



MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

ECOLE DOCTORALE « DIVERSITE DU VIVANT » (ED 392)

Année 2007

N° attribué par la Bibliothèque

□□□□□□□□□□□□□□□□

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Discipline : **Systématique moléculaire**

Présentée et soutenue publiquement par

Jean-François Flot

Le 7 septembre 2007

VERS UNE TAXONOMIE MOLÉCULAIRE DES CORAUX DU GENRE *POCILLOPORA*

Sous la direction de : **Monsieur le Professeur Simon Tillier**

JURY

M. Pierre-Henri Gouyon	Professeur	Muséum national d'Histoire naturelle	Président
M. Marc-André Selosse	Professeur	Université de Montpellier II	Rapporteur
M. Ralph Tollrian	Professeur	Ruhr-Universität Bochum (Allemagne)	Rapporteur
M. Mehdi Adjeroud	Maître de Conférences (HDR)	Ecole Pratique des Hautes Etudes (Perpignan)	Examineur
M. Jean-Pierre Cuif	Professeur	Université Paris-Sud 11	Examineur
M. Simon Tillier	Professeur	Muséum national d'Histoire naturelle	Directeur de thèse

à la mémoire de Dominique Dubost

Remerciements

Ils s'adressent en premier lieu à mon directeur de thèse, Simon Tillier, pour avoir accepté de me prendre comme étudiant sur un sujet de thèse que je lui proposais, chose assez rare dans le domaine des sciences biologiques. C'était un pari risqué car il s'agissait d'un projet nouveau pour lequel il a fallu tout mettre au point : l'échantillonnage, les marqueurs, la méthodologie... Tout au long de cette thèse, Simon m'a permis de bénéficier d'une liberté scientifique dont n'oseraient rêver la plupart des doctorants, et d'un soutien financier sans faille : les résultats présentés ici en sont les fruits.

Mes remerciements vont également à René Barbault et Hervé Le Guyader, directeurs successifs de l'école doctorale diversité du vivant, pour la confiance et les soutiens financiers ponctuels qu'ils m'ont accordés ; à Hervé Le Guyader une fois encore pour m'avoir accueilli au sein de l'UMR 7138 Systématique, Adaption, Evolution qu'il dirige ; à Michel Veuille, directeur du département Systématique et Evolution où s'est déroulée ma thèse ; et à Eric Pasquet, directeur du service de systématique moléculaire du Muséum, pour m'avoir permis d'y réaliser les analyses moléculaires indispensables à mon projet.

Ces analyses moléculaires ont occupé une grande partie du temps de ma thèse, et n'auraient jamais pu être menées à bien sans l'aide et les conseils d'Annie Tillier, de Josie Lambourdière et de Céline Bonillo. Merci également aux nombreux étudiants et enseignants-chercheurs que j'ai croisés dans les couloirs du service de systématique moléculaire, et dont les conseils, suggestions et remarques m'ont été profitables tout au long de cette thèse : Juliette Arabi, Coralie Beltrame, Lucie Bittner, Régis Debruyne, Agnès Dettai, Jacques Dubois, Philippe Gaubert, Alexandre Hassanin, Guillaume Lecointre, Blaise Li, Julien Lorion, Hélène Magalon, Begoña Martinez-Cruz, Julie Martin-Lescanne, Aurélien Miralles, Florence Noël, Billy Nguembock, Catherine Ozouf-Costaz, James Russell, Sarah Samadi, Francesco Santini, Marc-André Sélosse, Alodie Snirc, Sophie Sanchez, Nicolas Vidal et bien d'autres encore... Un merci tout particulier aux membres passés et présents de l'équipe 'Espèce et spéciation' de l'UMR 7138 : Jawad Abdelkrim, Marie-Catherine Boisselier-Dubayle, Lionel Bottan, Magalie Castelin, Julien Lorion, Nicolas Puillandre, Erwan Quéméré, Sarah Samadi et mon directeur de thèse Simon Tillier. Je garderai un excellent souvenir de ces quatre années passées en votre compagnie !

Toujours au sein de l'UMR 7138, merci à Philippe Lopez d'avoir accepté d'héberger mon programme Champuru sur son serveur, et à Catherine Lagrenade, Ghislaine Frébourg et Danièle Merkiled pour leur assistance administrative. Merci également à Elizabeth Nguyen Van (CNRS IFR 101), Nicole Bonneville, Anne-Marie Médiani, Nathalie Petchnikow et Najet Thiney (MNHN) pour leur gestion de mes multiples bons de commande et ordres de mission, et à Yvette Pallix pour s'être occupée avec gentillesse et efficacité des formalités administratives de ma soutenance de thèse. Les conseils de Lionel Cavicchioli (EDIT) en matière de programmation XHTML m'ont été d'une aide précieuse et je l'en remercie. Merci encore à Marie Leclerc et au Dr. Sandrine Le Dimet pour leur suivi médical hors pair de mes nombreuses missions outre-mer, et pour les conseils et formations qu'elles m'ont prodigués.

J'ai eu la chance de rencontrer aux quatre coins du monde des chercheurs intéressés par mon projet qui m'ont accueilli et assisté lors de mes collectes d'échantillons sur le terrain : Fenny Cox à Hawaïi, Yoshikatsu Nakano à Okinawa, Claude Payri et Bertrand Richer de Forges en Nouvelle-Calédonie, Wilfredo Licuanan aux Philippines, Jean-Louis Etienne à Clipperton, Ramón Andrés López-Pérez et Juan Manuel Vargas-Hernández au Mexique ; j'ai pour eux une immense gratitude. Merci également à Eric Folcher, Catherine Geoffray et Jean-Louis Menou en Nouvelle-Calédonie et à Mehdi Adjeroud, Carlos Gonzales, Margarita Hermoso-Salazar, Jean-Michel Pontier, Francisco Solís-Marín et Vivianne Solís-Weiss à Clipperton pour leur aide lors des récoltes sur le terrain : ce fut un plaisir de travailler à vos côtés !

Ces collectes d'échantillons et la mise au point de marqueurs moléculaires n'auraient jamais abouti sans les soutiens financiers de la fondation E. W. Pauley, de l'école doctorale diversité du vivant, du comité national des sciences biologiques, des PPF «Structure et évolution des écosystèmes» et « Etat et structure phylogénétique de la biodiversité actuelle et fossile », de l'IRD, de Diversitas et de la société Septième Continent. Un fois les marqueurs mis au point, l'accord passé entre le Genoscope et le Muséum concernant le séquençage des produits de PCR amplifiés au service de systématique moléculaire (projet *Macrophylogeny of Life* sous la direction de Guillaume Lecointre) m'a permis d'analyser rapidement mes échantillons : un grand merci à Jean Weissenbach, directeur général du Genoscope, pour ce soutien, et à Corinne Cruaud et Arnaud Couloux pour avoir géré au jour le jour la réalisation pratique de cet accord. Merci également au personnel de la société Genoscreen, basée à Lille, pour son sérieux et sa rapidité lors de mes demandes ponctuelles de séquençage.

En parallèle à ces activités de recherches, une part importante de mon temps durant ces quatre années fut consacrée à des activités d'enseignement : tout d'abord dans le cadre d'un monitorat d'initiation à l'enseignement supérieur à l'université Pierre et Marie Curie pendant trois ans, puis pendant ma quatrième année de thèse en tant que professeur agrégé de sciences de la vie et de la terre en l'académie de Paris. J'ai ainsi eu la chance d'enseigner devant des publics variés : Première S, Terminale S, L1 et classe de préparation à l'agrégation. Merci à Fabienne Audebert et Najat Takvorian, coordinatrices des enseignements de l'UE Diversité du Vivant, et à Catherine Reeb, responsable des enseignements de biologie des organismes à la préparation à l'agrégation SVT, pour leur confiance et leurs encouragements. Un grand merci également à mes collègues de SVT du lycée Montaigne pour leur aide et leurs « tuyaux » qui m'ont permis de préparer mes cours avec une efficacité maximale, me laissant le temps de mener cette thèse à bien. Merci enfin à mes élèves pour leurs questions toujours stimulantes, sinon pertinentes, qui sont venues nourrir ma réflexion sur les problèmes biologiques en général et sur cette thèse en particulier.

Last but not least, rien de tout cela n'aurait été possible sans le soutien de ma famille : mes parents Gisèle et Jean-Luc, mon épouse Asuncion, et ma fille Sarah, née pendant les premiers mois de cette thèse...

L'origine de ce projet remonte à l'été 2002 : j'étais étudiant en master de chimie, biologie et sciences marines à l'université des Ryukyus (Okinawa, Japon), grâce à une bourse d'étude et de recherche du ministère japonais de l'éducation. Je bénéficiai alors d'un financement de la fondation E. W. Pauley pour participer à un cours intensif de biologie moléculaire des coraux, organisé par l'Hawaii Institute of Marine Biology. Pendant les deux mois de ce cours, il était demandé à chaque participant de travailler sur un projet de recherche qui lui soit propre : avec une certaine dose d'optimisme, je proposai de tester, à l'aide d'outils moléculaires, les délimitations morphologiques des espèces du genre *Pocillopora* présentes à Hawaii. Faute de temps, ce petit projet n'aboutit pas, mais, piqué au vif, je décidai d'y consacrer ma thèse...

REMERCIEMENTS	2
I. INTRODUCTION	7
1. Contexte général.....	7
a. Quelques définitions préalables	7
b. Polype et colonie, <i>ramet</i> et <i>genet</i> : le problème de l'individu chez les coraux.....	9
c. Une taxonomie marquée par des changements de paradigmes	12
2. Quels caractères pour l'étude de la diversité des coraux ?	14
a. Caractères squelettiques	14
b. Caractères microsquelettiques.....	15
c. Caractères anatomiques.....	15
d. Caractères comportementaux	16
e. Caractères écologiques.....	16
f. Caractères cytogénétiques	17
g. Caractères moléculaires.....	17
3. Orientations méthodologiques	18
a. Modèle d'étude.....	18
b. Stratégie d'échantillonnage	20
c. Caractères étudiés.....	21
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	24
1. Protocole de récolte	24
2. Développement de nouveaux marqueurs moléculaires.....	27
3. Une méthode nouvelle pour le séquençage direct des hétérozygotes.....	28
Article 1 : Phase determination from direct sequencing of length-variable DNA regions ..	31
Article 2 : Champuru 1.0: a computer software for unraveling mixtures of two DNA sequences of unequal lengths	36

III. RÉSULTATS	48
1. Le génome mitochondrial de Pocillopora contient deux régions variables.....	48
Article 3 : The mitochondrial genome of <i>Pocillopora</i> (Cnidaria: Scleractinia) contains two variable regions: the putative D-loop and a novel ORF of unknown function	50
2. A Hawaii, données mitochondriales et nucléaires sont compatibles avec la morphologie	59
Article 4 : Molecular phylogeny and systematics of the scleractinian coral genus <i>Pocillopora</i> in Hawaii	60
Article 5 : Patterns of genetic structure among Hawaiian corals of the genus <i>Pocillopora</i> yield clusters of individuals that are compatible with morphology	67
3. A Clipperton, données mitochondriales et nucléaires sont congruentes et suggèrent la présence de deux espèces putatives.....	89
4. A l'échelle du Pacifique, l'analyse du réseau d'haplotypes mitochondriaux permet de proposer de nouvelles hypothèses de délimitation d'espèces	95
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	99
ANNEXE : AUTRES ARTICLES PUBLIÉS PENDANT LA THÈSE	102
Article 6 : Comparative coral cytogenetics	103
Article 7 : Les coraux de Clipperton	109
Article 8 : Molecular identification of symbiotic dinoflagellates in Pacific corals in the genus <i>Pocillopora</i>	131
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	140

I. Introduction

1. Contexte général

a. Quelques définitions préalables

Le terme ‘corail’ est assez vague, et la plupart des auteurs limitent son étendue aux cnidaires qui secrètent un squelette externe massif composé de carbonate de calcium (Yonge, 1968), excluant par là les ‘coraux mous’ et autres octocoralliaires peu ou pas calcifiés tels que les gorgones. Les coraux au sens large comprennent alors des hydrozoaires tels que *Millepora* (corail de feu), des octocoralliaires entièrement calcifiés tels que *Corallium rubrum* (corail rouge), *Heliopora coerulea* (corail bleu) ou *Tubipora musica*, et les coraux *sensu stricto* (madréporaires). Tous les coraux font partie du groupe des anthozoaires, ‘animaux-fleurs’ dont la nature animale ne fut établie qu’au XVIIIe siècle par Réaumur (1710). Dans la suite de cet exposé j’utiliserai le terme ‘corail’ dans son sens le plus strict, c’est-à-dire en le limitant aux madréporaires.

Encadré 1 : Place des coraux dans la classification des cnidaires (phylum Cnidaria)

1. Anthozoaires (classe Anthozoa)
 - 1.1. **Octocoralliaires** (sous-classe Alcyonaria)
 - 1.2. Cerianthipathaires (sous-classe Cerianthipatharia)
 - 1.3. Hexacoralliaires (sous-classe Hexacorallia)
 - 1.3.1. Actiniaires (ordre Actiniaria)
 - 1.3.2. **Madréporaires** (ordre Scleractinia)
 - 1.4. Zoanthaires (sous-classe Zoantharia)
 2. Cubozoaires (classe Cubozoa)
 3. **Hydrozoaires** (classe Hydrozoa)
 4. Staurozoaires (classe Staurozoa)
- (selon l’ITIS, Integrated Taxonomic Information System)

Les noms en gras correspondent aux taxa contenant des espèces de coraux au sens large ; au sens strict, les coraux sont les madréporaires (ordre Scleractinia).

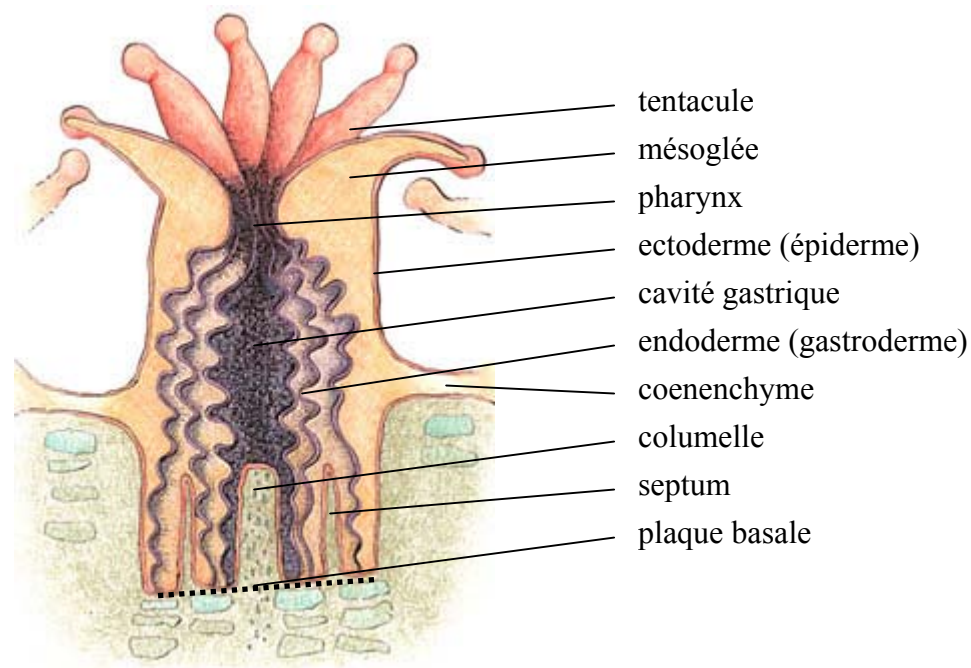


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation anatomique d'un polype de madrépore

Les coraux sont des organismes diploblastiques, c'est-à-dire organisés en deux feuillet (ectoderme et endoderme) séparés par une gelée généralement dépourvue de cellules, la mésoglée. L'unité de base est appelée polype. L'observation histologique montre la présence de cellules digestives spécialisées dans l'endoderme, également appelé gastroderme pour cette raison. De nombreuses espèces de coraux établissent des relations symbiotiques avec des algues unicellulaires du groupe des dinoflagellés, appelées alors zooxanthelles et hébergées à l'intérieur de cellules endodermiques : ces coraux zooxanthellés sont fréquemment constructeurs de récifs et qualifiés pour cette raison d'hermatypiques (mais voir Schuhmacher & Zibrowius, 1985). L'ectoderme, quant à lui, est au contact de l'environnement extérieur du polype et présente des cellules urticantes spécialisées dans la défense et la prédation : les cnidoblastes. Cet ectoderme est souvent recouvert d'un mucus plus ou moins épais abritant une faune microbienne complexe (Bourne & Munn, 2005).

La nutrition se fait généralement par capture, à l'aide des tentacules, de petites proies ou de particules qui sont alors ingérées puis digérées. Les déchets éventuels sont ensuite rejetés par la bouche, ouverture unique du polype faisant également office d'anus. Le gastroderme qui limite la cavité gastrique présentent de nombreux replis ou mésentères qui viennent augmenter la surface d'échange interne du polype ; ce sont également dans ces mésentères

que se développent les structures reproductives mâles et/ou femelles. Les mésentères, tout comme les tentacules, sont présents en nombre multiple de six chez les madréporaires, ce qui est une caractéristique de la classe des hexacoralliaires ; cependant, cette symétrie radiaire n'apparaît que secondairement au cours du développement embryonnaire (Krempf, 1919, 1920) à partir d'une symétrie bilatérale d'origine qui reste décelable dans l'organisation anatomique de nombreux coraux adultes comme les *Porites*.

Cette organisation des tissus mous se retrouve dans celle du squelette externe qui supporte la croissance du polype. On désigne par 'calice' le squelette d'un polype, image 'en creux' de son anatomie interne. Ainsi, les replis mésentériques alternent avec des éléments squelettiques radiaires, appelés septa, recouverts d'endoderme et qui séparent les mésentères. Chez certains coraux, les septa se prolongent à l'extérieur du calice par des costae de structure similaire. D'autre part, à la verticale de la bouche et de la cavité gastrique se trouve chez beaucoup d'espèces une structure squelettique axiale appelée columelle.

La partie du calice supportant l'extrémité aborale du polype, dénommée 'plaque basale', joue un rôle crucial dans le processus de biominéralisation à l'origine de l'accumulation d'aragonite, une forme de carbonate de calcium : tout d'abord les tissus du polype se soulèvent, créant un espace libre entre l'ectoderme aboral (également appelé épithélium calicoblastique) et la plaque basale sous-jacente ; puis le polype sécrète une nouvelle plaque basale surélevée par rapport à la précédente. Ce processus laisse fréquemment des lacunes dans le squelette externe (représentées en bleu sur la figure 1), de taille d'autant plus importante que l'élévation du polype est rapide (de 1 à 10 mm par an selon les espèces et les conditions environnementales).

b. Polype et colonie, *ramet* et *genet* : le problème de l'individu chez les coraux

Certains coraux ne possèdent qu'un seul polype : c'est par exemple le cas du faviidé *Cynarina lacrymalis* (figure 2), mais aussi de nombreux fungiidés. Dans ce cas, les tissus mous recouvrent généralement la plus grande partie du squelette, sauf éventuellement la partie fixée au substrat. D'autres coraux, qualifiés de coloniaux, sont formés par multiplication végétative (fission) d'un polype initial : chez certains coraux comme *Tubastrea coccinea* (figure 3), les polypes restent facilement reconnaissables, tandis que d'autres possèdent des polypes de si petite taille qu'ils sont difficiles à distinguer (figure 4, *Pocillopora* sp.). Dans ce cas, le tissu vivant connectant les polypes entre eux est appelé coenenchyme.



Figure 2 : *Cynarina lacrymalis* (Nouvelle-Calédonie, photo J.-F. Flot) ; diamètre du polype environ 10 cm



Figure 3 : *Tubastrea coccinea* (Clipperton, photo J.-F. Flot) ; diamètre de chaque polype environ 1 cm



Figure 4 : *Pocillopora* sp. (Clipperton, photo J.-F. Flot) ; diamètre de chaque polype environ 1mm

D'un point de vue morphologique, se pose alors la question de la définition de l'individu chez les coraux : s'agit-il du polype, ou de la colonie toute entière ? Dans la plupart des cas, tous les polypes d'une colonie descendent d'un même polype ancestral par fission et possèdent donc le même génome. Cependant, la situation se complique si l'on prend en compte non seulement le génome du corail mais également le génome de ses zooxanthelles, voire des microbes vivant à sa surface : cet 'hologénome' (Rosenberg et al., 2007) diffère le plus souvent d'un endroit à l'autre d'une même colonie (Rowan et al., 1997). De plus, des mutations somatiques (Buss, 1982) sont susceptibles de se produire lors des divisions mitotiques qui participent à la multiplication clonale des polypes, entraînant une hétérogénéité génétique intraorganisme (Pineda-Krch & Lehtilä, 2004). Par ailleurs, la fusion de jeunes polypes ou de petites colonies coralliennes présentant des génotypes distincts est bien documentée, notamment dans les genres *Pocillopora* (Hidaka, 1985; Hidaka et al., 1997) et *Stylophora* (Frank et al., 1997), et peut aussi réunir des cellules d'origines différentes au sein d'une même colonie, voire d'un même polype...

Une définition simple et opérationnelle de l'individu chez les coraux, comme chez de nombreux autres organismes coloniaux, est 'un organisme que l'on peut compter', c'est-à-dire une colonie (Jackson & Coates, 1986), et c'est la définition que j'adopterai dans la suite de cet exposé. Cependant, il arrive fréquemment que plusieurs colonies observées sur le terrain soient en réalité génétiquement identiques, car une colonie peut se scinder en deux par mortalité partielle, voire donner naissance par multiplication végétative à de nombreuses autres colonies : ainsi des fragments qui se détachent d'une colonie peuvent s'implanter là où les courants, les vagues ou les activités humaine les déposent (Rosen & Taylor, 1969; Sammarco, 1982; Lirman, 2000), tandis que des larves d'origine asexuée et morphologiquement indistinguables des larves issues de la reproduction sexuée sont produites par de nombreuses espèces de corail (Stoddart, 1983; Fautin, 2002). Ce problème est pris en compte par le concept de *genet* (Harper, 1977), initialement développé pour l'étude des populations végétales et que l'on peut définir comme l'ensemble de tous les individus, souvent génétiquement identiques mais pas forcément, issus d'un même zygote produit par reproduction sexuée. La colonie corallienne constitue alors un rameau, ou *ramet*, de cet ensemble plus large et difficilement reconnaissable sans étude génétique poussée (Heyward & Collins, 1985; Jackson & Coates, 1986). Les colonies chimériques, quant à elles, peuvent alors être considérées comme la juxtaposition de plusieurs *ramets*.

c. Une taxonomie marquée par des changements de paradigmes

Dans la première édition du *Systema naturae* (1735), Linné plaçait les cnidaires dans le groupe vaste et hétérogène des zoophytes en raison de leurs affinités apparentes avec les règnes animaux et végétaux ; dans les éditions ultérieures, les coraux furent rangés parmi les lithophytes en raison de leur squelette calcaire, et placés pour la plupart au sein du genre *Madrepora* (d'où l'origine du terme 'madréporaire').

Au cours du siècle suivant, de nombreux auteurs (par exemple Pallas, 1766; Forskål, 1775; Ellis & Solander, 1786; Esper, 1794-1797; Lamarck, 1816; Ehrenberg, 1834) décrivent de nouvelles espèces d'anthozoaires et créèrent de nouveaux genres : ainsi Lamarck dans son *Histoire naturelle des animaux sans vertèbres* (1816) distingue-t-il 18 genres de 'polypiers lamellifères' (*Stylina*, *Sarcinula*, *Caryophyllia*, *Turbinolia*, *Cyclolites*, *Fungia*, *Pavonia*, *Agaricia*, *Meandrina*, *Monticularia*, *Echinopora*, *Explanaria*, *Astrea*, *Porites*, *Pocillopora*, *Madrepora*, *Seriatopora*, *Oculina*). Il faudra cependant attendre les travaux de Dana (1846) aux Etats-Unis, puis ceux de Milne Edwards et Haime (1857) en France pour que la classification actuelle des coraux voie le jour, au moins dans ses grandes lignes. Cette classification apparaît dans sa forme la plus aboutie dans les monographies de Vaughan et Wells (1943) puis de Wells (1956). Une révision récente (Veron & Stafford-Smith, 2000) distingue 800 espèces, repartis en 110 genres et 18 familles.

Initialement les espèces étaient décrites à partir d'un seul ou d'un très petit nombre d'échantillons. Lorsque de plus amples collections devinrent disponibles, notamment lors de l'expédition du *Challenger* en Australie (1873-1876), il apparut évident que la variabilité morphologique des coraux constituerait une difficulté majeure de leur taxonomie : 'rien, en effet, ne reste stable chez ces animaux : ni l'aspect général de la colonie, ni le coenenchyme, ni même les calices' (Gravier, 1911).

Le premier, Quelch (1886) reconnut l'influence des paramètres de l'environnement sur les variations intraspécifiques des coraux. Dans les années qui suivirent, plusieurs taxonomistes essayèrent d'aborder ce problème de différentes manières, que ce soit par l'étude des parties molles des polypes (Duerden, 1902; Matthai, 1914, 1923) ou en abandonnant complètement la nomenclature binomiale linnéenne pour définir un type nouveau d'unité taxonomique, la 'forme locale' (Bernard, 1903, 1905, 1906). Ce fut cependant Vaughan (1907) qui, le premier, proposa une définition de l'espèce prenant en compte cette plasticité phénotypique des

coraux : ‘*a group of individuals connected among themselves by intergrading characters, and separated by distinct lacunae from all other individuals or groups of individuals*’. Cette définition resta peu employée dans les années qui suivirent, jusqu’à ce que Laborel (1970) la reprenne dans son étude des coraux brésiliens et introduise le terme ‘écomorphose’ pour désigner les variations intraspécifiques déterminées par les facteurs environnementaux. Un concept similaire fut employé par Wijisman-Best (1972) dans son étude des faviinés de Nouvelle-Calédonie sous le terme ‘écotype’, puis comme ‘écomorphes’ par Veron et collaborateurs dans leur révision des coraux de la grande barrière de corail en Australie (Veron & Pichon, 1976; Veron et al., 1977; Veron & Pichon, 1980, 1984; Veron & Wallace, 1984).

L’analyse d’un grand nombre d’échantillons récoltés dans des biotopes contrastés permet de mettre en évidence des discontinuités dans la variation des caractères morphologiques en fonction de l’environnement, et de réunir des écomorphes souvent très dissemblables au sein d’une même espèce. Cependant de telles discontinuités sont parfois élusives et tendent à s’estomper lorsque l’on augmente le nombre d’échantillons (Brackel, 1977). De plus, les discontinuités mises en évidence sont souvent différentes d’une localité géographique à l’autre (Veron, 2001) : ainsi des formes séparées par des discontinuités en Australie, et donc considérées comme des espèces distinctes, apparaîtront-elles reliées par un continuum de morphologies intermédiaires aux Philippines où elles seront considérées comme des écomorphes d’une seule et même espèce.

Dans ces conditions, les espèces de coraux n’apparaissent pas comme des unités naturelles, mais comme des entités aux limites floues et variables géographiquement, ce qui pourrait s’interpréter par une évolution de type réticulaire. Cette hypothèse, proposée par Veron dans son ouvrage *Corals in space and time: the biogeography and evolution of the Scleractinia* (1995), repose sur le fait que, pour la plupart des organismes marins, les courants océaniques sont les vecteurs de la dispersion des larves et gouvernent donc la connectivité génétique entre populations. Ces connections ont changé à de multiples reprises au cours des temps géologiques, ce qui a pu modifier la distribution et la composition génétique des espèces. En conséquence, des espèces ont pu diverger en raison d’un isolement génétique, puis fusionner à nouveau sous l’influence de courants. Ceci permettrait d’expliquer pourquoi les frontières entre espèces de coraux apparaissent distinctes à petite échelle géographique, mais deviennent floues lorsque l’on considère une étendue plus importante. Un certain nombre de données expérimentales concernant le genre *Acropora* apparaissent compatibles avec cette hypothèse :

diversité de nombres chromosomiques somatiques (Kenyon, 1997; Flot et al., 2006), possibilité de fécondations croisées entre coraux appartenant à des morphoespèces distinctes lors d'expériences en laboratoires (Willis et al., 1997; Hatta et al., 1999; van Oppen et al., 2002b), croisements naturels entre morphoespèces produisant des morphologies nouvelles (van Oppen et al., 2001; van Oppen et al., 2002b; Vollmer & Palumbi, 2002; Miller & van Oppen, 2003). Cependant, cette hypothèse n'a jamais été testée de façon rigoureuse, et pose de plus un problème de définition : en l'absence d'isolement reproductif strict entre morphoespèces, ne devrait-on pas considérer comme espèces les unités plus englobantes reproductivement isolées les unes des autres ? Ce choix aurait pour conséquence heureuse de diminuer grandement le nombre d'espèces reconnues et sans doute d'éliminer la plupart des problèmes d'identification, mais il est douteux qu'une telle simplification taxonomique satisfasse écologues, physiologistes et biologistes de la conservation, pour lesquels les espèces définies en terme d'isolement reproductif intégral sembleraient des regroupements bien artificiels au regard de la diversité génétique sous-jacente...

Ceci laisse à penser que toute discussion sur un concept d'espèce applicable aux coraux restera vaine tant que la structure génétique de leurs populations et la nature des relations entre leurs morphes n'auront pas été élucidées : plutôt que de s'imposer dès le départ un cadre théorique strict concernant la délimitation des espèces, une démarche plus féconde, me semble-t-il, consiste à étudier le mieux possible le matériel biologique disponible afin de réunir un maximum d'information sur les relations entre diversité morphologique et diversité génétique sous-jacente, et à ne choisir une définition et un critère de délimitation des espèces qu'en dernier lieu...

2. Quels caractères pour l'étude de la diversité des coraux ?

a. Caractères squelettiques

A l'heure actuelle, la taxonomie des madréporaires est presque exclusivement basée sur l'utilisation de caractères squelettiques (Lang, 1984) : forme et orientation des branches, mode de division des polypes, tailles respectives des septa et costae, présence ou absence de columelle, de pali ou de lobes paliformes... Cependant la morphologie du squelette des coraux varie en fonction d'un très grand nombre de facteurs externes : Randall (1976) cite la lumière, la sédimentation, les courants, l'agitation de l'eau, la température, la profondeur, la salinité, l'émersion, les dommages physique, la prédation, la compétition intra et interspécifique,

l'association avec d'autres organismes, les maladies et la topographie du substrat ; d'autre part une étude récente a mis en évidence l'influence de la gravité sur la morphologie du corail *Stylophora pistillata* (Meroz et al., 2002). La délimitation d'espèces de coraux sur la base de caractères squelettiques passe donc par la détermination préalable des variations intraspécifiques. Pour cela, Veron et Pichon (1976) adoptent une démarche en trois étapes : tout d'abord l'observation de la variation morphologique au sein de chaque colonie, souvent impressionnante lorsque différentes parties d'une colonie occupent différents micro-habitats ; puis la détermination de la variation au sein d'un même biotope ; et enfin l'observation du changement graduel de forme de croissance lors du passage d'un biotope à un autre. Les discontinuités morphologiques qui subsistent sont alors considérées comme des limites entre espèces.

b. Caractères microsquelettiques

Ces caractères, généralement observés au microscope électronique à balayage (en ce qui concerne les ornements des septa) ou sur des lames minces, semblent moins sensibles aux variations des conditions environnementales que les caractères squelettiques présentés ci-dessus (mais voir Clode & Marshall, 2003). Ainsi, l'étude de la disposition spatiale des 'centres de calcification' donne des résultats congruents avec les résultats d'analyses moléculaires concernant la délimitation des ensembles supra-familiaux (Cuif et al., 2003; Fukami et al., 2004b).

c. Caractères anatomiques

L'étude anatomique des parties molles des polypes a rarement été utilisée en taxonomie des coraux (Lang, 1984), à quelques exceptions près : ainsi Wells (1971b) sépare-t-il les genres *Catalaphyllia* et *Euphyllia* sur la base du nombre de verticilles de tentacules de leurs polypes, tandis que certaines espèces du genre *Euphyllia* se distinguent uniquement par la forme de leurs tentacules (Veron & Stafford-Smith, 2000). L'étude des nématocystes, organes urticants ou adhésifs caractéristiques des cnidaires, est très utilisée pour leur taxonomie mais se heurte à plusieurs difficultés chez les coraux : tout d'abord, la composition en nématocystes est différente d'un organe à un autre et varie au cours du développement ainsi qu'en fonction de l'état physiologique du corail (Fautin, 1988; Hayashibara et al., 2000; Paruntu et al., 2000). D'autre part, les nématocystes d'un même type sont aussi susceptibles de changer de forme graduellement, par exemple lors de la formation de certains types de tentacules impliqués dans les agressions entre colonies (Hidaka et al., 1987). L'utilisation de ces caractères passe

donc nécessairement par la comparaison entre nématocystes de même type, prélevés dans les mêmes organes chez des coraux au même stade de leur développement et dans le même état physiologique (Hidaka, 1992). Quant au sperme des coraux, sa morphologie varie en fonction de la position systématique mais aussi en fonction du mode de fécondation interne ou externe (Harrison, 1985; Steiner, 1991; Steiner & Cortés, 1996): ce mode de reproduction étant variable d'un genre à l'autre, voire d'une espèce à l'autre au sein d'un genre, l'utilisation des caractères morphologiques du sperme à des fins taxonomiques est sujette à caution.

d. Caractères comportementaux

Le comportement d'extension des polypes est souvent spécifique de l'espèce ou du genre : ainsi Wells (1966) distingue-t-il le sous-genre *Heliofungia* sur la base d'un caractère comportemental, l'extension permanente des polypes hors de leur calice sauf lors de la planulation. L'utilité systématique des caractères liés à la prédation ou à la capture de particules nutritives en suspension est plus débattue, mais selon Lewis et Price (1975) un certain nombre de différences interspécifiques seraient présentes chez certains genres.

Les réactions d'agressions entre colonies coralliennes situées à faible distance ou au contact l'une de l'autre, décrites pour la première fois par René Catala à l'aquarium de Nouméa (Catala, 1964), peuvent servir à distinguer des espèces très semblables morphologiquement : ainsi le corail solitaire *Scolymia cubensis*, longtemps considéré comme un écomorphe de *S. lacera*, fut distingué de ce dernier suite à l'observation d'une réaction d'agression systématique de *S. lacera* envers *S. cubensis* lorsque des individus de chaque espèce étaient mis au contact l'un de l'autre. Comme aucune réaction n'était observée lors de contacts entre individus de *S. lacera*, ou entre individus de *S. cubensis*, on en déduisit qu'il s'agissait d'espèces différentes (Lang, 1971; Wells, 1971a).

e. Caractères écologiques

Le preferendum écologique et la mesure de paramètres physiologiques concomitants ont pu servir, dans quelques cas, à préciser les limites entre espèces de corail morphologiquement proches (Lang, 1971; Head, 1983; Gattuso et al., 1991). Les associations des coraux avec d'autres organismes, qu'elles soient de nature mutualiste ou parasitaire, sont également susceptibles de fournir des caractères taxonomiques intéressants bien qu'elles aient été rarement utilisées : par exemple, une spécificité de certaines espèces de mollusques du genre *Lithophaga* pour un hôte corallien particulier a pu être observée (Highsmith, 1980; Kleemann, 1980)

f. Caractères cytogénétiques

Le nombre et la forme des chromosomes (résumés dans la formule chromosomique) ont été utilisés avec succès à des fins taxonomiques chez des hydrozoaires (Niiyama, 1944; Rahat et al., 1985) et des actiniaires (Fukui, 1993, 1996). En ce qui concerne les coraux, les premières tentatives basées sur l'utilisation de tissus somatiques (Wijsman & Wijsman-Best, 1973) furent peu fructueuses : un grand nombre de petits chromosomes furent observés sans qu'il soit possible de les compter. Ce n'est qu'après la découverte qu'un grand nombre d'espèces de coraux se reproduisaient de façon externe (Harrison et al., 1984) qu'il devint possible d'établir leurs caryotypes à partir d'embryons obtenus par fécondation *in vitro* (Heyward, 1985b, 1985a; Kenyon, 1993, 1997; Flot et al., 2006). Les données actuelles concernent un total de 34 espèces de 8 genres appartenant à 6 familles différentes, soit moins de 5% des 800 espèces actuelles réparties en 110 genres et 18 familles (Veron & Stafford-Smith, 2000). Un nombre chromosomique de base de 28 apparaît conservé dans la plupart des genres étudiés, tandis qu'une grande diversité de nombres chromosomiques est observée au sein du genre *Acropora* (allant de 24 chez *A. danai* à 54 chez *A. elseyi*). Il se pourrait que les techniques d'hybridation *in situ* permettent d'affiner ces analyses, cependant ces techniques n'ont jusqu'alors jamais été employées chez les coraux.

g. Caractères moléculaires

Les marqueurs moléculaires se présentent sous différentes formes ou techniques : séquences d'ADN nucléaire ou mitochondrial, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Rapid Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), microsatellites, allozymes. Les marqueurs de séquence ont permis de mettre en évidence chez les coraux le caractère artificiel d'un grand nombre de regroupements taxonomiques basés sur des caractères morphologiques (Chen et al., 1995; Romano & Palumbi, 1996; Veron et al., 1996; Romano & Palumbi, 1997; Romano & Cairns, 2000; Chen et al., 2002; Cuif et al., 2003; Fukami et al., 2004b). Cette 'révolution moléculaire' (Stolarski & Roniewicz, 2001) a notamment révélé l'existence d'une division des coraux scléactiniens en deux grands clades : les coraux 'complexes' et les coraux 'robustes'. Cependant, les marqueurs de séquence ont été peu employés pour étudier la diversité infragénérique des coraux pour deux raisons : d'une part le génome mitochondrial des cnidaires est apparemment très peu variable (van Oppen, 1999; Shearer et al., 2002), et d'autre part on connaît très peu de marqueurs nucléaires appropriés, à l'exception des espaceurs ribosomiques (Diekmann et al., 2001; Chen et al., 2004; Forsman et al., 2005) et de quelques introns chez les acroporidés (van

Oppen et al., 2000; van Oppen et al., 2001; van Oppen et al., 2002c; Vollmer & Palumbi, 2002; van Oppen et al., 2004).

L'étude d'autres types de caractères moléculaires chez les coraux rencontre d'importantes difficultés techniques : il est nécessaire de disposer d'un ADN génomique de bonne qualité pour pouvoir employer les techniques de RFLP, AFLP et RAPD (Bensch & Åkesson, 2005), or la présence de zooxanthelles dans les tissus de la plupart des espèces de coraux rend très difficile l'obtention d'ADN pur de corail non-fragmenté ; il faut alors partir d'échantillons de sperme (Brazeau et al., 1998; Fukami et al., 2004a), qui ne contiennent pas de zooxanthelles mais dont la collecte sur le terrain est laborieuse et souvent infructueuse. La mise au point de marqueurs microsatellites pose quant à elle moins de difficultés : il est possible de partir de sperme (Miller & Howard, 2004; Severance et al., 2004), mais aussi de partir d'un extrait d'ADN contenant un mélange de génomes de corail et de zooxanthelles puis de vérifier l'origine de chaque marqueur microsatellite isolé (Magalon et al., 2004), ou encore de partir de tissus coralliens débarrassés de leurs zooxanthelles par un traitement manuel sous une loupe binoculaire (Maier et al., 2001) ou par un traitement à base d'herbicide (Underwood et al., 2006). Les microsatellites apparaissent cependant plus rares et difficiles à isoler chez certains coraux que dans bien d'autres groupes d'organismes (Márquez et al., 2002). Et comme des marqueurs mis au point sur une espèce ne peuvent généralement être utilisés que sur des espèces relativement proches (Scribner & Pearce, 2000), de nombreuses études infra-génériques chez les coraux se basent encore sur l'analyse d'allozymes (Garthwaite et al., 1994; Stobart & Benzie, 1994; Stobart, 2000; Maté, 2003) malgré les inconvénients de cette méthode, notamment sa faible sensibilité et la nécessité de travailler à partir de tissus frais (Ridgway, 2005).

3. Orientations méthodologiques

a. Modèle d'étude

Les coraux du genre *Pocillopora* ont été pris comme modèle dans la présente étude pour les raisons suivantes :

- tout d'abord, ces coraux sont réputés faire montre d'une incroyable plasticité phénotypique (Wood Jones, 1907, 1910; Veron & Pichon, 1976; Veron, 1995; Veron & Stafford-Smith, 2000), et la délimitation des espèces de ce genre pose un problème particulièrement difficile en raison de la très grande variabilité des caractères

squelettiques des calices (nombre de septa, présence et forme de la columelle,...) en fonction de leur position au sein même d'une colonie (Veron & Pichon, 1976). En l'absence de caractères squelettiques non-ambigus, l'identification des espèces repose presque entièrement sur des critères de forme et d'orientation des branches, caractères hautement influencés par les paramètres environnementaux, et l'incertitude taxonomique qui en résulte mine les nombreuses études écologiques et physiologiques portant sur ces organismes, notamment *P. damicornis*, l'espèce de corail la plus étudiée ;

- ensuite, malgré son aire de répartition très large (de la Mer Rouge et des côtes orientales de l'Afrique aux côtes occidentales du continent américain), une révision récente de ce genre distingue seulement 17 espèces (Veron & Stafford-Smith, 2000). Ce genre constitue donc un modèle adapté pour mettre au point puis tester une méthodologie pour la révision taxonomique d'un genre corallien à l'aide de marqueurs moléculaires ; ces méthodes pourront ensuite être appliquées à des genres apparemment plus riches en espèces et donc potentiellement plus complexes à élucider, tels que les genres *Acropora* (plus de 150 espèces) et *Porites* (plus de 50 espèces);
- enfin, la répartition géographique des espèces décrites semble indiquer que le centre de biodiversité des coraux du genre *Pocillopora* se situerait dans l'est du Pacifique, notamment sur les côtes du Mexique et de Panama (Veron & Stafford-Smith, 2000), au contraire de la plupart des organismes marins dont le centre de biodiversité se situe dans le « triangle d'or de la biodiversité » (Philippines, Indonésie, Malaisie, Papouasie-Nouvelle-Guinée) (Veron, 1995). Parmi les explications proposées à cette distribution inhabituelle, le transport de colonies coralliennes fixées à des pierres poncees et autres objets flottants pourrait conduire à leur accumulation dans l'est du Pacifique en raison des courants marins (Veron & Stafford-Smith, 2000): la plupart des coraux observés fixés à des objets flottants appartiennent en effet au genre *Pocillopora* (Jokiel, 1989; Jokiel, 1990; Bryan et al., 2004). Cependant, il n'a jamais été vérifié si la diversité morphologique observée dans l'est du Pacifique reflète vraiment la diversité génétique sous-jacente, et n'est pas simplement le résultat d'une plasticité phénotypique plus importante.

A ces raisons principales viennent s'ajouter deux arguments supplémentaires qui font de la taxonomie du genre *Pocillopora* un problème particulièrement important à éclaircir :

- le genre *Pocillopora* est un des rares genres coralliens au sein duquel différents modes de reproduction sont observés : ainsi, des coraux attribués à l'espèce *P. verrucosa* se reproduisent de façon externe (*spawning*) en Mer Rouge (Fadlallah, 1985; Shlesinger & Loya, 1985; Shlesinger et al., 1998), en Afrique du Sud (Kruger & Schleyer, 1998), aux Maldives (Sier & Olive, 1994) et à Okinawa (Kinzie, 1993), mais de façon interne (*brooding*) à Enewetak (Stimson, 1978). De façon similaire, des populations attribuées à *P. damicornis* se reproduisent de façon externe dans le Pacifique Est (Glynn et al., 1991), de façon interne à Hawaii (Kolinski & Cox, 2003) et présentent un mélange des deux stratégies en Australie occidentale (Ward, 1992). Outre la question du nombre d'espèces en présence, une telle diversité de stratégies à l'intérieur d'un même genre contraste fortement avec la thèse d'Harrison (1985) selon laquelle le mode de reproduction dépend de la position phylogénétique des coraux. Une fois les limites entre espèces établies sur la base de données moléculaires, l'élucidation des relations phylogénétiques entre ces espèces devrait permettre de comprendre l'évolution apparemment complexe de ce caractère chez les coraux du genre *Pocillopora*.
- enfin, les coraux du genre *Pocillopora* ont sévèrement souffert du blanchissement sur la plupart des récifs du monde (Fisk & Done, 1985; Williams & Bunkley-Williams, 1990; Paulay & Benayahu, 1999; Loya et al., 2001; Mumby et al., 2001; McClanahan et al., 2004), et sont également une des proies favorites de l'étoile de mer mangeuse de corail *Acanthaster planci* (Ormond et al., 1976; Chess et al., 1997; Cortés, 1997). A certaines localités où ils étaient autrefois abondants, ces coraux sont devenus rares ou ont même disparus (Guzmán, 1991, Loya et al., 2001). Le déclin de ces organismes au rôle-clef dans l'édification des récifs coralliens menace cet écosystème dans son ensemble et souligne la nécessité de parvenir à une meilleure connaissance de leur taxonomie.

b. Stratégie d'échantillonnage

Tandis que les premières descriptions d'espèces de coraux étaient fondées sur un très faible nombre d'échantillons, voire sur un seul échantillon par espèce décrite, la prise en compte de leur variabilité morphologique intraspécifique passe nécessairement par la collecte d'un grand nombre d'individus (Wijsman-Best, 1972; Veron & Pichon, 1976). Cependant, les études moléculaires se limitent le plus souvent à une poignée d'individus jugés 'représentatifs' de chaque taxon ou morphotype d'intérêt (voir par exemple van Oppen et al., 2004). Une telle stratégie de récolte ne convient pas à la recherche des limites entre espèces, car la collecte

d'individus représentatifs des espèces recherchées conduit, de façon souvent même inconsciente, à l'exclusion d'individus atypiques ou de morphologies intermédiaires et donc à une sous-estimation de la variabilité des populations coralliennes échantillonnées.

