquences : Après avoir nettoyé les séquences sur CodonCode Aligner et alignées via MEGA version 6 (Tamura *et al.*, 2013), les séquences des amorces sont soustraites. L'alignement s'est fait en privilégiant les transitions aux transversions et les transversions aux gaps en décalant parfois certaines portions de bases les uns par rapport aux autres afin d'aligner les bases que nous considérons comme homologues avec le MEGA 6 CLUSTER W (Tamura *et al.*, 2011).

Analyse des données

La visualisation des morpho-espèces par un arbre de distance s'est faite à l'aide d'arbres de distances avec le modèle Kimura K80 de MEGA 6 (Peterson *et al.*, 2011) à partir des alignements *trnL-F* et ITS2. Cela permet de vérifier la cohérence des données : les séquences produisant des longues branches sont inspectées avec une attention toute particulière. Les séquences douteuses ont fait systématiquement l'objet d'un blast sur NCBI pour identifier les contaminations environnementales.

ADN barcoding

L'ADN barcoding demande à poser un seuil a priori de distance nucléotidique en dessous duquel les spécimens sont considérés comme appartenant à la même espèce et au-dessus duquel ils sont considérés comme appartenant à des espèces différentes (variations intraspécifiques et interspécifiques) (Fontaneto et al., 2015 ; Hebert et al., 2003 ; Vogler et Monaghan, 2007 ; Collins et Cruickshank, 2012). Il permet l'identification des individus des espèces déjà connues et la découverte de nouvelles espèces pour référencer les bases de données. Ces variations considèrent que les individus d'une espèce donnée présentent plus de ressemblances moléculaires que les individus d'espèces différentes. En traçant la distribution des distances entre les paires de séquences dans un ensemble de données, lorsque cette distribution révèle une lacune évidente (appelée Barcode gap), un seuil placé dans cet espace peut être utilisé pour délimiter les espèces (Lefébrune et al., 2006).

Analyse des séquences et partitionnement avec le logiciel ABGD

La méthode, appelée Automatique Barcode Gap Discovery (ABGD) est une méthode permettant de diviser un ensemble de séquences d'un alignement en groupes, considérés comme des hypothèses moléculaires d'espèces. ABGD autorise un changement du seuil de délimitation de groupes (Puillandre *et al.*, 2011). Les paramètres retenus sont $P=0.01$ et $X=0.5$ avec P (la distance limite maximale intraspécifique) et X (la valeur minimale du barcode gap). Le plugin « Species Delimitation » de Geneious a été utilisé afin d'obtenir des informations de synthèse sur les hypothèses d'espèces (groupes ABGD) : distance intraspécifique maximale, distance interspécifique par rapport au groupe le plus proche monophylie (Puillandre *et al.*, 2011).

Résultats et discussion

Report des hypothèses de morphoespèces sur un arbre de distance: Avec l'arbre obtenu avec les séquences *trnL-F* sans celles de Genbank, on confirme nos groupes d'hypothèses primaires de morpho-espèces (FIG.1). Pour ce qui est de l'alignement ITS2, vu le faible nombre de séquences, seuls deux groupes de plus d'un individu ont pu être reconnus ((FIG.1). Les échantillons CR13E64, CR13E44 et CR11615 (*R. sp* à écailles noires) forment et CR11528 et CR11564 (*R. vulcanicola*) forment chacun un clade au sein duquel les distances sont très proches, *R.sp.5* (distance maximale intraspécifique 0.006 et distance minimale interspécifique 0.027), *R. vulcanicola* (distance maximale intra spécifique 0.002 et distance minimale inter spécifique 0.054). *R. atropurpurea* forme un clade au niveau de chaque marqueur. Les spécimens CR13E50, CR13E51, CR13E55 et CR13E57 forment un clade. Ce clade qui est un peu éloigné ($d=0.007$) du deuxième clade CR13E11A et CR13E14 qui sont des échantillons placés dans la même hypothèse. La plupart des morpho-espèces sont reconnues par ABGD pour *trnL-F* sauf *R. congoana* qui est partitionné en trois (groupe 2.8 et 9) (FIG. 3). Pour ITS2, un certain nombre de morpho-espèces sont reconnues malgré le faible nombre de séquences obtenues. Cependant le groupe entouré en gris (FIG. 2)

montre un mélange de spécimens appartenant à plusieurs morpho-espèces.

La synthèse fournie par le plugin « Species Delimitation » pour *trnL-F* indique une distance interspécifique minimale moyenne $d=0.0504$ (Tableau 3). Ce tableau n'est pas présenté pour ITS2, au vu du faible nombre des séquences et d'individus par groupes.

L'inclusion des séquences GenBank a été effectuée dans un second temps, car le nombre de spécimens par morpho-espèces devenait si faible que ABGD en général peut fournir dans ce cas des hypothèses biaisées (Puillandre *et al.*, 2011). Nous avons dû modifier les paramètres de P et choisir $P=0.05$ afin de retrouver les groupes délimités préalablement ainsi que les spécimens identifiés sur GenBank comme des morpho-espèces différentes. L'intérêt de cette dernière analyse est de confronter les séquences de spécimens identifiés avec les spécimens éthiopiens et malgaches de notre étude. Seul *R. lamellosa* montre une distance génétique faible (distance intra spécifique=0.002) avec CR13E25B, permettant de confirmer l'appartenance à la même espèce de ces deux spécimens. Les autres spécimens inclus sont soit dans des groupes indépendants, soit regroupés au sein d'un même groupe (groupe 4 : groupe de *R. section pilifer*).