Afin d'éviter un tel biais méthodologique, je me suis efforcé de collecter un grand nombre d'échantillons dans la plus grande variété d'environnements possibles et sans a priori sur leur identification. Pour cela, j'ai réalisé des sortes de transects virtuels, perpendiculaires au rivage et partant des profondeurs les plus grandes jusqu'au voisinage de la surface. Le long de ces parcours j'ai récolté des échantillons de tous les individus susceptibles d'appartenir au genre *Pocillopora*, sans chercher à les identifier par leur morphologie mais en gardant une trace de celle-ci sous la forme de photographies numériques. Afin de récolter sans peine entre vingt et cinquante échantillons par plongée, j'ai été conduit à prélever des échantillons de taille beaucoup plus réduite qu'il n'est d'usage en taxonomie des coraux, ce qui a permis de limiter l'impact de mes recherches sur les organismes étudiés et a facilité grandement l'obtention des permis de collectes auprès des autorités compétentes de chaque pays visité. D'autre part, cette stratégie d'échantillonnage m'a permis de travailler dans des conditions de sécurité maximale, car le temps passé à la profondeur maximale de chaque plongée ne dépassait pas quelques minutes et la lente remontée le long du récif qui suivait immédiatement cette phase permettait une élimination progressive optimale des gaz dissous (Carturan et al., 2002).

Pour bâtir mon plan d'échantillonnage, je me suis efforcé de couvrir l'aire géographique la plus large possible en prenant en compte la répartition des 17 morphotypes distingués dans *Corals of the World* (Veron & Stafford-Smith, 2000). Mon objectif était de réaliser un échantillonnage quasi-exhaustif de la diversité des formes rencontrées sur le terrain, comprenant les 17 morphoespèces reconnues actuellement mais aussi les nombreuses formes intermédiaires ou atypiques observables, bien souvent difficiles à attribuer à l'une ou l'autre de ces espèces. Cette répartition m'a conduit à sélectionner neuf localités pour mon échantillonnage : Mer Rouge, Madagascar, Japon, Philippines, Nouvelle Calédonie, Hawaii, Polynésie, Clipperton, Mexique.

c. Caractères étudiés

Parmi les caractères disponibles pour l'étude de la diversité des coraux, les caractères moléculaires et cytogénétiques présentent l'intérêt de ne pas être *a priori* soumis à des variations phénotypiques liées aux paramètres environnements. De tels caractères permettent donc d'étudier les différences génétiques entre colonies coralliennes puis, par un retour à la

morphologie, de faire la part des choses entre plasticité phénotypique et diversité d'ordre génétique : ainsi des variations morphologiques entre colonies coralliennes génétiquement identiques pourront être mises sur le compte de la plasticité phénotypique.

L'utilisation des caractères cytogénétiques a fait l'objet d'essais préliminaire en 2004 à Okinawa : j'ai récolté en plongée des branches de colonies attribuées aux morphotypes *P. meandrina* et *P. eydouxi* puis les ai placées dans des bacs d'eau de mer afin de recueillir leurs gamètes et obtenir des embryons, seul matériel permettant la détermination du caryotype chez les coraux (voir article 6 en annexe pour un protocole détaillé). Cependant, peu d'embryons se sont développés, probablement en raison de fortes pluies ayant entraîné une baisse de la salinité des bacs, et les embryons obtenus se sont désagrégés lors des étapes ultérieures sans fournir de préparation chromosomique exploitable.

Suite à cet échec, je me suis consacré exclusivement au développement et à l'utilisation de marqueurs moléculaires. La nécessité de récolter des échantillons dans des endroits parfois très reculés m'a conduit à écarter d'emblée l'utilisation d'allozymes, qui nécessite de travailler à partir de tissus frais ou conservés dans l'azote liquide et entraîne donc des protocoles d'échantillonnage très lourds. En ce qui concerne les marqueurs moléculaires ADN, seuls les microsatellites et les marqueurs de séquence permettent de travailler à partir de mélanges d'ADN de corail, de zooxanthelles et d'autres organismes associés, ce qui est généralement le cas pour de l'ADN prélevé sur une colonie corallienne ; les techniques permettant d'isoler de l'ADN génomique de corail pur à partir de tels mélanges existent, mais conduisent toutes à une fragmentation partielle de cet ADN génomique qui limite l'application des techniques de RFLP, de RAPD et d'AFLP (Bensch & Åkesson, 2005). Si les microsatellites sont des marqueurs très performants notamment pour les analyses de parenté et l'étude de la structure génétique des populations, leur utilisation à des fins taxonomiques est néanmoins sujette à caution (Scribner & Pearce, 2000), principalement en raison de l'homoplasie allélique (Estoup et al., 2002) résultant des contraintes s'exerçant sur la taille des allèles (Garza et al., 1995). Ceci m'a conduit à privilégier une approche basée sur le développement de plusieurs marqueurs de séquence mitochondriaux et nucléaires et la comparaison des résultats obtenus à l'aide de ces différents marqueurs (Pamilo & Nei, 1988).

Le génome mitochondrial, haploïde et à transmission généralement maternelle, a l'avantage de présenter le plus souvent des temps de coalescence très courts (Moore, 1995, 1997), ce qui a conduit au choix d'un fragment de ce génome comme 'code-barre' permettant l'identification rapide des organismes vivants (Hebert et al., 2003a). Cependant, ce génome ne

se recombinant que très rarement, l'ensemble des gènes qu'il porte ne représente qu'un seul marqueur moléculaire ; de plus, ce marqueur n'est pas neutre mais soumis à sélection (Bazin et al., 2006). Les marqueurs nucléaires, quant à eux, sont indépendants les uns des autres à moins d'être très proches sur un même chromosome, et présentent l'avantage supplémentaire d'être présents pour la plupart en deux copies par génome diploïde, d'où la possibilité d'utiliser un même jeu de données de séquences pour des analyses phylogénétiques et pour des analyses de génétique des populations (voir par exemple Palumbi & Baker, 1994); de plus, sous certaines conditions il peut arriver que le temps de coalescence de marqueurs nucléaires soit inférieur au temps de coalescence du génome mitochondrial (Hoelzer, 1997).

Parmi les marqueurs nucléaires, les espaceurs ribosomiques (ITS, *Internal Transcribed Spacers*) présentent la particularité d'être présents en plusieurs centaines de copies par génome évoluant de façon concertée, d'où des temps de coalescence très courts se traduisant par la présence d'une seule séquence dominante par individu, voire par espèce ; pour ces raisons, ces marqueurs sont fréquemment utilisés en taxonomie moléculaire (Alvarez & Wendel, 2003). Pour obtenir d'autres marqueurs indépendants, j'ai choisi de m'intéresser à des introns de gènes plutôt qu'à des séquences codantes : en effet, si les séquences codantes sont faciles à aligner et si l'utilisation des 3^e positions de codon, les plus variables, permet de différencier des unités de niveau populationnel ou spécifique (Cho et al., 1995), les données publiées suggèrent que les introns évoluent environ deux fois plus vite que les 3^e positions de codon (Hedin & Maddison, 2001) et offrent donc une meilleure résolution. De plus, la probabilité de séquencer par erreur des paralogues au lieu d'orthologues est plus faible dans le cas des introns que pour des séquences codantes, car les positions des introns sont souvent différentes et leurs séquences très divergentes d'un paralogue à l'autre.

II. Matériels et méthodes

1. Protocole de récolte

Mon échantillonnage a été réalisé au cours de six séjours sur le terrain, qui m'ont permis de collecter un total de 756 fragments de coraux du genre *Pocillopora* (figure 5) :

- en juillet-août 2002 à Hawaii (37 échantillons), dans le cadre d'un projet antérieur à la thèse ;
- en juin 2004 à Okinawa (175 échantillons), en marge du symposium de *l'International Society for Reef Studies* ;
- en novembre – décembre 2004 en Nouvelle Calédonie (330 échantillons);
- en mars 2005 à Clipperton (74 échantillons), dans le cadre de l'expédition conduite par le Dr. Jean-Louis Etienne ;
- en août 2005 aux Philippines (65 échantillons) ;
- et en novembre 2005 au Mexique (75 échantillons), en marge de la *First DIVERSITAS Open Science Conference*.

Il ne m'a malheureusement pas été possible, pour des raisons financières et pratiques, d'étendre cet échantillonnage à trois des localités sélectionnées (Mer Rouge, Madagascar, Polynésie). Pour cette raison, seules 14 des 17 espèces morphologiques distinguées dans *Corals of the World* (Veron & Stafford-Smith, 2000) ont pu être échantillonnées : *P. ankeli*, *P. capitata*, *P. damicornis*, *P. danae*, *P. effusus*, *P. elegans*, *P. eydouxi*, *P. inflata*, *P. kelleheri*, *P. ligulata*, *P. meandrina*, *P. molokensis*, *P. verrucosa*, *P. woodjonensis*. Trois morphoespèces manquent à l'appel : *P. fungiformis* et *P. indiani*, présents uniquement dans l'océan Indien, et *P. zelli*, signalé uniquement en Polynésie. Par contre, de nombreux échantillons de *Pocillopora* récoltés n'ont pu être attribués à aucune de ces 17 espèces morphologiques.

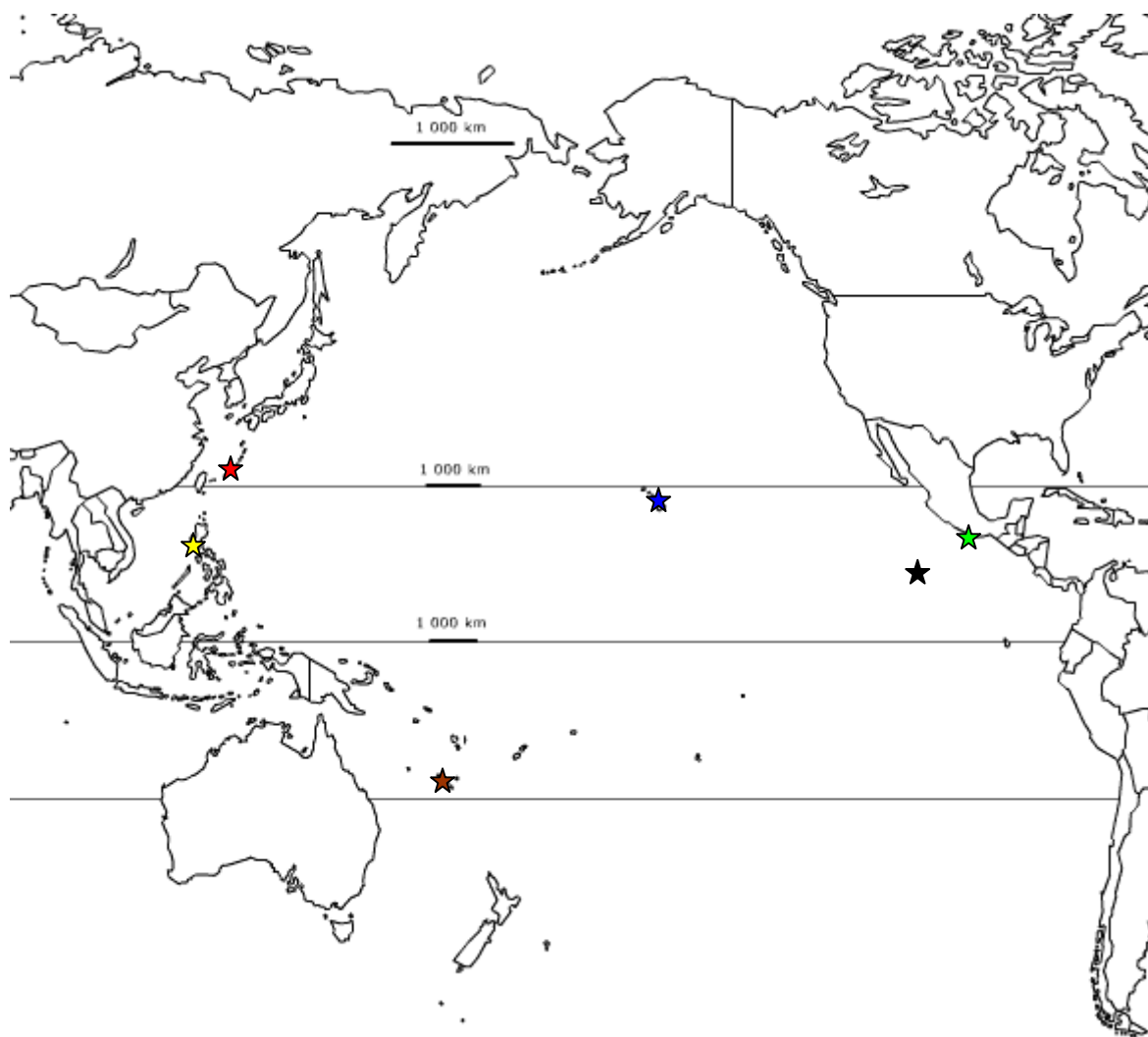


Figure 5 : Carte de l'océan Pacifique montrant la localisation des différentes collectes d'échantillons (le code de couleurs est le même que sur les figures 12 et 14)

Les plongées étaient organisées de la façon suivante :

- descente 'dans le bleu', c'est-à-dire de manière quasi-verticale ou tout du moins le plus rapidement possible jusqu'à la profondeur maximale de récolte ;
- remontée immédiate, lente et progressive depuis cette profondeur maximale jusqu'à la surface en longeant du récif ;
- à chaque colonie corallienne rencontrée sur mon trajet susceptible d'appartenir au genre *Pocillopora*, prise de plusieurs photographies numériques couleurs (sous différents angles et à différentes distances), puis prélèvement d'un petit fragment de branche, photographié puis étiqueté avant d'être placé dans un filet.

Le filet était placé dans un seau d'eau de mer fraîche ou dans un sac isotherme rempli d'eau de mer dès la fin de la plongée, ceci afin de ramener à terre des échantillons vivants et d'assurer ainsi une qualité d'ADN satisfaisante. De plus, en comparant l'heure de chaque cliché numérique avec les paramètres de profondeur enregistrés toutes les trente secondes par mon ordinateur de plongée, je pouvais déterminer la profondeur de chaque colonie corallienne échantillonnée.

Grâce à ce protocole, il m'a été possible de récolter entre 20 et 50 échantillons par plongée, soit près de 100 échantillons par jour dans le cas de deux plongées quotidiennes. Le facteur limitant était cependant le temps nécessaire au traitement des échantillons et à l'extraction de leur ADN de retour à terre, à raison de cinq minutes environ par échantillon soit douze échantillons à l'heure... Pour cette extraction, je prélevais un sous-fragment de quelques millimètres cubes de volume à l'aide de cisailles puis le plaçais dans un tube Eppendorf numéroté, lequel était ensuite rempli d'un tampon de fixation composé à base de thiocyanate de guanidium (tampon CHAOS, encadré 2).

Encadré 2 : Composition du tampon CHAOS (concentrations finales)
(d'après un protocole aimablement communiqué par le Dr. Masayuki Hatta, Département de Biologie, Université Ochanomizu, Tokyo) :

Thiocyanate de guanidium 4 mol.l⁻¹
Sel sodique de N-lauroylsarcosine 0.5%
2-Mercaptoéthanol 0.1 mol.l⁻¹ (0.7% v/v)
Tampon Tris-Cl 25 mmol.l⁻¹ pour un pH final de 8

Le thiocyanate de guanidium est un dénaturant chaotrope très puissant (Mason et al., 2003) qui dissocie les complexes nucléoprotéiques et inactive les nucléases avant que celles-ci n'aient le temps de dégrader l'ADN (Cox, 1968). La N-lauroylsarcosine, quant à elle, est un détergent qui rompt les membranes cellulaires, facilitant la désagrégation des tissus et l'accès du thiocyanate de guanidium aux complexes nucléoprotéiques ; tandis que le 2-mercaptoéthanol est un réducteur qui brise les ponts disulfures inter- et intraprotéiques et évite l'oxydation des acides nucléiques.

L'intérêt principal de cette méthode est que l'ADN ainsi préservé peut être conservé à température ambiante pendant plusieurs années sans se dégrader. Reste alors à le purifier, ce que j'ai réalisé à l'aide d'une machine ABI Prism 6100 (NucleicAcid Prepstation). Pour ce

faire, 50 à 100 μ L de tampon CHAOS contenant l'ADN corallien ont été mélangés directement à 500 μ L de la solution commerciale *DNA Purification Solution* vendue par ABI, puis purifiés selon le protocole fourni avec cet appareil. Les ADN ainsi obtenus se sont révélés d'excellente qualité, et ont pu être utilisés directement pour les amplifications par la réaction en chaîne de la polymérase, sans qu'il y ait besoin de les diluer.

2. Développement de nouveaux marqueurs moléculaires

Les marqueurs mitochondriaux classiquement utilisés chez les métazoaires n'ont donné que peu de résultats dans le cas présent : ainsi, je n'ai observé aucun site variable dans le fragment de Folmer du gène *cox1* (Folmer et al., 1994), pourtant proposé comme marqueur universel pour la détermination moléculaires des espèces chez les métazoaires (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b), aucun site variable dans le gène *rns* responsable de la synthèse de l'ARN 12S, et n'ai détecté qu'un seul site variable lors du séquençage du gène *cox1* dans sa quasi-totalité. J'ai donc entrepris de séquencer le génome mitochondrial complet de deux individus du genre *Pocillopora* afin de localiser dans celui-ci d'éventuelles régions variables (article 3). La connaissance du génome mitochondrial complet de *Pocillopora* m'a ensuite permis de définir des amorces spécifiques pour l'amplification des régions les plus variables de ce génome (article 5).

En ce qui concerne la mise au point de marqueurs nucléaires, j'ai commencé par tester des amorces tirées de publications existantes chez les coraux et ayant pour cible la région des espaceurs ribosomiques (ITS) (Diekmann et al., 2001), un intron de la calmoduline (Vollmer & Palumbi, 2002), un intron du minicollagène (Wang et al., 1995; Hatta et al., 1999) et un intron du gène *Pax-C* (van Oppen et al., 2000). Cette approche m'a permis d'obtenir des séquences d'ITS à partir desquelles j'ai pu redéfinir des amorces plus spécifiques visant l'ITS2, mais n'a pas fonctionné pour les autres gènes : les amorces publiées, définies pour des coraux du genre *Acropora*, étaient sans doute trop spécifiques pour pouvoir être utilisées chez *Pocillopora*. Changeant de stratégie, je me suis alors intéressé à des amorces EPIC (*exon-primed, intron-crossing*) universelles, ou tout du moins décrites comme telles et ayant pour cible des introns des sous-unités α et β de l'ATP synthétase, de l'antiporteur ADP/ATP mitochondrial, de la sous-unité de 54 kD de la particule de reconnaissance du signal, du facteur de transcription IID, de la lysyl-ARNt synthétase, d'une métalloprotéase à zinc (Jarman et al., 2002) et de l'actine (Palumbi & Baker, 1994) : à l'aide de ces amorces je ne suis parvenu à amplifier qu'un seul intron, celui de la sous-unité β de l'ATP synthétase. Pour

trouver d'autres marqueurs, ma troisième et dernière stratégie a été de définir directement de nouvelles amorces dégénérées en alignant des séquences déposées dans GenBank : séquences d'ADNc, ESTs, résultats de séquençage aléatoire (*shotgun sequencing*) obtenus chez divers cnidaires. J'ai employé cette approche pour les gènes de la tubuline, de la superoxyde dismutase, de la calmoduline, et du facteur d'élongation-1 α , et elle a été couronnée de succès pour ces deux derniers gènes.

Au total, six marqueurs variables ont ainsi pu être développés: deux régions mitochondriales (région de contrôle putative, ORF) et quatre gènes nucléaires (ITS2, intron de la calmoduline, intron du facteur d'élongation-1 α , intron de la sous-unité β de l'ATP synthétase). L'approche la plus efficace pour développer de nouveaux marqueurs de séquence s'est avéré être de redéfinir des amorces à partir d'alignement de séquences déposées dans GenBank plutôt que de partir d'amorces publiées, même 'universelles'. Parmi les six marqueurs obtenus, trois (l'ORF mitochondrial et les deux derniers introns) n'avaient jamais été séquencés chez aucun corail, et aucun sauf l'ITS2 n'avait jamais été séquencé chez *Pocillopora* ou des genres apparentés.

3. Une méthode nouvelle pour le séquençage direct des hétérozygotes

Contrairement aux marqueurs mitochondriaux, présents en une seule copie par individu (sauf en cas d'hétéroplasmie) et séquençables directement sans difficulté particulière, on s'attend pour des marqueurs nucléaires à observer fréquemment des individus hétérozygotes, c'est-à-dire dans lesquels différents allèles d'un marqueur donné sont détectés. Hormis le cas, trivial, où les deux allèles ne diffèrent que par une substitution nucléotidique, le séquençage direct de tels individus donne des résultats apparemment inexploitable, notamment lorsque les deux allèles ont des tailles différentes (figure 6) ; le moyen le plus couramment utilisé pour démêler les deux séquences en présence étant alors de cloner le produit de PCR, puis de séquencer plusieurs des colonies bactériennes obtenues. Cette approche présente un certain nombre de désavantages : tout d'abord le nombre de séquençages nécessaires est multiplié par cinq (si l'on souhaite obtenir les séquences des deux allèles avec une probabilité de 0,95), voire beaucoup plus (si l'on se fixe un seuil de probabilité supérieur) ; ensuite, l'étape de clonage, coûteuse en temps et en matériel, limite fortement le nombre d'individus analysable ; enfin, l'isolement puis le séquençage de molécules individuelles du produit de PCR initial introduit

le risque de séquencer, au lieu des allèles véritables, des ADN mutants ou recombinants générés lors du processus d'amplification (Meyerhans et al., 1990; Cronn et al., 2002; Yu et al., 2006).

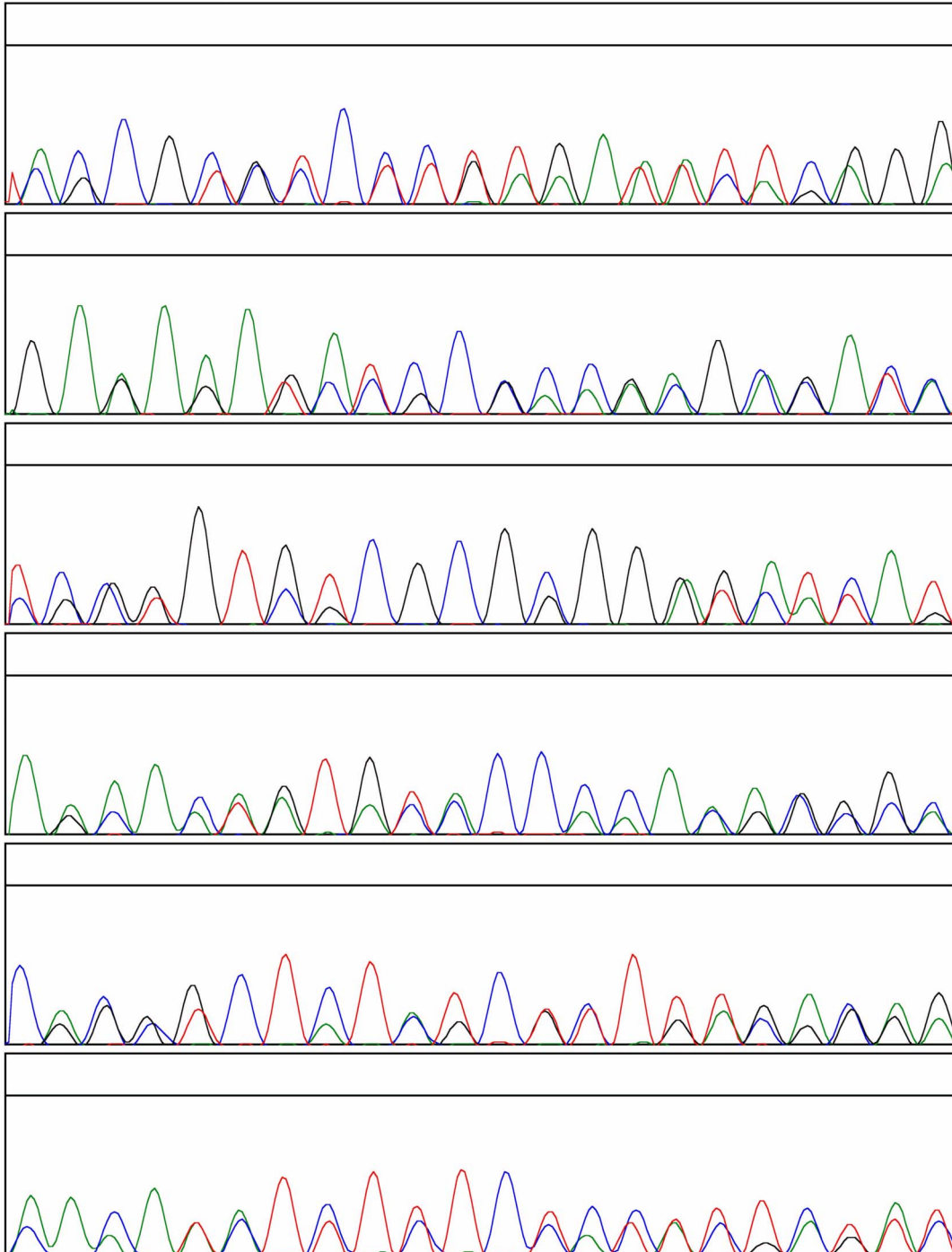
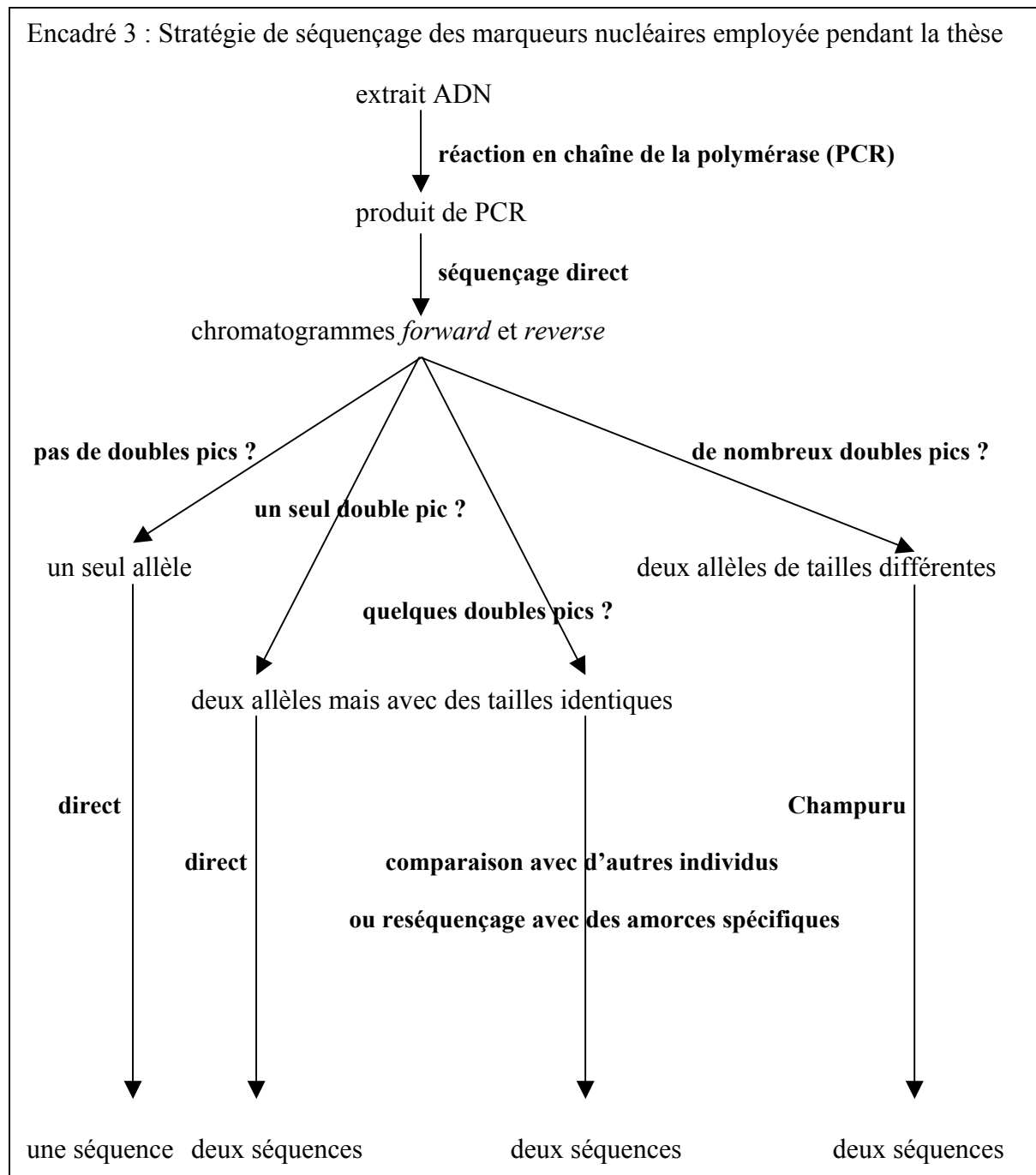


Figure 6 : Exemple de chromatogramme obtenu lors du séquençage direct d'un mélange de deux allèles de tailles différentes

D'autres méthodes, également coûteuses et longues à mettre en œuvre, ont été proposées pour résoudre ce problème (voir l'introduction de l'article 1), mais aucune ne permet de traiter aisément de nombreux échantillons. J'ai donc été amené à développer une méthode nouvelle de séquençage direct des individus hétérozygotes, permettant d'obtenir directement les séquences de leurs deux allèles lorsque ceux-ci sont de longueurs différentes (article 1). J'ai par la suite implémenté cette méthode dans un programme (Champuru) écrit en langage Perl, qui a également fait l'objet d'une publication (article 2). Cette méthode facilite considérablement le séquençage de marqueurs nucléaires, selon le principe schématisé sur le diagramme figurant dans l'encadré 3.



Article 1 : Phase determination from direct sequencing of length-variable DNA regions

Molecular Ecology Notes (IF 2006 1,22)

soumis le 4 novembre 2005, accepté le 13 février 2006

TECHNICAL NOTE

Phase determination from direct sequencing of length-variable DNA regions

JEAN-FRANÇOIS FLOT,* ANNIE TILLIER,† SARAH SAMADI* and SIMON TILLIER*

*UMR UPMC-CNRS-MNH-IRD 7138, Département Systématique et Évolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, Case Postale 26, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France, †Service de Systématique Moléculaire, Département Systématique et Évolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, Case Postale 26, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

Abstract

For diploid organisms, haplotype determination usually requires sequencing cloned polymerase chain reaction (PCR) products or comparing the genotypes of several individuals. We found out that phase could be reconstructed from direct sequencing of mixed PCR products by combining for each individual the complementary information contained in its forward and reverse chromatograms, provided these products had different lengths. When applied to the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from corals of the genus *Pocillopora*, this new method allowed us to identify two dominant sequence types in some specimens; however, sequencing cloned PCR products from the same specimens yielded more variants, including possible PCR-generated recombination artifacts.

Keywords: coral, double peaks, haplotyping, indels, ITS

Received 3 November 2005; revision received 5 January 2006; accepted 13 February 2006

Except for some genes located on sexual chromosomes, all genes in the diploid genome of a cell are present in several versions that may be identical or not: two versions in the case of single-copy autosomal genes, or many more in the case of repeated DNA regions such as ribosomal DNA (rDNA) and transposons. As a result, haplotype determination is not an easy task that usually requires comparing diploid genotypes with those of other individuals from the same population (Clark 1990). Diverse computational methods have been proposed to do so (Excoffier & Slatkin 1995; Stephens *et al.* 2001; Bonizzoni *et al.* 2003); however, these algorithms only work well with data sets comprising large numbers of individual genotypes. Pedigree analysis can also be used to infer the haplotypes of an individual based on its genotype and the genotypes of known relatives (Wijsman 1987; Tapadar *et al.* 2000), but such information is rarely available except for humans. As an alternative, several molecular methods have been proposed to find out the haplotypes of an individual (see review in Kwok & Xiao 2004) such as sequencing cloned polymerase chain reaction (PCR) products (e.g. Muir *et al.* 2001), heteroduplex analysis (Chang & Kidd 1997),

single-stranded conformation polymorphism (Sunnucks *et al.* 2000), denaturing gradient gel electrophoresis (Knapp 2005), extreme DNA dilution to single-molecule level (Ding & Cantor 2003) and the use of allele-specific PCR primers (Pettersson *et al.* 2003), but these methods can be costly and time-consuming.

We describe here a direct method for extracting sequence information from PCR-amplified mixtures of two products that differ in length. It is based on the observation that different bases are superposed in the forward and reverse chromatograms obtained by sequencing such mixtures directly (Fig. 1). This occurred to us while investigating a noncoding intergenic region, the internal transcribed spacer 2 (ITS2), located in rDNA between the 5.8S and 28S RNA genes. This region is present in several hundred copies per genome, with considerable variation in copy number both between and within species; unlike other duplicated genes, however, these copies are prevented from diverging by a variety of homogenization mechanisms, resulting in a concerted mode of evolution (Dover 1982; Liao 1999). Discrete rDNA arrays can be found on different chromosomes, and it has been proposed that homogenization occurs more frequently within arrays than between nonsyntenic arrays (Seperack *et al.* 1988; Schlotterer & Tautz 1994). As a result, several distinct

Correspondence: Jean-François Flot, Fax: +33 1 40 79 38 44; E-mail: jfflot@mnhn.fr

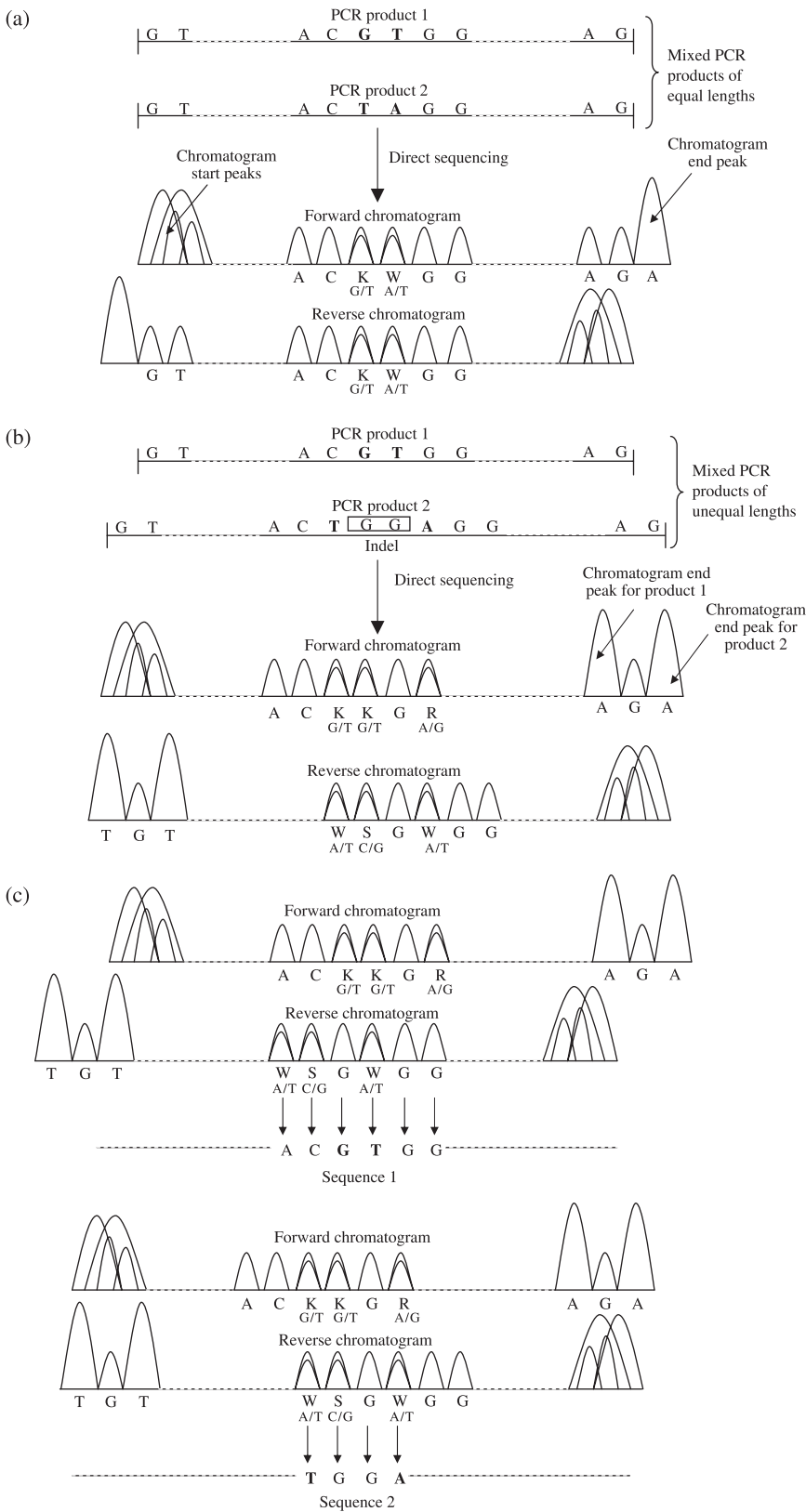


Fig. 1 Schematic representation of the principle underlying our method. (a) If there are no insertions/deletions, directly sequencing a mixture of two PCR products differing at *n* positions results in chromatograms displaying *n* double peaks. The information contained in the forward and reverse chromatograms is identical. (b) When dealing with a mixture of PCR products that differ in length, however, different bases are superposed in the forward reverse chromatograms. As a result, the information provided by each chromatogram is different. (c) By combining the complementary information brought by the forward and reverse chromatograms, it is possible to deduce the sequences present in the mixture.

Table 1 List of primers

Marker name	Primer Sequence	Reference
ITS2	ITS2-5 5'-AGCCAGCTGCGATAAGTAGTG-3'	this publication
R28S1	5'-GCTGCAATCCCAAACAACC-3'	this publication

groups of ITS sequences may coexist in a single genome, with little or no genetic exchanges between them (Muir *et al.* 2001).

Fragments of corals of the genus *Pocillopora* were collected in Hawaii, and their genomic DNA purified by using the Wizard Genomic DNA Extraction kit (Promega). Coral-specific primers (Table 1) were used to amplify the ITS2 regions in 25 µL reaction mixes that included 20 µL H₂O, 2.5 µL 10× buffer (containing 11 mM MgCl₂), 1.3 µL DMSO, 1 µL dNTP mix (6.6 µM total), 0.3 µL primers (25 µM), 0.15 µL Red *Taq* (Sigma) and 0.5 µL DNA extract. PCR conditions comprised an initial denaturation step of 60 s at 94 °C, followed by 40 cycles (30 s denaturation at 94 °C, 30 s annealing at 53 °C, 75 s elongation at 72 °C) and a final 5-min elongation step at 72 °C. PCR products were sequenced in both directions with the same primers as for amplification, and sequences were assembled and cleaned using SEQUENCHER 4 (Gene Codes).

Chromatograms of most individuals displayed numerous double peaks (Fig. 2a). No triple peaks or quadruple peaks were observed, however, suggesting that double peak resulted from the superposition of no more than two sequences. Moreover, double peaks were rare in the first hundred of nucleotides of each chromatogram and abundant downstream, as expected if two sequences of unequal lengths were superposed. To reconstruct these two sequences, we duplicated the chromatograms in SEQUENCHER and considered for each sequence the information brought by its forward and reverse chromatograms: for instance, if a given base in a sequence was either G or C according to one chromatogram, and either C or A according to the other, this base had to be a C. Conversely, if a G or C double peak was deduced to be a C in one sequence, that position had to be a G in the other sequence. This way, we could trace back the origin of each peak in the chromatograms to the reconstructed sequences, verifying a posteriori that each chromatogram resulted from the superposition of two sequences and allowing double checking for possible mistakes (Fig. 2b).

For comparison, we cloned the PCR products from three individuals among those found by direct sequencing to contain two markedly different ITS sequence types (2–2.5% sequence difference, including indels) and sequenced three to nine clones per individual using the same primers as for amplification (data not shown). Each cloned sequence was found to be very similar (less than 0.8% difference) or

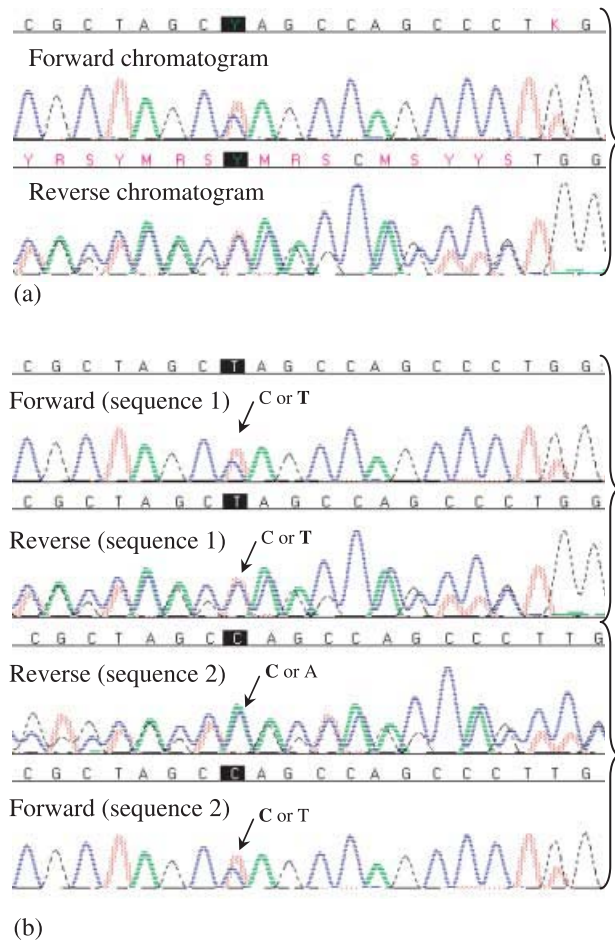


Fig. 2 Example of phase reconstruction using our method. (a) Reverse and forward chromatograms obtained by direct sequencing displayed several double peaks. (b) After duplicating the chromatograms in SEQUENCHER and aligning them, the two sequences in superposition were easily deduced base by base: at the position highlighted here, for instance, sequence 2 had a C or A according to its forward chromatogram, and a C or T according to its reverse chromatogram. By deduction, sequence 2 had a C at this position, which cleared up the C or T indetermination for sequence 1.

identical to one or the other of the two sequences obtained by direct sequencing from the same individual. Moreover, differences between cloned sequences were scattered all over our target region and not restricted to the 25 sites found variable among sequences obtained by direct sequencing, which suggests that these differences may have resulted from errors occurring during the PCR amplification process or from amplification of rare rDNA variants. Occasionally, sequencing cloned PCR products also yielded seemingly recombinant sequences, different parts of which were similar or identical to parts of the two sequences obtained by direct sequencing. Such 'hybrid' sequences may really exist among the numerous ITS copies present in the genome of each cell (see, for instance, McFadden &

Hutchinson 2004); however, it could also result from PCR-mediated recombination (Bradley & Hillis 1997; Cronn *et al.* 2002), a well-documented artefact that can lead to significant errors if recombinant sequences are included in a dataset.

By contrast, direct sequencing of ITS2 yielded at most two sequences per individual, allowing us to identify the dominant sequence types much faster and cheaper than by cloning. This method also allows finding out the haplotypes of single-copy genes from direct sequencing, provided these haplotypes differ in length. However, the method exposed here can be tedious when performed 'by hand', and applying it to large numbers of individuals will only become convenient when programs are available to perform it automatically. Moreover, this method only works for length-variable DNA regions and will best be used in conjunction with other existing techniques in order to clear up the cases of individuals containing different haplotypes of identical length.

Acknowledgements

This research received financial support from the French Ministry of Research and Education (PhD scholarship to J.-F. Flot) and from the E. W. Pauley Foundation. Thanks to all organizers and participants in the 2002 Pauley Summer Program 'Molecular Biology of Corals', and especially to E. Cox, F. Stanton and D. Thornhill for helping with sample collection. Thanks also to M.-C. Boisselier, H. Magalon and B. Li for useful discussions.

References

- Bonizzoni P, Della Vedova G, Dondi R, Li J (2003) The haplotyping problem: an overview of computational models and solutions. *Journal of Computer Sciences and Technology*, **18**, 675–688.
- Bradley R, Hillis D (1997) Recombinant DNA sequences generated by PCR amplification. *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 592–593.
- Chang F-M, Kidd KK (1997) Rapid molecular haplotyping of the first exon of the human dopamine D4 receptor gene by heteroduplex analysis. *American Journal of Medical Genetics*, **74**, 91–94.
- Clark A (1990) Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. *Molecular Biology and Evolution*, **7**, 111–122.
- Cronn R, Cedroni M, Haselkorn T, Grover C, Wendel JF (2002) PCR-mediated recombination in amplification products derived from polyploid cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**, 482–489.
- Ding C, Cantor CR (2003) Direct molecular haplotyping of long-range genomic DNA with M1-PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **100**, 7449–7453.
- Dover G (1982) A molecular drive through evolution. *Bioscience*, **32**, 526–533.
- Excoffier L, Slatkin M (1995) Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 921–927.
- Knapp LA (2005) Denaturing gradient gel electrophoresis and its use in the detection of major histocompatibility complex polymorphism. *Tissue Antigens*, **65**, 211–219.
- Kwok P-Y, Xiao M (2004) Single-molecule analysis for molecular haplotyping. *Human Mutation*, **23**, 442–446.
- Liao D (1999) Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *American Journal of Human Genetics*, **64**, 24–30.
- McFadden CS, Hutchinson MB (2004) Molecular evidence for the hybrid origin of species in the soft coral genus *Alcyonium* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia). *Molecular Ecology*, **13**, 1495–1505.
- Muir G, Fleming CC, Schlotterer C (2001) Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 112–119.
- Pettersson M, Bylund M, Alderborn A (2003) Molecular haplotype determination using allele-specific PCR and pyrosequencing technology. *Genomics*, **82**, 390–396.
- Schlötterer C, Tautz D (1994) Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. *Current Biology*, **4**, 777–783.
- Seperack P, Slatkin M, Arnheim N (1988) Linkage disequilibrium in human ribosomal genes: implications for multigene family evolution. *Genetics*, **119**, 943–949.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, **68**, 978–989.
- Sunnucks P, Wilson ACC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, **9**, 1699–1710.
- Tapadar P, Ghosh S, Majumder PP (2000) Haplotyping in pedigrees via a genetic algorithm. *Human Heredity*, **50**, 43–56.
- Wijsman EM (1987) A deductive method of haplotype analysis in pedigree. *American Journal of Human Genetics*, **41**, 356–373.

Article 2 : Champuru 1.0: a computer software for unraveling mixtures of two DNA sequences of unequal lengths

Molecular Ecology Notes (IF 2006 1,22)

soumis le 9 février 2007, accepté le 1er mai 2007

PROGRAM NOTE

CHAMPURU 1.0: a computer software for unraveling mixtures of two DNA sequences of unequal lengths

JEAN-FRANÇOIS FLOT

*UMR UPMC-CNRS-MNHN-IRD 7138, Département Systématique et Évolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, Case Postale 26, 57 rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05, France***Abstract**

CHAMPURU is an interactive, user-friendly web software that facilitates the deconvolution of mixed chromatograms obtained when sequencing directly mixtures of two DNA templates of unequal lengths. The program takes as input two strings of characters describing the forward and reverse chromatograms as obtained by direct sequencing and returns, most often after several iterations aimed at correcting basecalling errors, the sequences of the two templates present in the mixture. CHAMPURU was written in PERL, with a web interface accessible online at <http://134.157.186.185/champuru/champuru.htm>.

Keywords: double peaks, haplotyping, indels, length variant heterozygote, mixed trace, sequencing

Received 9 February 2007; revision accepted 1 May 2007

Sequencing mixtures of DNA templates poses specific problems, especially when these templates differ in lengths. Such situation is encountered, for instance, when sequencing nuclear markers in diploid organisms (Kwok & Xiao 2004), when sequencing reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) products from alternatively spliced genes (Tenney *et al.* 2007), when analysing microbial communities in environmental samples (Muyzer & Smalla 1998) or when dealing with forensic evidence (Mortera *et al.* 2003). We recently described a method allowing phase determination from direct sequencing of length-variable DNA regions (Flot *et al.* 2006). Here we present a computer program, CHAMPURU 1.0, designed to perform this task automatically for mixtures of two sequences. In the dialect of Okinawa, ‘champuru’ means ‘to mix up’; it is also the name of a popular local dish, a sautéed mixture of diverse ingredients. CHAMPURU was written in PERL, with a web interface allowing interactive sequence reconstruction over the Internet (accessible online at <http://134.157.186.185/champuru/champuru.htm>).

CHAMPURU takes as input two strings of characters describing the forward and reverse chromatograms as obtained by direct sequencing. Double peaks should be represented by their corresponding one-letter codes following the 1984 recommendations of the Nomenclature

Committee of the International Union of Biochemistry (1985). Most chromatogram analysis programs, such as PHRED (Ewing *et al.* 1998), SEQUENCING ANALYSIS 5.2 (Applied Biosystems) and CEQ 2000XL DNA ANALYSIS SYSTEM (Beckman Coulter), are capable of detecting double peaks and calling them using International Union of Biochemistry (IUB) codes, and commercial sequencing companies routinely provide such re-analysed sequences upon request. Moreover, sequence alignment programs such as SEQUENCHER (Gene Codes) can also be used to call secondary peaks and produce chromatogram descriptions that meet CHAMPURU’s requirements. As all automatic basecalling programs make mistakes, especially when dealing with long stretches of double peaks, it is a good idea to check visually for forgotten peaks and other errors at this stage; to ensure efficient haplotype reconstruction, low-quality trace data found at the beginning and/or at the end of a chromatogram should also be discarded.

To use the software, one simply should copy/paste the forward and reverse input sequences into the corresponding fields of the web interface (example sequences are provided on the webpage, along with the original chromatograms and a tutorial showing how the example sequences were generated from the original chromatograms). As most users will prefer to use CHAMPURU while displaying chromatogram alignments in another software, the default option considers that the reverse sequence is entered as it is when aligned with the forward sequence, that is, as the

Correspondence: Jean-François Flot, Fax: +33 1 40 79 38 44; E-mail: jfflot@mnhn.fr

2 PROGRAM NOTE

reverse complement of the sequence obtained from direct sequencing. If this is not the case, the checkbox 'Reverse-complement reverse sequence' should be ticked. After users hit the 'Submit' button on the web form, CHAMPURU starts by computing, for all possible alignments of the two sequences provided, a 'compatibility score' equal to the number of compatible positions in the alignment minus the number of compatible positions expected for an alignment of two random sequences of As, Ts, Gs and Cs (i.e. one fourth of the length of the overlap between the two sequences): for instance, W (= A or T) is considered compatible with A, T, K (= G or T) and D (= A, T or G), but not with S (= C or G). As a result of this computing, a web page is generated that displays the three best compatibility scores obtained and the strict consensus sequences of the two alignments with highest compatibility scores. If there are two optimal alignments, as expected for mixtures of two sequences of different lengths, the third best compatibility score will represent 'background scores' and will be much lower than the two highest ones: in that case, each consensus sequence displayed can be interpreted as one of the two sequences present in the mixture. However, if there is only one optimal alignment, the second and third best compatibility scores will be approximately equal to each other and much lower than the first one, meaning that a single sequence is detected in the input data and that the second consensus sequence should be discarded. It may also happen that the three best compatibility scores have similar values: in that case, either no signal is found in the input data (as when the forward and reverse sequences entered correspond to different, unrelated genes), or more than two sequences of different lengths are detected (as when sequencing a mixture of three or more haplotypes).

Along with each compatibility score, users are provided with a number representing the offset between the forward and reverse sequences in the corresponding alignment, expressed as the position of the first base of the forward chromatogram by reference to the first base of the reverse chromatogram. This makes it easier to visualize in another software the alternative alignments detected by CHAMPURU. If incompatibilities between the forward and reverse chromatogram sequences are detected, they are represented as underscores ('_') in the consensus sequences and users are invited to check their input data for basecalling errors (most often undetected double peaks) before resubmitting corrected sequences. Even if no incompatibility is detected, some ambiguities may persist in the consensus sequences at positions where both the forward and reverse sequence data are ambiguous: CHAMPURU solves this by comparing the two consensus sequences and by using the information carried by one sequence to clean up the other (for details of the method see Flot *et al.* 2006). As a final verification step, the software simulates the result of sequencing directly, in the forward and reverse directions,

a mixture of the two haplotypes it has reconstructed, and compares it with the actual forward and reverse input sequences. If some peaks in the input sequences are not found in the superposition of the two consensus sequences, users are invited again to check their input data (usually for spurious double-base callings of single peaks, but also sometimes for undetected double peaks in other positions).

Phase determination using CHAMPURU is thus an iterative process, in which users go back and forth between their chromatogram data and the web interface. After at most a few iterations, the mixture of sequence information obtained by direct sequencing is unraveled as a correspondence becomes established between the input chromatogram data and the output consensus sequences (Fig. 1). Output sequences can then be exported by copying and pasting them from the webpage into other applications, or downloaded as a single FASTA file.

To our knowledge, the only other programs available for deconvoluting mixed traces are TRACE RECALLING (Tenney *et al.* 2007), CODONCODE ALIGNER (CodonCode Corporation) and KB BASECALLER (Applied Biosystems). The first two programs can resolve haplotypes that differ by an indel by performing sequence subtraction, but a reference genome sequence (for TRACE RECALLING) or a 'wild type' homozygous chromatogram obtained using the same primer as the mixed chromatogram (for CODONCODE ALIGNER) has to be provided and must be largely identical to one of the two haplotypes present in the template mixture. According to Tenney *et al.* (2007), KB BASECALLER handles heterozygous indels by attempting to shift the sequence represented in the trace relative to itself and by looking for matches between the shifted sequences, but this only works for indels smaller than 15 bp; moreover, this method is not expected to resolve haplotypes very divergent from one another or that differ by multiple indels.

By contrast, CHAMPURU makes it possible to determine the two haplotypes present in a template mixture without relying on any prior knowledge of the expected sequences. Its method works whatever the number of indels, as long as only two different templates are sequenced at the same time. Actually, it even works when two non-homologous, unrelated templates happen to be sequenced simultaneously (for instance, due to nonspecific annealing of the primers used during PCR). However, when the sequences are very divergent, differences in electrophoretic mobility among bases (Frank & Köster 1979) may sometimes cause misalignment of the peaks or even complete phase shift of one or several nucleotides (Fig. 2). In such situation, one cannot summarize input chromatograms as strings of IUB code letters and phase determination has to be performed 'by hand' as outlined previously (Flot *et al.* 2006). Hopefully, future versions of CHAMPURU will accept as input the raw trace data generated by automated sequencing, thus handling this type of situation. Another elegant way to solve

FORWARD

TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAATGGCG
 GCTCTTGGGTTCTCCAGGAGCATGTCTGTCTGAGTGTCTATTCAAACAY
 CCATCGTGCGAATCCGCGTGCAGCGCTCCGCTGGTCCCGTCTGTAGC
 GGATGGGGCCGGGACCGCCCGCCGTTGACCGGGTCTGCGCGCGTTGA
 GGTGCGCGGTGAGATGACCGGTGCTGCTAGCCWKSYSKYGSYS
 CKSSSSYSRSYKWCYGYKTCCKYGWMMYTYRRRRWKMARGRWSM
 RMSAWMCGMCAWSCGRYRTSSGYGKSGMKCRKRGAWCAWRRWAC
 MMKAWACSSYMAMSGSYCWMKSSYYTWKMSKWWWSAMRKMWYWM
 WYCWTTCCKMYWYTKWTTCTKYTKYCKSKGYSYRSCGGKRRSSGSWK
 SYSRMAKSWMAARGRAAWMRSSWYCRSMYYCAGAYCWSRSAWS
 RSKMMMSGCTRMMYKYWRRMWTWWWRMWWAKYRRRWRMRMR
 RAMWARMAASKAWYMMSSMWKYMMSRSKARYGRMGMGKGAAGM
 GSKMARAKYTSAAATYSMRATSYCYGMWKCSKSSAKYKGYRRKTSK
 AGWWGCRMKWSYASKYKSWRGSSSMKSSYMMKKYSYWWGKWR
 CKSRMRYSGCASRKSRYRMRSSYSMSWMSYSGYMKGKSSRSRSGC
 CSRCSRYSRCKWTSKRMKWYSRRGWKKY

SEQUENCE 1

TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAATGGCG
 GCTCTTGGGTTCTCCAGGAGCATGTCTGTCTGAGTGTCTATTCAAACAY
 CATCCATCGTGCGAATCCGCGTGCAGCGCTCCGCTGGTCCCGTCT
 GTAGCGGATGGGGCCGGGACCGCCCGCGTGAACGGGTTCTGTCG
 GCGTTGAGGGTTCGCGGTGAGATGACCGGTGCTGCTAGCCAGCC
 CTGGTGTCTGCTCGGCCGACCGGTGCGTTTACCCTGCTCCCTGAAAT
 TCAGGGAGAAAAGATCCGCCAAGCGACATCCGGTGTGCGCGGGGAT
 CATAGAACAAAGATAACCCTAACCGCCACGGCTCTATCGTTTGACG
 GAACAAATCTTTCTCCATTGATTCTTTTTCTGCTGCCGCGGGTAG
 CGGTGGCGGCATCTCAAAGGAAAAAGGAATCGCCTTCCAGACCTC
 AGATCAGGCAAGGTACCCGCTGAATTAAGCATATTAATAAGCGG
 AGGAAAAGAACTAACAAAGGATCCCGCAGTAACGGCGAGTGAAG
 CGGGAAGAGTCAAATTTGAAATCTCCGATGCTGCATCGGCGAGT
 TGATGTTGCGAGAAGCACTTTCTAGGCGGAGGGCCCTGCCTAAGTT
 GCTTGAACGGCACGTGCGAGAGGGTGACAACCCCGTCTGTGGCAG
 GGCCGCGCCACGATGTGCTTTCGAAGAGTC



REVERSE

GACTCTTCGAAAGCACATCGTGGGCGCGGCCCTGCCACAGACGGGG
 TTGTCACCCCTCTGCGAGTGCCTTCCAAGCAACTAGGACAGGGCCCT
 CCGCTAGAAAGTGTCTTCGCAACTACAACCTCGCCGATGCAGGCATCG
 GAGATTTCAAATTTGAGCTCTTCCGCTTCACTCGCGTTACTGGGGGA
 ATCCTTGTAGTTCTTTCTCCGCTTATTAATATGCTTAAATTCAGCG
 GGTAGCCTTGCTGATCTGAGGTCTGGAAGCGGATTCCTTTTCTCTTG
 AGATGCCGCCACCGCTACCCGGGCGGACAGAAAAAGAAATCGAATGG
 AGAAAGATTTGTTCCGTCAAAGCGATAGAGCGTGGCCGTTTAGGGTAT
 CTTGTTCTATGATCCCGCGGACACCGGATGTCGYTTGGCGGATCTTT
 CTCCTGAATTTCAAGGRACGCGGTAACCGACCGGYCGGGCCGAGCA
 SCAMSRKSRYSMSYRRCSSRYSAKCKSKMMYSYSRMCKCRACSCYSM
 ACGMMSKMSKWMMSGYSKRCGSSKSSCGSSYCCMKSCSYAYMSRCK
 RSRMCRGGSRSMMGSSSGMMSSSSGMWYSSSRMKWYGSRYGWTKGA
 WKWKWSAMTMRMMKMMRWSMKMCWKGWSWMSARRASCMS
 MRWKYGSWYWRMGWYMRKRWTYSAYKRWWYWCTGMAWTYY
 RCAMTWCW

SEQUENCE 2

TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAATGGCG
 GCTCTTGGGTTCTCCAGGAGCATGTCTGTCTGAGTGTCTATTCAAACAY
 CACCCATCGTGCGAATCCGCGTGCAGCGCTCCGCTGGTCCCGTCT
 GTAGCGGATGGGGCCGGGACCGCCCGCGTGAACGGGTTCTGTCG
 GCGTTGAGGGTTCGCGGTGAGATGACCGGTGCTGCTAGCCCTGG
 TGCTCGGCCGCGCGTTCGTTTACCCTGCTCCTTGAATTCAGGGA
 GAAAGATCCGCAACGACATCCGGTGTGCGCGGGGATCATAGAA
 CAAGATACCCCTAACCGCCACGGCTCTATCGCTTTGACGGAACAAA
 TCTTTCTCCATTGATTCTTTTTCTGCTGCCGCGGGTAGCGGTGGC
 GGCATCTCAAAGGAAAAAGGAATCGCCTTCCAGACCTCAGATCAG
 GCAAGGTACCCGCTGAATTTAAGCATATTAATAAGCGGAGGAAAA
 GAACTAACAAAGGATCCCGCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGAAG
 AGCTCAAATTTGAAATCTCCGATGCTGCATCGGCGAGTTGTAGTTG
 CGAGAAGCACTTTCTAGGCGGAGGGCCCTGCCTAAGTTGCTTGA
 ACGGACGTCGAGAGGGTGACAACCCCGTCTGTGGCAGGCGCGG
 CGCCACGATGTGCTTTCGAAGAGTC

Fig. 1 Example of correspondence established by CHAMPURU between the input data (on the left) and the two output sequences (on the right). Output sequences are deduced from the input data, and the input data can be reconstructed by simulating the direct sequencing of a mixture of the two output sequences: thus, the input data and the output sequences are equivalent in terms of their information content.

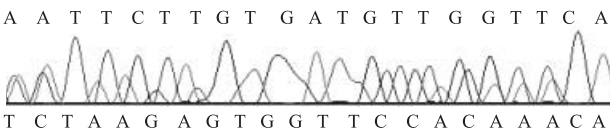


Fig. 2 Phase shift observed in an example where length difference between two allelic sequences was 65 deoxynucleotides. Because of differences in electrophoretic mobilities, the same migration distance spanned 21 bases for one allele (upper sequence) and 22 bases for the other (lower sequence). As a result, it was impossible to describe by one string of IUB codes the superposition of peaks in the chromatogram, and CHAMPURU could not be used to reconstruct automatically the two alleles.

this problem would be to design modified bases with electrophoretic mobilities nearly identical to one another, taking advantage of chemical modifications known to affect the electrophoretic mobility of deoxynucleotides without altering their recognition by DNA replication enzymes (see for instance Langer *et al.* 1981); using such modified bases during cycle sequencing instead of the regular A, T, G and C deoxynucleotides should alleviate peak misalignment issues.

Acknowledgements

This research was supported by a PhD scholarship from the French Ministry of Research and Education. Thanks to Hélène Magalon and Blaise Li for useful discussion and advice, and to Philippe Lope z for hosting the website on his server.

References

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using PHRED. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, **8**, 175–185.
 Flot J-F, Tillier A, Samadi S, Tillier S (2006) Phase determination from direct sequencing of length-variable DNA regions. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 627–630.
 Frank R, Köster H (1979) DNA chain length markers and the influence of base composition on electrophoretic mobility of oligodeoxyribonucleotides in polyacrylamide-gels. *Nucleic Acids Research*, **6**, 2069–2087.
 Kwok P-Y, Xiao M (2004) Single-molecule analysis for molecular haplotyping. *Human Mutation*, **23**, 442–446.
 Langer PR, Waldrop AA, Ward DC (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **78**, 6633–6637.

4 PROGRAM NOTE

Mortera J, Dawid AP, Lauritzen SL (2003) Probabilistic expert systems for DNA signature profiling. *Theoretical Population Biology*, **63**, 191–205.

Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127–141.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry

(1985) Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *Biochemical Journal*, **229**, 281–286.

Tenney AE, Wu JQ, Langton L, Klueh P, Quatrano R, Brent MR (2007) A tale of two templates: automatically resolving double traces has many applications, including efficient PCR-based elucidation of alternative splices. *Genome Research*, **17**, 212–218.

Contenu des principaux fichiers mis en ligne sur le serveur :

Fichier champuru.htm

```
<!DOCTYPE html PUBLIC "-//W3C//DTD XHTML 1.0 Strict//EN"
"http://www.w3.org/TR/xhtml1/DTD/xhtml1-strict.dtd">
<html xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml" xml:lang="en">

<head>
<title> Champuru v1.0</title>
<meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=iso-8859-
1"/>
</head>

<body>
<h1> Champuru v1.0 </h1>

<p> <br /> Flot et al. (2006) <strong>Phase determination from direct
sequencing of length-variable DNA regions</strong> <em>Molecular
Ecology Notes</em> <strong>6</strong> (3), 627-630 <a
href="http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1471-
8286.2006.01355.x">link</a><br />
Flot (in press) <strong>Champuru 1.0: a computer software for
unraveling mixtures of two DNA sequences of unequal lengths</strong>
<em>Molecular Ecology Notes</em> <a href="http://www.blackwell-
synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1471-8286.2007.01857.x">link</a><br
/><br />
</p>

<form action="champuru.pl" method="post">

<p> Forward sequence: <input type="text" name="forward" size="100"/>
(Max = 1500 bp)</p>
<p> Reverse sequence: <input type="text" name="reverse" size="100"/>
(Max = 1500 bp)</p>
<p> <input type="checkbox" name="revcomp" value="checked"/> Reverse-
complement reverse sequence </p>

<p> <input type="submit" value="Submit"/>
<input type="reset" value="Reset Form"/> <br /><br /></p>

<p><strong>Example dataset </strong> (original chromatograms: <a
```

```

href="ExampleForward.ab1"> Forward </a> and
<a href="ExampleReverse.ab1"> Reverse </a>) <br />
Forward sequence:<br />
ATCGTGGGCGGCCGGCCCTGCCACAGACGGGGTTGTCAACCCTCTGCGACGTGCCGTTCCAAGCAACT
TAGGCAGGGCCCCCTCCGCCTAGAAAGTGCTTCTCGCAACTACAACCTCGCCGATGCAGGCATCGGAGA
TTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCACTCGCCGTTACTGGGGGAATCCTTGTAGTTTCTTTTCTCCT
CCGCTTATTAATATGCTTAAATTCAGCGGGTAGCCTTGCCCTGATCTGAGGTCTGGAAGGCGATTCTT
TTTTTCCTTTGAGATGCCGCCACCGCTACCCGGCGGCAGCAGAAAAAGAATCGAATGGAGAAAGAT
TTGTTCCGTCAAAGCGATAGAGCCGTGGCCGTTTGGGGTACATTGTTCTATGATCCCCGCGCGACAC
CGGATGTGCGTTGGCGGATCTTCTCCCTGAATTTCAAGGGACGCGGTAAACCGACCGGTGCGGGCCG
AGCAGCACCAGGGCTGGCTAGCTAGCGCACGACCGGTCACTCGACCGCGACCTCAACGCCGCACG
AACCCGTTACGGCGGGCGCGYSYSSSSCCMYMYSCKMYASASRSRSGGRSMMRSRSGRSRRCGCGCRC
RCGSRKWKRCRCRMRKRKRKTKTKWRWAKASACWCWSASASASAYRYKCYYSKGRGARMCMRMRAGM
GCSMYWTKYGYKYWMARAKWKYKMRWKWYWCWSWRWWYTCYGCWWYTACWCTWYWTMTCRSMMTCK
MKCTGA<br />
Reverse sequence:<br />
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAATGGCGCTCTTGGGTTCTCCCAGGAGCATGTCTGTC
TGAGTGTCTATTCAAACATCCATCGTGCGAATCCGCGTGCGCGCTCCGCCTGGTCCCCGTCTGTAG
CGGATGGGGCCGGGACGCGCSCSCSSYGWRMRSGKKYKYGYGSSGYKKWGRGKSKCGSKSKMGAKRW
SMSSSKSYGYGCKMKMKMKMSMSMSCYSKKGYSYKCKSSSSCSMSMSKSKSKKTWYMSCGYSYCY
KWRWWYWSRGRGARARAKMYSMSMMRMGMSAYMYSKGTSKCGCGSGGRKMWYAKARMAMWRTRYM
CCMMAMRSSSMCRSSKCTMTMKCKYTKWSRSTRMAMAWMTYTYTCYMYWKMKWYTYTTTTYTSYKS
YSSCSSSGKRKMGSKGKSGSSRYMTCWMARRRRAAAARRRRWMKCSYYYYMSASMYCWSAKMWSRSR
MRRSKMYMCSCSWRWWTWWRMRYATWWWWAWRMGSRGRRAARARAMWMMWMMAMRRRKWYCCCMSW
RWMRSSGMGWGRRMGSGRRRAGMKCWMAWWTKWRAWMTCYSMKRYSYSYRYMKSSGMGWKKTRKWK
KYGMGARRMRCWYTYTMRSGSRGRGGSSCYSYSYMWWRWKYKYKRRMRSSRCRYSKCRSAGRGKG
WSAMMMCCSYSTSTGKRSRSGSSSSSSSSSCSCMRMKATGYGTYKCGAGASTSGKGTGTTGAKAKYGC
AC<br />
(with "Reverse-complement reverse sequence" ticked)</p>
<p> <a href="faq.htm"> Frequently Asked Questions </a><br />
<a href="tutorial.htm"> Tutorial </a><br />
<a href="mailto: jfflot__*(at)*__mnhn.fr"> Email the author
</a></p>
</form>
</body>

```

Fichier champuru.pl

```

#!C:\Perl\bin\perl.exe
use warnings;
use strict;
use CGI;
use CGI::Carp qw(fatalsToBrowser);
$CGI::POST_MAX=1024 * 10; # max 10K posts
$CGI::DISABLE_UPLOADS = 1; # no uploads

```

```

my $cgi=new CGI;
$cgi->default_dtd('-//W3C//DTD XHTML 1.0
Strict//EN','http://www.w3.org/TR/xhtml1/DTD/xhtml1-strict.dtd');
print $cgi->header(),
    $cgi->start_html(-dtd=>'yes', -title=>'Champururu v1.0 Output'),
    $cgi->h1('Champururu v1.0 Output');

sub max { my $max = shift; $_ > $max and $max = $_ for @_; $max };
sub min { my $min = shift; $_ < $min and $min = $_ for @_; $min };

my@bases = ('A', 'T', 'G', 'C', 'R', 'Y', 'M', 'K', 'W', 'S', 'V',
'B', 'H', 'D', 'N');
my %complement = ('A'=>'T', 'T'=>'A', 'G'=>'C', 'C'=>'G', 'R'=>'Y',
'Y'=>'R', 'M'=>'K', 'K'=>'M', 'W'=>'W', 'S'=>'S', 'V'=>'B', 'B'=>'V',
'H'=>'D', 'D'=>'H', 'N'=>'N');
my %code = ('A'=>1, 'T'=>2, 'G'=>4, 'C'=>8, 'R'=>5, 'Y'=>10, 'M'=>9,
'K'=>6, 'W'=>3, 'S'=>12, 'V'=>13, 'B'=>14, 'H'=>11, 'D'=>7, 'N'=>15);
my %rev_code = (1=>'A', 2=>'T', 4=>'G', 8=>'C', 5=>'R', 10=>'Y',
9=>'M', 3=>'W', 12=>'S', 6=>'K', 13=>'V', 14=>'B', 11=>'H', 7=>'D',
15=>'N');

sub comp { my $compatible; my $intersection;
$intersection = ($code{$_[0]} & $code{$_[1]});
if ($intersection == 0) {$compatible = 0} else {$compatible=1}
return ($compatible)} ;

sub inter { my $intersection;
$intersection = ($code{$_[0]} & $code{$_[1]});
if ($intersection == 0) { $intersection = '_' }
    else {$intersection=$rev_code{$intersection}};
return ($intersection)};

#processing input data
my $for = $cgi->param('forward'); chomp($for); my@forward=split(' ',
uc($for));
foreach my$r(@forward){if (!grep(/$r/, @bases)) {print "Unknown base
($r) in forward sequence!"; exit}};
my $rev = $cgi->param('reverse'); chomp($rev); my@reverse=split(' ',
uc($rev));
foreach my$r(@reverse){if (!grep(/$r/, @bases)) {print "Unknown base
($r) in reverse sequence!"; exit}};
print $cgi->start_p(), "Length of forward sequence: $#forward bases.

```



```

";
if ($#forward>1500){print $cgi->strong("Too long!");}
print $cgi->br(), "Length of reverse sequence: $#reverse bases. ";
if ($#reverse>1500){print $cgi->strong("Too long!");}
print $cgi->end_p();
if (($#forward>1500) or ($#reverse>1500)) {exit};
if ($cgi->param('revcomp') eq 'checked'){@reverse=reverse(@reverse);
foreach my$base(@reverse){$base=$complement{$base}}};

#computing the scores of all possible alignments
my $scoremax1 = 0; my $scoremax2=0; my $scoremax3=0 ;
my $imax1=0; my $imax2=0 ; my $imax3=0;
my $i; my $j;
for ($i=(-$#forward); $i<=($#reverse) ;$i++) {
        my $score = 0;
        if ($i<0) {for ($j=0;
        $j<=min(($#forward+$i), $#reverse);$j++)
        {$score=($score+comp($forward[$j-$i], $reverse[$j]))}; $score=$score-
        (($#forward+$i)+1)/4}
        elsif ($i>0) {for ($j=0;
        $j<=min($#forward, ($#reverse-
        $i));$j++) {$score=($score+comp($forward[$j], $reverse[$j+$i]))};
        $score=$score- (($#reverse-$i)+1)/4}
        elsif ($i==0) {for ($j=0;
        $j<=min($#forward, $#reverse);$j++) {$score=($score+comp($forward[$j], $
        reverse[$j]))}; $score=$score-(min($#forward, $#reverse)+1)/4};

        if ($score > $scoremax1) {$imax3=$imax2; $imax2=$imax1;
        $imax1=$i; $scoremax3=$scoremax2; $scoremax2=$scoremax1;
        $scoremax1=$score}

        elsif ($score > $scoremax2){$imax3=$imax2;
        $imax2=$i; $scoremax3=$scoremax2; $scoremax2=$score}

        elsif ($score > $scoremax3){$imax3=$i;
        $scoremax3=$score}} ;

print $cgi->p("Best compatibility score: $scoremax1 (offset:
$imax1)",
        $cgi->br(),
        "Second best compatibility score: $scoremax2
(offset: $imax2)",
        $cgi->br(),
        "Third best compatibility score: $scoremax3
(offset: $imax3)");

```

```

#combining forward and reverse information into strict consensus
sequences
my @seq1; my @seq2;

for ($j=-min($imax1,0); $j<=min($#forward,$#reverse-$imax1);$j++) {

$seq1[$j+min($imax1,0)]=inter($forward[$j],$reverse[$j+min($imax1,0)+
max($imax1,0)])}

for ($j=-min($imax2,0); $j<=min($#forward,$#reverse-$imax2);$j++) {

$seq2[$j+min($imax2,0)]=inter($forward[$j],$reverse[$j+min($imax2,0)+
max($imax2,0)])}

my $incomp=0;
foreach my$r(@seq1){if ($r eq '_') {$incomp=$incomp+1}};
foreach my$r(@seq2){if ($r eq '_') {$incomp=$incomp+1}};
my $sequence1=join(' ',@seq1);
my $sequence2=join(' ',@seq2);
if ($incomp>0) { print $cgi->p($cgi->strong("First reconstructed
sequence:"), $cgi->br(), $sequence1);

print $cgi->p($cgi->strong("Second reconstructed
sequence:"), $cgi->br(), $sequence2)};
if ($incomp==1) {print $cgi->p("There is 1 incompatible position,
please check sequence data.") ; exit};
if ($incomp>1) {print $cgi->p("There are $incomp incompatible
positions, please check sequence data.") ; exit};

#cleaning up ambiguities by sequence comparison
my @seq1rev=reverse(@seq1); my @seq2rev=reverse(@seq2);
my @reverserev=reverse(@reverse);
splice(@seq1rev,0,max(min($#forward-$#reverse+$imax1,0)-
min($#forward-$#reverse+$imax2,0),0));
splice(@seq2rev,0,max(min($#forward-$#reverse+$imax2,0)-
min($#forward-$#reverse+$imax1,0),0));
my $cutreverserev=-min($#forward-$#reverse+min($imax1,$imax2),0);
splice(@reverserev,0,$cutreverserev);
@seq1=reverse(@seq1rev);
@seq2=reverse(@seq2rev);@reverse=reverse(@reverserev);
splice(@seq1,0,max(min($imax1,0)-min($imax2,0),0));
splice(@seq2,0,max(min($imax2,0)-min($imax1,0),0));
my $cutforward=-min(min($imax1,$imax2),0);

```

```

splice(@forward,0,$cutforward);

for ($i=0;$i<5;$i++){
for ($j=0;$j<=min($#seq1,$#seq2);$j++) {
    if ($seq1[$j] ne $seq2[$j]) {
    if (comp($seq1[$j],$seq2[$j])==1) {
        if ($code{$seq1[$j]} > $code{$seq2[$j]}) {
            $seq1[$j]=$rev_code{$code{$seq1[$j]}-$code{$seq2[$j]}}
        else
            {$seq2[$j]=$rev_code{$code{$seq2[$j]}-$code{$seq1[$j]}}}} ;
        if ($seq1[$#seq1-$j] ne $seq2[$#seq2-$j]) {
            if (comp($seq1[$#seq1-$j],$seq2[$#seq2-$j])==1) {
            if ($code{$seq1[$#seq1-$j]} > $code{$seq2[$#seq2-$j]}) {
                $seq1[$#seq1-$j]=$rev_code{$code{$seq1[$#seq1-$j]}-$code{$seq2[$#seq2-$j]}}
            else
                {$seq2[$#seq2-$j]=$rev_code{$code{$seq2[$#seq2-$j]}-$code{$seq1[$#seq1-$j]}}}}
            }};
$sequence1=join(' ',@seq1);
$sequence2=join(' ',@seq2);
print $cgi->p($cgi->strong("First reconstructed sequence:"), $cgi->br(), $sequence1);
print $cgi->p($cgi->strong("Second reconstructed sequence:"), $cgi->br(), $sequence2);

#simulating direct sequencing
my @tocheckforward=('s');
for ($j=0; $j<=min($#seq1,$#seq2);$j++) {
    if ($code{$forward[$j]}!=$code{$seq1[$j]}|$code{$seq2[$j]})
    {push(@tocheckforward,$j+$cutforward+1)};
if ($#tocheckforward > 0) {print $cgi->start_p(), $cgi->strong("Check position");
if ($#tocheckforward==1) {print $cgi->strong(" $tocheckforward[1] ")}
else {foreach my$r(@tocheckforward){print $cgi->strong("$r ")};
    print $cgi->strong("on forward chromatogram."), $cgi->end_p()};

my @tocheckreverse=('s');
for ($j=0; $j<=min($#seq1,$#seq2);$j++) {
    if ($code{$reverse[$#reverse-$j]}!=$code{$seq1[$#seq1-$j]}|$code{$seq2[$#seq2-$j]}) {
        if ($cgi->param('revcomp') ne 'checked')
        {@tocheckreverse=(@tocheckreverse,1+$#reverse-$j)}
    else

```

```

{push(@tocheckreverse,$j+$cutreverserev+1)}  });
if ($#tocheckreverse > 0) {print $cgi->start_p(), $cgi->strong("Check
position");
if ($#tocheckreverse==1) {print $cgi->strong(" $tocheckreverse[1] ")}
else {
    if          ($cgi->param('revcomp')          ne          'checked')
    {@tocheckreverse=reverse(@tocheckreverse);
unshift(@tocheckreverse,pop(@tocheckreverse))};
    foreach my$r(@tocheckreverse){print $cgi->strong("$r ")};
print $cgi->strong("on reverse chromatogram."), $cgi->end_p()};

# generating FASTA output
if ($#tocheckforward+$#tocheckreverse==0) {
    my$timeData = localtime(time);
    my$clicktime=$timeData[0];
    if (!open (F, "> seq$clicktime.fas")){die "Writing error: $!"};
    print F ">Seq1\n";
    print F "$sequence1\n";
    print F ">Seq2\n";
    print F "$sequence2\n";
    print $cgi->p($cgi->a({-href =>"seq$clicktime.fas"},'FASTA output'),
    $cgi->br(), "(Right-click and choose 'Save Target As...' to save on
disk)",
    $cgi->br(), "PLEASE NOTE: This output file will remain stable on the
server for at least one minute after its creation, but may be
overwritten afterwards by other users' data!");
    close F};

print $cgi->end_html();

```

III. Résultats

1. Le génome mitochondrial de *Pocillopora* contient deux régions variables

Le génome mitochondrial présente chez de nombreux métazoaires une grande variabilité, au point que le séquençage d'une région de 600 paires de bases dans le gène de la cytochrome oxydase I à l'aide d'amorces universelles (Folmer et al., 1994) pourrait suffire, selon certains auteurs (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b), à identifier la plupart des espèces vivant sur Terre. Dans le cas des coraux du genre *Pocillopora*, cependant, les données de la littérature suggèrent que ce marqueur ne présente aucune variabilité infragénérique (Ridgway, 2002), ce que j'ai pu vérifier sur mon échantillonnage : pas une seule différence de séquence n'a pu être observée pour ce marqueur entre des coraux du genre *Pocillopora* morphologiquement très différents et/ou récoltés à des milliers de kilomètres les uns des autres.

Cette grande stabilité apparente du génome mitochondrial est générale chez les cnidaires (Shearer et al., 2002), et surprenante dans la mesure où des radiations évolutives très récentes dans la quasi-totalité des groupes paraissent peu vraisemblables. Aucune explication satisfaisante n'a été avancée jusqu'à présent : on trouve bien dans le génome mitochondrial des octocoralliaires un gène *mutS* pouvant être impliqué dans la réparation de l'ADN mitochondrial et donc limiter la vitesse d'évolution de celui-ci (Pont-Kingdon et al., 1995; Pont-Kingdon et al., 1998; Culligan et al., 2000), mais le génome mitochondrial des madréporaires séquencés jusqu'à présent ne contient pas de gène inhabituel (van Oppen et al., 2002a; Fukami & Knowlton, 2005; Tseng et al., 2005; Medina et al., 2006). Cependant, il se pourrait que l'homologue du gène *mutS* se trouve chez ces espèces dans le génome nucléaire, et que la protéine correspondante soit ensuite importée dans la mitochondrie.

Malgré cette apparente stabilité, une région non codante du génome mitochondrial des acroporidés, localisée entre le gène codant pour la troisième sous-unité de la cytochrome oxydase et le gène de l'ARN ribosomique 16S, semble présenter un niveau de variabilité suffisant pour permettre de distinguer des espèces proches (van Oppen et al., 2001; Vollmer & Palumbi, 2002; van Oppen et al., 2004). Je me suis efforcé de séquencer la région

intergénique correspondante chez *Pocillopora* à l'aide d'amorces définies par référence aux génomes mitochondriaux de coraux disponibles dans GenBank, mais les gènes situés de part et d'autre chez *Acropora* se sont révélés pratiquement contigus chez *Pocillopora*. Intrigué par ce résultat, j'ai procédé au séquençage complet du génome mitochondrial de *Pocillopora*, ou plus exactement de deux individus de ce genre présentant des morphologies contrastées, ce afin d'y localiser des régions variables susceptibles de servir de marqueurs dans le cadre de mon étude. Il s'est alors avéré que le génome mitochondrial de *Pocillopora* comprenait en réalité deux régions variables : l'une, non codante, localisée entre les gènes *atp8* et *cox1*, et l'autre, apparemment codant pour une protéine nouvelle de fonction inconnue, localisée entre les gènes *atp6* et *nad4*. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication présentée ci-après (article 3).

Article 3 : The mitochondrial genome of *Pocillopora* (Cnidaria: Scleractinia) contains two variable regions: the putative D-loop and a novel ORF of unknown function

Gene (IF 2006 2,72)

soumis le 4 avril 2007, accepté le 4 juillet 2007

The mitochondrial genome of *Pocillopora* (Cnidaria: Scleractinia) contains two variable regions: The putative D-loop and a novel ORF of unknown function

Jean-François Flot*, Simon Tillier

UMR UPMC-CNRS-MNHN-IRD 7138, Département Systématique et Évolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, Case Postale 26, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

Received 2 April 2007; received in revised form 30 June 2007; accepted 4 July 2007
Available online 17 July 2007

Abstract

The complete mitochondrial genomes of two individuals attributed to different morphospecies of the scleractinian coral genus *Pocillopora* have been sequenced. Both genomes, respectively 17,415 and 17,422 nt long, share the presence of a previously undescribed ORF encoding a putative protein made up of 302 amino acids and of unknown function. Surprisingly, this ORF turns out to be the second most variable region of the mitochondrial genome (1% nucleotide sequence difference between the two individuals) after the putative control region (1.5% sequence difference). Except for the presence of this ORF and for the location of the putative control region, the mitochondrial genome of *Pocillopora* is organized in a fashion similar to the other scleractinian coral genomes published to date. For the first time in a cnidarian, a putative second origin of replication is described based on its secondary structure similar to the stem-loop structure of O_L , the origin of L-strand replication in vertebrates. © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Coral; Complete mitochondrial genome; Control region; Second origin of replication

1. Introduction

Pocillopora is a keystone reef-building scleractinian coral genus that used to be abundant on most coral reefs of the world except in the Atlantic; however, it has been heavily impacted by pollution, coral bleaching and predation by the crown-of-thorn starfish *Acanthaster planci* to the point that it is now rare or extinct in several locations (Guzmán, 1991; Loya et al., 2001). Unfortunately, precise assessment of its conservation status is rendered difficult by the lack of a reliable taxonomic framework for this group (Veron and Stafford-Smith, 2000): the morphological taxonomy of this genus is particularly challenging due to extensive phenotypic plasticity observed even within a single colony, whereas, as for many other cnidarians, molecular taxonomy is hampered by the scarcity of available markers.

Abbreviations: H-strand, heavy strand; L-strand, light strand; nt, nucleotide; O_H , origin of replication of the heavy strand; O_L , origin of replication of the light strand; ORF, open reading frame; tRNA, transfer ribonucleic acid.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 40 79 37 52; fax: +33 1 40 79 38 44.

E-mail address: jfflot@mnhn.fr (J.-F. Flot).

This scarcity of molecular taxonomic markers for cnidarians is partly explained by the extremely low level of variation observed in their mitochondrial genomes (van Oppen, 1999; France and Hoover, 2002; Shearer et al., 2002; McFadden et al., 2004; Hellberg, 2006), possibly in relation to the presence of protein-coding mitochondrial genes capable of interacting with DNA: a DNA mismatch-repair gene homologous to bacterial *mutS* is present in octocorallians (Pont-Kingdon et al., 1995, 1998; Culligan et al., 2000), a homing endonuclease was described in the plumose anemone *Metridium senile* (Beagley et al., 1998) and in the zoanthid *Savalia savaglia* (Sinniger et al., 2007), and a putative DNA-dependant DNA polymerase has recently been found in the mitochondrial genome of the scyphozoan jellyfish *Aurelia aurita* (Shao et al., 2006). Unusual protein-coding mitochondrial genes are also present in sponges, but all those described until now appear to have metabolic roles, not to interact with DNA (Lavrov et al., 2005; Erpenbeck et al., 2007; Wang and Lavrov, 2007).