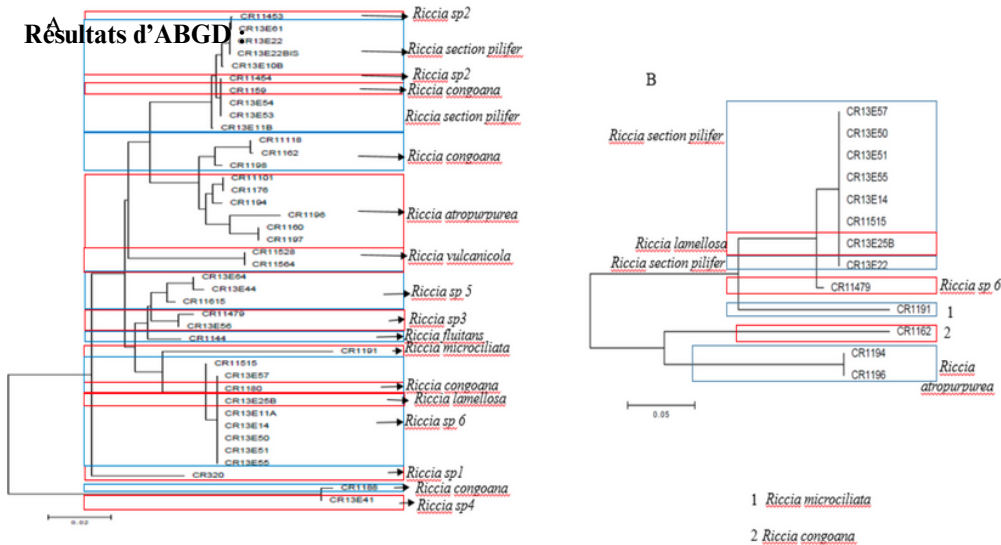


Figure 2 : Cladogramme issu de l'analyse des séquences TrnL-F (A) et ITS2 (B) (test Neighbor-Joining). Les couleurs (bleu ou rouge) désignent les hypothèses morphologiques (morpho-espèces) élaborées lors de la phase d'identification des échantillons

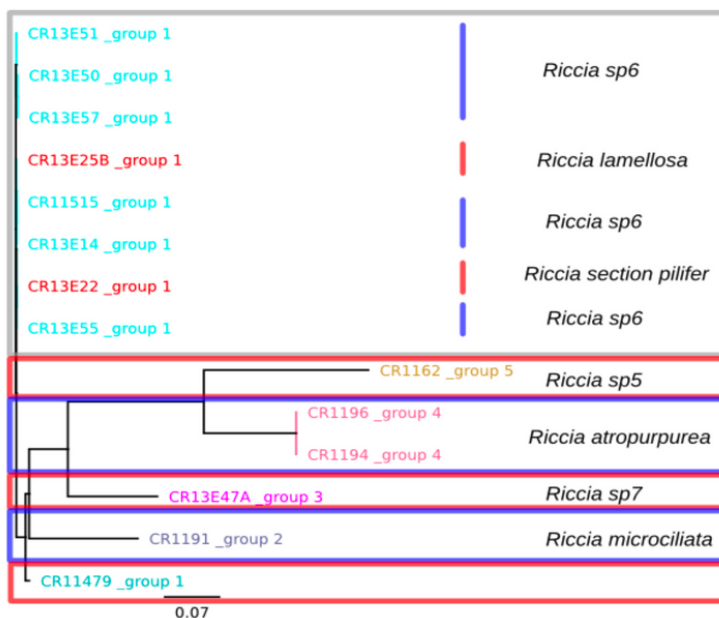


Figure 3 : Hypothèses de délimitations produits par ABGD pour trnL-F avec les paramètres Pmin= 0.001 ; Pmax=0.01, X (relatifs gaps with)=0.5, step=10 et le modèle Kimura 80 (K80). Chaque groupe ABGD est colorié dans une couleur spécifique.