Unlike other cnidarians except corallimorpharians, all scleractinian mitochondrial genomes published to date contain only the usual set of thirteen mitochondrial protein-coding genes also present in mammals (van Oppen et al., 2002; Fukami and

Knowlton, 2005; Tseng et al., 2005; Medina et al., 2006). Nevertheless, scleractinian mitochondrial genomes are as stable as those of other cnidarians, and only a small non-coding region of the mitochondrial genome, located between the cytochrome *c* oxidase subunit 3 and the small ribosomal RNA genes, has been reported to display sufficient variability to distinguish between some congeneric coral species (van Oppen et al., 2001; Vollmer and Palumbi, 2002; van Oppen et al., 2004). This small region is considered as the putative control region and is thus supposed to contain the first origin of replication, even though the exact mechanism of cnidarian mitochondrial genome replication is unknown and a second origin of replication has never been characterized.

As part of a study aiming at revising species boundaries in *Pocillopora* by using molecular tools, we attempted to sequence the putative control region but soon realized that the cytochrome *c* oxidase subunit 3 and small ribosomal RNA genes were actually contiguous in corals belonging to this genus. Intrigued by this result suggesting that the mitochondrial genome of *Pocillopora* might deviate from the standard organization of scleractinian mitochondrial genomes, we decided to sequence the complete mitochondrial genomes of two individuals belonging to two distinct morphospecies of this genus, in order to localize their control region and possibly other variable regions suitable for molecular taxonomy.

2. Materials and methods

2.1. DNA extraction and sequencing

Coral fragments were collected on December 2, 2004 on a coral reef located near the town of Touho in northeastern New Caledonia. Sample 04NC293, attributed to *Pocillopora damicornis* based on its morphology, was collected at 20.8 meters depth, whereas 04NC304, attributed to *Pocillopora eydouxi*, was sampled at 8.6 m depth. Photographs of the colonies sampled are presented in Fig. 1. Fragments were brought back to the surface and their tissues preserved in a modified guanidine solution as in Fukami et al. (2004). DNA was later extracted and purified using an ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation machine. Five generic coral primers (nd5-fl: 5'-GGATCCTCATATTCNCNGNTTYATG-3'; cox3-r1: 5'-GAGAAGGCTCAACCAATGATA-3'; cob-r1: 5'-TTTGAA GGAAGANGGCAARTC-3', rns-fl: 5'-GTTAGTACAAA-TAGTCCGTCGCC-3'; cox1-r1: 5'-TCGTCTTGGAAATCCTGCTAA-3') were designed based on alignments of cnidarian sequences available in GenBank and used together with the universal LCO1490 primer (Folmer et al., 1994) to amplify three large overlapping fragments approximately 9000, 5400 and 5800 nucleotides long. These fragments were then sequenced on both strands (Genoscreen, Lille, France) by primer walking.

2.2. Analysis and annotation of the complete mitochondrial genomes

Examination of all open reading frames (ORFs) and codon usage as well as various DNA statistics were performed using the Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000), version 2 (avail-

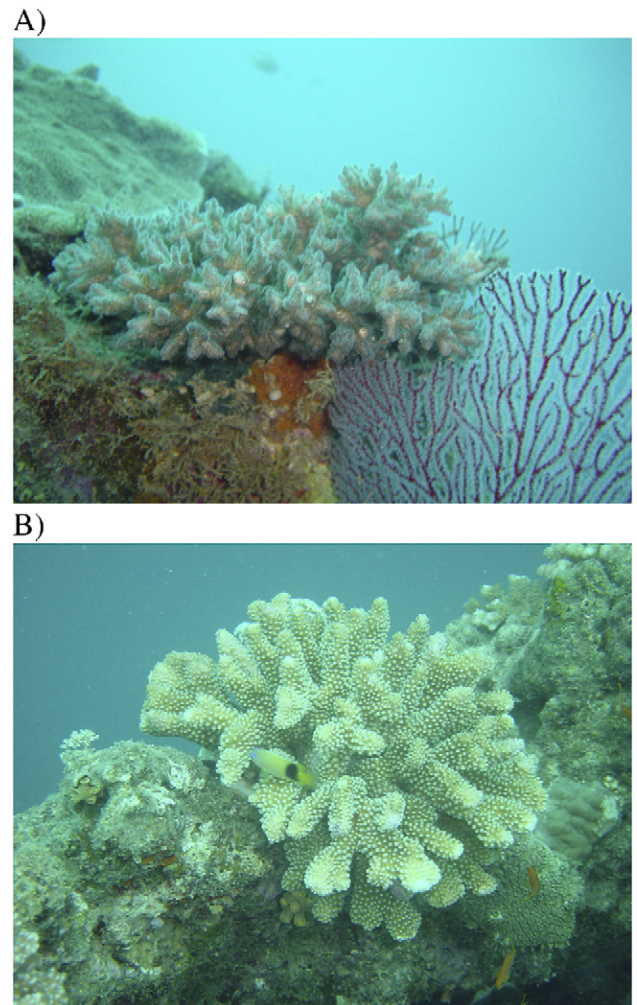


Fig. 1. Underwater photographs of the two corals sequenced. A) 04NC293, attributed to *Pocillopora damicornis*. B) 04NC304, attributed to *Pocillopora eydouxi*.

able at <http://bioinformatics.org/sms2/>). Protein-coding and ribosomal RNA genes were identified by performing similarity searches in GenBank using BLAST (Benson et al., 2004) or by looking for characteristic suites of amino acids in the transcribed ORF sequences. The ends of the large and small subunit ribosomal RNA genes were assumed to be adjacent to the ends of their neighboring genes (as in Lavrov et al., 2000). tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997) was used to search for tRNAs in the mitochondrial genome sequences, and secondary structures of various stretches of RNA and DNA were examined by using RNAstructure 4.3 (Mathews et al., 2004) available online at <http://rna.urmc.rochester.edu/rnastructure.html>. Protein domains were searched for and identified using SMART 5 (Letunic et al., 2006). The mitochondrial genome sequences of 04NC293 and 04NC304 are available in GenBank (accession numbers EF526302 and EF526303).

3. Results and discussion

3.2. Genome organization and nucleotide composition

The two mitochondrial genomes sequenced slightly differ in length due to the presence of small indels in the large subunit

ribosomal RNA gene and in an intergenic non-coding region: total lengths are 17,415 nt and 17,422 nt (Table 1). These sizes are within the range of mitochondrial genome sizes previously reported from scleractinian corals, the longest being 19,387 nt for *Siderastrea radians* and the shortest 14,853 nt for *Astrangia* sp. (Medina et al., 2006).

Both genomes contain the 13 mitochondrial protein-coding genes typical of metazoans, encoding the subunits 1 to 6 and 4 L of NADH dehydrogenase (*nad1-6*, *nad4 L*), cytochrome b (*cob*), the subunits 6 and 8 of ATP synthase (*atp6*, *atp8*), and the subunits 1 to 3 of cytochrome c oxidase (*cox1-3*). They also contain the transfer RNA genes associated with formyl-methionine (*trnM*) and tryptophan (*trnW*), the large (*rnl*) and small (*rns*) subunit ribosomal RNA genes and a novel ORF of unknown function (Fig. 2).

Except for the presence of this ORF and for the locations and sizes of intergenic regions, this organization is similar to that published for other species of scleractinian corals (van Oppen et al., 2002; Fukami and Knowlton, 2005; Medina et al., 2006): gene order is the same, all genes are found on the same strand and are therefore transcribed in the same direction (see arrow on Fig. 2) and the *nad5* gene is interrupted by one group I intron.

The coding strand has the following base composition: 26.9% A, 11.2% C, 18.9% G, and 43% T. According to its G+T content of 61.9%, the coding strand is the H (heavy) strand,

which means that all genes are actually transcribed from the lighter L-strand as in other coral species but also as in *Halocynthia*, *Caenorabditis* and *Ascaris* (Yokobori et al., 1999). By contrast, the major coding strand is the L-strand in mammals and most other metazoan groups. The A+T content of *Pocillopora* is 69.9%, the highest value of all cnidarian mitochondrial genomes sequenced to date (other values range from 51.7% in *Savalia savaglia* to 68.3% in *Astrangia* sp., with an average of 62.5%).

3.3. Repartition of variability

There are a total of 32 nucleotide differences between the genomes of *P. damicornis* and *P. eydouxi*: 14 transitions, 9 transversions and 4 indels respectively 1, 1, 1 and 6 nt long, resulting in an average difference of 0.18%. Two regions contain most of these differences (Fig. 3): the intergenic region 11 (13 differences) and the ORF (9 differences). As a result, these two regions have the highest percentage differences among all mitochondrial regions: 1.5% for *igr11*, and 1.0% for the ORF, the third highest percentage difference being 0.29% (in *atp6* and in *nad3*). No variable position was found in any intergenic region except *igr11*, which is consistent with the lack of variation observed by Conception et al. (2006) in their analysis of *igr1* from four morphospecies of *Pocillopora* (*P. damicornis*, *P. danae*,

Table 1
Position and size of all coding and non-coding regions in the two mitochondrial genomes determined (numbers of overlapping nucleotides between contiguous regions are shown on the right side of the table)

Region	Position in 04N293	Position in 04NC304	Length in 04N293	Length in 04NC304	Number of encoded amino acids	Start codon	Stop codon	
<i>trnM</i>	1–71	1–71		71 nt				
<i>rnl</i>	72–1987	72–1988	1916 nt	1917 nt				
<i>nad5</i> (5')	1988–2698	1989–2699		711 nt	237	ATG		
<i>igr1</i>	2699–2822	2700–2823		124 nt				
<i>nad1</i>	2823–3800	2824–3801		978 nt	325	ATG	TAA	
<i>igr2</i>	3801–3851	3802–3852		51 nt				
<i>cob</i>	3852–4991	3853–4992		1140 nt	379	GTG	TAA	
<i>igr3</i>	4992–4995	4993–4996		4 nt				
<i>nad2</i>	4996–6303	4997–6304		1308 nt	435	ATT	TAA	
<i>igr4</i>	6304	6305		1 nt				
<i>nad6</i>	6305–6868	6306–6869		564 nt	187	ATG	TAA	1
<i>atp6</i>	6868–7545	6869–7546		678 nt	225	ATG	TAA	
<i>igr5</i>	7546–7547	7547–7548		2 nt				
ORF	7548–8456	7549–8457		909 nt	302	ATG	TAG	
<i>igr6</i>	8457–8890	8458–8891		434 nt				
<i>nad4</i>	8891–10,381	8892–10,382		1491 nt	496	ATA	TAG	
<i>rns</i>	10,382–11,290	10,383–11,291		909 nt				
<i>cox3</i>	11,291–12,070	11,292–12,071		780 nt	259	ATG	TAA	
<i>igr7</i>	12,071–12,081	12,072–12,082		11 nt				
<i>cox2</i>	12,082–12,882	12,083–12,883		801 nt	266	ATG	TAG	19
<i>nad4L</i>	12,864–13,163	12,865–13,164		300 nt	99	ATG	TAA	
<i>nad3</i>	13,163–13,507	13,164–13,508		345 nt	114	ATG	TAA	1
<i>igr8</i>	13,508–13,561	13,509–13,562		54 nt				
<i>nad5</i> (3')	13,562–14,689	13,563–14,690		1128 nt	375		TAA	
<i>igr9</i>	14,690–14,701	14,691–14,702		12 nt				
<i>trnW</i>	14,702–14,771	14,703–14,772		70 nt				
<i>igr10</i>	14,772	14,773		1 nt				
<i>atp8</i>	14,773–14,985	14,774–14,986		213 nt	70	ATG	TAA	
<i>igr11</i>	14,986–15,828	14,987–15,835	843 nt	849 nt				
<i>cox1</i>	15,829–17,388	15,836–17,395		1560 nt	519	ATG	TAA	
<i>igr12</i>	17,389–17,415	17,396–17,422		27 nt				

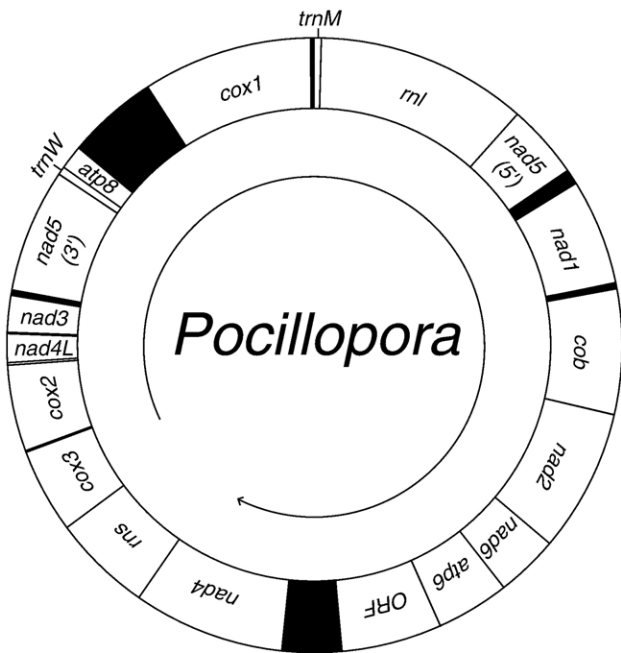


Fig. 2. Gene map of the mitochondrial genome of *Pocillopora* (drawn to scale). Non-coding intergenic regions are filled in black, whereas the space between the two lines separating *cox2* from *nad4L* represents the large overlap (19 nucleotides) observed between these two genes. All genes are transcribed in the same orientation, as represented by the circular arrow.

P. eydouxi and *P. meandrina*). Conception et al. also did not find any variable position in the *nad5* (5') and *nad1* genes located on each side of *igr1*, as in the present study.

Only two variable positions were found in *cox1*, the gene proposed as a universal marker for metazoan species identification (Hebert et al., 2003a,b). Unfortunately, these two positions are located outside of the 710 nt Folmer region proposed for DNA barcoding studies, which may explain why former analyses of *cox1* in *Pocillopora* using this region failed to detect any variation (Ridgway, 2002). One variable position was found within the I3-M11 *cox1* partition that has been recently singled-out as more informative in corals and sponges (Erpenbeck et al., 2006). However, the other variable site is located so near the 5' end of *cox1* that it would have been nearly

impossible to sequence it without prior knowledge of the sequence of *igr11* (Fig. 4).

3.4. Protein-coding genes

A total of 14 protein-coding genes were detected, 13 of which are commonly found in other metazoan mitochondrial genomes (*atp6*, *atp8*, *cob*, *cox1-3*, *nad1-6*, *nad4L*). All protein-coding genes start with the usual ATG, except *cob* that uses GTG as start codon (Table 1). All 14 genes have complete termination codons: TAA for most of them except *nad4*, *cox2* and the ORF that end in TAG. As in other cnidarian mitochondrial genomes sequenced to date, a moderate amount of overlap occurs between protein-coding genes: the third nucleotide of the stop codon of *nad6* (TAA) is also the first nucleotide of the initiation codon of *atp6* (ATG), and there is a similar overlap between *nad4L* and *nad3* (Table 1). Moreover, an overlap of 19 nucleotides was inferred between the 3' end of *cox2* and the 5' end of *nad4L*, as reported previously from the mitochondrial genome of *Montastrea annularis* (Fukami and Knowlton, 2005).

No statistically significant difference in codon usage was detected between the two *Pocillopora* mitochondrial genomes in a two-tailed Fisher test (Agresti, 1992), so only one codon usage chart is presented here (Table 2). As expected from the high A + T content of the mitochondrial genome of *Pocillopora*, there appears to be a general preference for codons ending in A or T over codons ending in G or C (except for GGG that is the most frequent codon for glycine): only 4.1% of all codons (including those in the ORF) end in C, and TAA is 2.5 times more common than TAG as a stop codon. Of the 14 nucleotide substitutions found in protein-coding genes, 6 are synonymous and 8 are nonsynonymous. As a result, a dN/dS ratio of 0.39 was estimated using the method of Nei and Gojobori (1986), which is higher than values usually reported for metazoan mitochondrial genomes (Bazin et al., 2006).

The ORF putatively encodes a protein long of 302 amino acids; out of the 9 nucleotide differences detected in this ORF, four are synonymous and five are non-synonymous (see arrows on Fig. 5). The dN/dS ratio for the ORF alone is 0.37, a value close to the ratio for the rest of the mitochondrial genome (0.44)

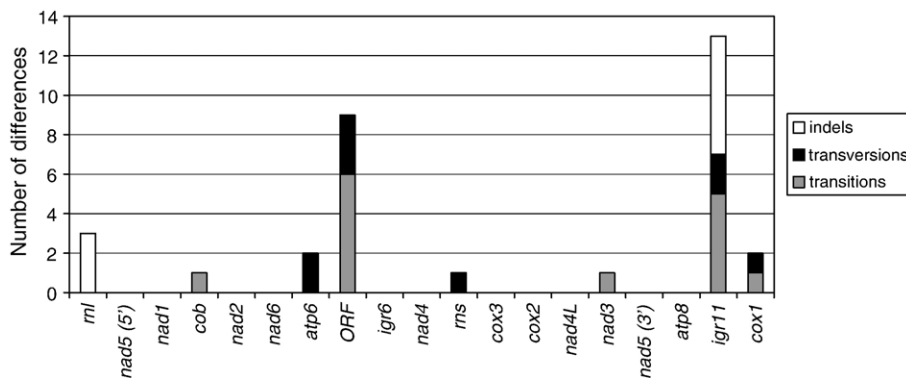


Fig. 3. Repartition of the sequence differences observed between the two *Pocillopora* mitochondrial genomes. For the sake of clarity, all intergenic regions except the two largest ones (*igr6* and *igr11*) were omitted from the diagram.

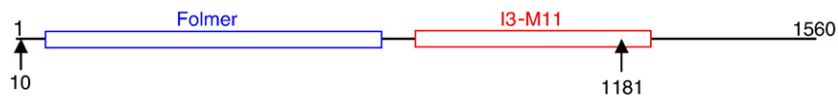


Fig. 4. Map of the *cox1* gene of *Pocillopora* (arrows indicate variable nucleotide positions).

and for the mitochondrial genome as a whole (0.39), as expected since all mitochondrial genes are linked and recombination is absent or extremely rare in metazoans. To verify whether this ORF had biological significance and to try to determine its function, the same region was sequenced in the mitochondrial genomes of *Seriatopora* and *Stylophora*, two genera closely related to *Pocillopora*. Alignment of the four amino acid sequences is presented in Fig. 5: despite extensive variation in the central region, there are strong similarities between *Pocillopora*, *Seriatopora* and *Stylophora* over large regions at the beginning and at the end of the putative protein. This strongly suggests that the protein is expressed, but databases searches for conserved amino acid patterns yielded no information on its possible function except that it has two putative transmembrane domains (located in the conserved regions at the beginning and at the end of the protein, see Fig. 5); by contrast, all other unusual protein-coding genes discovered in cnidarian mitochondrial genomes contain amino acid patterns characteristic of interaction with DNA (Pont-Kingdon et al., 1995; Beagley et al., 1998; Shao et al., 2006).

3.5. RNA genes

The small and large mitochondrial ribosomal RNA genes of *Pocillopora* are located almost opposite to each other on the circular genome (Fig. 2) as in other corals, but unlike most other metazoans in which mitochondrial rRNA genes are usually clustered (Boore, 1999).

Only two transfer RNA genes were detected: *trnM* (formyl-methionine) and *trnW* (tryptophan), as in most other cnidarian

mitochondrial genomes (except octocorallians where only *trnM* is present). Transfer RNA genes that are missing in comparison with other metazoan mitochondrial genomes may be encoded in the nucleus and later imported into the mitochondrion, as suggested in other organisms (Schneider and Maréchal-Drouard, 2000). Putative secondary structures for the two tRNA genes of *Pocillopora* are presented in Fig. 6.

3.6. Non-coding regions

The 11 intergenic regions identified make up a total of 1564–1570 nucleotides, i.e. about 9% of the total length of the mitochondrial genome of *Pocillopora*. Nearly 90% of these non-coding nucleotides are found in three major intergenic regions (*igr1*, *igr6* and *igr11*, respectively 124, 434 and 843–846 nucleotides long), each of them large enough to represent a likely candidate for the control region that is responsible for the initiation of mitochondrial DNA replication. The other non-coding regions, ranging in size from 1 to 54 nt, are much shorter than the control region of *Strongylocentrotus purpuratus* that is, with a length of only 121 nucleotides, the shortest control region ever described (Jacobs et al., 1988).

To determine which one among *igr1*, *igr6* and *igr11* has the best chance to act as control region, three criteria can be used: size, variability and the presence of tandemly arranged repeated sequences. The control region usually corresponds to the longest non-coding region of a mitochondrial genome, which would make *igr11* the likeliest candidate. Mitochondrial control regions are also characterized by their high variability and mutation rate (Upholt and Dawid, 1977; Walberg and Clayton,

Table 2

Total number of occurrences of each codon in the 13 usual mitochondrial protein genes and in the ORF of 04NC293 (*Pocillopora damicornis*)

	13 genes		ORF		13 genes		ORF		13 genes		ORF		13 genes		ORF	
Phe	TTT	512	14	Ser	TCT	158	7	Tyr	TAT	144	7	Cys	TGT	42	0	
	TTC	18	0		TCC	4	0		TAC	8	1		TGC	1	2	
Leu	TTA	331	13	Pro	TCA	31	3	End	TAA	10	0	Trp	TGA	67	5	
	TTG	99	4		TCG	16	3		TAG	3	1		TGG	25	1	
Leu	CTT	148	4	Thr	CCT	70	2	His	CAT	70	4	Arg	CGT	20	2	
	CTC	4	0		CCC	11	3		CAC	6	1		CGC	2	1	
	CTA	15	3		CCA	36	6		Gln	CAA	72		12	CGA	27	2
	CTG	3	1		CCG	17	0		CAG	11	3		CGG	6	3	
Ile	ATT	299	8	Ala	ACT	77	3	Asn	AAT	104	16	Ser	AGT	69	10	
	ATC	17	1		ACC	4	0		AAC	11	4		AGC	6	0	
Met	ATA	97	9	Gly	ACA	50	6	Lys	AAA	108	1	Arg	AGA	20	5	
	ATG	92	7		ACG	15	2		AAG	13	3		AGG	7	8	
Val	GTT	237	12	Glu	GCT	104	9	Asp	GAT	71	9	Gly	GGT	94	11	
	GTC	9	2		GCC	16	3		GAC	12	3		GGC	22	5	
	GTA	31	12		GCA	56	1		GAA	75	15		GGA	90	3	
	GTG	33	10	GCG	29	0	GAG	36	8	GGG	108	9				

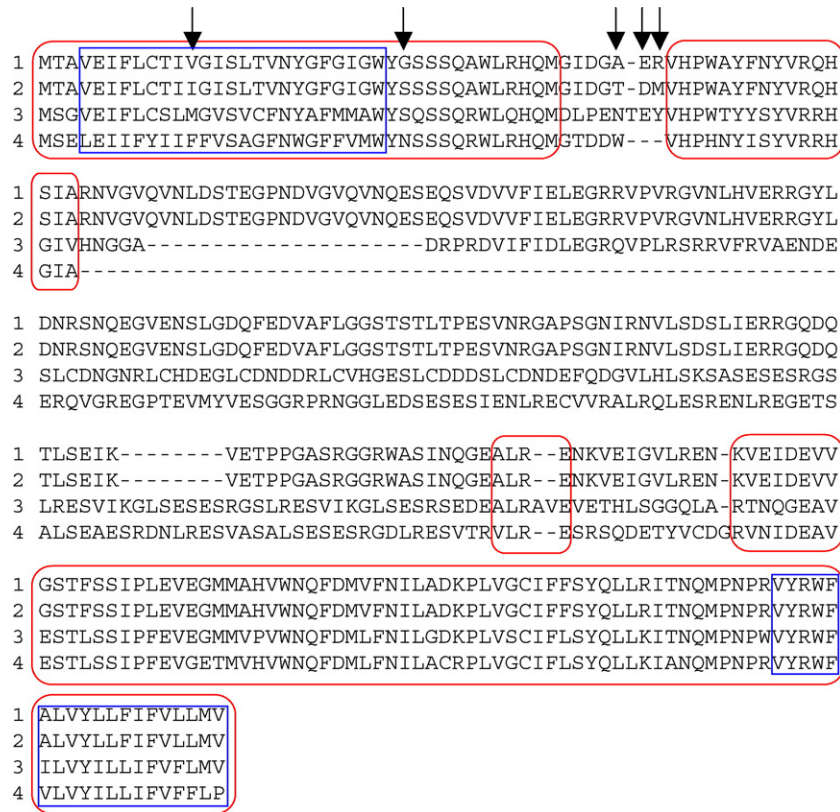


Fig. 5. Alignment of the translated ORF sequences of *Pocillopora* (line 1: 04NC293; line 2: 04NC304), *Stylophora* (line3) and *Seriatopora* (line 4). Red boxes indicate conserved regions, blue boxes are drawn around the two putative transmembrane domains, and arrows show amino acid positions that differ between the two *Pocillopora* sequences.

1981; Parsons et al., 1997): since there are 13 differences between the *igr11* sequences of the two individuals sequenced, and none in *igr1* nor *igr6*, the variability criterion also favors

igr11. However, no repeats were detected in the sequence of *igr11*, whereas close examination of *igr6* revealed the presence

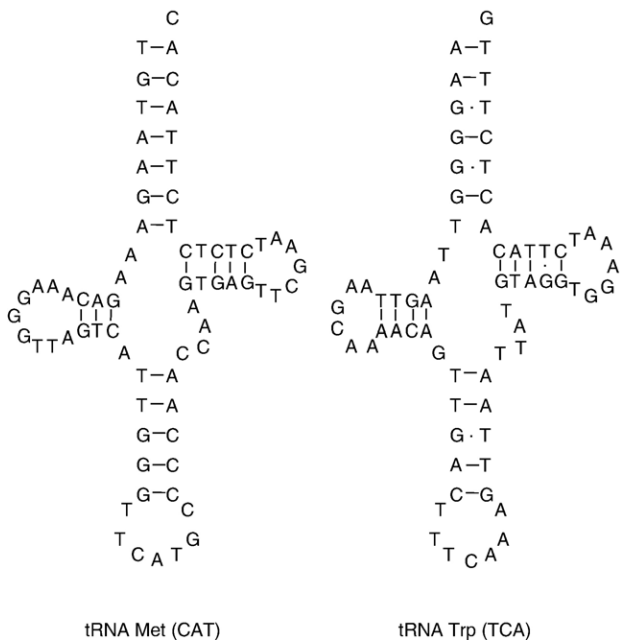


Fig. 6. Cloverleaf representations of the two tRNAs found in the mitochondrial genome of *Pocillopora*. Non-Watson–Crick GT pairs are represented by specific symbols (points).

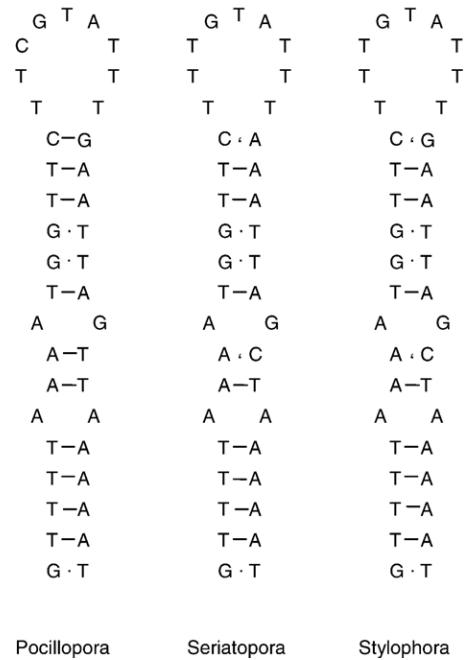


Fig. 7. Stem-loop structures at the 3' end of *igr6* in *Pocillopora*, *Seriatopora* and *Stylophora*. Non-Watson–Crick GT and AC pairs are represented by specific symbols (points and apostrophes, respectively).

of three contiguous head-to-tail repeats (i.e., tandem repeats) of a block of 92 nucleotides, with an additional incomplete repetition on each side of the three-repeat cluster.

This second largest non-coding region, *igr6*, is located about two-thirds of the mitochondrial genome away from *igr11* in the direction of transcription, which is similar to the distance observed in the mammalian mitochondrial genome between the origins of replication of the L and H strands (O_L and O_H) (Taanman, 1999). Moreover, a 39-nucleotide DNA fragments with the potential to form a stem-loop structure is located at the 3' end of *igr6* near the *nad4* gene. Such structure is known to be a characteristic feature of O_L in vertebrates (Johansen et al., 1990; Clayton, 1991) that is conserved between distantly related species (Anderson et al., 1982) and is required for initiation of replication of the L-strand (Hixson et al., 1986). Mitochondrial replication in other taxa is poorly understood, except in *Drosophila* where both origins of replication are located in the A+T rich region near a conserved stem-loop structure similar to the one observed in *Pocillopora* (Saito et al., 2005). To determine whether this loop is conserved in taxa related to *Pocillopora*, we sequenced *igr6* from *Seriatopora* and *Stylophora*. Although these two genera have a *igr6* sequence that is very divergent from the one of *Pocillopora* and much shorter (149 and 129 nt, respectively), a fragment of 52 nt that includes the stem-loop structure is strongly conserved among the three genera (Fig. 7). This leads us to propose that the loop located in *igr6* may function as a second origin of replication in the mitochondrial genome of *Pocillopora*, which would support the putative identification of *igr11* as the control region.

3.7. Implications regarding the molecular taxonomy of *Pocillopora*

The findings presented here suggest that the putative control region and the ORF may be variable enough to be used as molecular markers to shed light on the taxonomy and phylogeography of *Pocillopora*. Since these two regions encompass respectively 39 and 29 percents of the differences between the two genomes sequenced, by sequencing both markers one could hope to capture about two thirds of the overall amount of mitochondrial genome variability. Moreover, knowledge of the complete mitochondrial genome of *Pocillopora* will make it easy to design specific primers targeting these two regions.

Acknowledgements

Sampling for this project was supported by a grant from the program *Structure et évolution des écosystèmes*, and molecular analyses by a grant from the program *Etat et structure phylogénétique de la biodiversité actuelle et fossile*. Thanks to Claude Payri, Jean-Louis Menou, Eric Folcher and Catherine Geoffroy for helping with sample collection in New Caledonia, and to Annie Tillier, Josie Lambourdière and Céline Bonillo for assistance with PCR amplification at the *Service de Systématique Moléculaire* (IFR101). The useful remarks of two anonymous reviewers are acknowledged. Thanks also to Alexandre Hassanin for critically reading an earlier version of

the manuscript, and to Julien Lorion, Nicolas Puillandre and Sarah Samadi for useful discussions.

References

- Agresti, A., 1992. A survey of exact inference for contingency tables. *Stat. Sci.* 7, 131–153.
- Anderson, S., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F., Young, I.G., 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156, 683–717.
- Bazin, E., Glemin, S., Galtier, N., 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312, 570–572.
- Beagley, C.T., Okimoto, R., Wolstenholme, D.R., 1998. The mitochondrial genome of the sea anemone *Metridium senile* (Cnidaria): introns, a paucity of tRNA genes, and a near-standard genetic code. *Genetics* 148, 1091–1108.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L., 2004. GenBank: update. *Nucleic Acids Res.* 32, D23–D26.
- Boore, J., 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27, 1767–1780.
- Clayton, D.A., 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 453–478.
- Conception, G.T., Medina, M., Toonen, R.J., 2006. Noncoding mitochondrial loci for corals. *Mol. Ecol. Notes* 6, 1208–1211.
- Culligan, K.M., Meyer-Gauen, G., Lyons-Weiler, J., Hays, J.B., 2000. Evolutionary origin, diversification and specialization of eukaryotic MutS homolog mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res.* 28, 463–471.
- Erpenbeck, D., Hooper, J.N.A., Wörheide, G., 2006. COI phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life'—are we sequencing a suboptimal partition? *Mol. Ecol. Notes* 6, 550–553.
- Erpenbeck, D., et al., 2007. Mitochondrial diversity of early-branching Metazoa is revealed by the complete mt genome of a haplosclerid demosponge. *Mol. Biol. Evol.* 24, 19–22.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- France, S.C., Hoover, L.L., 2002. DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiologia* 471, 149–155.
- Fukami, H., Knowlton, N., 2005. Analysis of complete mitochondrial DNA sequences of three members of the *Montastraea annularis* coral species complex (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia). *Coral Reefs* 24, 410–417.
- Fukami, H., et al., 2004. Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. *Nature* 427, 832–835.
- Guzmán, H.M., 1991. Restoration of coral reefs in Pacific Costa Rica. *Conserv. Biol.* 5, 189–194.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270, 313–321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.* 270, S96–S99.
- Hellberg, M., 2006. No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evol. Biol.* 6, 24.
- Hixson, J., Wong, T., Clayton, D., 1986. Both the conserved stem-loop and divergent 5'-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand DNA replication. *J. Biol. Chem.* 261, 2384–2390.
- Jacobs, H.T., Elliott, D.J., Math, V.B., Farquharson, A., 1988. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 202, 185–217.
- Johansen, S., Guddal, P.H., Johansen, T., 1990. Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Res.* 18, 411–419.
- Lavrov, D.V., Boore, J.L., Brown, W.M., 2000. The complete mitochondrial DNA sequence of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Mol. Biol. Evol.* 17, 813–824.

- Lavrov, D.V., Forget, L., Kelly, M., Lang, B.F., 2005. Mitochondrial genomes of two demosponges provide insights into an early stage of animal evolution. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1231–1239.
- Letunic, I., Copley, R.R., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J., Bork, P., 2006. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res.* 34, D257–D260.
- Lowe, T., Eddy, S., 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25, 955–964.
- Loya, Y., Sakai, K., Yamazato, K., Nakano, Y., Sambali, H., Van Woesik, R., 2001. Coral bleaching: the winners and the losers. *Ecol. Lett.* 4, 122–131.
- Mathews, D.H., Disney, M.D., Childs, J.L., Schroeder, S.J., Zuker, M., Turner, D.H., 2004. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7287–7292.
- McFadden, C.S., Tullis, I.D., Breton Hutchinson, M., Winner, K., Sohm, J.A., 2004. Variation in coding (NADH dehydrogenase subunits 2, 3, and 6) and noncoding intergenic spacer regions of the mitochondrial genome in Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Mar. Biotechnol. (NY)* 6, 516–526.
- Medina, M., Collins, A.G., Takaoka, T.L., Kuehl, J.V., Boore, J.L., 2006. Naked corals: skeleton loss in Scleractinia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9096–9100.
- Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418–426.
- Parsons, T.J., et al., 1997. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat. Genet.* 15, 363–368.
- Pont-Kingdon, G., et al., 1995. A coral mitochondrial *mutS* gene. *Nature* 375.
- Pont-Kingdon, G., et al., 1998. Mitochondrial DNA of the coral *Sarcophyton glaucum* contains a gene for a homologue of bacterial MutS: a possible case of gene transfer from the nucleus to the mitochondrion. *J. Mol. Evol.* 46, 419–431.
- Ridgway, T., 2002. Testing the applicability of molecular genetic markers to population analyses of scleractinian corals. *Symbiosis* 33, 243–261.
- Saito, S., Tamura, K., Aotsuka, T., 2005. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics* 171, 1695–1705.
- Schneider, A., Maréchal-Drouard, L., 2000. Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol.* 10, 509–513.
- Shao, Z., Graf, S., Chaga, O.Y., Lavrov, D.V., 2006. Mitochondrial genome of the moon jelly *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa): a linear DNA molecule encoding a putative DNA-dependent DNA polymerase. *Gene* 381, 92–101.
- Shearer, T.L., van Oppen, M.J.H., Romano, S.L., Wörheide, G., 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Mol. Ecol.* 11, 2475–2487.
- Sinniger, F., Chevalloné, P., Pawlowski, J., 2007. Mitochondrial genome of *Savalia savaglia* (Cnidaria, Hexacorallia) and early metazoan phylogeny. *J. Mol. Evol.* 64, 196–203.
- Stothard, P., 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28, 1102–1104.
- Taanman, J.W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1410, 103–123.
- Tseng, C.C., Wallace, C.C., Chen, C.A., 2005. Mitogenomic analysis of *Montipora cactus* and *Anacropora matthai* (cnidaria; scleractinia; acroporidae) indicates an unequal rate of mitochondrial evolution among Acroporidae corals. *Coral Reefs* 24, 502–508.
- Upholt, W.B., Dawid, I.B., 1977. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D loop region. *Cell* 11, 571–583.
- van Oppen, M.J.H., 1999. Atypically low rate of cytochrome *b* evolution in the scleractinian coral genus *Acropora*. *Proc. Biol. Sci.* 266, 179–183.
- van Oppen, M.J.H., McDonald, B.J., Willis, B., Miller, D.J., 2001. The evolutionary history of the coral genus *Acropora* (Scleractinia, Cnidaria) based on a mitochondrial and a nuclear marker: reticulation, incomplete lineage sorting, or morphological convergence? *Mol. Biol. Evol.* 18, 1315–1329.
- van Oppen, M.J., Catmull, J., McDonald, B.J., Hislop, N.R., Hagerman, P.J., Miller, D.J., 2002. The mitochondrial genome of *Acropora tenuis* (Cnidaria; Scleractinia) contains a large group I intron and a candidate control region. *J. Mol. Evol.* 55, 1–13.
- van Oppen, M.J.H., Koolmees, E.M., Veron, J.E.N., 2004. Patterns of evolution in the scleractinian coral genus *Montipora* (Acroporidae). *Mar. Biol.* 144, 9–18.
- Veron, J.E.N., Stafford-Smith, M., 2000. *Corals of the World*. Australian Institute of Marine Science.
- Vollmer, S.V., Palumbi, S.R., 2002. Hybridization and the evolution of reef coral diversity. *Science* 296, 2023–2025.
- Walberg, M.W., Clayton, D.A., 1981. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 5411–5421.
- Wang, X., Lavrov, D.V., 2007. Mitochondrial genome of the homoscleromorph *Oscarella carmela* (Porifera, Demospongiae) reveals unexpected complexity in the common ancestor of sponges and other animals. *Mol. Biol. Evol.* 24, 363–373.
- Yokobori, S., et al., 1999. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the ascidian *Halocynthia roretzi* (Chordata, Urochordata). *Genetics* 153, 1851–1862.

2. A Hawaii, données mitochondriales et nucléaires sont compatibles avec la morphologie

Les marqueurs mitochondriaux et nucléaires mis au point pendant ma thèse ont été testés dans un premier temps sur la plus petite des populations échantillonnées, celle d'Hawaii, où la diversité morphologique des coraux du genre *Pocillopora* est suffisamment faible pour permettre l'attribution non-ambiguë de chaque échantillon récolté à un morphotype donné. Les résultats préliminaires du séquençage de l'ITS2 dans cette population d'Hawaii ont fait l'objet d'une publication dans les actes du 10^e symposium international sur les coraux (International Coral Reef Symposium), qui s'est tenu en juillet 2004 à Okinawa (article 4). Les résultats obtenus en utilisant l'ensemble des marqueurs, mitochondriaux et nucléaires, sont quant à eux décrits dans un manuscrit en cours de préparation (article 5).

Pour tous les marqueurs nucléaires étudiés plus de deux séquences ont été observées chez certains individus, alors qu'on se serait attendu à un maximum de deux allèles par individu diploïde (sauf éventuellement pour les ITS, présents en plusieurs centaines de copies par génome eucaryote). L'article 4, basé uniquement sur les résultats obtenus pour l'ITS2, ne le mentionne pas car seul un individu d'Hawaii possédait trois versions de ce marqueur, et la troisième séquence, d'intensité plus faible, avait alors été considérée comme artéfactuelle. Cependant des nombres élevés de séquences (jusqu'à cinq pour l'intron du facteur d'élongation-1 α) ont été détectés par la suite dans de nombreux individus pour chaque marqueur nucléaire étudié. Ceci m'a conduit à employer dans l'article 5 le terme 'haplotype', introduit par Ruggero Ceppellini (1967) pour désigner le génotype haploïde d'une portion d'ADN ou d'un chromosome, plutôt que le terme 'allèle' qui implique une relation d'orthologie entre les séquences.

L'article 5 introduit également une façon nouvelle de représenter, sur un réseau d'haplotype, les champs de recombinaison (*sensu* Doyle, 1995) en reliant par des courbes les haplotypes présents dans un même individu. Cette représentation est applicable à tout marqueur de séquence non-haploïde, et permet de repérer rapidement quels groupes d'haplotypes correspondent à des groupes d'individus.

Article 4 : Molecular phylogeny and systematics of the scleractinian coral genus *Pocillopora* in Hawaii

Proceedings of the 10th International Coral Reef Symposium

soumis le 30 août 2004, accepté le 4 août 2005

Molecular phylogeny and systematics of the scleractinian coral genus *Pocillopora* in Hawaii

Jean-François FLOT^{1*} and Simon TILLIER¹

¹UMR 7138 "Systématique, Adaptation, Evolution", Département Systématique et Evolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

*Corresponding author: J.-F. Flot

FAX: +33 1 40 79 38 44, email: jfflot@mnhn.fr

Abstract Corals of the genus *Pocillopora* are major reef builders ranging from the eastern coasts of Africa to the western coasts of America. However, the systematics of these keystone organisms is unclear, possibly due to morphological plasticity in response to environmental parameters such as light and wave action. To investigate species boundaries in Hawaiian populations of *Pocillopora*, 37 individuals representative of the five morphotypes of *Pocillopora* present in Hawaii were collected on the reefs of Oahu. For each individual we amplified and sequenced 750 base pairs of a repeated ribosomal DNA (rDNA) region comprising part of the 5.8S RNA gene, the complete Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) and part of the 28S RNA gene. We found 25 variable characters, and the resulting unrooted phylogenetic tree of alleles was consistent with the monophyly of *P. ligulata* and *P. eydouxi* in Hawaii. On the other hand, Hawaiian *P. damicornis*, *P. meandrina* and *P. molokensis* appeared non-monophyletic, which could result from introgressive hybridization, ongoing speciation or retention of an ancestral polymorphism at this locus.

Keywords Scleractinia, Hawaii, taxonomy, speciation, hybridization

Introduction

Corals of the genus *Pocillopora* have been severely impacted on most reefs of the world by bleaching (Fisk and Done 1985; Williams and Bunkley-Williams 1990; Paulay and Benayahu 1999; Mumby et al. 2001; McClanahan et al. 2004) and are favorite preys of the crown-of-thorn starfish *Acanthaster planci* (Ormond et al. 1976; Chess et al. 1997; Cortés 1997). The demise of these keystone reef-building organisms threatens the coral reef ecosystem as a whole, and a prerequisite to understanding the causes and consequences of this demise is a sound knowledge of the systematics, ecology and evolution of this group of marine invertebrates.

Species of *Pocillopora* are notoriously difficult to identify due to the lack of unequivocal morphological characters. Moreover, corals of this genus show an extraordinary range of morphological diversity that has

led to the coining of more than 40 species names. At the end of the 19th century, it was already clear that species of *Pocillopora* had "already been far too much multiplied" (Brüggemann 1879). Wood Jones (1910) considered that all forms observed in the Cocos-Keeling Atoll were growth variants resulting from differences in environmental conditions, whereas other authors distinguished four (Veron and Pichon 1976), five (Dai 1989), nine (Reyes-Bonilla 2002) or seventeen species of *Pocillopora* (Veron and Stafford-Smith 2000). Despite this confusion, no molecular analysis has ever been conducted to clarify species boundaries and to determine the actual number of species.

Interestingly, corals of the genus *Pocillopora* show a diversity of reproductive strategies. Corals attributed to *P. verrucosa* spawn in the Red Sea (Fadlallah 1985; Shlesinger and Loya 1985), in South Africa (Kruger and Schleyer 1998), in the Maldives (Sier and Olive 1994) and in Okinawa (Kinzie 1993), but reportedly brood in Enewetak (Stimson 1978). Similarly, populations attributed to *P. damicornis* spawn in the eastern Pacific (Glynn et al. 1991), brood in Hawaii (Kolinski and Cox 2003) and display both strategies in western Australia (Ward 1992). Obviously, such observations are difficult to interpret without a reliable taxonomical framework.

In Hawaii, *Pocillopora* presents five relatively well-defined and easily recognizable morphotypes known as *P. damicornis* (Fig. 1), *P. meandrina* (Fig. 2), *P. ligulata* (Fig. 3), *P. eydouxi* (Fig. 4) and *P. molokensis* (Fig. 5). The question whether the morphotype called *P. meandrina* in Hawaii and elsewhere represents a separate entity from *P. verrucosa* and *P. elegans* is debated (see discussion in Reyes-Bonilla 2002). Affinities between central Indo-Pacific, Hawaiian and far eastern occurrences of *P. ligulata* are also unclear, whereas *P. molokensis* is considered a Hawaiian endemic species (Veron and Stafford-Smith 2000).

These five Hawaiian morphotypes differ in reproductive biology and habitat preference: *P. damicornis* is a brooder, *P. meandrina* spawns and the reproductive modes of *P. eydouxi*, *P. ligulata* and *P. molokensis* are unknown (Kolinski and Cox 2003). *P. damicornis* is mostly found in calm, shallow waters, *P. meandrina* and *P. ligulata* on shallow reef parts exposed

to wave action, *P. eydouxi* in deeper, exposed locations, and *P. molokensis* in deep waters only (below 20 meters).



Fig. 1. *Pocillopora damicornis* (photo J.-F. Flot)

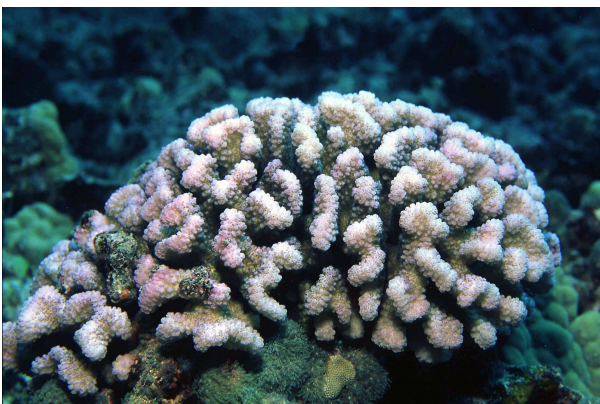


Fig. 2. *Pocillopora meandrina* (photo Keoki Stender)



Fig. 3. *Pocillopora ligulata* (photo Yuko Stender)

In an attempt to determine whether these morphotypes of *Pocillopora* found in Hawaii represent different species or if some of them are growth variants of a single species, we analyzed a 750bp region of ribosomal DNA (rDNA) comprising a fragment of the 5.8S RNA gene, the complete Internal Transcribed Spacer (ITS) 2, and part of the 28S RNA gene. The ITS region, located between the 18S and 28S RNA, has been widely used to study inter- and intraspecific phylogenetic relationships in various cnidarians such as soft corals (Lee and Song 2000; Fujiwara et al. 2003; McFadden

and Hutchinson 2004) and scleractinian corals (Odorico and Miller 1997; Medina et al. 1999; van Oppen et al. 2000; Diekmann et al. 2001; Rodriguez-Lanetty and Hoegh-Guldberg 2002). This non-coding region evolves rapidly, but due to concerted evolution of the numerous copies present in a genome (Dover 1982), a reproductively isolated group of individuals will generally tend to share a single ITS sequence type.



Fig. 4. *Pocillopora eydouxi* (photo Keoki Stender)



Fig. 5. *Pocillopora molokensis* (photo Keoki Stender)

Materials and Methods

Thirty-seven small coral fragments were sampled at Kaneohe Bay, Kahe Point and Moku Manu in Oahu (Fig. 6) from colonies identified as *P. damicornis* Linnaeus 1758, *P. eydouxi* Milne Edwards and Haime 1860, *P. ligulata* Dana 1846, *P. meandrina* Dana 1846 or *P. molokensis* Vaughan 1907 based on their morphology (Table 1).

Genomic DNA was purified from fresh samples by using the Wizard Genomic DNA Extraction kit (Promega). The coral-specific primer ITS_c2-5 (5'-AGCCAGCTGCGATAAGTAGTG-3') and the reverse primer R28S1 (5'-GCTGCAATCCCAAACAACCC-3') were used to amplify the ITS2 region of rDNA in 25 μ L reaction mixes containing 20 μ L H₂O, 2.5 μ L buffer (containing 11mM MgCl₂), 1.3 μ L DMSO, 1 μ L dNTP mix (6.6mM total), 0.3 μ L primers (25 μ M), 0.15 μ L Red Taq (Sigma) and 0.5 μ L DNA extract. PCR conditions comprised an initial denaturation step of 60s at 94 $^{\circ}$ C, followed by 40 cycles (30s denaturation at 94 $^{\circ}$ C, 30s annealing at 53 $^{\circ}$ C, 75s

elongation at 72°C) and a final 5-min elongation step at 72°C. PCR products were sequenced in both directions with the same primers as for amplification, and sequences were assembled and cleaned using Sequencher 4 (Gene Codes). Since all chromatograms containing double peaks could be interpreted as a superposition of two sequences, these sequences were deduced directly from the corresponding forward and reverse chromatograms or, in a few ambiguous cases, inferred by comparison with other individuals (Clark 1990). Sequences were imported into MEGA3 (Kumar et al. 2004) and aligned using ClustalW as implemented in this software with default options; the alignment was subsequently refined by hand. Finally, Minimum Evolution (ME) phylogenetical analyses were conducted in MEGA3 (Search Options: CNI (level=1) with initial tree=NJ MaxTrees=3) under the Kimura 2-parameter model with Pairwise Deletion of gaps/missing data and with 10000 bootstrap replicates.

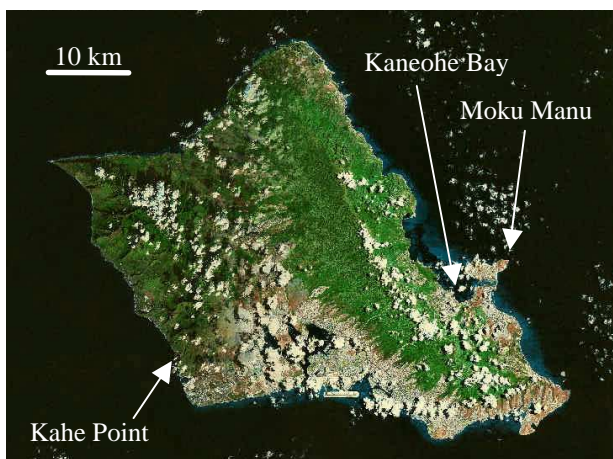


Fig. 6. Location of sampling sites in Oahu (Hawaii)

Table 1. List of samples collected for this study

Morphotype	Location	Sample names	Number of samples
<i>P. damicornis</i>	Kaneohe Bay	02Oahu01-16	16
<i>P. meandrina</i>	Kaneohe Bay	02Oahu17-23	7
<i>P. ligulata</i>	Kaneohe Bay	02Oahu24-29	6
<i>P. eydouxi</i>	Kahe Point	02Oahu30-32	3
<i>P. molokensis</i>	Moku Manu	02Oahu33-37	5

Results

Among the 37 pairs of chromatograms analyzed, 9 displayed no double peaks and the 28 others were made up of the superposition of two sequences. No chromatogram required the superposition of more than two ITS sequences to explain its pattern of double-peaks. Since we never found more than two sequences in a single specimen, the 65 sequences obtained were

considered as alleles, i.e. orthologous sequences. Hence, individuals containing only one such allele were considered homozygous, and those containing two, heterozygous. Alleles were of variable length due to the presence of a complex microsatellite region, but alignment posed little difficulty since there was no indel in the rest of the alignment. Our final dataset comprised 25 variable positions, including 5 singletons.

The phylogenetical tree of alleles obtained is presented in Fig. 7. Since ITS sequences from *Pocillopora* were impossible to align with those of any other coral genus present in GenBank, this tree remains unrooted. Although a rooted tree is ultimately necessary to test the monophyly of hypothesized clades, associations on an unrooted tree are a prerequisite for monophyly. Such associations were observed for the alleles of *P. eydouxi* and for those of *P. ligulata*, but neither for those of *P. damicornis*, *P. meandrina* nor *P. molokensis*: for the latter three morphotypes there were several morphotype-specific groups of alleles, but none of these groups included all alleles from all individuals of the corresponding morphotype.

Discussion

ITS has recently come under criticism as a phylogenetic marker in corals due to ancient rDNA lineages predating species divergence in *Acropora* (Vollmer and Palumbi 2004). Our results show that ITS2 is an informative molecular marker in the genus *Pocillopora*. Moreover, patterns of ITS diversity observed in our study are identical to those expected for single-copy nuclear markers since each individual's chromatogram could be interpreted as the combination of at most two sequences.

These results are compatible with the hypothesis of Hawaiian *P. eydouxi* and *P. ligulata* being monophyletic, as expected for true biological species. Interestingly, while all alleles of *P. eydouxi* were identical except in the microsatellite region, alleles of *P. ligulata* displayed a much higher diversity.

On the other hand, our dataset does not support the monophyly of Hawaiian *P. damicornis*, *P. meandrina* and *P. molokensis*. Since these morphotypes are found in contrasting environments (shallow and calm locations for *P. damicornis*, shallow exposed reefs for *P. meandrina* and deeper waters for *P. molokensis*), they could be growth forms of a single species; however, the non-random association of morphotypes and alleles on Fig. 7 suggests a more complex situation. Such a pattern could result from incomplete lineage sorting with partial retention of an ancestral polymorphism, as expected in the case of recent or ongoing speciation, or from hybridization.

Two "types" of *P. damicornis* have been described in Hawaii, "type Y" and "type B", with slight differences in growth form, pigmentation and reproductive biology (Richmond and Jokiel 1984). The distinct groups of alleles observed in the case of *P. damicornis* may correspond to these two morphological types, but we could not test this hypothesis since the morphology and

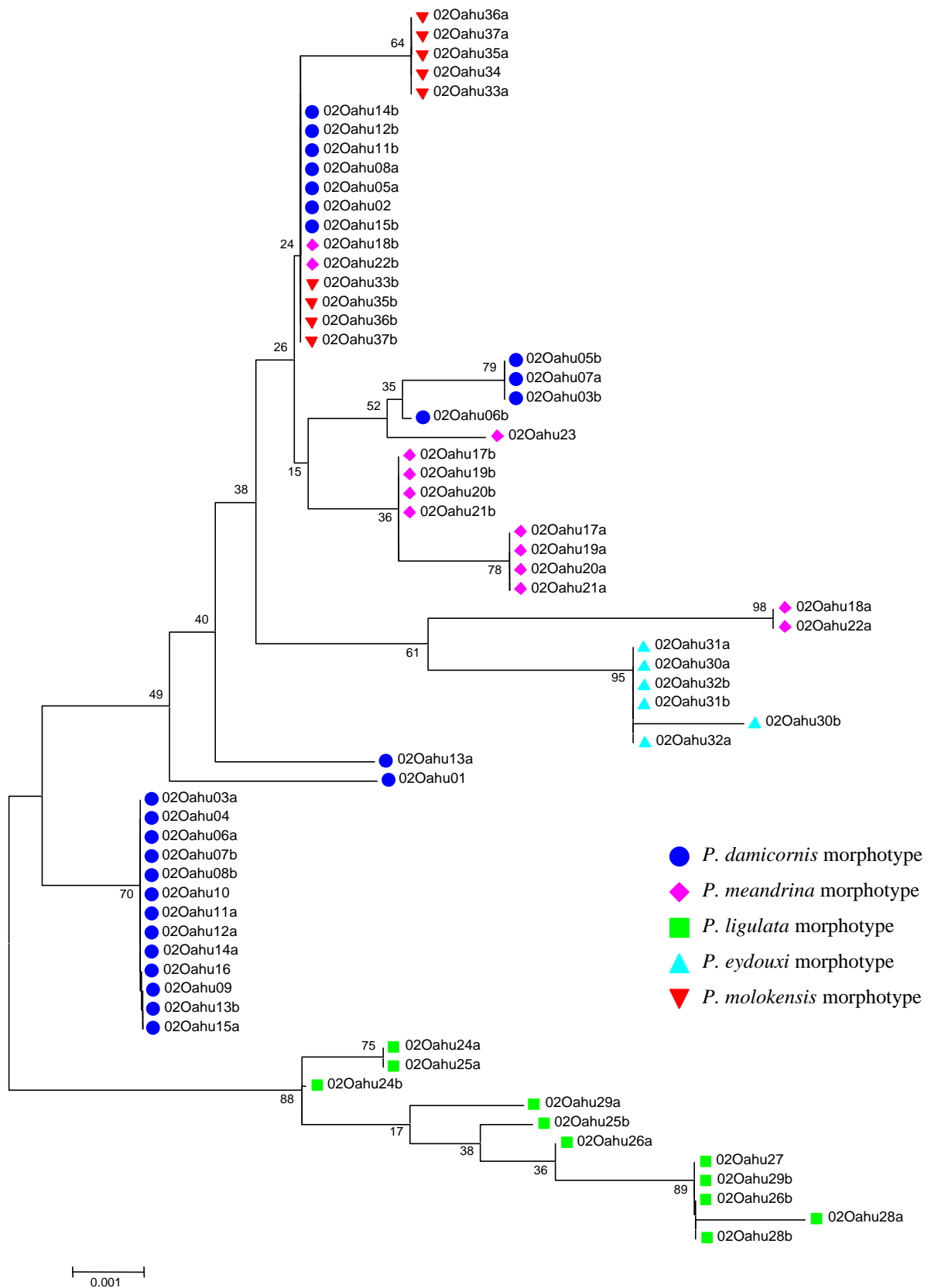


Fig. 7. ME tree of alleles (10000 bootstrap replicates). Alleles from heterozygous individuals were named by appending the letter a or b to the name of the sample, and the morphotype of the individual in which each allele was found is represented by the color and shape of the marker preceding its name.

color of each colony of *P. damicornis* were not recorded while sampling. If it is the case, however, the abundance of individuals with one allele from each group would suggest that “type Y” and “type B” are not reproductively isolated and do not represent separate species.

It has been increasingly recognized that a single marker is insufficient to reconstruct the phylogeny of a group of living organisms (Pamilo and Nei 1988; Doyle 1992; Nichols 2001). This preliminary study raises numerous questions that we are planning to address by sequencing additional nuclear and mitochondrial markers and by collecting samples from other locations spanning the distribution range of the genus *Pocillopora*.

Acknowledgements

This research received financial support from the French Ministry of Research and Education (Ph.D. scholarship to J.-F. Flot) and from the E. W. Pauley Foundation. Thanks to all organizers and participants in the 2002 Pauley Summer Program “Molecular Biology of Corals”, and especially to Evelyn Cox, Frank Stanton and Daniel Thornhill for helping with sample collection. Thanks also to Keoki and Yuko Stender for providing useful information on where to find *P. molokensis* and for allowing some pictures from their website on Hawaii’s marine life to be reproduced here. Annie Tillier, Josie Lambourdière and Céline Bonillo provided assistance with DNA sequencing at the *Service de Systématique Moléculaire* of the *Muséum National d’Histoire Naturelle*. Thanks to Sarah Samadi, Marie-Catherine Boisselier and Hélène Magalon for useful discussions, and to Nancy Knowlton and Juan Maté for their helpful remarks and comments on an earlier version of this paper. J.-F. Flot’s participation in the 10th ICRS was supported by the *Ecole Doctorale “Diversité du Vivant”* and by the *Comité National des Sciences Biologiques*.

References

- Brüggemann F (1879) Corals. An account of the petrological, botanical, and zoological collections made in Kerguelen's Land and Rodriguez during the Transit of Venus expeditions, carried out by order of Her Majesty's government in the years 1874-75. *Phil Trans R Soc Lond* 168: 569-579
- Chess JR, Hobson ES, Howard DF (1997) Interactions between *Acanthaster planci* (Echinodermata, Asteroidea) and scleractinian corals at Kona, Hawai'i. *Pac Sci* 51: 121-133
- Clark A (1990) Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. *Mol Biol Evol* 7: 111-122
- Cortés J (1997) Biology and geology of eastern Pacific coral reefs. *Coral Reefs* 16: S39-S46
- Dai C-F (1989) Scleractinia of Taiwan I. Families Astrocoeniidae and Pocilloporidae. *Acta Oceanogr Taiwan* 22: 83-101
- Diekmann OE, Bak RPM, Stam WT, Olsen JL (2001) Molecular genetic evidence for probable reticulate speciation in the coral genus *Madracis* from a Caribbean fringing reef slope. *Mar Biol* 139: 221-233
- Dover G (1982) Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111-117
- Doyle JJ (1992) Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Syst Bot* 17: 144-163
- Fadlallah YH (1985) Reproduction in the coral *Pocillopora verrucosa* on the reefs adjacent to the industrial city of Yanbu (Red Sea, Saudi Arabia). *Proc 5th Int Coral Reef Symp* 4: 313-318
- Fisk DA, Done TJ (1985) Taxonomic and bathymetric patterns of bleaching in corals, Myrmidon Reef (Queensland). *Proc 5th Int Coral Reef Symp* 6: 149-154
- Fujiwara S, Yasui K, Watanabe K, Wakabayashi T, Tsuzuki M, Iguchi K (2003) Molecular phylogenetic relationships between prostanoid-containing Okinawan soft coral (*Clavularia viridis*) and nonprostanoid-containing *Clavularia* species based on ribosomal ITS sequence. *Mar Biotechnol* 5: 401-407
- Glynn PW, Gassman NJ, Eakin CM, Cortes J (1991) Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama, and the Galapagos Islands (Ecuador) I. Pocilloporidae. *Mar Biol* 109: 355-368
- Kinzie RA (1993) Spawning in the reef corals *Pocillopora verrucosa* and *P. eydouxi* at Sesoko Island, Okinawa. *Galaxea* 11: 93-105
- Kolinski S, Cox EF (2003) An update on modes and timing of gamete and planula release in Hawaiian scleractinian corals with implications for conservation and management. *Pac Sci* 57: 17-27
- Kruger A, Schleyer MH (1998) Sexual reproduction in the coral *Pocillopora verrucosa* (Cnidaria: Scleractinia) in KwaZulu-Natal, South Africa. *Mar Biol* 132: 703-710
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163
- Lee YJ, Song JI (2000) Phylogenetic analysis of the genus *Dendronephthya* (Nephtheidae, Alcyonacea) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear rDNA. *Kor J Biol Sci* 4: 319-324
- McClanahan TR, Baird AH, Marshall PA, Toscano MA (2004) Comparing bleaching and mortality responses of hard corals between southern Kenya and the Great Barrier Reef, Australia. *Mar Pollut Bull* 48: 327-335
- McFadden CS, Hutchinson MB (2004) Molecular evidence for the hybrid origin of species in the soft coral genus *Alcyonium* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia). *Mol Ecol* 13: 1495-1505
- Medina M, Weil E, Szmant AM (1999) Examination of the *Montastraea annularis* species complex (Cnidaria: Scleractinia) using ITS and COI sequences. *Mar Biotechnol* 1: 89-97
- Mumby PJ, Chisholm JRM, Edwards AJ, Clark CD, Roark EB, Andrefouet S, Jaubert J (2001) Unprecedented bleaching-induced mortality in

- Porites* spp. at Rangiroa Atoll, French Polynesia. Mar Biol 139: 183-189
- Nichols R (2001) Gene trees and species trees are not the same. Trends Ecol Evol 16: 358-364
- Odorico D, Miller D (1997) Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8S rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): patterns of variation consistent with reticulate evolution. Mol Biol Evol 14: 465-473
- Ormond RFG, Hanscomb NJ, Beach DH (1976) Food selection in the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* (L.). Mar Behav Physiol 4
- Pamilo P, Nei M (1988) Relationships between gene trees and species trees. Mol Biol Evol 5: 568-583
- Paulay G, Benayahu Y (1999) Patterns and consequences of coral bleaching in Micronesia (Majura and Guam) in 1992-1994. Micronesica 31: 109-124
- Reyes-Bonilla H (2002) Checklist of valid names and synonyms of stony corals (Anthozoa: Scleractinia) from the eastern Pacific. J Nat Hist 36: 1-13
- Richmond RH, Jokiel PL (1984) Lunar periodicity in larva release in the reef coral *Pocillopora damicornis* at Enewetak and Hawaii. Bull Mar Sci 34: 280-287
- Rodriguez-Lanetty M, Hoegh-Guldberg O (2002) The phylogeography and connectivity of the latitudinally widespread scleractinian coral *Plesiastrea versipora* in the Western Pacific. Mol Ecol 11: 1177-1189
- Shlesinger Y, Loya Y (1985) Coral community reproductive patterns: Red Sea versus the Great Barrier Reef. Science 228: 1333-1335
- Sier CJS, Olive PJW (1994) Reproduction and reproductive variability in the coral *Pocillopora verrucosa* from the Republic of Maldives. Mar Biol 118: 713-722
- Stimson JS (1978) Mode and timing of reproduction in some common hermatypic corals of Hawaii and Enewetak. Mar Biol 48: 173-184
- van Oppen MJH, Willis BL, Van Vugt H, Miller DJ (2000) Examination of species boundaries in the *Acropora cervicornis* group (Scleractinia, Cnidaria) using nuclear DNA sequence analyses. Mol Ecol 9: 1363-1373
- Veron JEN, Pichon M (1976) Scleractinia of eastern Australia. I. Families Thamnasteriidae, Astrocoeniidae, Pocilloporidae. Aust Inst Mar Sci Monogr Ser 1
- Veron JEN, Stafford-Smith M (2000) Corals of the World. Australian Institute of Marine Science
- Vollmer SV, Palumbi SR (2004) Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics. Mol Ecol 13: 2763-2772
- Ward S (1992) Evidence for broadcast spawning as well as brooding in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. Mar Biol 112: 641-646
- Williams EHJ, Bunkley-Williams L (1990) The world-wide coral reef bleaching cycle and related sources of coral mortality. Atoll Res Bull 335: 1-71
- Wood Jones F (1910) Corals and atolls. Lovell, Reeve and Co., London

Article 5 : Patterns of genetic structure among Hawaiian corals of the genus *Pocillopora* yield clusters of individuals that are compatible with morphology

soumis aux *Comptes Rendus Biologies* (IF 2006 1,48) le 21 août 2007

Patterns of genetic structure among Hawaiian corals of the genus *Pocillopora* yield clusters of individuals that are compatible with morphology

La structuration génétique des coraux du genre *Pocillopora* à Hawaii délimite des groupes d'individus compatibles avec la morphologie

J.-F. FLOT^{1,*}, H. MAGALON², CORINNE CRUAUD³, ARNAUD COULOUX³, S. TILLIER¹

¹ UMR UPMC-CNRS-MNHN-IRD 7138, Département Systématique et Evolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP 26, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

² EPHE, UMR CNRS 7625, Laboratoire Fonctionnement et Evolution des Systèmes Ecologiques, Université Pierre et Marie Curie, 7 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France

³ GENOSCOPE. Centre National de Séquençage. 2 rue Gaston Crémieux, CP5706, 91057 Evry Cedex, France

* Author for correspondence

email jfflot@mnhn.fr phone +33 1 40 79 37 52 fax +33 1 40 79 38 44

Abstract:

Six variable sequence markers are developed and analyzed to find out species boundaries in Hawaiian corals of the genus *Pocillopora*: the putative mitochondrial control region; a recently discovered, hypervariable mitochondrial open reading frame; the internal transcribed spacer 2 (ITS2), located in the nuclear ribosomal DNA; and three nuclear introns of calmodulin, elongation factor-1 α and the ATP synthase β subunit. Using the first two markers, we identify five distinct mitochondrial lineages and these lineages are compatible with morphology. The situation is more complex with nuclear markers since more than two haplotypes are observed in some individuals. To detect clusters of individuals, haplotype networks are constructed with additional connections drawn between co-occurring haplotypes to delineate potential fields for recombination: few clusters of nuclear haplotypes are found to correspond to clusters of individuals, but those that are detected (mostly in the ITS2 dataset) are also compatible with morphology.

Résumé:

Six marqueurs de séquence variables sont développés et analysés pour déterminer les frontières interspécifiques chez les coraux du genre *Pocillopora* à Hawaïi : la région de contrôle putative, une région codante mitochondriale hypervariable, le deuxième espaceur ribosomique (ITS2) et trois introns nucléaires des gènes de la calmoduline, du facteur d'élongation-1 α et de la sous-unité β de l'ATP synthétase. Les deux premiers marqueurs nous permettent d'identifier cinq lignées mitochondriales distinctes et compatibles avec la morphologie. La situation est plus complexe pour les marqueurs nucléaires puisque plus de deux haplotypes sont observés chez certains individus. Afin de détecter les groupes d'individus, nous construisons des réseaux d'haplotypes sur lesquels nous délimitons des champs de recombinaison potentiels en reliant par des connexions supplémentaires les haplotypes trouvés en cooccurrence : peu de groupes d'haplotypes nucléaires correspondent à des groupes d'individus, mais ceux qui sont détectés (pour la plupart dans le jeu de données ITS2) sont aussi compatibles avec la morphologie.

Keywords: Cnidaria, Scleractinia, species delimitation, field for recombination, mitochondrial markers, EPIC-PCR

Mots-clés : cnidaires, madréporaires, délimitation d'espèces, champ de recombinaison, marqueurs mitochondriaux, EPIC-PCR

1. Introduction

Delimitation and identification of coral species is rendered difficult by intra- and interpopulational morphological variations that are often similar in range to, or even greater than, differences between currently recognized species [1]. Indeed, coral colonies are known to display phenotypic plasticity in response to “light, sedimentation, current and water agitation, temperature, depth, salinity, emersion, physical damage, predation, intra- and interspecific competition, association with other organisms, disease, substrate topography” [2], and even gravity [3]. Moreover, crossings between morphologically different corals currently considered as distinct species have been demonstrated to bring out intermediate morphologies that add to the general confusion [4].

Since it is not subject to ecophenotypic variation, the DNA of an organism is commonly used as a source of information to tell intraspecific genetic diversity and phenotypic plasticity from interspecific differences. DNA sequence markers are well suited for this purpose as they generally cross-amplify over a wide range of species, genera and families: the mitochondrial *cox1* gene, in particular, can be amplified consistently from most living creatures by using universal primers [5] and has been proposed as a reference marker for the ‘barcoding of life’ [6]. The nuclear, ribosomal internal transcribed spacers (ITS) are also widely used [7] as, despite their presence in several hundred copies per genome, concerted evolution [8, 9] usually results in the presence of a single dominant ITS type per individual with little intraspecific variation [10]. More recently, exon-primed, intron-crossing (EPIC) PCR amplification of gene introns [11-13] has been proposed as a way to assess variation at several independent nuclear loci.

Coral biodiversity, however, has proved difficult to study using molecular sequence markers. Cnidarian mitochondrial DNA seems to evolve very slowly [14], and *cox1* sequences typically display little to no variability among congeneric corals [15, 16], whereas in *Acropora* the presence of silenced, mutation-prone ITS pseudogenes [17] as well as ancestrally shared lineages [18] has cast doubt on the utility of ribosomal DNA for coral species delimitation. As for EPIC-PCR, its application to corals has been limited until now to *Acropora* [4, 19, 20] and *Montipora* [21] and has yet to provide the basis for a taxonomic revision of these genera.

In the discussion surrounding scleractinian coral species delimitation, corals of the genus *Pocillopora* are of special interest due to their spectacular, supposedly intraspecific

morphological variations [22]. Species boundaries in this group are poorly understood, and the resulting taxonomic uncertainties undermine the numerous physiological and ecological studies conducted on these keystone organisms. Previous attempts to develop variable molecular sequence markers in this group have been largely unsuccessful [15, 23, 24] except for the second internal transcribed spacer (ITS2) [25, 26]. The present article reports the development of five other variable sequence markers in *Pocillopora*: two regions identified previously as the most variable in the mitochondrial genome of *Pocillopora* [27]; and three nuclear EPIC markers (an intron of calmodulin, an intron of elongation factor-1 α and an intron of the nuclear gene encoding the β subunit of the mitochondrial ATP synthase). All six markers are then tested on a set of Hawaiian coral samples attributed to five different morphospecies in order to assess their utilities and draw guidelines for future studies.

2. Materials and methods

Thirty-seven small coral fragments were sampled at Kaneohe Bay, Kahe Point and Moku Manu in Oahu from colonies identified as *Pocillopora damicornis* Linnaeus 1758, *Pocillopora eydouxi* Milne Edwards and Haime 1860, *Pocillopora ligulata* Dana 1846, *Pocillopora meandrina* Dana 1846 and *Pocillopora molokensis* Vaughan 1907 based on their morphology (Table 1). Genomic DNA was purified from fresh samples using Wizard Genomic DNA Extraction kit (Promega).

As these coral DNA extracts also contained DNA from zooxanthellae and possibly bacteria, coral-specific primers (Table 2) were defined with the help of Primer3 [28] based on alignments of sequences obtained from GenBank. Each marker was amplified in 25 μ l reaction mixes containing 20 μ l H₂O, 2.5 μ l Red Taq buffer (Sigma), 1 μ l dNTP mix (6.6 mmol l⁻¹ total), 1.3 μ l DMSO, 0.3 μ l primers (25 μ mol l⁻¹), 0.15 μ l Red Taq (Sigma) and 0.5 μ l DNA extract. PCR conditions comprised an initial denaturation step of 60 s at 94°C, followed by 40 cycles (30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 53°C, 75 s elongation at 72°C) and a final 5-min elongation step at 72°C. PCR products were sequenced in both directions with the same primers as for amplification, and sequences were assembled and cleaned using Sequencher 4 (Gene Codes).

PCR amplification products obtained from nuclear markers frequently contained more than a single sequence type (Table 1). Mixed sequences were determined by direct phase extraction [29] with the help of Champuru v1.0 [30, available online at

<http://134.157.186.185/champuru>] when they differed in length, by inter-individual comparison [31] when they had identical lengths, and by resequencing using haplotype-specific internal primers [32, 33] whenever the two previous methods yielded ambiguous or uncertain results.

All sequences obtained in this study were deposited in GenBank (accession numbers XXXXXXXX-XXXXXXX). For each marker, sequences were imported into MEGA3 [34] and aligned by eye without difficulty. Sequence alignments were converted in the Roehl format using DNAsp [35] and haplotype networks were constructed using the median-joining algorithm [36] implemented in Network 4.1 (available online at <http://www.fluxus-engineering.com/>).

For mitochondrial DNA, clusters of haplotypes were delimited somewhat arbitrarily by grouping together haplotypes separated by a single mutation step. A different method was used for the nuclear markers: in order to detect clusters of haplotypes corresponding to clusters of individuals, connections between haplotypes found co-occurring in a coral colony were added as curved lines on the median-joining networks. This is analogous to the proposal by Doyle [37] to consider a group of individuals sharing a common pool of alleles as a ‘field for recombination’ [38] (FFR), i.e., a species-level population unit; with the difference that, in the present case, not all co-occurring haplotypes of a given marker may have the potential to recombine since it is unclear whether they are orthologous or paralogous sequences (which is also the reason why we call them haplotypes, and not alleles). In the graphical representation introduced here, clusters of haplotypes that correspond to clusters of individuals stand out as having a single connection to the rest of the network: each such cluster of individual comprises one or several FFRs, and in some cases FFRs can be found that are not part of any cluster (see Figures).

3. Results and discussion

3.1. Mitochondrial markers yield clusters of individuals that are compatible with morphology

As expected for mitochondrial markers in the absence of recombination, haplotype networks obtained for the ORF and for the putative control region are congruent and only the network resulting from the concatenation of both markers is presented here (Figure 1). A total

of 7 haplotypes are detected: a single haplotype specific of *P. molokensis*, two closely related haplotypes (separated by a single mutation) specific of *P. ligulata*, two closely related haplotypes (separated by a single mutation) for corals of the *P. eydouxi* and *P. meandrina* morphotypes and two not-so-closely related haplotypes (separated by 8 mutations) for corals of the *P. damicornis* morphotype.

P. molokensis and *P. ligulata* corals fall in two distinct clusters, whereas a single cluster comprises all individuals of the *P. meandrina* and *P. eydouxi* morphotypes. *P. meandrina* and *P. eydouxi* are often difficult to distinguish in the field, with young colonies attributed to *P. eydouxi* being very close morphologically to *P. meandrina*: our mitochondrial data suggest that these two morphotypes are either a single species or very closely related ones. Regarding *P. damicornis*, two morphological variants have been described in Hawaii with slight differences in growth form, pigmentation and reproductive timing suggesting that they may be sympatric cryptic species [39], which could explain our observation of two divergent mitochondrial lineages; in the present study, unfortunately, morphological details of the corals sampled were not recorded so this hypothesis cannot be tested here.

3.2. For all nuclear markers, more than two haplotypes are detected in some individuals

Up to three haplotypes per coral colony are detected for ITS2 and the ATP synthase β subunit, up to four for calmodulin, and up to five for elongation factor-1 α (Table 1). As haplotypes have variable lengths, the number of end peaks of a chromatogram can be used as a minimal estimate of the number of haplotypes (Figure 2); obtaining the sequence of each haplotype, however, is the only way to determine this number since haplotypes of identical lengths have their end peaks superposed [29].

The occurrence of several dominant ITS types per individual is well documented in various organisms, such as oaks [40] and corals [18], and can be explained by a failure or delay in homogenization among the several hundred copies of ribosomal DNA present in a typical genome [8, 9, 41]. In the case of the nuclear introns, however, the finding of more than two sequences per individual comes unexpected, even though similar observations have been previously reported in periwinkles for calmodulin [42] and in *Penaeus* shrimps for elongation factor-1 α [43]. Presence of more than two gene copies in some individuals could result from gene duplication, but this explanation seems unlikely for the ATP synthase β subunit marker

since it was short-listed as ‘likely not to be member of a multigene family’ by Jarman et al. [13] based on examination of the complete genomes of *Homo*, *Caenorhabditis* and *Drosophila*. Moreover, our primers were designed overlapping the exon-intron boundaries for enhanced specificity and should have discriminated between paralogous gene copies, except if duplication happened recently or if concerted evolution limits divergence [44].

Other mechanisms may be responsible for the increased numbers of haplotypes observed in our study: there are no karyotypic information available for *Pocillopora*, but variations in chromosome numbers have been reported for corals of the genus *Acropora* [45, 46], and a study of microsatellite inheritance using controlled crosses in *Acropora palmata* yielded triploid larvae possessing one paternal and two maternal alleles [47]. Chimeric colonies resulting from the fusion of two or more genetically distinct organisms have also been reported in corals of the genus *Pocillopora* [48, 49], which may explain the high numbers of haplotypes per colony observed here. Finally, intraspecific variations in gene copy numbers have recently been discovered in humans [50, 51] and other mammals [reviewed in 52]; however, further research will be needed to determine whether such phenomenon can occur in non-mammalian organisms.

3.3. Nuclear sequence markers yield clusters of individuals that are also compatible with morphology

For ITS2 (Figure 3), two clusters are detected that comprise more than a single individual: one includes all individuals of the *P. ligulata* morphotype, and the other all individuals of the *P. eydouxi* morphotype. In addition, two clusters of a single individual are detected, each of them of the *P. damicornis* morphotype. For calmodulin (Figure 4), a single cluster of individuals is detected that comprises three samples of the *P. meandrina* morphotype. For elongation factor-1 α (Figure 5), two clusters stand out, each of them made of a single *P. eydouxi* individual, whereas for the ATP synthase β subunit (Figure 6), only one cluster of one *P. damicornis* coral sample is detected.

None of these clusters comprises colonies of different morphotypes; hence, our nuclear datasets do not contradict previous morphological hypotheses, but do not support many of them either. Despite their higher variability in terms of haplotype numbers and of differences between haplotypes, nuclear markers turn out to be less informative than mitochondrial ones for delimiting clusters of individuals. The same apparent paradox is

observed when comparing ITS2 and the other nuclear markers: haplotypes are fewer and less divergent for ITS2 than for calmodulin, elongation factor-1 α and the ATP synthase β subunit, but nevertheless ITS2 seems to yield more clusters of individuals.

Two main hypotheses can be proposed to explain why fewer clusters of individuals are detected by using nuclear markers than by looking at mitochondrial DNA. First, it might be that individuals belonging to different mitochondrial clusters are exchanging genes through sexual reproduction; but in that case, it would be difficult to explain why clusters of mitochondrial and nuclear haplotypes are compatible with morphology, unless some strong environmental selection is acting concomitantly on both genomes. Such selection may explain part of the molecular differences observed between *P. damicornis* and *P. eydouxi*, two morphotypes found in contrasting reef environments in Hawaii (calm shallow waters for *P. damicornis*, deeper exposed locations for *P. eydouxi*) but not between *P. ligulata* and *P. meandrina* that are usually found interspersed among each other on shallow reef parts exposed to wave action.

Or, second, the different mitochondrial clusters may correspond to reproductively isolated sympatric populations (i.e., biological species), in which case incomplete lineage sorting and retention of a shared ancestral polymorphism could explain why these species cannot be distinguished using nuclear intron sequences. A prediction from this second hypothesis would be that, among nuclear markers, those with shorter coalescence time due to concerted evolution, such as ITS2, should yield clearer patterns than other genes; and this is precisely what is observed here.

4. Conclusions

Our results show that mitochondrial data obtained by sequencing variable regions of the mitochondrial genome can be useful for resolving interpopulational relationships among pocilloporid corals. On the other hand, nuclear markers in *Pocillopora* are plagued with high numbers of haplotypes in some individuals that make sequencing cumbersome and costly; moreover, these markers turn out not to be very informative in terms of clusters of individuals. Among nuclear markers, ITS2 provides a slightly clearer picture than nuclear gene introns but apparently does not resolve all potential interspecific relationships, i.e. does not allow identification of the more restricted clusters delineated by mitochondrial and morphological data. Had our nuclear markers displayed only one or two haplotypes per individual as

expected, we could have tried to sort individuals into clusters by using population genetic models that are not hindered by shared ancestral haplotypes [53]. However, since orthology/paralogy relationships among our sequences are unclear, the actual number of copies of each marker remains unknown and a population genetic analysis of our data is impossible.

The data presented here bring partial support to the morphological delimitation of species in Hawaiian corals of the genus *Pocillopora*. ITS2 and mitochondrial data concur with the delimitation of *P. ligulata* as a distinct populational unit of possible species level, whereas mitochondrial data also strongly support the distinctiveness of *P. molokensis*: these results may have significant implications regarding conservation since these two morphospecies are listed as putative Hawaiian endemics [54]. However, and with regard to the high level of intra- and interpopulational variation, determining whether these Hawaiian morphological and genetic clusters may belong to more widespread genetic clusters will require further investigation. It is also unclear whether the two mitochondrial lineages identified among corals of the *P. damicornis* morphotype are two cryptic species or just an instance of intraspecific variation similar to the one previously reported for corals of the genus *Montastrea* [16]. Moreover, further research will be needed to clarify the status of the *P. meandrina* and *P. eydouxi* morphotypes that could only be distinguished using ITS2, not using mitochondrial markers: given our small sample size for *P. eydouxi*, the hypothesis that these two morphotypes may be growth forms of a single species cannot be rejected. Hence, this report is a first step toward a molecular reassessment of species boundaries in the coral genus *Pocillopora*, but examination of a larger number of specimens collected over the whole area of distribution of this genus will be required before more general conclusions can be reached.

Acknowledgements

Research by J.-F. Flot was supported by a PhD scholarship from the French Ministry of Research and Education and by a research grant from the MNHN program *Etat et structure phylogénétique de la biodiversité actuelle et fossile*. Support from the *Consortium National de Recherche en Génomique* is acknowledged (agreement n°2005/67 on the project ‘Macrophylogeny of life’ directed by Guillaume Lecointre). This project benefited greatly from the assistance of Annie Tillier, Josie Lambourdière and Céline Bonillo at the *Service de*

Systématique Moléculaire (MNHN CNRS IFR 101). Thanks to Evelyn Cox, Frank Stanton and Daniel Thornhill for helping with sample collection during the 2002 Pauley Summer Program ‘Molecular Biology of Corals’; participation of J.-F. Flot in this program was supported by the E. W. Pauley Foundation. Thanks also to Keoki Stender for providing field information, to Marie-Catherine Boisselier, Magalie Castelin, Julien Lorion and Nicolas Puillandre for useful discussions, and to Sarah Samadi for critically reading an earlier version of this paper.

References

- [1] J.E.N. Veron, *Corals in space and time: the biogeography & evolution of the Scleractinia*, University of New South Wales Press, Sydney, Australia, 1995.
- [2] R.H. Randall, Some problems in reef coral taxonomy, *Micronesica* 15 (1976) 151-156.
- [3] E. Meroz, I. Brickner, Y. Loya, A. Peretzman-Shemer, M. Ilan, The effect of gravity on coral morphology, *Proc. R. Soc. Lond. B* 269 (2002) 717-720.
- [4] S.V. Vollmer, S.R. Palumbi, Hybridization and the evolution of reef coral diversity, *Science* 296 (2002) 2023-2025.
- [5] O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek, DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3 (1994) 294-299.
- [6] P.D.N. Hebert, A. Cywinska, S.L. Ball, J.R. deWaard, Biological identifications through DNA barcodes, *Proc. Biol. Sci.* 270 (2003) 313-321.
- [7] I. Álvarez, J.F. Wendel, Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference, *Mol. Phylogenet. Evol.* 29 (2003) 417-434.
- [8] D. Liao, Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications, *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1999) 24-30.
- [9] G. Dover, Molecular drive: a cohesive mode of species evolution, *Nature* 299 (1982) 111-117.
- [10] D.M. Hillis, M.T. Dixon, Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference, *Quarterly Review of Biology* 66 (1991) 411-453.
- [11] S. Palumbi, C. Baker, Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales, *Mol. Biol. Evol.* 11 (1994) 426-435.
- [12] N. Bierne, S.A. Lehnert, E. Bédier, F. Bonhomme, S.S. Moore, Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR, *Mol. Ecol.* 9 (2000) 233-235.
- [13] S.N. Jarman, R.D. Ward, N.G. Elliott, Oligonucleotide primers for PCR amplification of coelomate introns, *Mar. Biotechnol. (NY)* 4 (2002) 347-355.

- [14] T.L. Shearer, M.J.H. van Oppen, S.L. Romano, G. Wörheide, Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria), *Mol. Ecol.* 11 (2002) 2475-2487.
- [15] T. Ridgway, Testing the applicability of molecular genetic markers to population analyses of scleractinian corals, *Symbiosis* 33 (2002) 243-261.
- [16] H. Fukami, N. Knowlton, Analysis of complete mitochondrial DNA sequences of three members of the *Montastraea annularis* coral species complex (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia), *Coral Reefs* 24 (2005) 410-417.
- [17] L.M. Márquez, D.J. Miller, J.B. MacKenzie, M.J.H. van Oppen, Pseudogenes contribute to the extreme diversity of nuclear ribosomal DNA in the hard coral *Acropora*, *Mol. Biol. Evol.* 20 (2003) 1077-1086.
- [18] S.V. Vollmer, S.R. Palumbi, Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics., *Mol. Ecol.* 13 (2004) 2763-2772.
- [19] M.J.H. van Oppen, B.J. McDonald, B. Willis, D.J. Miller, The evolutionary history of the coral genus *Acropora* (Scleractinia, Cnidaria) based on a mitochondrial and a nuclear marker: reticulation, incomplete lineage sorting, or morphological convergence?, *Mol. Biol. Evol.* 18 (2001) 1315-1329.
- [20] M.J.H. van Oppen, B.L. Willis, H. Van Vugt, D.J. Miller, Examination of species boundaries in the *Acropora cervicornis* group (Scleractinia, Cnidaria) using nuclear DNA sequence analyses, *Mol. Ecol.* 9 (2000) 1363-1373.
- [21] M.J.H. van Oppen, E.M. Koolmees, J.E.N. Veron, Patterns of evolution in the scleractinian coral genus *Montipora* (Acroporidae), *Mar. Biol.* 144 (2004) 9-18.
- [22] J.E.N. Veron, M. Stafford-Smith, *Corals of the world*, Australian Institute of Marine Science, 2000.
- [23] T. Ridgway, Allozyme electrophoresis still represents a powerful technique in the management of coral reefs, *Biodiversity and Conservation* 14 (2005) 135-149.
- [24] G.T. Conception, M. Medina, R.J. Toonen, Noncoding mitochondrial loci for corals, *Mol. Ecol. Notes* 6 (2006) 1208-1211.
- [25] J.-F. Flot, S. Tillier, Molecular phylogeny and systematics of the scleractinian coral genus *Pocillopora* in Hawaii, *Proc. 10th Int. Coral Reef Symp.* 1 (2006) 24-29.