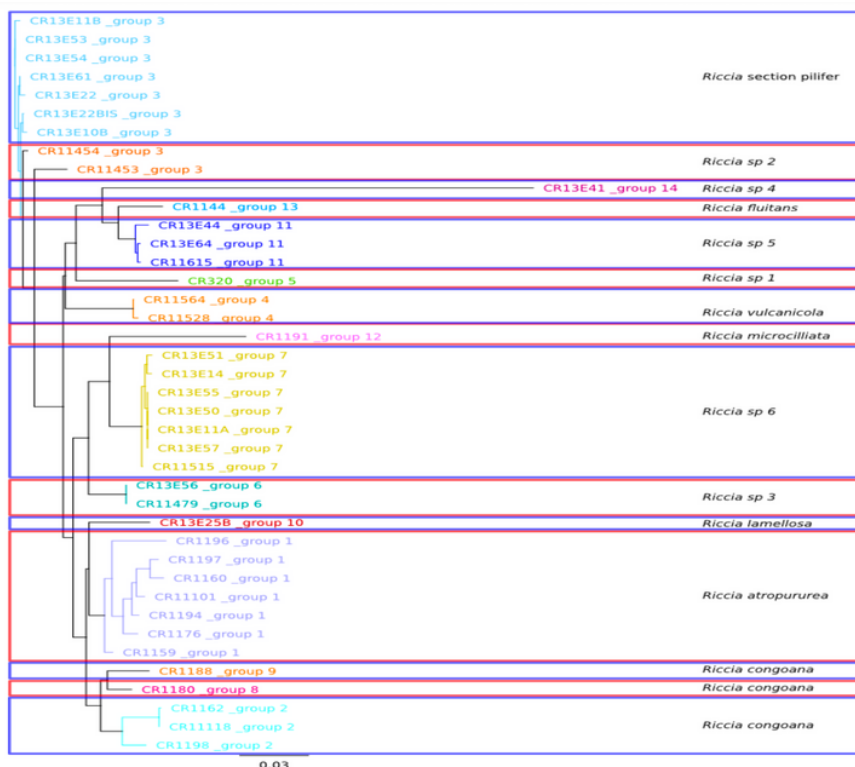


Figure 4: Hypothèses primaires moléculaires produit par ABGD pour ITS2 avec les paramètres $P_{min}= 0,001$; $P_{max}=0,01$, X (relatifs gaps width)= 0,5; Step=10 et Kimura (K80) TS/TV

Tableau 3 : les distances inter et intra spécifique entre les morpho-espèces les plus proches

Discussion

Cette étude nous permet de proposer 9 hypothèses secondaires d'espèces, confirmées par la morpho-anatomie et ladélimitation moléculaire d'espèce par un gène chloroplastique *trnLF* et nucléaire ITS2 : *R. sp1*, *R. sp2*, *R. sp3*, *R. sp4*, *R. sp5*, *R. atropurpurea*, *R. fluitans*, *R. microciliata* et *R. vulcanicola*.

Cependant, les incongruences notées pour *R. congoana* (3 groupes ABGD avec *trnLF*, *R. section pilifer*, *R. lamellosa* (séquences identiques pour ITS2 avec *R. sp6*) ne suffisent pas à éliminer définitivement ces espèces. En effet, pour *R. section pilifer* et *R. lamellosa* il y a concordance entre *trnLF* et la morphoespèce (soutenue par la séquence GenBank pour *R. lamellosa*.). Il est probable que : (1) le faible nombre de spécimens en ITS2 ait pu entraîner un biais pour le groupe; (2) ou plus probablement qu'il y ait eu des erreurs de séquençage des deux spécimens *CR13E25B* et *CR13E22*. La séparation morphologique est donc loin d'être parfaite, ce qui n'est cependant pas étonnant pour des espèces cryptiques (Duminil & Di Michele, 2009). De plus, l'ajout de d'autres caractères morphologiques aurait pu permettre une meilleure séparation (Duminil & Di Michele, 2009; Allaer, 2017). D'après les résultats de l'analyse, il n'y a aucune congruence (correspondance) entre les hypothèses demorpho-espèces récoltés entre les deux lieux d'études de part et d'autre du canal du Mozambique, à savoir à Madagascar et Ethiopie. Par contre, on note des espèces communes entre l'Ethiopie et les espèces africaines continentales comme *R. vulcanicola* ou *R. lamellosa* qui a déjà été décrites (Parolly *et al.*, 2018). Pour Madagascar il y a aussi correspondance entre des espèces étudiées et des espèces déjà décrites en zone continentale africaine (*R. atropurpurea*, *R. congoana*, *R. microciliata*) même parfois européenne (*R. fluitans*). *Riccia sp1*, *R.sp2*, *R. sp4*, *R. sp5* et *R. sp6* n'ont pas pu être identifiées nécessitant une étude plus approfondie : espèces déjà décrites ou nouvelles espèces pour la science. Comparé aux échantillons de GBIF, cinq espèces ont été identifiées commune aux récoltes réalisées au Madagascar.

Nos résultats soulignent en particulier la sensibilité de la méthode à la présence d'événements de spéciation récents, via des taux de spéciation (irréaliste) élevés ou un grand nombre d'espèces (Puillandre *et al.*, 2011). Ils mettent en avant la diversité des *Riccia*. Les séquences de *trnL-F* présentent une certaine divergence avec les séquences déposées sur NCBI (sauf *R. lamellosa*), ce qui révèle que toutes nos séquences appartiennent à des espèces pas encore séquencées ou pas encore déposés. ABGD détecte l'écart des barcodes qu'il utilise pour la partition des données. Pour que cet écart soit le plus correct possible, le nombre de spécimens par échantillons doit être au moins supérieur à 3 (Puillandre *et al.*, 2011).