- [26] C.A. Chen, C.-C. Chang, N.V. Wei, C.-H. Chen, Y.-T. Lein, H.-E. Lin, C.-F. Dai, C.C. Wallace, Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in scleractinian corals, *Zool. Stud.* 43 (2004) 759-771.
- [27] J.-F. Flot, S. Tillier, The mitochondrial genome of *Pocillopora* (Cnidaria: Scleractinia) contains two variable regions: the putative D-loop and a novel ORF of unknown function, *Gene* (in press).
- [28] S. Rozen, H. Skaletsky, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, in: S. Krawetz, S. Misener (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 2000, pp. 365-386.
- [29] J.-F. Flot, A. Tillier, S. Samadi, S. Tillier, Phase determination from direct sequencing of length-variable DNA regions, *Mol. Ecol. Notes* 6 (2006) 627-630.
- [30] J.-F. Flot, Champuru 1.0: a computer software for unraveling mixtures of two DNA sequences of unequal lengths, *Mol. Ecol. Notes* 0 (2007)???-???
- [31] A. Clark, Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations, *Mol. Biol. Evol.* 7 (1990) 111-122.
- [32] H. Rudi, K.-E. Gylder, O.A. Rognli, K. Rudi, Direct haplotype-specific DNA sequencing, *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 36 (2006) 253 - 257.
- [33] M.P. Hare, S.R. Palumbi, The accuracy of heterozygous base calling from diploid sequence and resolution of haplotypes using allele-specific sequencing, *Mol. Ecol.* 8 (1999) 1750-1752.
- [34] S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, *Brief. Bioinform.* 5 (2004) 150-163.
- [35] J. Rozas, J.C. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer, R. Rozas, DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods, *Bioinformatics* 19 (2003) 2496-2497.
- [36] H. Bandelt, P. Forster, A. Röhl, Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies, *Mol. Biol. Evol.* 16 (1999) 37-48.
- [37] J.J. Doyle, The irrelevance of allele tree topologies for species delimitation, and a non-topological alternative, *Syst Bot* 20 (1995) 574-588.

- [38] H. Carson, The species as a field for recombination, in: E. Mayr (Ed.), The species problem, American Association for the Advancement of Science, Washington, 1957, pp. 23-38.
- [39] R.H. Richmond, P.L. Jokiel, Lunar periodicity in larva release in the reef coral *Pocillopora damicornis* at Enewetak and Hawaii, Bull Mar Sci 34 (1984) 280-287.
- [40] G. Muir, C.C. Fleming, C. Schlötterer, Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L, Mol. Biol. Evol. 18 (2001) 112-119.
- [41] C. Schlötterer, D. Tautz, Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution, Curr. Biol. 4 (1994) 777-783.
- [42] R.J. Simpson, C.S. Wilding, J. Grahame, Intron analyses reveal multiple calmodulin copies in *Littorina*, J. Mol. Evol. 60 (2005) 505-512.
- [43] S.C. France, N. Tachino, J. Thomas F. Duda, R.A. Shleser, S.R. Palumbi, Intraspecific genetic diversity in the marine shrimp *Penaeus vannamei*: multiple polymorphic elongation factor-1 α loci revealed by intron sequencing, Mar. Biotechnol. (NY) 1 (1999) 261-268.
- [44] E.A. Zimmer, S.L. Martin, S.M. Beverley, Y.W. Kan, A.C. Wilson, Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77 (1980) 2158-2162.
- [45] J.C. Kenyon, Models of reticulate evolution in the coral genus *Acropora* based on chromosome numbers: parallels with plants., Evolution Int. J. Org. Evolution 51 (1997) 756-767.
- [46] J.-F. Flot, C. Ozouf-Costaz, M. Tsuchiya, R. van Woesik, Comparative coral cytogenetics, Proc. 10th Int. Coral Reef Symp. 1 (2006) 4-8.
- [47] I.B. Baums, C.R. Hughes, M.E. Hellberg, Mendelian microsatellite loci for the Caribbean coral *Acropora palmata*, MEPS 288 (2005) 115-127.
- [48] M. Hidaka, Tissue compatibility between colonies and between newly settled larvae of *Pocillopora damicornis*, Coral Reefs 4 (1985) 111-116.
- [49] M. Hidaka, K. Yurugi, S. Sunagawa, R.A. Kinzie, Contact reactions between young colonies of the coral *Pocillopora damicornis*, Coral Reefs 16 (1997) 13-20.

- [50] J. Sebat, B. Lakshmi, J. Troge, J. Alexander, J. Young, P. Lundin, S. Maner, H. Massa, M. Walker, M. Chi, N. Navin, R. Lucito, J. Healy, J. Hicks, K. Ye, A. Reiner, T.C. Gilliam, B. Trask, N. Patterson, A. Zetterberg, M. Wigler, Large-scale copy number polymorphism in the human genome, *Science* 305 (2004) 525-528.
- [51] A.J. Iafrate, L. Feuk, M.N. Rivera, M.L. Listewnik, P.K. Donahoe, Y. Qi, S.W. Scherer, C. Lee, Detection of large-scale variation in the human genome, *Nat. Genet.* 36 (2004) 949-951.
- [52] J.L. Freeman, G.H. Perry, L. Feuk, R. Redon, S.A. McCarroll, D.M. Altshuler, H. Aburatani, K.W. Jones, C. Tyler-Smith, M.E. Hurles, N.P. Carter, S.W. Scherer, C. Lee, Copy number variation: New insights in genome diversity, *Genome Res.* 16 (2006) 949-961.
- [53] J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly, Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics* 155 (2000) 945-959.
- [54] J.E. Maragos, Revised checklist of extant shallow-water stony coral species from Hawaii (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia), *Bishop Mus Occas Pap* 42 (1995) 54-55.

Figure captions

Figure 1 Median-joining network of mitochondrial haplotypes. Colored circles represent haplotypes and their area is proportional to the number of times a given haplotype was sampled. Colors within the circles indicate the morphotypes of the individuals in which each haplotype was detected (dark blue: *P. damicornis*; pink: *P. meandrina*; green: *P. ligulata*; pale blue: *P. eydouxii*; red: *P. molokensis*). Mutations are shown in red on the branches (numbers refer to positions in the alignments) and haplotype clusters are enclosed in dashed circles.

Figure 2 Examples of traces showing variation in the number of end peaks due to different numbers of haplotypes per individual. From top to bottom: ATP synthase, sample 9; ATP synthase, sample 2; ATP synthase, sample 4; calmodulin, sample 37. All ATP synthase haplotypes end with a C (a A overhang is added by the polymerase during the PCR process), whereas calmodulin haplotype sequences end with a A that appears artefactually larger than the actual end peak.

Figure 3 Network of ITS2 haplotypes. Colored curved lines connect haplotypes that co-occur in at least one individual, and their width is drawn proportional to the number of individuals in which the two haplotypes co-occur. Color code for the lines is the same as for the haplotypes (dark blue: *P. damicornis*; pink: *P. meandrina*; green: *P. ligulata*; pale blue: *P. eydouxii*; red: *P. molokensis*). Clusters of haplotypes that correspond to clusters of individuals are enclosed in dashed circle: for instance, all *P. ligulata* haplotypes fall into one such cluster, and each of the two pools of co-occurring haplotypes observed within this cluster corresponds to a distinct potential field for recombination (FFR). The *P. eydouxii* cluster on the right side of the network comprises a single pool of co-occurring haplotypes; hence, in our dataset all individuals of the *P. eydouxii* morphotype are part of a single FFR.

Figure 4 Network of calmodulin haplotypes (dark blue: *P. damicornis*; pink: *P. meandrina*; green: *P. ligulata*; pale blue: *P. eydouxii*; red: *P. molokensis*).

Figure 5 Network of elongation factor-1 α haplotypes (dark blue: *P. damicornis*; pink: *P. meandrina*; green: *P. ligulata*; pale blue: *P. eydouxii*; red: *P. molokensis*).

Figure 6 Network of ATP synthase β subunit haplotypes (dark blue: *P. damicornis*; pink: *P. meandrina*; green: *P. ligulata*; pale blue: *P. eydouxi*; red: *P. molokensis*).

Table captions

Table 1 List of samples showing morphology, sampling location and number of haplotypes for each marker. Haplotype numbers higher than 2 are shown in bold letters. Location codes: KB, Kaneohe Bay (21°26'N 157°47'W); KP, Kahe Point (121°21'N 158°07'W); MM, Moku Manu (21°28'N 157°43'W).

Table 2 List of primers used for PCR amplification. ORF: mitochondrial open-reading frame; CR: putative mitochondrial control region; ITS2: internal transcribed spacer 2; Calm: calmodulin; EF-1 α : elongation factor-1 α ; ATPS β : ATP synthase β subunit.

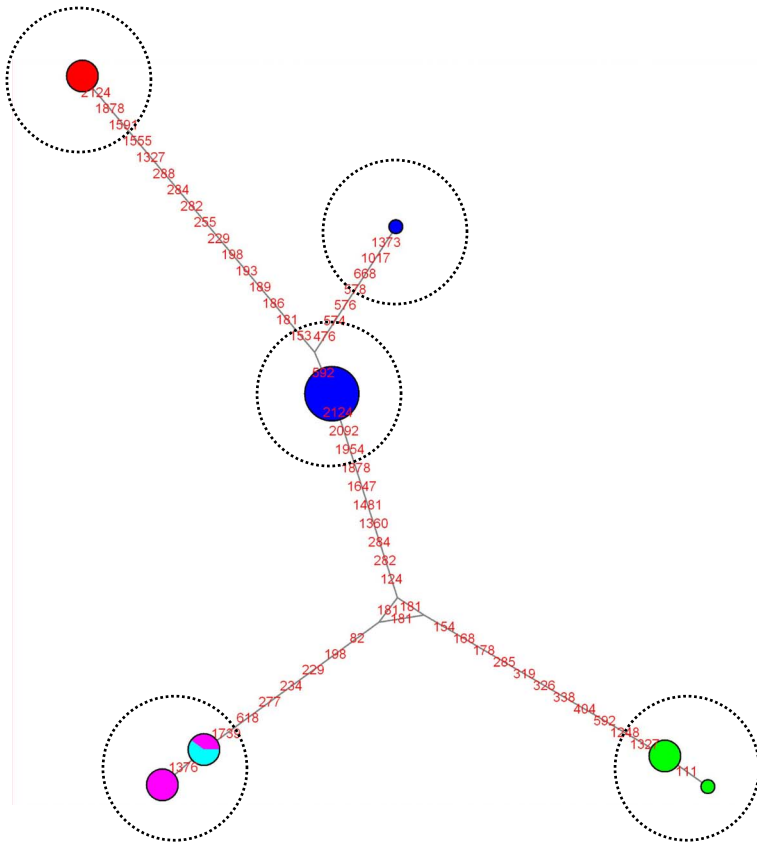


Figure 1 (mitochondrial DNA)

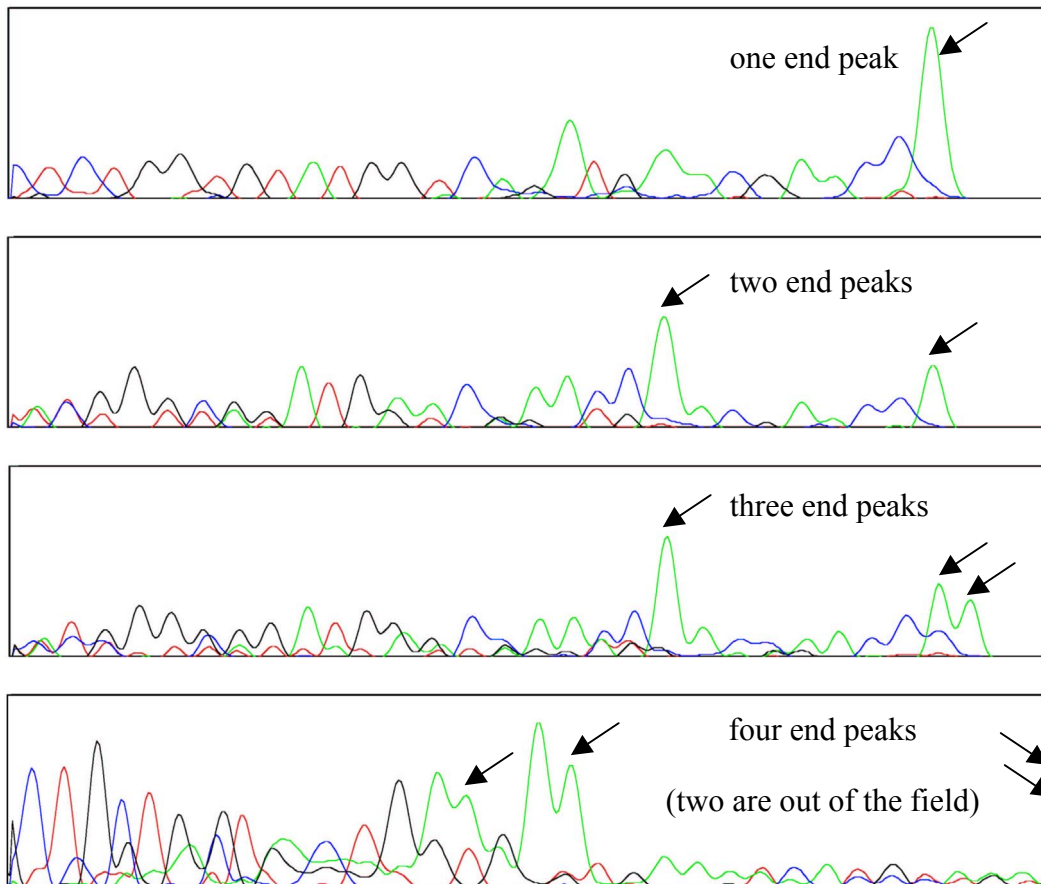


Figure 2 (PCR end peaks)

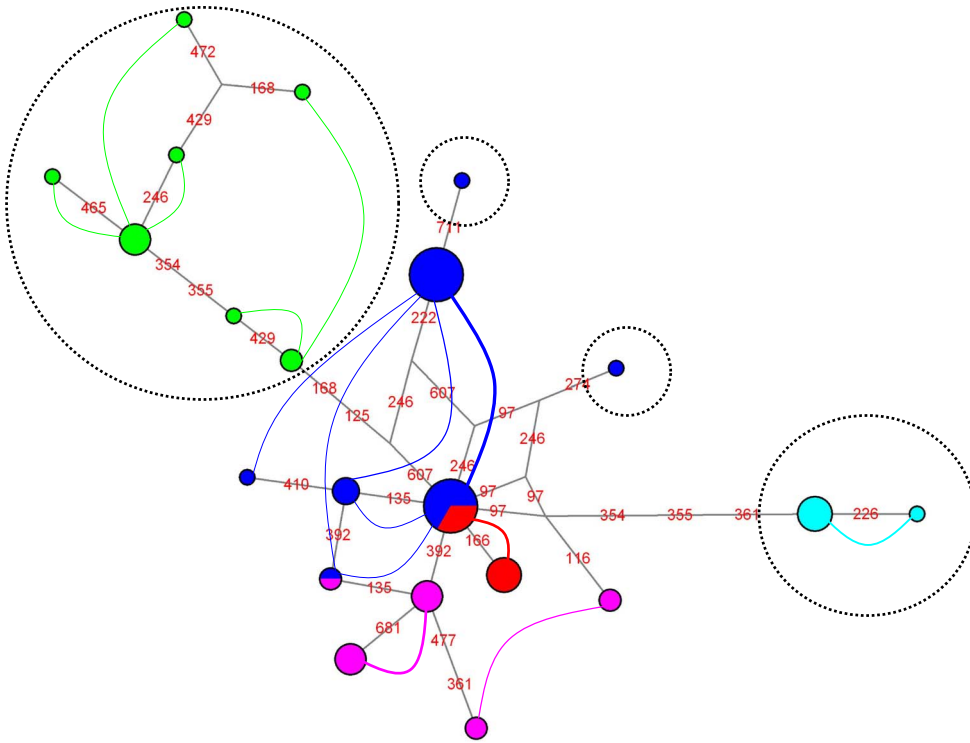


Figure 3 (ITS2)

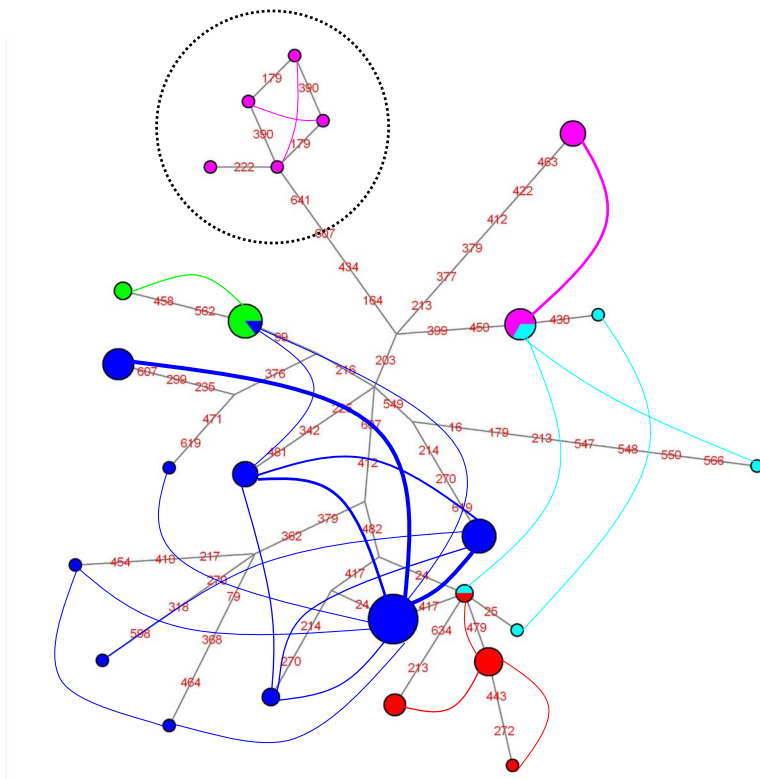


Figure 4 (Calmodulin intron)

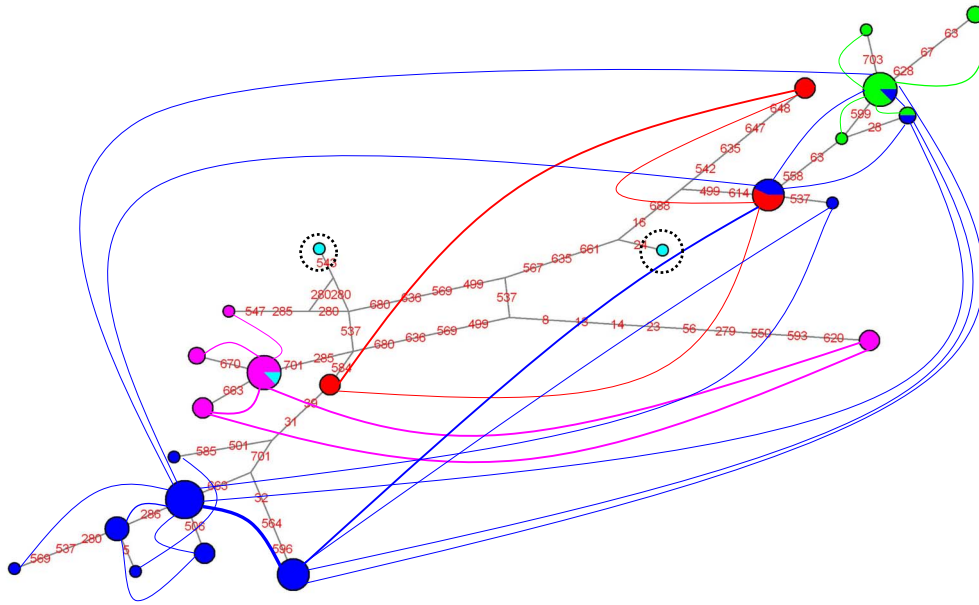


Figure 5 (Elongation factor-1α intron)

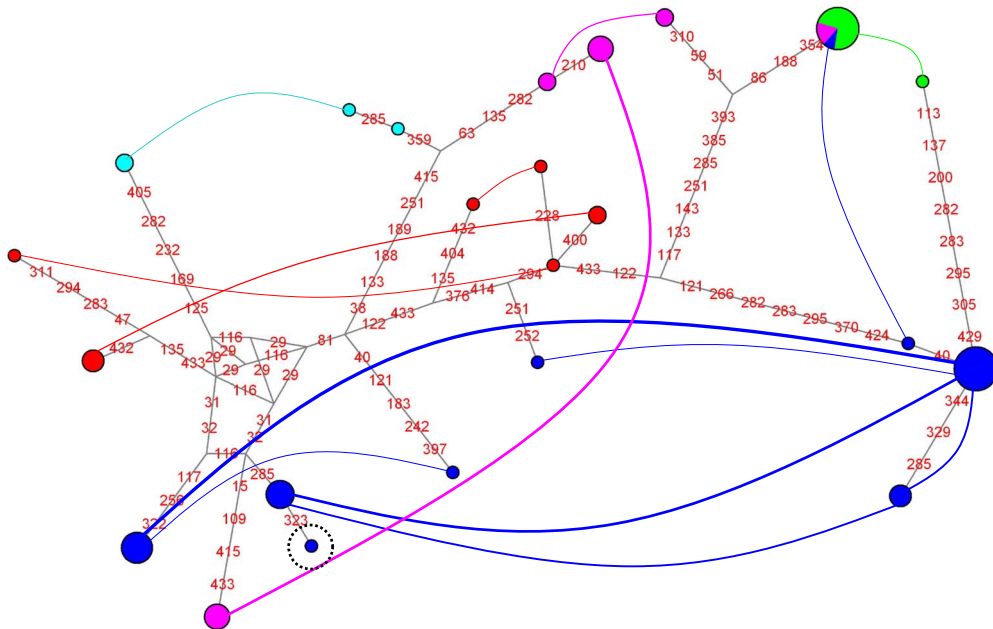


Figure 6 (ATP synthase subunit β intron)

Sample	Morphotype	Location	Number of haplotypes					
			ORF	CR	ITS2	Calm	EF-1 α	ATPS β
1	<i>P. damicornis</i>	KB	1	1	1	2	2	1
2	-	-	1	1	1	2	2	2
3	-	-	1	1	2	4	3	3
4	-	-	1	1	1	4	2	3
5	-	-	1	1	2	3	2	3
6	-	-	1	1	3	2	2	2
7	-	-	1	1	2	3	5	2
8	-	-	1	1	2	2	1	2
9	-	-	1	1	1	2	2	1
10	-	-	1	1	1	2	2	2
11	-	-	1	1	2	2	2	1
12	-	-	1	1	2	2	1	2
13	-	-	1	1	2	3	2	2
14	-	-	1	1	2	2	2	1
15	-	-	1	1	2	2	2	2
16	-	-	1	1	1	2	1	2
17	<i>P. meandrina</i>	-	1	1	2	2	1	2
18	-	-	1	1	2	2	2	2
19	-	-	1	1	2	2	3	2
20	-	-	1	1	2	2	3	2
21	-	-	1	1	2	2	3	2
22	-	-	1	1	2	2	2	2
23	-	-	1	1	2	1	2	2
24	<i>P. ligulata</i>	-	1	1	2	2	2	2
25	-	-	1	1	2	1	2	1
26	-	-	1	1	2	1	2	1
27	-	-	1	1	1	1	2	1
28	-	-	1	1	2	2	2	2
29	-	-	1	1	2	1	2	2
30	<i>P. eydouxi</i>	KP	1	1	2	2	1	2
31	-	-	1	1	2	2	1	1
32	-	-	1	1	2	2	1	1
33	<i>P. molokensis</i>	MM	1	1	2	2	1	2
34	-	-	1	1	1	2	1	2
35	-	-	1	1	2	2	2	1
36	-	-	1	1	2	2	2	2
37	-	-	1	1	2	2	4	2

Table 1 (list of samples)

Marker	Primer name	Primer sequence
ORF	FATP6.1	5'-TTGGGSATTCGTTTAGCAG-3'
	RORF	5'-SCCAATATGTAAACASCATGTCA-3'
CR	FNAD5.2deg	5'-GCCYAGRGGTGTGTTCAAT-3'
	RCOI3	5'-CGCAGAAAGCTCCAATCGTA-3'
ITS2	ITSc2-5	5'-AGCCAGCTGCGATAAGTAGTG-3'
	R28S1	5'-GCTGCAATCCCAAACAACCC-3'
Calm	FCalmPoc	5'-TGAGGTTGATGCTGATGGTATG-3'
	RCalmInt	5'-GAAATCAATTGTTCCATTACCTG-3'
EF-1 α	FefIntr2	5'-TTACCGGTACTIONCACAGTTAAGAC-3'
	RefPoc1	5'-TCACCAGTACCAGCAGCAAC-3'
ATPS β	ATPS β 2	5'-TGAAAGACAAGAGCTCCAAGGTA-3'
	ATPS β r2	5'-GGTTCGTTTCATCTGACCATACAC-3'

Table 2 (list of primers)

3. A Clipperton, données mitochondriales et nucléaires sont congruentes et suggèrent la présence de deux espèces putatives

Îlot corallien le plus à l'est de l'océan Pacifique et l'un des plus isolés au monde, Clipperton présente un grand intérêt pour les biogéographes qui s'efforcent de retracer l'histoire de la faune et de la flore de cette région. Les coraux de Clipperton, notamment, ont fait l'objet de nombreuses publications (Durham & Barnard, 1952; Hertlein & Emerson, 1957; Sachet, 1962a, 1962b; Wellington et al., 1995; Glynn et al., 1996; Carricart-Ganivet & Reyes-Bonilla, 1999; Linsley et al., 1999; Glynn & Ault, 2000; Reyes Bonilla & Carricart-Ganivet, 2000; Ketchum & Reyes Bonilla, 2001; Flot & Adjeroud, sous presse). Cependant, l'évaluation de la biodiversité corallienne de Clipperton est rendue difficile par les incertitudes taxonomiques concernant les genres principaux peuplant les récifs de cette île : les genres *Pavona*, *Pocillopora* et *Porites*. Ainsi, en ce qui concerne les coraux du genre *Pocillopora*, trois espèces (*P. meandrina nobilis*, *P. verrucosa*, *Pocillopora* sp.) sont signalées par Hertlein et Emerson (1957), tandis que Glynn et al. (1996) n'en reconnaissent qu'une, peut-être deux (*Pocillopora* sp.), Carricart-Ganivet et Reyes-Bonilla en observent trois (*P. verrucosa*, *P. meandrina*, *P. sp.*) et l'inventaire morphologique réalisé au cours de l'expédition du Dr. Jean-Louis Etienne (Flot & Adjeroud, sous presse) en trouve six (*P. effusus*, *P. elegans*, *P. eydouxi*, *P. meandrina*, *P. verrucosa* et *P. woodjonesi*). Pour clarifier cette situation pour le moins confuse, quatre des marqueurs développés pendant la thèse ont été séquencés dans la population récoltée à Clipperton (74 individus) : les deux marqueurs mitochondriaux, mais aussi l'ITS2 et l'intron du gène de la sous-unité β de l'ATP synthétase (les deux marqueurs nucléaires présentant le moins d'haplotypes par individus à Hawaii, et donc les plus facilement séquençables).

Un total de quatre haplotypes mitochondriaux sont détectés, formant deux groupes nettement distincts (respectivement colorés en violet et en rouge sur la figure 5). Dans le cas de l'ITS2 (figure 6), malgré une diversité haplotypique plus importante, deux groupes sont également détectés qui sont congruents avec les groupes observés précédemment. En ce qui concerne l'ATP synthétase (figure 7), deux champs de recombinaison (Doyle, 1995) sont détectés qui comprennent chacun les individus d'un de ces deux groupes. La congruence observée entre trois marqueurs indépendants (ADN mitochondrial, ITS2, ATP synthétase) suggère fortement

la présence d'au moins deux espèces de *Pocillopora* à Clipperton ; et vu la très faible diversité mitochondriale observée à l'intérieur de chaque groupe, l'hypothèse de deux espèces peut être avancée. Par ailleurs, un retour rapide à la morphologie des individus de chaque groupe montre que celle-ci est compatible avec la délimitation moléculaire : un caractère diagnostique (la présence de renflements globuleux entre les branches du corail et à la base de celles-ci) permet de distinguer les individus des deux groupes (figure 8 et 9).

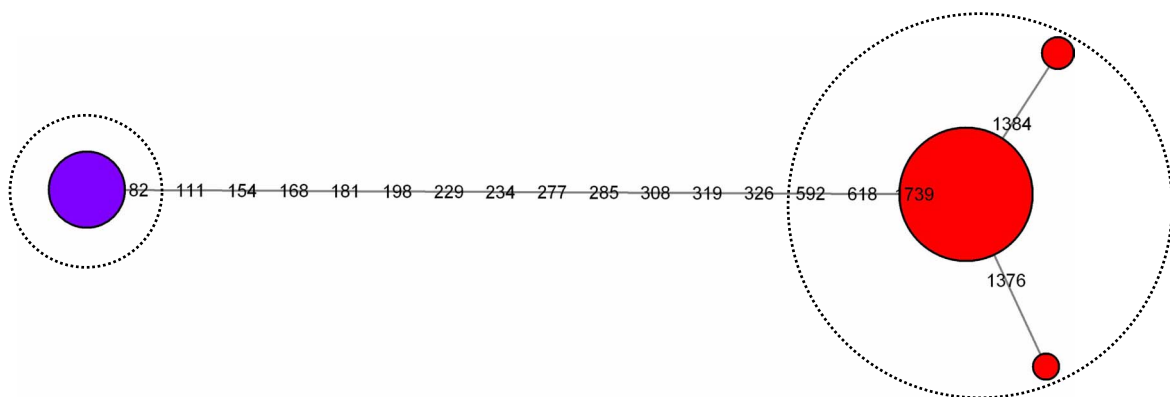


Figure 7 : Réseau d'haplotypes mitochondriaux obtenu à Clipperton (les disques colorés correspondent aux haplotypes, et leur diamètre est proportionnel à la fréquence de l'haplotype correspondant ; les cercles pointillés entourent chaque groupe d'haplotypes identifié)

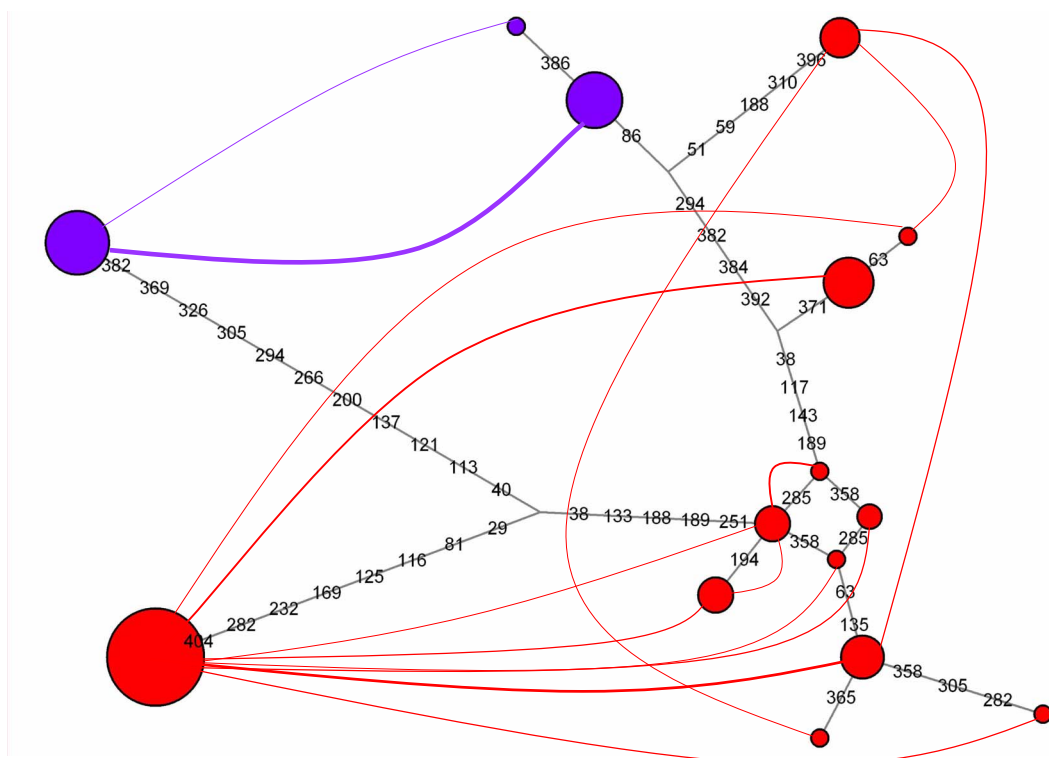


Figure 9 : Réseau d'haplotypes obtenu à Clipperton pour le marqueur ATP synthétase

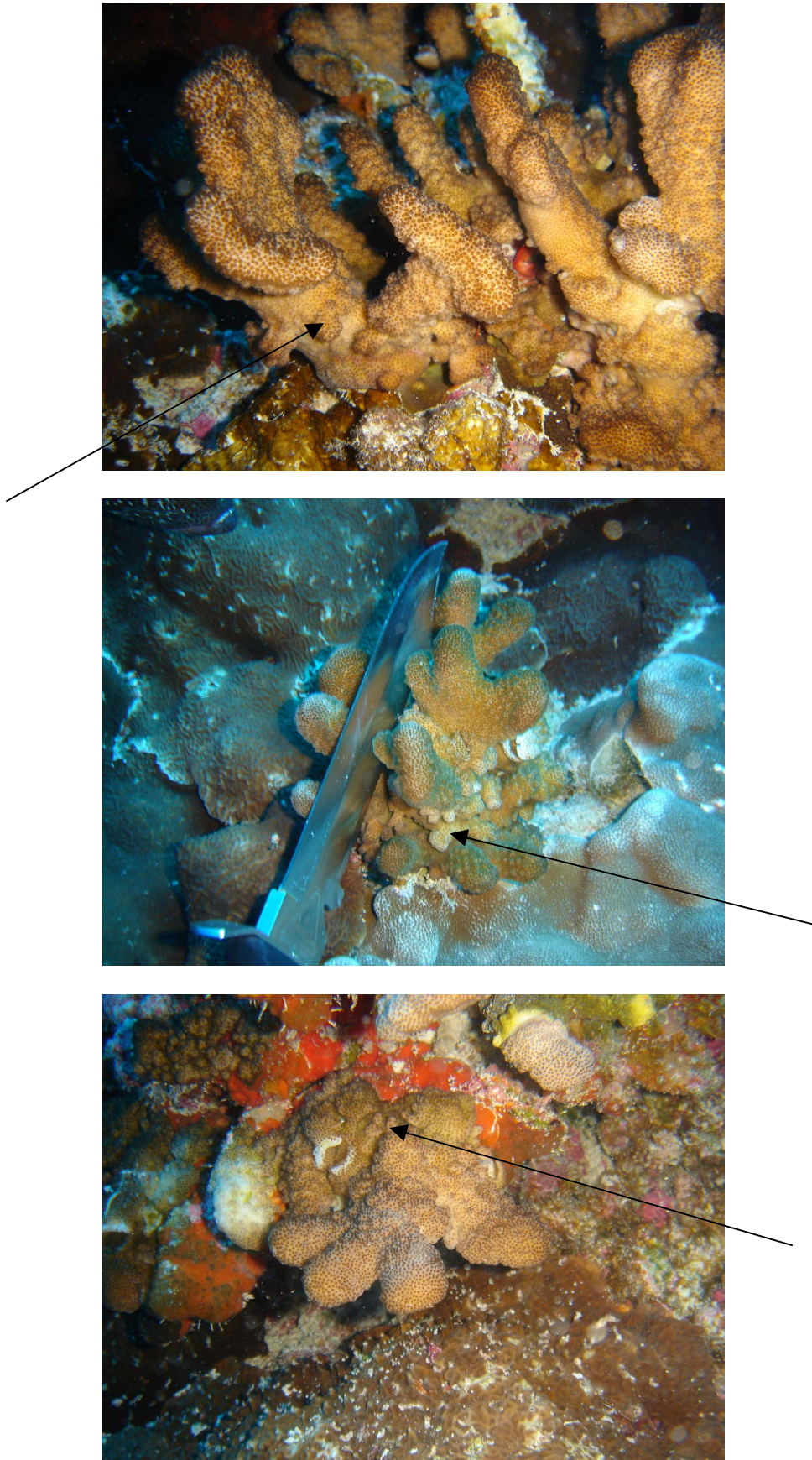


Figure 10 : Exemples de morphologies des individus renfermant les haplotypes figurés en violet sur les figures précédentes (chaque flèche pointe un renflement globuleux caractéristique)



Figure 11 : Exemples de morphologies des individus renfermant les haplotypes figurés en rouge sur les figures précédentes (aucun renflement globuleux n'est observé entre les branches ni à leur base)

4. A l'échelle du Pacifique, l'analyse du réseau d'haplotypes mitochondriaux permet de proposer de nouvelles hypothèses de délimitation d'espèces

Les deux marqueurs mitochondriaux ont été séquencés pour l'ensemble des individus échantillonnés. Comme attendu dans le cas de deux marqueurs mitochondriaux, les résultats obtenus lors d'analyses séparées sont parfaitement congruents, et seul le résultat de l'analyse combinée des deux marqueurs est présenté ci-dessous :

Localité	Nombre d'individus séquencés	Nombre d'haplotypes mitochondriaux
Hawaii	37	7
Okinawa	175	15
Nouvelle-Calédonie	330	22
Clipperton	74	4
Philippines	65	8
Mexique	75	3
Toutes localités	756	33

Bien que l'effort d'échantillonnage (en terme de nombre d'individus échantillonnés) ait varié d'une localité à l'autre, on remarque que l'est du Pacifique (Clipperton, Mexique) se caractérise par un faible nombre d'haplotypes par rapport à l'ouest (Okinawa, Nouvelle-Calédonie, Philippines) et au centre (Hawaii).

Le réseau d'haplotype correspondant, construit à l'aide de l'algorithme de *median-joining* implémenté dans le programme Network (Bandelt et al., 1999), est présenté sur la figure 12. On n'observe pas de structuration géographique apparente, mais la plupart des haplotypes sont spécifiques d'une ou plusieurs localités : seul un haplotype (en bas à gauche du réseau) est retrouvé dans toutes les localités échantillonnées.

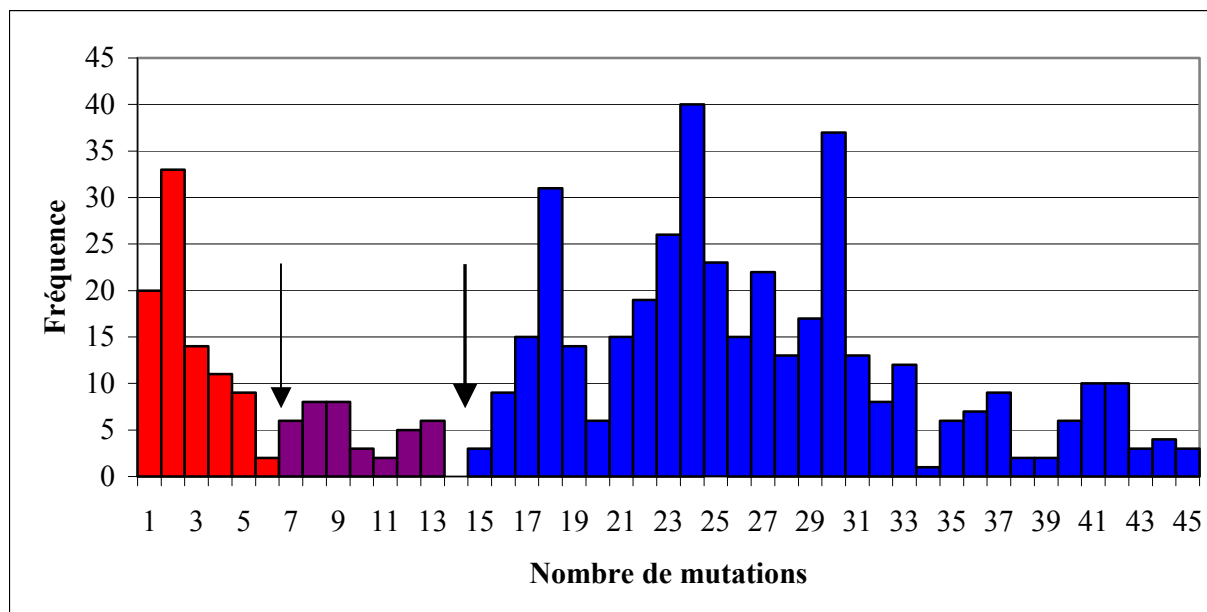


Figure 13 : Histogramme montrant la distribution du nombre de mutations entre paires d'haplotypes (en rouge : distances intraspécifiques putatives ; en bleu : distances interspécifiques putatives; en violet : distances intermédiaires). Les flèches pointent deux seuils possibles qui conduisent aux hypothèses de délimitation d'espèces de la figure 14.

En fonction du seuil retenu, le nombre de groupes d'haplotypes mitochondriaux (et donc d'espèces putatives) varie également :

Localité	Nombre de groupes (1 ^{ère} hypothèse)	Nombre de groupes (2 ^{ème} hypothèse)
Hawaii	5	4
Okinawa	5	3
Nouvelle-Calédonie	7	4
Clipperton	2	2
Philippines	3	3
Mexique	2	2

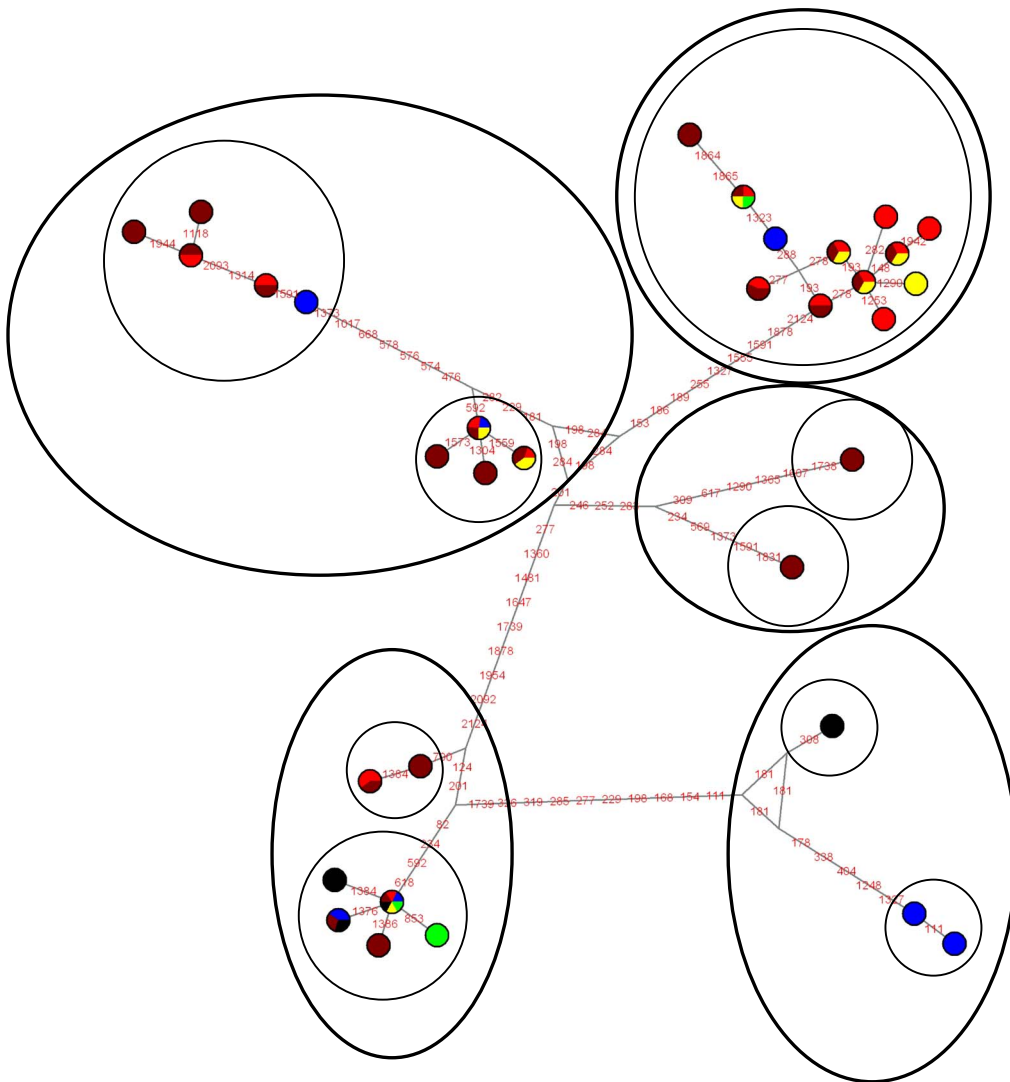


Figure 14 : Réseau d'haplotypes mitochondriaux montrant les groupements en espèces putatives selon que la valeur-seuil maximale pour des distances interspécifiques est fixée à 6 mutations (traits fins) ou à 14 (traits épais).

IV. Conclusion et perspectives

Les résultats présentés ici à l'échelle du Pacifique sont encore préliminaires, dans la mesure où le séquençage des marqueurs ITS2 et ATP synthétase n'est pas terminé pour tous les individus récoltés. Ces données supplémentaires permettront peut-être de trancher entre les différentes hypothèses possibles de délimitation d'espèces basées sur l'analyse du génome mitochondrial. Dans les deux hypothèses ici présentées, on remarque cependant que le nombre d'espèces putatives présentes à l'est du Pacifique est inférieur au nombre d'espèces putatives présentes à l'ouest : ceci corrobore les données concernant le nombre d'haplotypes mitochondriaux détectés, plus faible à l'est du Pacifique qu'à l'ouest, et devra conduire à une réévaluation de l'hypothèse d'un centre de biodiversité des coraux du genre *Pocillopora* à l'est du Pacifique précédemment formulée sur des bases morphologiques. Ce contraste entre l'appréciation morphologique et moléculaire de la biodiversité des coraux du genre *Pocillopora* est particulièrement évident à Clipperton, où six espèces morphologiques laissent place à deux espèces putatives une fois les données moléculaires prises en compte.

Quelles que soient les hypothèses de délimitation d'espèces retenues une fois le séquençage des marqueurs nucléaires terminé, celles-ci devront être testées à l'aide d'autres jeux de données indépendants : marqueurs microsatellites ou allozymes (afin de détecter et quantifier les flux de gènes entre populations appartenant à la même espèce putative ou à des espèces différentes), marqueurs cytogénétiques (afin de déterminer si ces espèces putatives présentent des nombres chromosomiques différents, et peut-être ainsi pouvoir interpréter les nombres élevés d'haplotypes par individu observés pour chaque marqueur nucléaire), caractères morphologiques (afin de rechercher des caractères diagnostiques pouvant faciliter la reconnaissance des espèces nouvellement délimitées sur le terrain et dans les collections historiques). Dans le cas des microsatellites et des caractères morphologiques, ceci pourra se faire à partir des collections réunies dans le cadre de cette thèse ; par contre, l'étude de marqueurs allozymes et cytogénétiques nécessitera la collecte de matériel nouveau suivant un protocole différent de celui employé ici.

Ces résultats devront être élargis à d'autres localités, notamment à la Polynésie qui représente un 'trou' majeur dans mon échantillonnage concernant l'océan Pacifique, ainsi qu'à l'océan Indien (Madagascar, Sri Lanka) et à la Mer Rouge. D'autre part, le faible nombre d'espèces putatives identifiées aux Philippines est un résultat surprenant, notamment en comparaison de

la Nouvelle Calédonie et d'Okinawa, mais qui pourrait s'expliquer par le nombre relativement faible d'individus récoltés (65) et l'état de dégradation des récifs prospectés : des récoltes complémentaires seront nécessaires aux Philippines et si possibles dans les autres pays du 'triangle d'or de la biodiversité' : Indonésie, Malaisie, Papouasie-Nouvelle Guinée.

Lorsque des hypothèses de délimitation d'espèces fiables basées sur plusieurs jeux de données indépendants seront finalement disponibles, comprendre l'évolution de caractères tels que le mode de reproduction au sein du genre *Pocillopora* et étudier sa phylogéographie nécessitera de disposer d'arbres enracinés des différentes espèces putatives. Malheureusement, les marqueurs développés ici (régions variables mitochondriales, ITS2, introns de gènes nucléaires) sont trop variables pour cela, car les séquences obtenues chez *Pocillopora* ne sont pas alignables avec celles des genres pourtant supposés voisins *Seriatopora* et *Stylophora*. Obtenir une phylogénie des espèces du genre *Pocillopora* passera donc nécessairement par le séquençage d'autres marqueurs nucléaires et mitochondriaux plus conservés.

Une découverte étonnante faite au cours de cette thèse concerne la présence d'un gène nouveau et de fonction encore inconnue dans le génome mitochondrial des coraux des genres *Pocillopora*, *Seriatopora* et *Stylophora*. Ce résultat est d'autant plus surprenant que tous les génomes de madréporaires séquencés jusqu'à présent étaient très similaires, ce qui peut suggérer que *Pocillopora*, *Seriatopora* et *Stylophora* appartiennent à une lignée distincte au sein des coraux. Cette hypothèse pourra être testée par des reconstructions phylogénétiques à l'aide de marqueurs de séquence adaptés. La question de la fonction de ce marqueur, ainsi que l'origine de sa grande variabilité, devra faire l'objet d'études complémentaires ; de même, l'identification d'une seconde origine de réplication putative dans les génomes mitochondriaux de *Pocillopora*, *Seriatopora* et *Stylophora* demande à être testée par des méthodes biochimiques telles que celles employées dans les genres *Homo* et *Drosophila* (Kang et al., 1997; Saito et al., 2005).

Enfin, l'établissement d'un cadre de référence taxonomique testable pour les coraux du genre *Pocillopora* permet de poser en termes clairs un grand nombre de questions d'ordre biochimique, physiologique et écologique qui ne pouvaient être étudiées jusqu'à présent en raison du flou taxonomique concernant ces organismes. L'échantillonnage réuni au cours de la thèse pourra être réutilisé avec profit pour certaines de ces études, car chaque échantillon comporte, en sus de l'ADN nucléaire et mitochondrial du corail, les ADN nucléaires, mitochondriaux et chloroplastiques de ses zooxanthelles endosymbiotiques ainsi que les ADN des bactéries vivant à sa surface ou dans ses tissus. Le typage des zooxanthelles présentes

dans chaque échantillon et la comparaison des phylogénies de l'hôte et de ses symbiotes dinoflagellés pourrait ainsi permettre de déterminer si la transmission verticale des zooxanthelles observée chez les coraux du genre *Pocillopora* (Hirose et al., 2000, 2001) s'accompagne ou non d'une co-évolution... Les résultats préliminaires obtenus à ce sujet en marge de la thèse, alors que je ne disposais pas encore d'hypothèses moléculaires sur les délimitations des espèces du genre *Pocillopora*, sont présentés en fin d'annexe.

Annexe : autres articles publiés pendant la thèse

Article 6 : Comparative coral cytogenetics

Proceedings of the 10th International Coral Reef Symposium

soumis le 30 août 2004, accepté le 14 juillet 2005

Comparative coral cytogenetics

Jean-François FLOT^{1*}, Catherine OZOUF-COSTAZ², Makoto TSUCHIYA³, Robert VAN WOESIK⁴

¹UMR 7138 "Systématique, Adaptation, Evolution", Département Systématique et Evolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

²CNRS, IFR 101, Service de Systématique Moléculaire, Département Systématique et Evolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

³Department of Chemistry, Biology and Marine Science, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

⁴Department of Biological Sciences, Florida Institute of Technology, Florida, USA

*Corresponding author: J.-F. Flot

FAX: +33 1 40 79 38 44, email: jfflot@mnhn.fr

Abstract There is little information available on the chromosomes of scleractinian corals. Until now, the chromosome numbers for only 29 of the 800 species of reef corals have been published, which represents less than 4%. Furthermore, only 6 genera (of 110) in 4 families (of 18) have been examined. The data available show a considerable variation in diploid chromosome numbers within the genus *Acropora*, whereas a diploid chromosome number of 28 is conserved across 4 scleractinian families and may represent the basic chromosome number of this group. Here we present data regarding chromosome numbers and morphologies in six species of scleractinian corals. While the chromosome sizes of *Favia pallida* were suitable for karyotyping (1 to 5 µm in length), those of *Galaxea fascicularis*, *Acropora millepora*, *A. spathulata*, *A. papillare* and *A. nasuta* were too small (less than 1 µm in length) for identification and pairing. *F. pallida* had 14 pairs of metacentric to submetacentric chromosomes; diploid chromosome number estimates for the other species were 26 for *G. fascicularis* and *A. papillare*, 28 for *A. millepora* and *A. spathulata*, and 40 for *A. nasuta*.

Keywords *Acropora*, *Favia*, *Galaxea*, karyotype, chromosome number, polyploidy

Introduction

The number of chromosomes per cell is invariant for most species. Considerable information can be obtained by examining karyotypes: for example, sex determination depends in many cases on the presence or absence of sex chromosomes that may be morphologically differentiated. Comparing chromosomes in different species is also useful when examining evolutionary relationships. In plants, such as wheat, hybridization leads to network-like, or reticulate, phylogenies that can be examined through karyotyping.

Wijsman and Wijsman-Best (1973) first examined coral chromosomes by using somatic tissue from adult colonies. They observed numerous small chromosomes, but were not able to count them. Following the discovery

by Harrison et al. (1984) that the majority of coral species reproduce by releasing gametes into the water followed by external fertilization and development, Heyward (1985) used the rapidly dividing cells of such embryos to obtain karyotypes for *Goniopora lobata*, *Lobophyllia hemprichii*, *Montipora digitata* and *M. dilatata*. All four species, representing the 3 families Poritidae, Mussidae and Acroporidae, had 14 pairs of metacentric to submetacentric chromosomes following the nomenclature of Levan et al. (1964). Ten years later Kenyon (1997) observed 28 chromosomes in 16 species of *Acropora*, as well as in *Montipora verrucosa*, *M. spumosa* and *Fungia scutaria*; however, 6 other species of *Acropora* had disparate chromosome numbers of 24, 30 (2 species), 42, 48 and 54. These results indicate that there is considerable variation in chromosome numbers in at least some groups of scleractinian corals and that comparative cytogenetics may shed light on the systematics and evolution of these organisms.

Until now, the chromosome numbers of only 29 of approximately 800 reef coral species have been determined, representing 6 genera (of 110) in 4 families (of 18). Here we present new data on two coral species common in the Indo-Pacific, *Favia pallida* and *Galaxea fascicularis*, belonging to two families for which no chromosomal data were previously available (Faviidae and Oculinidae). Additionally, four species of *Acropora* were investigated, one of which is very common in Australia (*A. nasuta*). Three others (*A. millepora*, *A. spathulata*, *A. papillare*) present morphological similarities suggesting they may be related by polyploidization or hybridization, an hypothesis that we wished to examine in light of potential differences in their chromosome numbers.

Materials and Methods

Fertilization experiments were conducted at the Orpheus Island Marine Station (James Cook University, Australia) from December 3rd to 6th, 2001. Six species of corals were collected from the reefs near the island and kept in running seawater until spawning: *Favia pallida* Dana 1846, *Galaxea fascicularis* Linnaeus 1767,

Acropora millepora Ehrenberg 1834, *A. spathulata* Brook 1891, *A. papillare* Latypov 1992 and *A. nasuta* Dana 1846. For each species, gametes from three to six colonies were mixed in a large bowl of seawater to maximize fertilization success by avoiding self-incompatibility. Following Kenyon (1997), 10-hour old embryos received a 2-hour 0.02% colchicine treatment, followed by a 20-minute hypotonization in a mix of seawater and tap water (2:1). Embryos were then fixed using three changes of freshly mixed solution of absolute ethanol, glacial acetic acid and distilled water (2:1:1).

For light microscopic observations of the chromosomes, fixed embryos were soaked in diethyl ether for 4-24 hours in order to remove intra-cellular lipids, then returned to the fixative and transferred to a droplet of 2% lacto-aceto-orcein on a glass slide for staining. Best results were obtained with 5 minutes of staining followed by a few seconds of destaining in lactic acid. Stained embryos were squashed between a slide and a coverslip, sealed with transparent nail polish and observed using an Olympus BX50 optical microscope located at the Sesoko Station, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus. Digital pictures were taken using a DP50 Olympus camera connected to the microscope. Alternatively, fixed embryos were permeabilized for a few hours in a solution of 0.1% Triton X100, then soaked for 30 minutes in DAPI, a DNA-specific fluorescent dye. Chromosomes were observed under UV using a karyotyping workstation equipped with a Zeiss Axioplan microscope and the GENUS software from Applied Imaging, located at the Muséum National d'Histoire Naturelle in Paris.

Results

Chromosomes of *Favia pallida* varied from 1 to 5 μm in length in their most condensed state (Fig. 1). Chromosomes were easier to observe using DAPI than lacto-aceto-orcein; however, more morphological details could be seen using lacto-aceto-orcein than DAPI. This species was found to possess 14 pairs of metacentric to submetacentric chromosomes.



Fig. 1. Karyotype of *Favia pallida* (28 chromosomes).

Chromosomes of *Galaxea fascicularis* (Fig. 2) and the four species of *Acropora* examined (Fig. 3-6) were very small, i.e. less than 1 μm in length in their most condensed state. As a result, chromosome pairs could not be identified and we resorted to counting the numbers of chromosomes in several chromosome plates from several embryos. Lacto-aceto-orcein staining of the DNA yielded easier chromosome counts than DAPI staining because small particles of background fluorescence were difficult

to distinguish from bona fide chromosomes using the latter technique. No differences in chromosome numbers were observed between embryos of the same species. Estimate diploid numbers were 26 for *G. fascicularis* and *A. papillare*, 28 for *A. millepora* and *A. spathulata*, and 40 for *A. nasuta*. The chromosome number we found for *A. millepora* was the same as previously determined by Kenyon (1997).

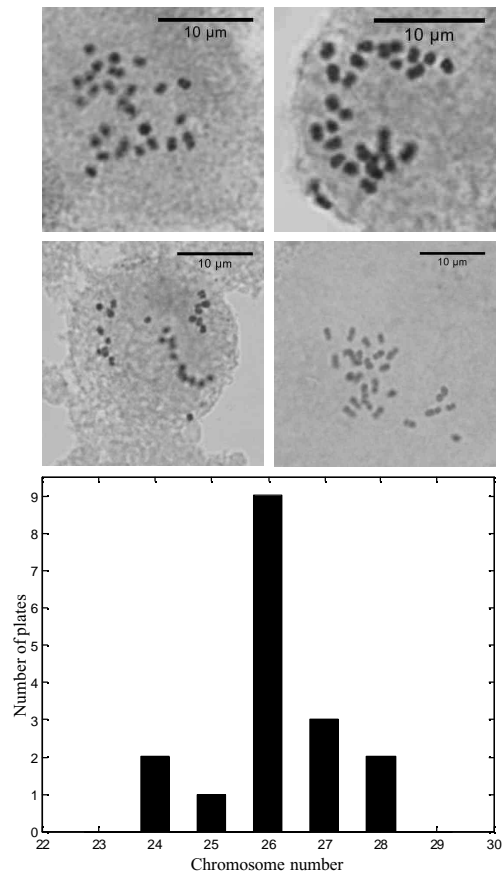


Fig. 2. Four examples of chromosome spreads obtained for *Galaxea fascicularis* (26 chromosomes) and histogram of the chromosome numbers observed in different metaphase plates.

Discussion

The data reported here have increased our knowledge of chromosome numbers in corals to 34 species. As only 4 families had been studied previously, the present study represents an increase in familial coverage of 50% with two families examined for the first time. However, chromosome numbers and morphologies for a vast number of species, genera and whole families of scleractinian corals remain undetermined.

We found 40 chromosomes in *A. nasuta*, which is the first time such a chromosome number is reported for any coral. Based on Kenyon's (1997) Figure 3, a chromosome number of 40 may result from the complete loss of a chromosome pair or the fusion of two pairs of chromosomes in a triploid Acroporid ($2n = 42$) such as *A. valida*, but there may be other explanations.

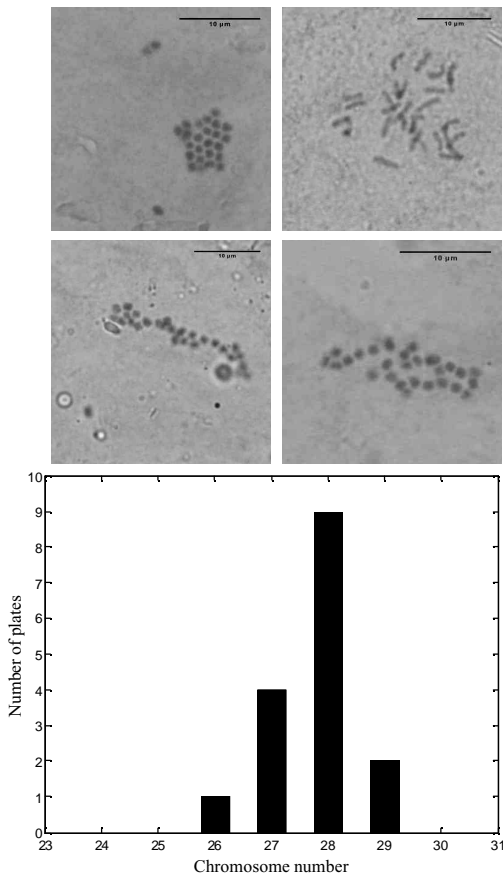


Fig. 3. Four examples of chromosome spreads obtained for *Acropora millepora* (28 chromosomes) and histogram of the chromosome numbers observed in different metaphase plates.

We found 14 pairs of metacentric to submetacentric chromosomes in *Favia pallida*, which is similar to karyotypes published by Heyward (1985) for four other species. Such a karyotype appears widespread among scleractinian corals since it has been observed in 4 genera belonging to 4 different families: *Montipora* (Acroporidae), *Favia* (Favidae), *Lobophyllia* (Mussidae) and *Goniopora* (Poritidae). Twenty-eight chromosomes were also reported for *Fungia scutaria* (Fungiidae) and 16 *Acropora* species by Kenyon (1997), but no details on chromosome morphology were given. We report here a similar chromosome number for one additional *Acropora* species, *A. spathulata*. Since a chromosome number of 28 is found in both the “robust” and “complex” clades of corals (Romano and Palumbi 1996; Cuif et al. 2003), it is probably ancestral among the Scleractinia. It is, however, not ancestral for Hexacorallia, since a diploid number of 32 chromosomes has been described for two species of sea anemones (Fukui 1993, 1996), and 30 chromosomes for two species of *Hydra* (Rahat et al. 1985). Twenty-six chromosomes, as observed in *Galaxea fascicularis* and *A. papillare*, could be derived from a primitive chromosome number of 28 by fusion of two chromosome pairs or complete loss of one pair of chromosomes. A more thorough examination of chromosome morphologies will allow us to test these hypotheses in the future.

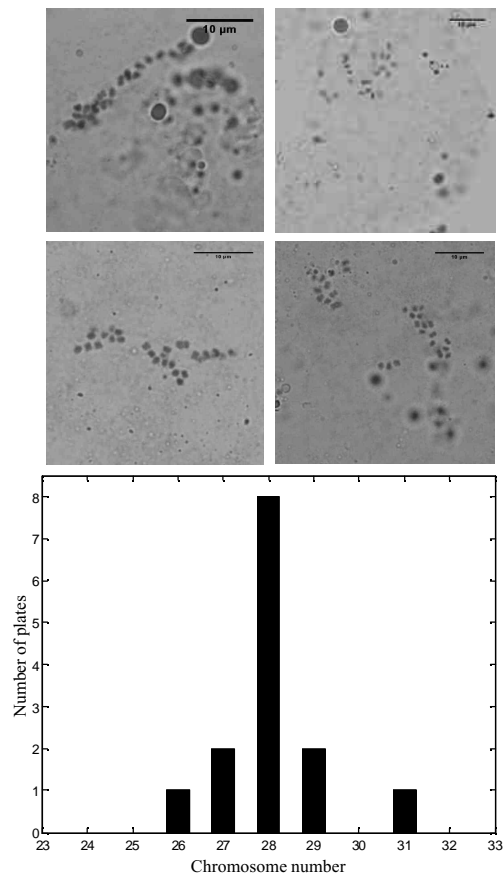


Fig. 4. Four examples of chromosome spreads obtained for *Acropora spathulata* (28 chromosomes) and histogram of the chromosome numbers observed in different metaphase plates.

It is difficult to count coral chromosomes on squash preparations because they fall at the lower end of the size range typical of animal chromosomes. Well-spread chromosomes are easier to count, but these counts are not reliable because chromosomes may be displaced to or from neighboring cells. Methodological improvements are needed before chromosome numbers become widely used in coral systematics. Improvements can be made using fluorescent antibodies directed towards coral histones; precise three-dimensional pictures of the chromosomes could then be obtained using a confocal laser fluorescent microscope. Fast and reliable chromosome counts could also be provided by the use of flow cytometry, which is often used to quantify chromosome numbers in animal and plant nuclei and is able to distinguish differences of less than one chromosome. Alternatively, the technique of fluorescence *in-situ* hybridization using fluorescent DNA probes targeting specific sequences would allow researchers to draw homologies between the chromosomes of different coral species, yielding a wealth of new taxonomical information. Such techniques would also allow us to easily check whether species with unusually high chromosome numbers evolved by repeated chromosomal fissions, autopolyploidy or allopolyploidy.

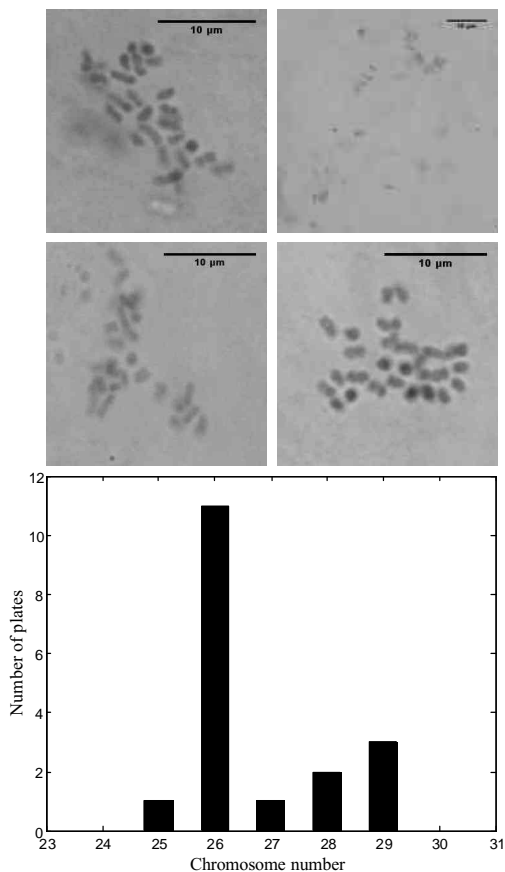


Fig. 5. Four examples of chromosome spreads obtained for *Acropora papillare* (26 chromosomes) and histogram of the chromosome numbers observed in different metaphase plates.

Acknowledgements

J.-F. Flot received financial support from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (Monbukagakusho), the Ecole Normale Supérieure de Cachan (Prix d'Action Internationale 2001) and the PADI AWARE Foundation (Asia Pacific Office). Thanks to Dr. Andrew Baird, Dr. Morgan Pratchett and Marie Kospartov for their assistance with sample collection. Thanks also to Dr. Bette Willis for sharing coral embryos on spawning nights and to Dr. Akihiro Takemura for allowing part of these experiments to be conducted in his laboratory at the Sesoko Station, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus. Jean-Pierre Coutanceau provided advice and assistance with using the karyotyping workstation located at the Muséum National d'Histoire Naturelle in Paris. Thanks to Kristen Marhaver and an anonymous reviewer for their helpful comments and suggestions on an earlier version of this paper. J.-F. Flot's participation in the 10th ICRS was supported by the *Ecole Doctorale "Diversité du Vivant"* and by the *Comité National des Sciences Biologiques*.

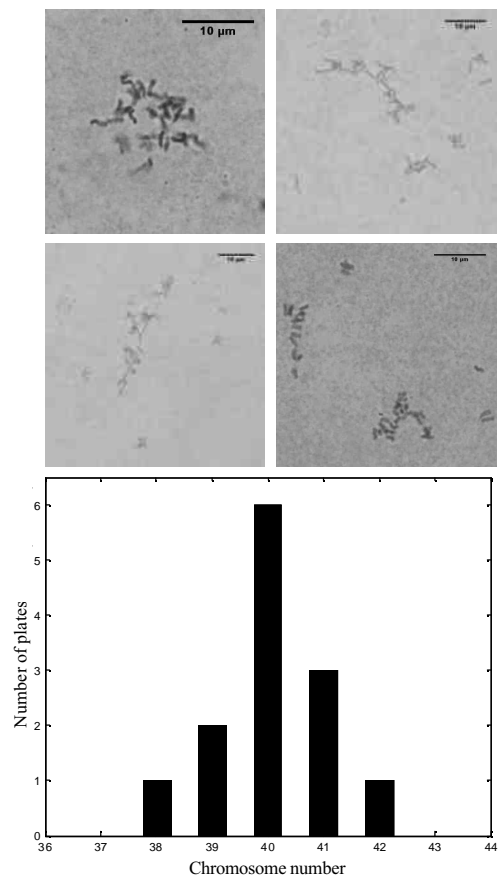


Fig. 6. Four examples of chromosome spreads obtained for *Acropora nasuta* (40 chromosomes) and histogram of the chromosome numbers observed in different metaphase plates.

References

- Cuif J-P, Lecointre G, Perrin C, Tillier A, Tillier S (2003) Patterns of septal biomineralization in Scleractinia compared with their 28S rRNA phylogeny: a dual approach for a new taxonomic framework. *Zool Scripta* 32: 459-473
- Fukui Y (1993) Chromosomes of the sea anemone *Haliplanella lucia* (= *H. lineata*) (Cnidaria: Actiniaria). *J Mar Biol Ass UK* 73: 971-973
- Fukui Y (1996) Karyotype of the sea anemone *Aiptasiomorpha* sp. (Anthozoa, Actiniaria) from Japan. *Biol Bull* 190: 6-7
- Harrison PG, Babcock R, Bull G, Oliver J, Wallace C, Willis B (1984) Mass spawning in tropical reef corals. *Science*: 1186-1189
- Heyward AJ (1985) Comparative coral karyology. Fifth International Coral Reef Congress 6: 47-51.
- Kenyon JC (1997) Models of reticulate evolution in the coral genus *Acropora* based on chromosome numbers: parallels with plants. *Evolution* 51: 756-767
- Levan A, Fredga D, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220
- Rahat A, Rahat M, Searle JB (1985) A simple method for the preparation of hydra chromosome spreads:

introducing chromosome counts into hydra taxonomy.
Experientia 41: 282-283

Romano SL, Palumbi SR (1996) Evolution of scleractinian corals inferred from molecular systematics. *Science* 271: 640-642

Wijsman HJ, Wijsman-Best M (1973) A note on the chromosomes of some madreporarian corals from the Mediterranean (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia: Dendrophyllidae, Caryophyllidae, Faviidae). *Genen Phenen* 16: 61-64

Article 7 : Les coraux de Clipperton

Clipperton: environnement et biodiversité d'un microcosme océanique

édité par Loïc Charpy, collection Patrimoines naturels, MNHN

contribution envoyée le 31 janvier 2007

Les coraux de Clipperton

Jean-François Flot (1), Mehdi Adjeroud (2)

(1) UMR 7138 UPMC-CNRS-MNHN-IRD « Systématique, Adaptation, Evolution », Département Systématique & Evolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP 26, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France, jfflot@mnhn.fr

(2) Ecole Pratique des Hautes Etudes, Université de Perpignan, Laboratoire « Ecosystèmes Aquatiques Tropicaux et Méditerranéens » UMR 8046 CNRS-EPHE, 66860 Perpignan, France, et Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement, BP 1013 Papetoai, Moorea, Polynésie Française, adjeroud@univ-perp.fr

Introduction

L'île de Clipperton est en grande partie constituée d'une accumulation de squelettes carbonatés de coraux, ce qui s'observe aisément sur une coupe naturelle de la partie superficielle de l'îlot (Fig. 1) ; seul le rocher témoigne encore de la structure volcanique d'origine qui a permis la colonisation initiale par les coraux. Pendant longtemps, Clipperton fut d'ailleurs considéré comme l'unique récif corallien véritable du Pacifique-Est : on pensait que les coraux des côtes sud-américaines, des Galápagos et des Iles Revillagigedo, malgré leur abondance locale, ne formaient pas de récifs coralliens à proprement parler, c'est-à-dire de bioconstructions structurées de carbonate de calcium (Glynn *et al.* 1972 ; Dana 1975 ; Cortés 1997). Même si l'existence de récifs coralliens à ces autres localités est maintenant reconnue, Clipperton n'en demeure pas moins l'un des îlots coralliens les plus isolés au monde, et le plus à l'est du Pacifique (Sachet 1962) : pour ces raisons, l'étude de sa faune corallienne est d'un grand intérêt systématique et biogéographique. Nous allons nous pencher ici sur les principaux organismes à l'origine de cette prodigieuse accumulation de carbonate de calcium : les coraux. Après avoir passé en revue les différentes espèces recensées à Clipperton et esquissé les problèmes posés par leur taxonomie, nous aborderons une partie de leur écologie en examinant la structure des communautés et les schémas de répartition des principales espèces.

Les coraux : définitions et aperçu historique

Au cours des siècles le terme ‘corail’ a été utilisé dans des sens divers, mais la plupart des auteurs actuels limitent son étendue aux seuls cnidaires qui secrètent un squelette externe massif composé de carbonate de calcium (Yonge 1968), excluant de cette manière les ‘coraux mous’ et autres octocoralliaires peu ou pas calcifiés tels que les gorgones. Les coraux au sens large comprennent alors des hydrozoaires tels que *Millepora* (corail de feu), des octocoralliaires entièrement calcifiés tels que *Corallium rubrum* (corail rouge), *Heliopora coerulea* (corail bleu) et *Tubipora musica*, et les coraux *sensu stricto* (scléactiniaires, également appelés madréporaires). Ces derniers sont majoritaires et, avec les anémones de mer, les zoanthaires et les corallimorphes, constituent le groupe des hexacoralliaires. Hexacoralliaires et octocoralliaires font partie des anthozoaires, ‘animaux-fleurs’ dont la nature animale ne fut établie qu’au XVIII^e siècle par Réaumur (1710). Parmi les scléactiniaires, certains établissent des relations symbiotiques avec des algues dinoflagellées capables de photosynthèse (zooxanthelles) : c’est le cas de la plupart des coraux tropicaux, qualifiés également d’hermatypiques (Wells 1933 ; Schuhmacher & Zibrowius 1985) car ils participent activement à la construction de récifs (ερμα en grec).

Dès la première édition du *Systema naturae* (1735), Linné plaçait les ‘orties de mer’, autrement dit les anémones, dans le groupe vaste et hétérogène des zoophytes ; dans les éditions ultérieures, les coraux étaient rangés parmi les lithophytes et appartenaient pour la plupart au genre *Madrepora* (d’où le terme ‘madréporaires’ qui les désigne encore aujourd’hui). Au cours du siècle suivant, de nombreux auteurs (notamment Pallas 1766 ; Forskål 1775 ; Ellis & Solander 1786 ; Esper 1794-1797 ; Lamarck 1816 ; Ehrenberg 1834) décrivent de nouvelles espèces d’anthozoaires et créèrent de nouveaux genres : ainsi Lamarck dans son *Histoire naturelle des animaux sans vertèbres* (1816) distingue-t-il 18 genres de ‘polypiers lamellifères’. Il faudra cependant attendre les travaux de Dana (1846) aux Etats-Unis, puis ceux de Milne Edwards & Haime (1857) en France pour que la classification actuelle des coraux voie le jour, au moins dans ses grandes lignes. Cette classification apparaît dans sa forme la plus aboutie dans les monographies de Vaughan & Wells (1943) puis de Wells (1956). Une révision récente (Veron & Stafford-Smith 2000) distingue 800 espèces de coraux hermatypiques, repartis en 110 genres et 18 familles.

La plupart des espèces de coraux sont des organismes coloniaux, c’est-à-dire qu’ils se composent d’une répétition d’organismes génétiquement identiques produits par bourgeonnement (reproduction asexuée) et restant en contact les uns avec les autres (Jackson

& Coates 1986). Parfois, l'unité de base, appelée polype, est si petite qu'elle est difficilement reconnaissable à l'œil nu (*Pocillopora*, Figs 2 et 3). D'autres espèces possèdent de larges polypes (*Tubastrea*, Fig. 4), voire un seul très grand (*Fungia*). Ceci pose le problème de la définition de l'individu chez les coraux, d'autant qu'une colonie peut se fragmenter, par exemple sous l'effet des vagues ou de la prédation : les fragments peuvent alors parcourir de grandes distances avant de se fixer pour former une colonie génétiquement identique, mais physiquement éloignée de la colonie d'origine (Heyward & Collins 1985 ; Lirman 2000).

Systematique des coraux de Clipperton

Au cours de l'expédition, nous avons examiné un grand nombre de colonies coralliennes et récolté 105 échantillons à des profondeurs allant de 52 mètres à la surface. Ces échantillons comprenaient, pour chaque colonie, un petit fragment squelettique, un extrait d'ADN et de nombreuses photographies sous-marines afin de garder trace de la morphologie de la colonie et de son environnement immédiat. En raison de leur petite taille, les fragments collectés seront régénérés rapidement par chaque colonie et ne devraient avoir aucun impact négatif sur leur survie.

Les coraux les plus fréquemment observés appartiennent à trois genres : *Porites*, *Pocillopora* et *Pavona*. Les coraux du genre *Porites* (Fig. 5) sont souvent massifs (ce qui leur vaut le surnom de 'patates de corail') et peuvent atteindre plusieurs mètres de diamètre. De croissance lente, ils se sont révélés des sources très importantes d'informations paléoclimatologiques, car leur squelette enregistre les variations des conditions environnementales tout au long de sa croissance (Gagan *et al.* 1994 ; Alibert & McCulloch 1997 ; Linsley *et al.* 1999). Quatre espèces difficiles à distinguer sont présentes à Clipperton : *Porites arnaudi* Reyes-Bonilla & Carricart-Ganivet 2000, *P. australiensis* Vaughan 1918, *P. lobata* Dana 1946 et *P. lutea* Milne Edwards & Haime 1860. Tandis que les trois dernières espèces sont présentes dans toute la province Indo-Pacifique, c'est-à-dire des côtes orientales de l'Afrique aux côtes occidentales de l'Amérique, *P. arnaudi* n'a jusqu'à présent été observée que dans la partie la plus orientale de l'océan Pacifique (Mexique, Clipperton, Iles Revillagigedo).

Les coraux du genre *Pocillopora* présentent quant à eux une variabilité morphologique très importante à Clipperton (Figs 6 à 8), ce qui a conduit à des divergences notables d'un auteur à l'autre quant au nombre d'espèces de ce genre présentes à cet endroit du globe : trois espèces

selon Hertlein (1957), une ou deux selon Glynn *et al.* (1996), trois selon Carricart-Ganivet & Reyes-Bonilla (1999), et six espèces en nous basant sur la morphologie des échantillons que nous y avons récoltés : *P. effusus* Veron 2000, *P. elegans* Dana 1846, *P. eydouxi* Milne Edwards & Haime 1860, *P. meandrina* Dana 1846, *P. verrucosa* (Ellis & Solander 1786) et *P. woodjonesi* Vaughan 1918.

Le genre *Pavona* est représenté à Clipperton par trois espèces : *P. maldivensis* (Gardiner 1905), *P. minuta* Wells 1954 et *P. varians* Verrill 1864 (Figs 9 et 10). La présence d'une quatrième espèce de ce genre (*P. gigantea* Verrill 1869) est mentionnée dans une publication ancienne (Durham & Barnard 1952), mais cette espèce n'a jamais été observée par la suite et est donc soit très rare à Clipperton, soit ne s'y trouve plus actuellement. Une espèce d'un genre voisin, *Leptoseris scabra* Vaughan 1907, est par contre relativement abondante (Fig. 11). Deux autres espèces de corail fréquemment observées à Clipperton sont *Millepora exaesa* Forskål 1775 (Fig. 16) et *Tubastrea coccinea* Lesson 1836 (Fig. 4) ; enfin, *Psammocora superficialis* Gardiner 1898 et une espèce indéterminée du genre *Astrangia* sont également présentes mais rares.

Toutes les espèces de coraux présentes à Clipperton sauf une sont des scléractiniaires (coraux *sensu stricto*) : *Millepora exaesa*, par contre, appartient au groupe des hydrozoaires qui comprend également certaines méduses, parenté se manifestant notamment par la puissance de ses cellules urticantes (cnidoblastes) qui lui valent le surnom de 'corail de feu'. A l'exception d'*Astrangia* et de *Tubastrea coccinea*, tous les coraux de Clipperton hébergent dans leurs tissus des zooxanthelles. D'autre part, nous avons pu observer de nombreuses colonies coralliennes mobiles, appartenant aux genres *Porites*, *Pocillopora*, et *Pavona* (Fig. 10) : ces 'coraux qui roulent', appelés *coralliths* en anglais (Glynn 1974 ; Pichon 1974 ; Scoffin *et al.* 1985 ; Lewis 1989 ; Dullo & Hecht 1990 ; Riegl *et al.* 1996 ; Rodríguez-Martínez & Jordán-Dahlgren 1999) se sont révélés particulièrement abondants à Clipperton.

En plus des espèces précédemment citées, des traces de coraux fossiles indiquent que la biodiversité corallienne de Clipperton a varié au cours du temps : ainsi un fragment squelettique érodé appartenant au genre *Balanophyllia* a-t-il été trouvé par 650 mètres de fond au large de l'atoll (Carricart-Ganivet & Reyes-Bonilla 1999). Du fait de l'isolement important de Clipperton, il se pourrait que certaines espèces rarement observées telles que *Pavona gigantea* ou *Psammocora superficialis* n'y soient présentes que par intermittence, au gré d'événements de colonisation ou d'extinction dépendant du hasard et des changements climatiques affectant les courants marins. Des restes de squelettes de coraux sont également

présents dans le lagon, sans qu'il soit possible de les attribuer à des espèces précises en raison de leur mauvais état de conservation : du temps où le lagon était ouvert sur l'océan, il est possible que cet habitat très différent des pentes coralliennes extérieures ait été colonisé par des espèces distinctes de celles observables aujourd'hui à Clipperton.

Cependant, la taxonomie actuelle des coraux, principalement basée sur la morphologie de leur squelette calcaire, est de plus en plus remise en question par les résultats d'études moléculaires (Romano & Palumbi 1996 ; Romano & Cairns 2000 ; Cuif *et al.* 2003 ; Fukami *et al.* 2004) : la liste d'espèces présentée ici, basée sur la morphologie des colonies rencontrées, ne reflète donc sans doute pas la réalité. Ainsi, les résultats préliminaires d'une étude moléculaire en cours (J.-F. Flot, données non publiées) suggèrent que les définitions morphologiques des espèces du genre *Pocillopora* sont inadéquates : il n'y aurait en fait que deux espèces du genre *Pocillopora* à Clipperton, présentant chacune des morphologies diverses. On sait que la morphologie des coraux est susceptible de varier en réponse à de nombreux facteurs tels que la lumière, la sédimentation, les courants, la température, la profondeur, la salinité, les interactions avec d'autres organismes (prédation, compétition, symbiose), la topographie du substrat et même la gravité (Randall 1976 ; Meroz *et al.* 2002) : on parle d'écomorphose pour qualifier ces transformations morphologiques en fonction de l'environnement de croissance. Cependant, il se pourrait également qu'une telle diversité morphologique soit sous contrôle génétique : la variété des formes refléterait alors la diversité génétique au sein d'une espèce. Des études moléculaires plus poussées seront nécessaires afin de trancher entre ces deux hypothèses.

Structure et répartition spatiale des assemblages d'espèces

Les coraux sont rarement distribués aléatoirement au sein des récifs (Done 1983 ; Adjeroud 1997), et les assemblages d'espèces se caractérisent généralement par une forte structuration spatiale, gouvernée par une variété de facteurs physiques et biologiques d'intensité variable et qui interagissent à différentes échelles spatio-temporelles (Quinn & Dunham 1983 ; Karlson & Hurd 1993 ; Karlson *et al.* 2004). Parmi ces facteurs, deux catégories sont distinguées: (i) les facteurs extrinsèques, qui comprennent les facteurs abiotiques (substrat, hydrodynamisme, hydrologie, etc.), les interactions biologiques (prédation, compétition spatiale, etc.) et les perturbations de grandes ampleurs, quelles soient d'origine naturelle ou anthropique ; et (ii) les facteurs intrinsèques, qui concernent essentiellement les traits d'histoire de vie des espèces,

comme les stratégies reproductives, les capacités de dispersion larvaire et les processus de recrutement.

Dans le cadre de notre étude sur les communautés coralliennes de Clipperton, l'objectif a été de caractériser l'hétérogénéité spatiale à plusieurs échelles (entre sites différemment exposés, et selon un gradient de profondeur), et de mettre en évidence les schémas de zonation des assemblages d'espèces. Neuf stations d'étude (Fig. 12) ont été réparties sur la pente externe autour de l'atoll, en trois sites (A, B et C) différemment exposés aux houles dominantes, et à trois profondeurs (6, 12 et 18 mètres) représentant un gradient de lumière et d'hydrodynamisme. A chaque station, les colonies coralliennes ont été identifiées au niveau générique et comptées dans trois transects couloirs larges d'un mètre et longs de dix, parallèles entre eux et à la ligne de rivage. En complément, les pourcentages de recouvrement des genres ont été obtenus en notant systématiquement les colonies présentes à l'aplomb de cent points marqués tous les 25 centimètres le long de trois transects de 25 mètres de longueur.

La richesse générique varie d'un site et d'une station à l'autre, avec entre trois et quatre genres recensés par station. Tandis que les genres *Pavona* et *Porites* sont observés aux neuf stations, *Pocillopora* est absent à l'une d'entre elles et *Leptoseris* n'a été observé qu'aux stations situées à 18 m de profondeur (Fig. 13). *Pavona*, *Pocillopora* et *Porites* sont les genres les plus abondants (jusqu'à 5,7 colonies par mètre carré), *Leptoseris* étant largement moins représenté (moins de 1,6 colonies par mètre carré).

L'abondance des colonies (tous genres confondus) est comprise entre 3,5 et 12,1 colonies par mètre carré, et montre un gradient d'augmentation avec la profondeur aux sites A et C. En revanche, les valeurs maximales sont enregistrées à 12 mètres de profondeur au site B. Aux trois sites, les abondances sont nettement inférieures aux faibles profondeurs.

Ce schéma de répartition spatiale (abondances minimales à 6 mètres de profondeur, et maximales à 12 ou 18 mètres selon les sites) se retrouve pour les genres *Pavona* et *Porites*. En revanche, à chacun des trois sites d'étude, *Pocillopora* se distingue par des abondances plus élevées aux stations de 6 et 12 mètres de profondeur qu'aux stations de 18 mètres où les abondances sont nettement inférieures, voire nulles comme au site B.

Concernant les pourcentages de recouvrement du substrat en corail vivant (tous genres confondus), les variations bathymétriques sont sensiblement contrastées entre les trois sites d'étude (Fig. 14). A chaque site, les valeurs maximales sont enregistrées à 18 (sites A et C) ou 12 (site B) mètres de profondeur, et les plus faibles valeurs à 6 (sites B et C) ou 12 mètres

(site A). *Porites* est le genre qui présente les plus forts recouvrements (jusqu'à 69,3 %), mais *Pavona* et *Pocillopora* occupent des surfaces relativement importantes, souvent supérieures à 10 %. En revanche, *Leptoseris* ne représente qu'une très faible proportion du recouvrement corallien (moins de 1% à une seule des neuf stations). Les recouvrements en *Porites* et *Pavona* sont généralement plus importants à 12 et 18 mètres de profondeur qu'à 6 mètres ; à l'inverse, les colonies de *Pocillopora* occupent des surfaces plus importantes à 6 et 12 mètres de profondeur.

Dans la partie supérieure de la pente externe récifale (moins de 30 mètres de profondeur), nos relevés quantitatifs indiquent donc que les coraux les plus fréquents sont *Porites*, *Pocillopora* et *Pavona*. A des profondeurs plus importantes (de 30 à 60 mètres), des observations qualitatives montrent que les espèces *Pavona varians*, *Tubastrea coccinea* et *Leptoseris scabra* dominent les assemblages. Quant aux coraux du genre *Astrangia*, on les rencontre dans des environnements cryptiques et peu visibles tels que sous les rebords de colonies massives de coraux des genres *Porites* et *Pavona*.

Ainsi, nos résultats mettent en évidence une forte hétérogénéité spatiale des assemblages coralliens à l'échelle de l'atoll. La répartition des différents genres de coraux, et par conséquent leur abondance et leur recouvrement, varient significativement avec la profondeur et selon les différents sites. Les schémas de répartition spatiale des trois principaux genres (*Pavona*, *Pocillopora*, *Porites*) sont distincts, et traduisent probablement des traits d'histoire de vie et des préférences écologiques caractéristiques.