Cette méthode est fournie un grand nombre de caractères moléculaires pris en compte (contrairement à la morphologie) pour aider à la délimitation des espèces. Ceci présenterait l'avantage majeur, de mettre en évidence des espèces cryptiques, morphologiquement indifférenciées mais reproductivement isolées très communes dans certains groupes taxonomiques. De plus, la grande plasticité phénotypique des caractères morphologiques à l'intérieur d'une même espèce peut parfois causer des erreurs dans l'identification des espèces (Vermeij, 1982 ; Palumbi, 1984 ; Russell, 1996 ; Fowler-Walker et al., 2006 ; Leliaert et al., 2009, Okassa Oyieyi, 2010). Elle donne aussi la possibilité d'identifier les stades immatures, qu'il est impossible de distinguer dans de nombreux groupes uniquement sur la base d'observations morphologiques. Le barcode moléculaire présente l'avantage d'assigner un individu à une espèce donnée quel que soit son stade de développement, étant donné que les séquences d'ADN d'un individu sont identiques à tous ses stades de développement (Stoeckle, 2003 ; Blaxter, 2004 ; Hebert et al., 2004b ; Paquin et Hedin, 2004 ; Barret et Hebert, 2005 ; Miller et al., 2005 ; Thomas et al., 2005 ; Vences et al., 2005a, b ; Ahrens et al., 2007). Dans un contexte de déclin accéléré de la biodiversité (Blackmore, 2002 ; Gewin, 2002 ; Mallet et Willmott, 2003 ; Wilson, 2003 ; Wheeler et al., 2004). En considérant la disparition rapide des habitats, particulièrement dans les régions tropicales, les scientifiques ont estimé que près de 20 % de la biodiversité aura disparue au milieu du 21ème siècle avec une connaissance faible de 10 % des espèces vivantes (Blaxter, 2004) sur 10 et 15 millions (Wilson, 2003). Il est donc indispensable dans ce contexte de préserver l'expertise taxonomique encore existante et de perfectionner (démocratiser) les méthodes d'identification du vivant afin de faciliter et accélérer ce décompte. Dans ce contexte, le barcode moléculaire a été proposé comme une méthode d'identification plus accessible et plus rapide que le diagnostic morphologique (Hebert et al., 2004a,b ; Barrett et Hebert, 2005 ; Hajibabaei et al., 2006a,b ; Evans et al., 2007 ; Linares et al., 2009). Elle nécessiterait en effet une expertise moins importante dans la mesure où les bases de données associant séquences d'ADN et noms d'espèces seraient correctement construites (Sperling, 2003 ; Moritz et Cicero, 2004 ; Will et Rubinoff, 2004 ; Hajibabaei et al., 2006b ; Scheffer et al., 2006 ; Okassa, 2010).

Les approches pour délimiter les espèces à l'aide de données moléculaires (Sites et Marshall, 2004) vont de l'utilisation de caractères diagnostiques ou de combinaisons de caractères aux méthodes de distance, aux approches coalescentes (par exemple, les modèles de Yule de croissance de la lignée stochastique de Pons et al. 2006) et aux tests de rapport de vraisemblance (Matz et Nielsen, 2005). Les approches statistiques pour délimiter les espèces sont aussi variées et controversées que les concepts et critères d'espèces eux-mêmes (Sites et Marshall, 2004 ; Nielsen et Matz, 2006 ; Zhang et al., 2008, Bond et Stockman, 2008, Goldstein et DeSalle, 2010).

Conclusion

Cette étude a pour objectif est de caractériser et d'étudier la diversité génétique de plusieurs espèces de bryophytes du genre *Riccia*, de part et d'autre du canal du Mozambique, par une approche de taxonomie intégrative. C'est une approche de l'étude diversité méconnue des hépatiques à thalles complexes du genre *Riccia* des zones tropicales, un groupe très diversifié et présentent un fort taux d'endémisme, rare chez les bryophytes. Les résultats obtenus montrent, sur un ensemble de 13 hypothèses morphologiques, 10 groupes ont été confirmés par l'analyse d'ABGD. Ces résultats soulignent en particulier la sensibilité de la méthode à la présence d'événements de spéciation récents et au nombre de caractères moléculaires pris en compte pour aider à la délimitation des espèces. L'apport des données morphologiques des hypothèses primaires de délimitation d'espèces et des analyses moléculaires préservent l'expertise taxonomique encore existante et assurent le perfectionnement des méthodes d'identification du vivant. Les différents résultats obtenus au cours de cette étude permettent non seulement d'enrichir notre connaissance de la biodiversité, mais aussi de fournir également une matière indispensable pour analyser des processus qui sont à l'origine de cette biodiversité. La méthode d'ABGD est rapide, c'est une méthode simple pour diviser un ensemble de séquences en espèces moléculaires qui doivent être complétées par d'autres éléments de preuve dans une approche intégrative taxonomique. Un effort d'échantillonnage est nécessaire dans d'autres pays d'Afrique continentale et les pays de l'Océan indien et une comparaison avec des échantillons des herbiers pour apporter plus d'éclaircissement.

Références

- Ahrens, D., Monaghan, M.T., Vogler, A.P. (2007) DNA-based taxonomy for associating adults and larvae in multi-species assemblages of chafers (Coleoptera: Scarabaeidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 44, 436–449.
- Barrett R.D.H. and Hebert P.D.N. (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 83, 481–491.
- Beckert, S., Steinhauser, S., Muhle, H. and Knoop V. (1999) A molecular phylogeny of bryophytes based on nucleotide sequences of the mitochondrial nad5 gene. *Plant Systematic and Evolution*. 218, 179–192.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K. and Das, I. (2007) Cryptic species as a window in diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 22:148-155.
- Blackmore, S. (2002) Biodiversity update: progress in taxonomy. *Science*, 298- 365.
- Blaxter, M.L. (2004) The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 359, 669-679.

Bond, J.E. and Stockman, A.K. (2008) An integrative method for delimiting cohesion species: finding the population-species interface in a group of Californian Trapdoor Spiders with extreme genetic divergence and geographic structuring. *Sys Biol* 57: 28–46.

Bopp, M. and Capesius, I. (1996) New aspects of bryophyte taxonomy provided by a molecular approach. *Botanica Acta*. 109: 368–372.

Capesius, I. (1995) A molecular phylogeny of bryophytes based on the nuclear encoded 18S rRNA genes. *Journal of Plant Physiology*. 146: 59–63.

Collins, R.A. and Cruickshank, R. (2012) The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Ressources*. 13: 969–975.

Crandall-Stotler, B. and Stotler, R. (2000) Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: Shaw, A. J. & Goffinet, B. (eds) *Bryophyte Biology*; pp. 21–70. Cambridge: Cambridge University Press.

Dionne, K. (2015) Coexistence d'un complexe d'espèces cryptiques à des échelles locales et régionales. Thèse du doctorat en Biologie. Université du Québec à Rimouski. 240 p. DOI: 10.13140/RG.2.1.2887.8167.

Dourdaïne, A. (2014) Etude de l'évolution de l'isolement reproducteur au sein d'un complexe d'espèces Bemisiatabaci. Rapport de stage. Master 2 - Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux. 60 p.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11–15.

Duff, R.J. and Nickrent, D.L. (1999) Phylogenetic relationships of land plants using mitochondrial small-subunit rDNA sequences. *American Journal of Botany*. 86, 372–386.

Evans, K.M., Wortley, A.H. and Mann, D.G. (2007) An assessment of potential diatom “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist* 158, 349–364.

Fontaneto, D. Flot, J.F. and Tang, C.Q. (2015) Guidelines for DNA taxonomy, with a focus on the meifauna. *Marine Biodiversity*. doi 10.1007/s12526-015-0319-7.

Fowler-Walker, M.J., Wernberg, T. and Connell, S.D. (2006) Differences in kelp morphology between wavesheltered and exposed localities: morphologically plastic or fixed traits? *Marine Biology*, 148, 755–767.

Gewin, V. (2002) All living things on line. *Nature*, 418, 362-363.

Goffinet, B. (2000) Origin and phylogenetic relationships of bryophytes. In : Shaw, A.J., Goffinet, B. (Eds.), *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 124- 149.

Goldstein, P. Z. and DeSalle, R., (2010) Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. *Bioessays* 33: 135–147. DOI 10.1002/bies.201000036.

Gradstein, S.R., Churchill, S.P. and Salazar A.N. (2001) *Guide to the Bryophytes of Tropical America*. Memoirs of the New York Botanical Garden. Vol. 86: pp. 577.

Graham, C.H., Ferrier, S., Huettman, F., Moritz, C. and Peterson T. (2004) New developments in museum-based informatics and applications in biodiversity analysis. *Trends in Ecology and Evolution*. 19: 497–503.

Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N. (2006a) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103, 968–971.

Hajibabaei, M., Smith, M.A., Janzen, D.H., Rodriguez, J.J., Whitfield, J.B., Hebert, P.D.N., (2006b) A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* 6, 959–964.

Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. (2003) Biological identifications through DNA barcodes.

Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 270(1512), 313–321. Hebert, P.D.N, Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W. (2004a) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 14812–14817.

Hebert, P.D.N., Stoeckle, L.Y., Zemlak, T.S., Francis, C.M. (2004b) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2, 10, e312.

Jovet-Ast, S. (1986) Les Riccia de la région méditerranéenne. *Cryptogamie, Bryologie, Lichenologie*. 7(3) : 287–429.

Jovet-Ast, S. (1975a) Germination et phase protonémique chez quelques espèces du genre *Riccia*. *Revue Bryologique et Lichénologique*. 41 : 263–276.

Jovet-Ast, S. (1987) Vers une classification phylogénétique des espèces du genre *Riccia*. *The Bryologist*. vol.90 N°4 pp. 321–330.

Kenrick, P., Crane, P. (1997) The origin and early diversification of Land plants, a cladistic study, Smithsonian institution.

Lefébure, T., Douady, C.J., Gouy, M., Gibert, J. (2006) Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea : proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 40: 435–447.

Leliaert, F., Verbruggen, H., Wysor, B., De Clerck O. (2009) DNA taxonomy in morphologically plastic taxa: algorithmic species delimitation in the *Boodlea* complex (Chlorophyta: Siphonocladales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, 122–133.

Lewis, L.A., Mishler, B.D., Vilgalys, R. (1997) Phylogenetic relationships of the liverworts (Hepaticae), a basal Embryophyte lineage, inferred from nucleotide sequence data of the chloroplast gene *rbcL*. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 7, 377–393.

Linares, M.C., Soto-Calderon, I.D., Lees, D.C., Anthony, N.M. (2009) High mitochondrial diversity ingeographically widespread butterflies of Madagascar: a test of the DNA barcoding approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50, 485–495.

Mac Glime, J. (2006) Bryophyte ecology, physiological ecology. Michigan Technological University (MTU) Botanical Society of America (BSA). Online publication [http:// www.bryoecol.mtu.edu/](http://www.bryoecol.mtu.edu/) International Association of Bryologists (IAB).

Mallet, J., Willmott, K. (2003) Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 57–59.

Marline, L., Andriamiarisoa, R.L., Bardat, J., Chuah-Petiot, M., Hedderson, T.A.J., Reeb, C., Strasberg, D., Wilding, N., Ah-Peng, C. (2012) Checklist of the bryophytes of Madagascar. *Cryptogamie, Bryologie*. 33: 199–255. <http://dx.doi.org/10.7872/cryb.v33.iss3.2012.199>.

Matz, M.V., Nielsen, R. (2005) A likelihood ratio test for species membership based on DNA sequence data. *Philos Trans R Soc B* 360: 1969–74.

Miller, K.B., Alarie, Y., Wolfe, G.W., Whiting, M.F. (2005) Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodytes umbrinus* Motschulsky (Coleoptera: Dytiscidae). *Systematic Entomology*, 30, 499–509.

Mishler, B.D., Lewis, L.A., Buchheim, M.A., Renzaglia, K.S., Garbary, D.J., Delwiche, C.F., Zechmann, F.W., Kantz, T.S., Chapman, R.L. (1994) Phylogenetic relationships of the « green algae » and « bryophytes ». *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 81, 451–483.

Moritz, C., Cicero, C. (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biology*, 210 - 354. Nielsen R, Matz M. 2006. Statistical approaches for DNA barcoding. *Syst Biol*. 55: 162–9.

Nishiyama, T., Kato, M. (1999) Molecular phylogenetic analysis among bryophytes and Tracheophytes based on combined data of plastid coded genes and the 18S rRNA gene. *Molecular Biology and Evolution*. 16, 1027–1036.

Okassa, M. (2010) Congruence entre différenciation morphologique et moléculaire (Barcode moléculaire) pour septespèces de la famille des Phytoseiidae (Acari : Mesostigmata). Thèse de Doctorat à Montpellier SupAgro. 297p.

Palumbi, S.R. (1984) Tactics of acclimation: morphological changes of sponges in an unpredictable environment. *Science*, 225, 1478-1480.

Paquin, P., Hedin, M. (2004) The power and perils of ‘molecular taxonomy’: a case study of eyeless and endangered Cicurina Araneae: Dictynidae from Texas caves. *Molecular Ecology*, 13, 3239–3255.

Parollya, G., Qasimov, T. & Kürchner, H. (2018) *Riccia lamellosa raddi* (Marchantiophyta), a new record for Azerbaijan. *Cryptogamie, Bryologie*, 39 (2): 163-168n doi/10.7872/cryb/v39.iss2.2018.163

Perold, S.M. (1996) Studies in the Ricciaceae of a Sub- Sahara Africa: A provisional key to the currently know species. *Bothalia*. 26: 95–123.

Perold, S.M. (1999) Hepatophyta. Part I: Marchantiopsida, Fascicule I: Marchantiidae, Flora of Southern Africa National Botanical Institute, Pretoria.

Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and Evolution*. 28(10), 2731–2739.

Pfenninger, J.M., Schwenck, K. (2007) Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology*. 56: 875–878.

- Pòcs, T. (1982) Tropical Forest bryophytes. In *Bryophyte Ecology*, ed. A.J.K.E.Smith. pp.59–104. London Chapman & Hall.
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., et al. (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst Biol.* 55: 595–609.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G. (2011) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation, *Molecular Ecology*. 21 (8): 1864–77.
- Qiu, Y.L., Cho, Y., Cox, J.C, Palmer, J.D. (1998) The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature*. 394: 671–674.
- Rabeau, L. (2019) Diversity and evolution in liverwort genus *Riccia* (Ricciaceae, Marchantiidae) : integrative and phylogenetic approaches with a focus on southern Africa and western Indian Ocean. Thèse de doctorat en Ecologie et Evolution.
- Russell, G.C. (1996) Phenotypic plasticity in an intertidal snail: the role of a common crab predator. *Evolution*, 50, 448–454.
- Samigullin, T.H., Valiejo-Roman, K.M., Troitsky, A.V., Bobrova, V.K., Filin, V.R., Martin, W., Antonov, A.S. (1998) Sequences of rDNA internal transcribed spacers from the chloroplast DNA of 26 bryophytes: properties and phylogenetic utility. *FEBS Letters*. 422, 47–51.
- Savage, J.M. (1995) Systematics and biodiversity crisis. *Bioscience*. 4:673–679.
- Scheffer, S.J., Lewis, M.L., Joshi, R.C. (2006) DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in The Philippines. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 204–210.
- Schljakov, R.N. (1972) On the higher taxa of liverworts class Hepaticae s. str. *Botanicheskii Zhurnal*. 57: 496–508.
- Shaw, A.J., Renzaglia, K.S. (2004) Diversity and classification of bryophytes. *American Journal of Botany*. 91: 1557–1581.
- Schuster, R.M. (1984) Evolution, phylogeny and classification of the Hepaticae. 1070 Pages 892–In R.M. Schuster(ed.), *New Manual of Bryology*. Hattori Botanical Laboratory, Nichinan, Japan.

Sites, J.W., Marshall, J.C. (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution*. 18:462–470.

Sites, J.W., Marshall, J.C. (2004) Operational criteria for delimiting species. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35: 199–227.

Sperling, F. (2003) DNA barcoding. Deus ex machina. *Newsl. Biol. Surv. Can. Terrestrial Arthropods*, Opinion page [online]. Vol. 22, issue 2. Available from http://www.biology.ualberta.ca/bsc/news22_2/opinionpage.htm [cited 28 December 2004].

Stech, M., Quandt, D. (2010) 20,000 species and five key markers: The status of molecular phylogenetics. *Phytotaxa*. 9: 196 – 228.

Stoeckle, M. (2003) Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *Biosciences*, 53, 796-797. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725–2729.

Thomas, M., Raharivololoniaina, L., Glaw, F., Vences, M., Vieites, D.R. (2005) Montane tadpoles in Madagascar: molecular identification and description of the larval stages of *Mantidactylus elegans*, *Mantidactylus medacassus* and *Boophis laurenti* from the Andringitra Massif. *Copeia*, 174–183.

Vences, M., Thomas, M., Bonett, R.M., Vieites, D.R. (2005a) Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 360, 1859– 1868.

Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y., Vieites, D.R. (2005b) Comparative performance of 16S rRNA in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2, 1-12. Vermeij, G.J. (1982) Phenotypic evolution in a poorly dispersing snail after arrival of a predator. *Nature*, 299, 349-350.

Vogler, A.P., Monaghan, M.T. (2007) Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 45: 1–10.

Wellman, C.H., Osterloff, P., Mohluddin, U. (2003) Fragments of the earliest land plants. *Nature*. 425: 282–285.

Wiens, J.J. (2007) Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology*. 56: 875–878.

Wigginton, M.J. (2004) Checklist and distribution of the liverworts and hornworts of Sub-Saharan Africa, including The East African Island Tropical. Bryology Research Report. 5:1– 102.

Will, K.W., Rubinoff, D. (2004) Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. Cladistics, 20, 47–55.

Wilson, E.O. (2003) The encyclopedia of Life. Trends in Ecology and Evolution, 18, 77–80.

Wheeler, J.A. (2000) Molecular phylogenetic reconstructions of the Marchantioid liverworts radiation. The Bryologist. 103: 314–333.

Wheeler, Q.D., Raven, P.H., Wilson, E.O. (2004) Taxonomy: impediment or expedient? Science, 303, 285.

Zhang, A.B., Sikes, D.S., Muster, C., Li, S.Q. (2008) Inferring species membership using DNA sequences with back-propagation neural networks. Syst Biol. 57: 202–15.

Annexes

Noms Scientifiques	Pays d'origine	Coordonnées	Date de récolte	Herbiers
<i>Riccia fluitans</i> L.	Madagascar	18.4S, 46.6E	1998 Aout	Bryophyte specimens at TAN Herbarium
<i>Riccia fluitans</i> L.		14.5S, 48.7E	1990 Mars	
<i>Riccia atropurpurea</i> Sim		16.5S, 49.8E	1990 Mars	
<i>Riccia fluitans</i> L.		24.5S, 47.2E	1988 Mars	
<i>Riccia fluitans</i> L.		12.5S, 49.2E	1987 Mai	
<i>Riccia congoana</i> Steph.		19.2S, 48.6E	1970 Novembre	
<i>Riccia congoana</i> Steph.		21.2S, 47.4E	1963 Novembre	
<i>Riccia atropurpurea</i> Sim		21.2S, 47.4E	1959 Mars	
<i>Riccia fluitans</i> L.		22.6S, 44.2E	1956 Avril	
<i>Riccia fluitans</i> L.		22.7S, 44.2E	1956 Novembre	
<i>Riccia congoana</i> Steph.		20.4S, 47.2E		
<i>Riccia atropurpurea</i> Sim		22.3S, 46.9E	2004 Juillet	
<i>Riccia microciliata</i> O.H.Volk & Perold		21.3S, 47.4E	2002 Décembre	
<i>Riccia papillispora</i> Steph.	Ethiopie	8.6N, 39.6E		Geneva Herbarium – General Collection (G)
<i>Riccia laxisquamata</i> Stephani		8.6N, 39.6E		

Tableau 1 : Liste des échantillons de bryophytes dans la base de données de GBIF

Morpho- espèces	Spécimens	Port du thalle	Couleur face dorsale	Taille	Forme des branches	Couleur des écailles	Aspect de la face dorsale	Caractères des spores	Caractères supplémentaires	Autres remarques
<i>Riccia fluitans</i>	<i>CR1144</i>	En rosette avec des touffes longues et filamenteuses	Jaune vert	5 à 10mmde long, 1 à 3mm de large	Lanières longues	Pas d'écailles				Ramification dichotomique et pas d'écailles
<i>Riccia congoana</i>	<i>CR1180</i> <i>CR1162</i> <i>CR1188</i> <i>CR1198</i> <i>CR11118</i>	Rosette partiellement irréguliers	Vert- jaune bleu vert	4 à 10 mm de long, 2 à 5mm de large	Ovales larges	Écaillesnoires périphériques	Face dorsale réticulée	Spores brun jaunâtre, sans aile et marque triradié forte		Bordure festonnée étroite
<i>Riccia atropurpurea</i>	<i>CR1176</i> <i>CR1160</i> <i>CR1196</i> <i>CR1194</i> <i>CR1197</i> <i>CR11101</i> <i>CR1159</i>	incomplètesou thalles isolés	bleu gris, bleu- vert	15 mm long max, branches2 à3 mm large	linéaires à faiblement ovales	typiques: noires puis pourpre passant au blanc à la marge		Spores brunes noires		Marge blanche bien visible à sec, les bords du thalle se touchant souvent au-dessus de la face dorsale

Tableau 2 : Hypothèses de morpho-espèces établies lors de l'identification des échantillons

Morpho- espèces	Spécimens	Port du thalle	Couleur face dorsale	Taille	Forme des branches	Couleur des écailles	Aspect de la face dorsale	Caractères des spores	Caractères supplémentai res	Autres remarques
<i>Riccia section pilifer</i>	CR3E61 CR13E22B CR13E22A CR13E53 CR13E54 CR13E10B CR13E11B	Thalles en rosettes	Vert-jaune	4 à 10 mm de long, 2 à 5 mm de large	Ovales	Écailles noires sur les côtés et le sommet	Thalle à aspect spongieux			Thalles à face dorsale avec des papilles vert- blanc lui- donnant un aspect velouté
<i>Riccia sp 1</i>	CR320	Thalles en rosettes	Vert-gris	4 à 10 mm de long, 2 à 5 mm de large	Ovales et larges	Pas d'écailles				Gouttière peu visible
<i>Riccia microcladia O.H. Volk & Perold</i>	CR1191	Thalles en rosette	Vert-gris	6 à 18 mm de long, 4 à 8 mm de large	Thalles ovales et larges	Pas écailles	Thalle un peu lisse	Spores triangulaires globuleux	Ornementati on réticulée	Thalle avec des cils logs hyalins en plusieurs rangées bordées à l'apex, Arquées et canalisés
<i>Riccia sp2</i>	CR11453 CR11454	Thalles en rosettes	Vert blanc	3 à 10 mm de long, 1 à 5 mm de large	Thalles ovales	Écailles de couleur blanche	Thalle avec un aspect plutôt lisse			
<i>Riccia sp3</i>	CR13E56 CR11479	Thalles en rosettes	Vert-jaune	4 à 10 mm de long, 2 à 5 mm de large	Thalles ovales	Pas écailles	Thalle à aspect spongieux			

Tableau 2 : Hypothèses de morpho-espèces établies lors de l'identification des échantillons

Morpho- espèces	Spécimens	Port du thalle	Couleur face dorsale	Taille	Forme des branches	Couleur des écailles	Aspect de la face dorsale	Caractères des spores	Caractères supplémentai res	Autres remarques
<i>Riccia sp4</i>	<i>CRI13E41</i>	Thalles en rosettes	Vert- blanc	4 à 10 mm de long, 2 à 5 mm de large	Frondes ovales					
<i>Riccia vulcanicola</i>	<i>CRI11528</i> <i>CRI11564</i>	Thalle en Rosettes de texture tendre	Vert gris Vert jaune	2 à 13 mm de long, 6 à 10 mm de large	Thalle en rosettes		Thalle à aspect spongieux	Spores triangulaire globulaires jaune brun à brun clair, aile mince		Surface dorsale avec des vésicules et pores distinctes ou des lacunes dans l'épiderme
<i>Riccia sp 6</i> (<i>vert jaune</i>)	<i>CRI13E14</i> <i>CRI11515</i> <i>CRI13E51</i> <i>CRI13E50</i> <i>CRI13E55</i> <i>CRI13E57</i> <i>CRI13E114</i>	Thalles en rosette	Vert- blanc Vert- jaune	3 à 15 mm de long, 2 à 4 mm de large	Thalles ovales	Écailles périphériques blanches	Thalle à aspect spongieux		Bordure blanchâtre recouverte avec des écailles blanches	
<i>Riccia sp5</i> (<i>écailles noires</i>)	<i>CRI13E41</i> <i>CRI13E64</i> <i>CRI11615</i>	Thalles en rosettes	Vert jaune	3 à 15 mm de long, 2 à 4 mm de large		Ecailles noires périphériques brillantes				Ecailles noires formant une couche continuesur les bordures du thalle
<i>Riccia lamellosa</i>	<i>CRI13B25B</i>	Thalles en rosette	Vert jaune	6 à 20 mm de long, 6 à 10 mm de large		Pas d'écailles	Thalle lisse	Frondes bifurquées		Thalles concaves avec surface unie, gouttière peu visible

Tableau 2 : Hypothèses de morpho-espèces établies lors de l'identification des échantillons

Gène	Région	Séquence		Taq	Tm
		Primer F	Primer R		
<i>trnL cf</i>	chloroplastique	CGAAATTGGTAGACGCTACG	ATTGAACTGGTGACACGAG	TaqPol	55° - 58,1°
<i>trnL cd</i>		CGAAATTGGTAGACGCTGCG	GGTTCAAGTCCCTCYAYCC	TaqPol	55° - 58,1°
<i>trnL ef</i>		GGTTCAAGTCCCTCCACCCC	ATTGAACTGGTGACACGAG	TaqPol	55° - 58,1°
<i>ITS2 5,8F & 25R</i>	Nucléaire	GCAACGATGAACGCAGC	TCCTCCGCTTAGTGATATGC	QbioTaq	58° - 59,6°

Tableau 3 : Couples d'amorces utilisés.