Conclusions

Les travaux antérieurs (Durham & Barnard 1952 ; Hertlein & Emerson 1957 ; Glynn *et al.* 1996 ; Carricart-Ganivet & Reyes-Bonilla 1999 ; Reyes Bonilla & Carricart-Ganivet 2000) et les résultats de nos prospections de 2005 ont permis de mieux connaître les coraux de Clipperton, et de dégager certains traits caractéristiques des communautés coralliennes des pentes externes de l'atoll.

L'ensemble des prospections met clairement en évidence la diversité remarquablement faible des coraux de Clipperton : à ce jour, seules 21 espèces de scléactiniaires, appartenant à 10 genres, ont été signalées à Clipperton (Table 1) ; parmi celles-ci, quatre sont extrêmement rares ou ne s'y trouvent plus à l'heure actuelle, et les données moléculaires suggèrent que les six espèces morphologiques du genre *Pocillopora* pourraient se réduire à deux... Pour

comparaison, 168 espèces de scléactiniaires, représentant 51 genres ont été répertoriées sur les récifs de Polynésie française (Pichon 1985). Les observations de Glynn *et al.* (1996) et celles que nous avons effectuées en 2005 montrent que parmi les taxa présents à Clipperton, seules quelques-uns (*Porites* spp., *Pocillopora* spp., *Pavona minuta* et *P. varians*) sont communément observés et contribuent de manière significative au recouvrement en corail vivant et, par conséquent, à la bioconstruction récifale. Les autres espèces sont peu abondantes et rarement observées.

Cette diversité étonnamment faible peut s'expliquer essentiellement par trois facteurs : (i) l'éloignement de Clipperton par rapport au centre de diversité maximale et au centre de dispersion des espèces, tous deux situés dans la région Indo-Malaise (région délimitée au nord par le sud de l'archipel des Ryukyus, à l'ouest par l'Indonésie et à l'est par la Papouasie Nouvelle-Guinée) ; (ii) l'isolement régional de Clipperton, distant de 1200 km des côtes mexicaines, de 2400 km des îles Galápagos, de 4000 km des îles Marquises et de 4950 km d'Hawaii ; (iii) la petite taille de son écosystème récifal, avec une pente externe d'une surface inférieure à quatre kilomètres carrés et ne présentant pas une grande diversité d'habitats.

Malgré cette faible diversité, les pourcentages de recouvrement en corail vivant (entre 11 % et 93 %) sont relativement élevés en comparaison d'autres écosystèmes coralliens du Pacifique central comme ceux de Polynésie française (Adjeroud 1997) ou même du Pacifique ouest comme la Grande Barrière de Corail (Harriott & Banks 2002). Ces forts pourcentages de recouvrement et d'abondance semblent témoigner d'une bonne santé des coraux. De plus, on observe beaucoup de colonies de grandes tailles (donc âgées), et peu de coraux morts. Il apparaît donc que l'écosystème récifal de Clipperton n'a pas souffert, au moins au cours des dernières années, de perturbations de grande ampleur telles que les cyclones ou les épisodes de blanchissement de coraux. Bien entendu, il ne s'agit là que de résultats préliminaires, et seul un suivi à long terme, avec des prospections interannuelles, permettra de déterminer avec précision l'état de santé du milieu corallien et son évolution.

Remerciements

Un grand merci à Jean-Louis Etienne et à Septième Continent pour avoir organisé cette expédition et pour avoir financé la participation de l'un d'entre nous (Jean-François Flot) ; la participation de Mehdi Adjeroud a quant à elle reçu le soutien financier du WWF-

France. Nos remerciements également à l'équipage du Rara Avis, voilier de l'association du Père Jaouen, pour nous avoir transportés sur l'île, ainsi qu'à toute l'équipe de l'expédition.

Références bibliographiques

- ADJEROUD M. 1997. — Factors influencing spatial patterns on coral reefs around Moorea, French Polynesia. *Marine Ecology Progress Series* 159: 105-119.
- ALIBERT C. A. & MCCULLOCH M. T. 1997. — Strontium/calcium ratios in modern *Porites* corals from the Great Barrier Reef as a proxy for sea surface temperature: Calibration of the thermometer and monitoring of ENSO. *Paleoceanography* 12(3): 345-364.
- CARRICART-GANIVET J. P. & REYES-BONILLA H. 1999. — New and previous records of scleractinian corals from Clipperton Atoll, eastern Pacific. *Pacific Science* 53(4): 370-375.
- CORTÉS J. 1997. — Biology and geology of eastern Pacific coral reefs. *Coral Reefs* 16(5): S39-S46.
- CUIF J.-P., LECOINTRE G., PERRIN C., TILLIER A. & TILLIER S. 2003. — Patterns of septal biomineralization in Scleractinia compared with their 28S rRNA phylogeny: a dual approach for a new taxonomic framework. *Zoologica Scripta* 32(5): 459-473.
- DANA J. D. 1846. — *United States Exploring Expedition. Vol. VII. Zoophytes*. C. Sherman, Philadelphia, 740 p.
- DANA T. F. 1975. — Development of contemporary Eastern Pacific coral reefs. *Marine Biology* 33(4): 355-374.
- DONE T. J. 1983. — Coral zonation: its nature and significance. in BARNES D. J. (ed), *Perspectives on coral reefs*. Brian Clouston, Manuka: 107-147.
- DULLO W.-C. & HECHT C. 1990. — Corallith growth on submarine alluvian fans. *Senckenbergiana Maritima* 21(1): 77-86.
- DURHAM J. W. & BARNARD J. L. 1952. — Stony corals of the eastern Pacific collected by the Velero III and Velero IV. *Allan Hancock Pacific Expeditions* 16: 1-110.

- EHRENBERG C. G. 1834. — *Die Corallenthiere des Rothen Meeres physiologisch untersucht und systematisch verzeichnet*. gedruckt in der Druckerei der K. Akademie der Wissenschafte, Berlin, 156 p.
- ELLIS J. & SOLANDER D. 1786. — *The natural history of many curious and uncommon zoophytes, collected from various parts of the globe*. White & Son, London, 208 p.
- ESPER E. J. C. 1794-1797. — *Fortsetzungen der Pflanzenthiere in Abbildungen nach der Natur mit Farben erleuchtet nebst Beschreibungen*. Raspeschen Buchh., Nürnberg, 533 p.
- FORSKÅL P. 1775. — *Descriptiones animalium, avium, amphibiorum, piscium, insectorum, vermium; quae in itinere orientale observavit*. Mölleriaulae Typographi, Hauniae, 164 p.
- FUKAMI H., BUDD A. F., PAULAY G., SOLÉ-CAVA A., CHEN C. A., IWAO K. et al. 2004. — Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. *Nature* 427: 832-835.
- GAGAN M. K., CHIVAS A. R. & ISDALE P. J. 1994. — High-resolution isotopic records from corals using ocean temperature and mass-spawning chronometers. *Earth and Planetary Science Letters* 121(3-4): 549-558.
- GLYNN P. W. 1974. — Rolling stones among the scleractinian: mobile corallith communities in the Gulf of Panama. *Proceedings of the 2nd International Coral Reef Symposium 2*: 183-200.
- GLYNN P. W., STEWART R. H. & MCCOSKER J. E. 1972. — Pacific coral reefs of Panamá: Structure, distribution and predators. *International Journal of Earth Sciences* 61(2): 483-519.
- GLYNN P. W., VERON J. E. N. & WELLINGTON G. M. 1996. — Clipperton Atoll (eastern Pacific): oceanography, geomorphology, reef-building coral ecology and biogeography. *Coral Reefs* 15(2): 71-99.
- HARRIOTT V.J., BANKS S.A. 2002. — Latitudinal variation in coral communities in eastern Australia: a qualitative biophysical model of factors regulating coral reefs. *Coral Reefs* 21(1): 83-94.
- HERTLEIN L. G. & EMERSON W. K. 1957. — Additional notes on the invertebrate fauna of Clipperton Island. *American Museum novitates* 1859: 1-9.

- HEYWARD A. J. & COLLINS J. D. 1985. — Fragmentation in *Montipora ramosa*: the genet and ramet concept applied to a reef coral. *Coral Reefs* 4(1): 35-40.
- JACKSON J. B. C. & COATES A. G. 1986. — Life cycles and evolution of clonal (modular) animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 313(1159): 7-22.
- KARLSON R. H., CORNELL H. V. & HUGHES T. P. 2004. — Coral communities are regionally enriched along an oceanic biodiversity gradient. *Nature* 429(6994): 867-870.
- KARLSON R. H. & HURD L. E. 1993. — Disturbance, coral reef communities, and changing ecological paradigms. *Coral Reefs* 12(3): 117-125.
- LAMARCK J.-B. D. M. D. 1816. — *Histoire naturelle des animaux sans vertèbres, présentant les caractères généraux et particuliers de ces animaux, leur distribution, leurs classes, leurs familles, leurs genres, et la citation des principales espèces qui s'y rapportent; précédée d'une introduction offrant la détermination des caractères essentiels de l'animal, sa distinction du végétal et des autres corps naturels, enfin, l'exposition des principes fondamentaux de la zoologie. Tome second.* Verdière, Paris, 568 p.
- LEWIS J. B. 1989. — Spherical growth in the Caribbean coral *Siderastrea radians* (Pallas) and its survival in disturbed habitats. *Coral Reefs* 7(4): 161-167.
- LINNAEUS C. 1735. — *Systema naturæ, sive, regna tria naturæ systematice proposita per classes, ordines, genera, & species.* Lugduni Batavorum, 11p.
- LINSLEY B. K., MESSIER R. G. & DUNBAR R. B. 1999. — Assessing between-colony oxygen isotope variability in the coral *Porites lobata* at Clipperton Atoll. *Coral Reefs* 18(1): 13-27.
- LIRMAN D. 2000. — Fragmentation in the branching coral *Acropora palmata* (Lamarck): growth, survivorship, and reproduction of colonies and fragments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 251(1): 41-57.
- MEROZ E., BRICKNER I., LOYA Y., PERETZMAN-SHEMER A. & ILAN M. 2002. — The effect of gravity on coral morphology. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 269: 717-720.

- MILNE EDWARDS H. & HAIME J. 1857. — *Histoire naturelle des coralliaires (Tome 2)*. Roret, Paris, 633 p.
- PALLAS P. S. 1766. — *Elenchus zoophytorum sistens generum adumbrationes generaliores et specierum cognitarum succinctas descriptiones cum selectis auctorum synonymis*. Hagæ (F. Varrentrapp), 451 p.
- PICHON M. 1974. — Free living scleractinian coral communities in the coral reefs of Madagascar. *Proceedings of the 2nd International Coral Reef Symposium 2*: 173-182.
- PICHON M. 1985. — Scleractinia. *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress 1*: 399-403.
- QUINN J. F. & DUNHAM A. E. 1983. — On hypothesis testing in ecology and evolution. *The American Naturalist* 122(5): 602-617.
- RANDALL R. H. 1976. — Some problems in reef coral taxonomy. *Micronesica* 15(1): 151-156.
- RÉAUMUR R. A. F. D. 1710. — Du mouvement progressif et de quelques autres mouvements de diverses espèces de coquillages, orties, et étoiles de mer. *Mémoires de l'Académie Royale des Sciences*: 439-490.
- REYES BONILLA H. & CARRICART-GANIVET J. P. 2000. — *Porites arnaudi*, a new species of stony coral (Anthozoa: Scleractinia: Poritidae) from oceanic islands of the eastern Pacific Ocean. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 113: 561-571.
- RIEGL B., PILLER W. E. & RASSER M. 1996. — Rolling stones: First report of a free living *Acropora anthocercis* (Brook) from the Red Sea. *Coral Reefs* 15(3): 149-150.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ R. E. & JORDÁN-DAHLGREN E. 1999. — Epibiotic and free-living *Porites astreoides*. *Coral Reefs* 18(2): 159-161.
- ROMANO S. L. & CAIRNS S. D. 2000. — Molecular phylogenetic hypotheses for the evolution of scleractinian corals. *Bulletin of Marine Science* 67(3): 1043-1068.
- ROMANO S. L. & PALUMBI S. R. 1996. — Evolution of scleractinian corals inferred from molecular systematics. *Science* 271(5249): 640-642.
- SACHET M.-H. 1962. — Geography and land ecology of Clipperton Island. *Atoll Research Bulletin* 86: 1-134.

- SCHUHMACHER H. & ZIBROWIUS H. 1985. — What is hermatypic? *Coral Reefs* 4(1): 1-9.
- SCOFFIN T. P., STODDART D. R., TUDHOPE A. W. & WOODROFFE C. 1985. — Rhodoliths and coralloliths of Muri Lagoon, Rarotonga, Cook Islands. *Coral Reefs* 4(2): 71-80.
- VAUGHAN T. W. & WELLS J. W. 1943. — Revision of the sub-orders, families and genera of the Scleractinia. *Geological Society of America Special Papers* 44: 1-363.
- VERON J. E. N. & STAFFORD-SMITH M. 2000. — *Corals of the world*. Australian Institute of Marine Science, 1382 p.
- WELLS J. W. 1933. — Corals of the Cretaceous of the Atlantic and Gulf coastal plains and western interior of the United States. *Bulletin of American Paleontology* 18: 83-388.
- WELLS J. W. 1956. — Scleractinia. in MOORE R. C. (ed), *Treatise on Invertebrate Paleontology*. Geological Society of America and University of Kansas Press, Lawrence: 328-444
- YONGE C. M. 1968. — Review lecture: Living corals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 169(1017): 329-344.

Table 1 : Liste des espèces de coraux signalées à ce jour à Clipperton

Phylum Cnidaria Hatschek, 1888

Classe Anthozoa Ehrenberg, 1834

Ordre Scleractinia Bourne, 1900

Famille Agariciidae Gray, 1847

Leptoseris scabra Vaughan, 1907^{3,4,6}

Pavona maldivensis (Gardiner, 1905)^{3,4,6}

P. minuta Wells, 1954^{3,4,6}

P. varians Verril, 1864^{1,2,3,4,6}

†*P. gigantea* Verril, 1869^{1,2}

Famille Caryophylliidae Gray, 1847

†**Cyathoceras* sp.²

†**Paracyathus* sp.²

Famille Dendrophylliidae Vaughan & Wells, 1943

†**Balanophyllia* sp.⁴

**Tubastrea coccinea* Lesson, 1836^{3,4,6}

Famille Pocilloporidae Lamarck, 1816

Pocillopora effusus Veron, 2000^{3,4,6}

P. elegans Dana, 1846⁶

P. eydouxi Milne Edwards & Haime, 1860⁶

P. meandrina Dana, 1846^{2,4,6}

P. verrucosa (Ellis & Solander, 1786)^{2,6}

P. woodjonesi Vaughan, 1918⁶

Famille Poritidae Gray, 1842

Porites arnaudi Reyes-Bonilla & Carricart-Ganivet, 2000^{4,5,6}

P. australiensis Vaughan, 1918^{4,6}

P. lobata Dana, 1846^{3,4,6}

P. lutea Milne Edwards & Haime, 1860^{4,6}

Famille Rhizangiidae D'Orbigny, 1851

**Astrangia* sp.⁴

Famille Siderastreidae Vaughan & Wells, 1943

Psammocora superficialis Gardiner, 1898^{4,6}

Classe Hydrozoa Owen, 1843

Ordre Milleporina Hickson, 1901

Famille Milleporidae Fleming, 1828

Millepora exaesa Forskål, 1775^{3,4,6}

† espèces très rares ou ne se trouvant plus à Clipperton à l'heure actuelle

* coraux n'hébergeant pas de zooxanthelles dans leurs tissus

¹(Durham & Barnard, 1952), ²(Hertlein & Emerson, 1957), ³(Glynn et al., 1996), ⁴(Carricart-Ganivet & Reyes-Bonilla, 1999), ⁵(Reyes Bonilla & Carricart-Ganivet, 2000), ⁶(nos observations)

Figure 1 : Coupe naturelle de la partie superficielle de Clipperton (la plupart des fragments visibles proviennent de coraux du genre *Pocillopora*).



Figure 2 : Photographie sous-marine d'un corail du genre *Pocillopora* prise à 10 mètres de profondeur sur le récif de Clipperton et montrant les tentacules déployés.

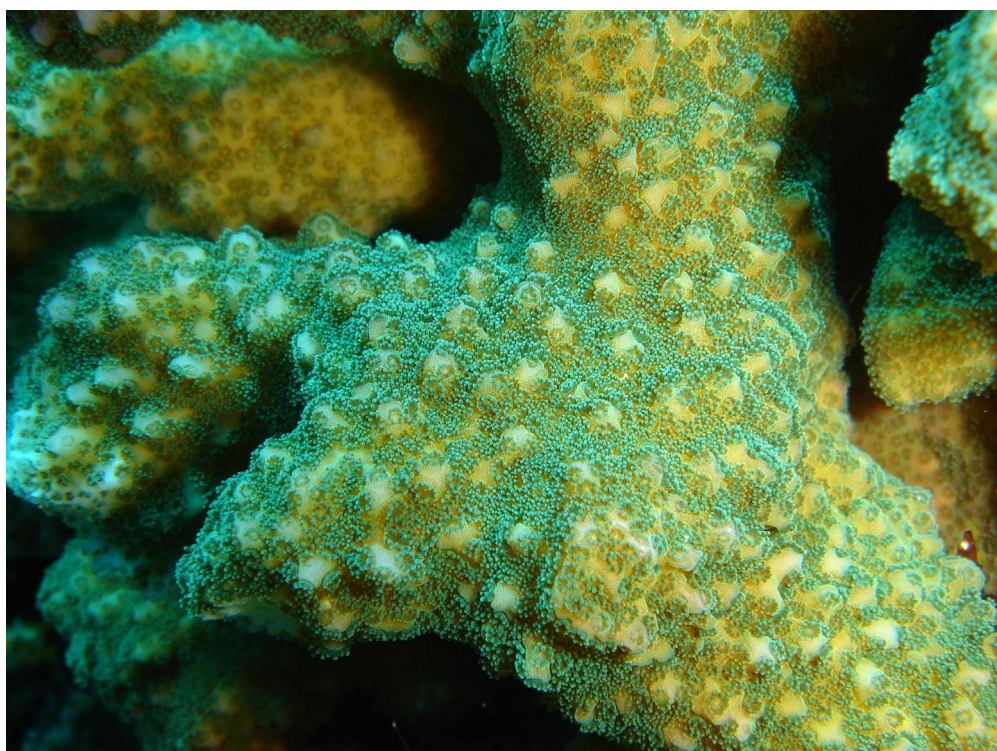


Figure 3 : Photographie d'un échantillon de corail du genre *Pocillopora* ramené à l'air libre lors de l'expédition. Les tentacules sont rétractés et forment de petits cercles colorés entourant la bouche de chaque polype (diamètre d'un polype : environ 2 millimètres).



Figure 4 : Photographie d'une colonie de *Tubastrea coccinea* prise à Clipperton par 35 mètres de profondeur, montrant les polypes aux tentacules rétractés (diamètre d'un polype : environ 2 centimètres).



Figure 5 : Photographie d'une colonie corallienne du genre *Porites* (Clipperton, profondeur 28 mètres).

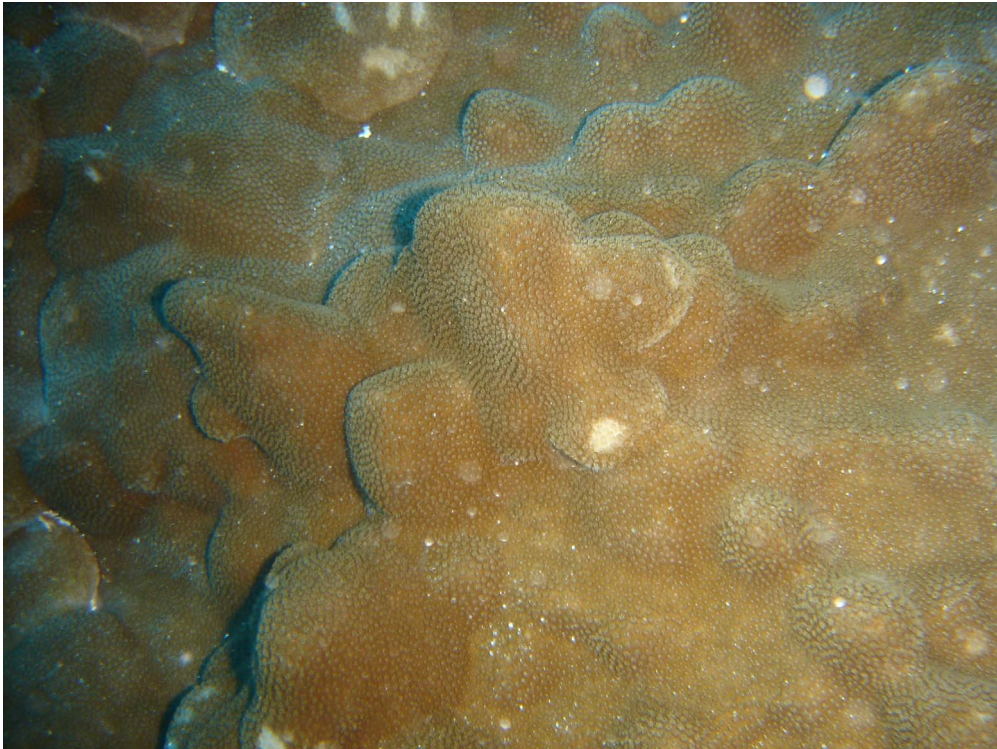


Figure 6 : *Pocillopora effusus* (Clipperton, profondeur 10 mètres).

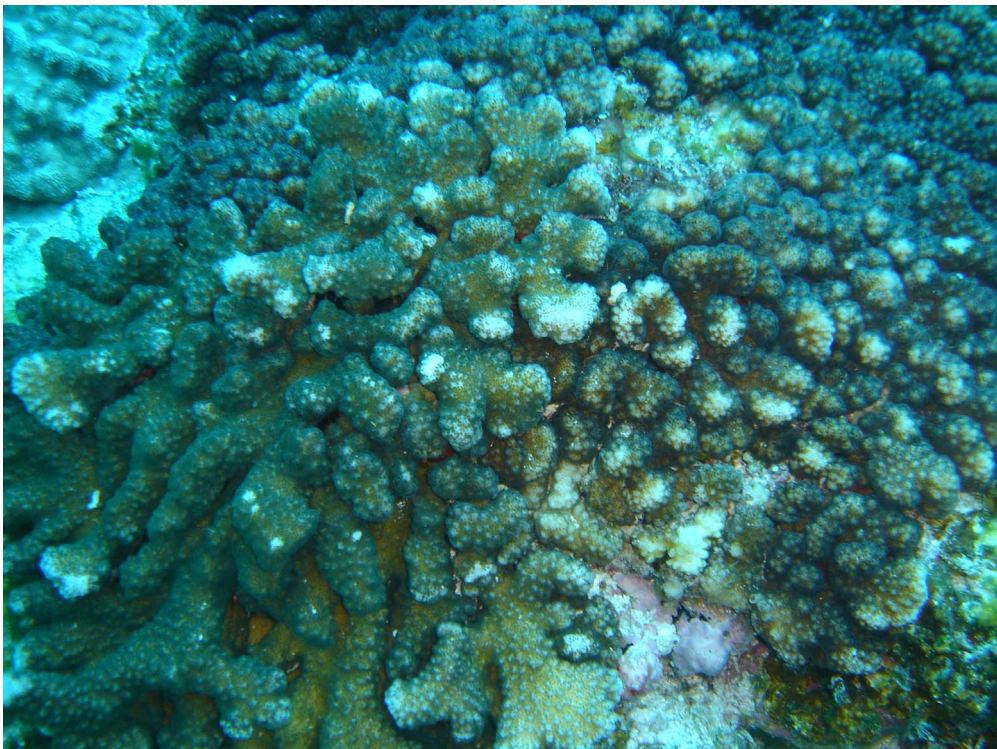


Figure 7: *Pocillopora elegans* (Clipperton, profondeur 26 mètres).



Figure 8 : *Pocillopora meandrina* (Clipperton, profondeur 10 mètres).

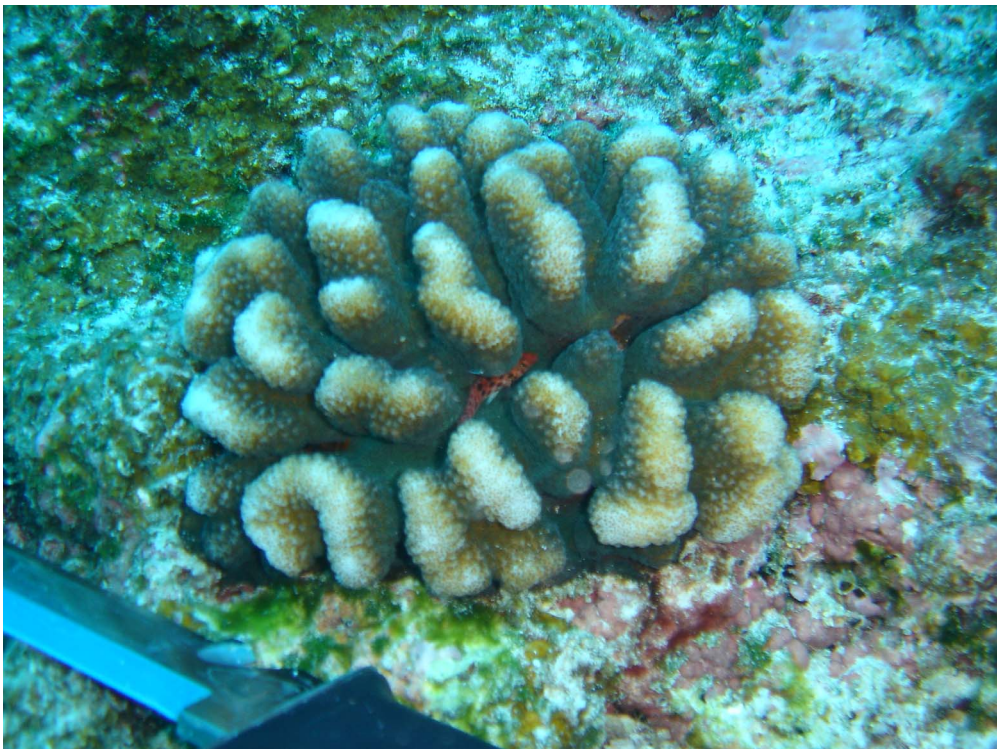


Figure 9 : *Pavona maldivensis* (Clipperton, profondeur 12 mètres).



Figure 10 : *Pavona varians* (Clipperton, profondeur 18 mètres).



Figure 11 : *Leptoseris scabra* (Clipperton, profondeur 29 mètres).



Figure 12 : Localisation des trois sites d'étude (A, B et C) mis en place sur la pente externe de l'atoll de Clipperton.

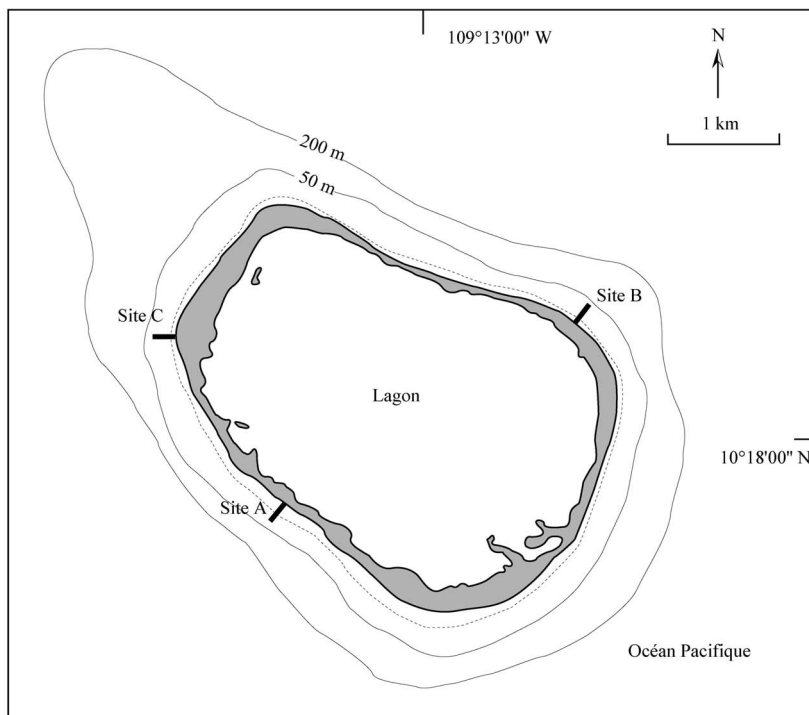


Figure 13 : Abondance des principaux genres aux neuf stations d'étude établies autour de Clipperton. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

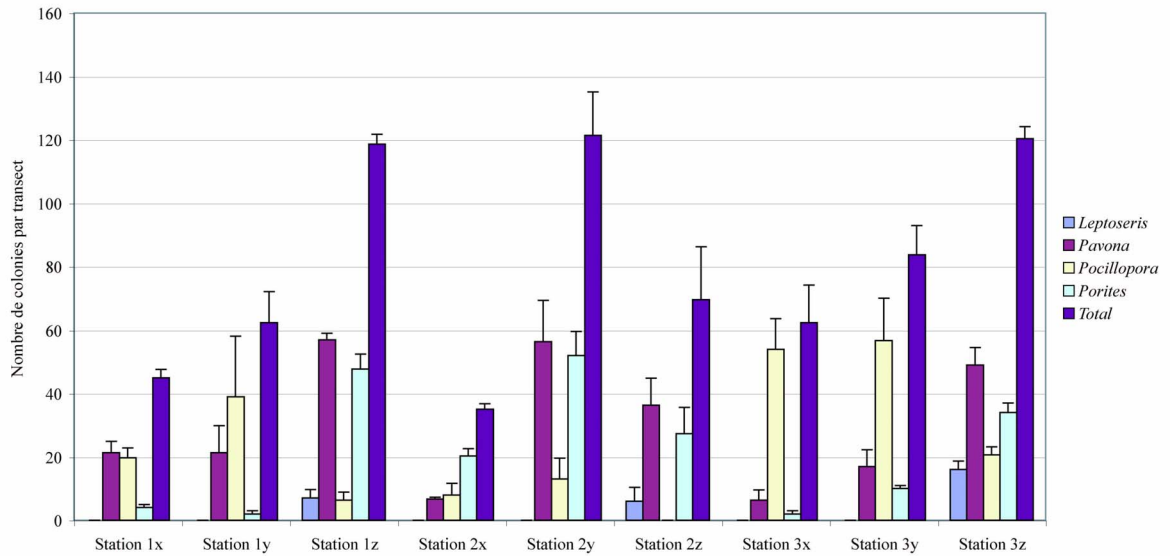
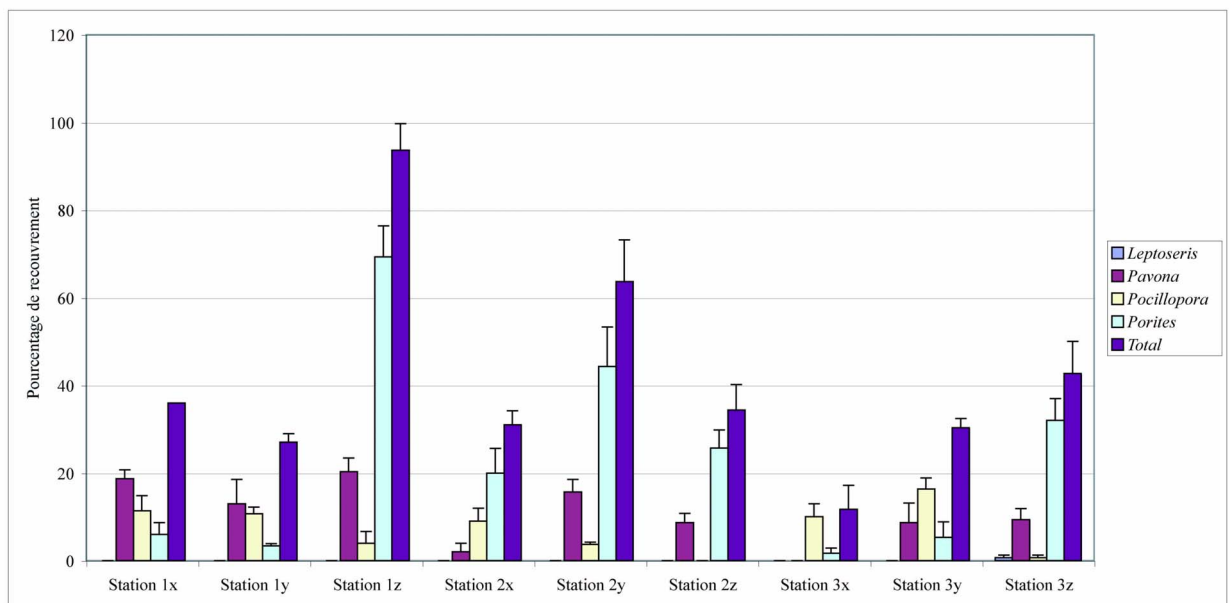


Figure 14 : Pourcentages de recouvrement des principaux genres aux neuf stations d'étude établies autour de Clipperton. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.



Article 8 : Molecular identification of symbiotic dinoflagellates in Pacific corals in the genus *Pocillopora*

Coral Reefs (IF 2006 2,20)

soumis le 16 janvier 2006, accepté le 2 mars 2007

Molecular identification of symbiotic dinoflagellates in Pacific corals in the genus *Pocillopora*

H. Magalon · J.-F. Flot · E. Baudry

Received: 16 January 2006 / Accepted: 2 March 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract This study focused on the association between corals of the genus *Pocillopora*, a major constituent of Pacific reefs, and their zooxanthellae. Samples of *P. meandrina*, *P. verrucosa*, *P. damicornis*, *P. eydouxi*, *P. ligulata* and *P. molokensis* were collected from French Polynesia, Tonga, Okinawa and Hawaii. *Symbiodinium* diversity was explored by looking at the 28S and ITS1 regions of the ribosomal DNA. Most zooxanthellae were found to belong to clade C, sub-clade C1, with little differentiation between populations. Interestingly, individuals of *P. damicornis* harbored sub-clade C1, clade D and clade A, depending on location. The symbiotic association of *P. damicornis* with its zooxanthellae may be somewhat more flexible than those of other *Pocillopora* species.

Keywords *Symbiodinium* · Zooxanthellae · *Pocillopora* · Coral · Clade · ITS

Communicated by Biology Editor M. van Oppen.

H. Magalon (✉)
UMR CNRS 7625, Laboratoire Fonctionnement
et Evolution des Systèmes Ecologiques, Université Pierre
et Marie Curie, 7 quai saint Bernard, 75005 Paris, France
e-mail: hmagalon@snv.jussieu.fr

J.-F. Flot
UMR UPMC-CNRS-MNHN-IRD 7138,
Département Systématique et Evolution,
Muséum National d'Histoire Naturelle, 43 rue Cuvier,
75005 Paris, France

E. Baudry
UMR CNRS 8079, Laboratoire Ecologie,
Systématique et Evolution, Université Paris-Sud,
Bat 362, 91405 Orsay Cedex, France

Introduction

Most tropical corals live in symbiosis with photosynthetic algae, the zooxanthellae (reviewed in Trench 1993). Most zooxanthellae belong to the genus *Symbiodinium* and 11 species have now been defined based on morphological, physiological and molecular criteria (reviewed in Baker 2003). Diversity of zooxanthellae from a wide range of hosts has been explored using molecular techniques with different levels of resolution. The first studies used allozymes and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) to differentiate between zooxanthella lineages (Rowan and Powers 1991). Later, *Symbiodinium* molecular phylogenetics became dominated by the study of nuclear DNA coding for ribosomal RNAs (nrDNA): 18S nrDNA encoding the small ribosomal subunit (SSU), 28S nrDNA encoding the large ribosomal subunit (LSU) and the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) located in between (reviewed in Baker 2003). Later studies turned to chloroplast DNA (23S rDNA) and mitochondrial DNA sequences (Santos et al. 2002a, b, 2003; Takabayashi et al. 2004). Recently, microsatellite markers have also been used to explore *Symbiodinium* diversity, particularly at the population level (e.g., Santos and Coffroth 2003; Magalon et al. 2006). All these studies have defined multiple clades (reviewed in Coffroth and Santos 2005) that can further be subdivided into “sub-clades” or “types” (based on ITS1; e.g., van Oppen et al. 2001, and based on ITS2 DGGE profiles; e.g., LaJeunesse 2001). Clades were first thought to correspond to ecological types with different photoacclimatory abilities (Rowan and Knowlton 1995). Studies on zooxanthellae depth distribution and on their responses to stress conditions have attempted to determine the characteristics of each clade. However, these categories are highly simplistic and artificial since differential sensitivity to

thermal stress among the various species of *Symbiodinium* seems to be distributed across all clades (Tchernov et al. 2004), as is sensitivity to irradiance (Savage et al. 2002). Researchers became interested in examining zooxanthellae diversity over a wide range of hosts and geographic locations. For instance, van Oppen et al. (2001) examined symbiont association across a large number of coral species belonging to the genus *Acropora* along the Great Barrier Reef and LaJeunesse (2005) published a complete survey of clade C diversity, encompassing nearly 100 host genera across the Atlantic and the Indo-Pacific.

In this study, zooxanthellae diversity was investigated in six *Pocillopora* species (Veron 2000): *P. meandrina*, *P. verrucosa*, *P. damicornis*, *P. eydouxi*, *P. ligulata* and *P. molokensis*, collected from French Polynesia, Tonga, Hawaii and Japan. *Pocillopora* is a major constituent of Pacific reefs where it may play an important role in coral reef ecosystems. Many studies have reported that *P. damicornis*, *P. verrucosa* and *P. eydouxi* from different regions [Japan (Hirose et al. 2000, 2001; Harii et al. 2002), Eastern Pacific (Glynn et al. 1991), Maldives (Sier and Olive 1994) and South Africa (Kruger and Schleyer 1998)] contained zooxanthellae in their oocytes prior to spawning, indicating maternal symbiont transmission. Even if *P. meandrina*, *P. ligulata* and *P. molokensis* are not mentioned specifically in these studies, it is probable that these latter species also transmit their zooxanthellae vertically since they are closely related to the ones cited above. Clade-specific 28S nrDNA primers were used and the ITS1 region was sequenced to investigate (1) whether the different species of the *Pocillopora* genus harbor different zooxanthellae, and (2) whether the association between the host and its symbiont is specific.

Materials and methods

Sample collection

Samples of *Pocillopora* spp. were collected between December 2000 and July 2004, from locations and depths shown in Table 1. All individuals were identified based on their morphology following Veron (2000). Total DNA extraction was performed as described in Magalon et al. (2004).

PCR amplifications of zooxanthellae nrDNA

Zooxanthella diversity was first explored by amplifying the 28S nrDNA region. Following preliminary sequencing, primers specific to clades A, B, C and D were designed manually by aligning the LSU region from the different clades available in GenBank (Table 2); primers were subsequently tested with the software package Primer3 (Rozen

and Skaletsky 2000). Specificity was checked by amplifying and sequencing the 28S nrDNA region from pure cultures of *Symbiodinium* clades A, B, C, D (kindly provided by T.C. LaJeunesse). PCR amplifications were carried out as described in Magalon et al. (2004) with an annealing temperature of 54°C. PCR products were run on 1% TBE-agarose gels. Amplifications were repeated using 30 and 40 cycles to detect zooxanthella types present in a lesser proportion.

To investigate zooxanthella diversity in more detail, the Internal Transcribed Spacer 1 region (ITS1), which is a non-coding region that evolves faster than the 28S nrDNA (Santos et al. 2002a), was sequenced. Two primers were used: one designed in the 3'-end of the 18S DNA [ITS-for: 5'-CGG TGA ATT ATT CGG ACT GAC-3'; reverse of SYM3, modified from Hunter et al. (1997)] and the other in the 5.8S region [ITSint-rev: 5'-GAA TTG CAG AAC TCC GTG-3' (reverse of ITSintfor2 from LaJeunesse and Trench (2000))]. The PCR protocol was identical to that of 28S nrDNA amplification, with the exception of the reaction volume which was 30 µl instead of 10 µl. Amplified products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions and the ITS1 region was directly sequenced in both directions using 3.2 pmol of primer. Reagents and cycling conditions were as specified in the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems, Foster City, California).

DNA sequence analysis

Chromatograms were checked using Chromas2 software (<http://www.technelysium.com.au>), and sequences aligned using BioEdit5 (Hall 1999). As double peaks were present in some sequences, the different rDNA types for such individuals were inferred by considering their sequence as the superposition of different sequences with no ambiguities and by comparing with those of other individuals of the population that did not exhibit ambiguities (Clark 1990; Stephens et al. 2001). ITS1 sequences were aligned to other related sequences of symbionts from different hosts and geographic regions obtained from GenBank (through Blast search, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Phylogenetic analyses using Neighbor-Joining (based on a Kimura two-parameter distance matrix) and Maximum Parsimony were conducted on aligned data sets using Mega2 (Kumar et al. 2001). Maximum Likelihood analysis was performed using PAUP* version 4.0b10 (Swofford 2001). A bootstrap re-sampling was conducted for 1,000 replicates to assess relative branch support (Felsenstein 1985). As ITS sequences from the major *Symbiodinium* clades (i.e., A, B, C and D) are highly divergent and difficult to align, sequences were analyzed separately for each clade.

Table 1 Host species (*P. Pocillopora*), collection site, sample code, collection depth (m) and symbiont types

Host species and collection site	Sample code	Depth (m)	Symbiont type
Society Archipelago, French Polynesia			
Moorea Island			
Site Mo1			
<i>P. meandrina</i> (3)	H2	13	C1.4
Site Mo2			
<i>P. meandrina</i> (3)	T4	13	C1.4
Site Mo3			
<i>P. meandrina</i> (4)	V8, MmP1	13	C1.4
<i>P. meandrina</i> (2)	MmL1, MmL2	5–6	C1.1, C1.4
<i>P. verrucosa</i> (5)	CR40, MvP1	13	C1.3, C1.4
<i>P. verrucosa</i> (1)	MvL2	5–6	C1.3
<i>P. damicornis</i> (2)	MdL1	5–6	D1 ^a , C1 ^b
<i>Acropora nasuta</i> (2)	Acro1	5–10	A1 ^a , C2 ^b
Tahiti Island			
<i>P. meandrina</i> (4)	Ta30, TmP1	13	C1.4
<i>P. meandrina</i> (2)	TmL1	5–6	C1.4
<i>P. verrucosa</i> (2)	TvP1, TvP2	13	C1.3, C1.4
<i>P. verrucosa</i> (2)	TvL1	5–6	C1.3
<i>P. damicornis</i> (2)	TdL1	5–6	D1 ^a , C1 ^b
Bora-Bora Island			
<i>P. meandrina</i> (3)	Bo10	13	C1.4
Tongatapu Island, Tonga			
<i>P. meandrina</i> (2)	To8, To22	2–5	C1.3, C1.4
<i>P. meandrina</i> (3)	To30	12–15	C1.3, C1.4
Hawaii			
<i>P. meandrina</i> (3)	02Oahu18	3–4	C1.1, C1.4
<i>P. damicornis</i> (3)	02Oahu04	1–2	C1.4
<i>P. eydouxi</i> (1)	02Oahu30	5–6	C1.1
<i>P. ligulata</i> (3)	02Oahu24	3–4	C1.2
<i>P. molokensis</i> (2)	02Oahu33	20–40	C1.2
Okinawa, Japan			
Maejima			
<i>P. meandrina</i> (4)	04Oki001, 04Oki003, 04Oki007, 04Oki008	5–10	C1.1, C1.4
<i>P. eydouxi</i> (2)	04Oki005	5–10	C1.1, C1.4
Oku			
<i>P. damicornis</i> (3)	04Oki040	5–6	C1.4
Amuro			
<i>P. damicornis</i> (2)	04Oki127	2–5	C1.1
Bise			
<i>P. damicornis</i> (3)	04Oki099	2–3	A1 ^a

Numerals in parentheses next to host names indicate the number of colonies independently sampled. Symbiont type annotated C1.n are designated from this study and belong to sub-clade C1 (van Oppen et al. 2001)

^a sensu LaJeunesse

^b sensu van Oppen

Results and discussion

Amplifications using the clade-specific primers showed that all corals sampled contained *Symbiodinium* clade C, except *P. damicornis* colonies from Bise (Okinawa, Japan) that associated exclusively with clade A. It is noteworthy that

P. damicornis from Moorea and Tahiti lagoons (French Polynesia) harbored clades C and D simultaneously. Fifty-eight clade C, 4 clade D and 3 clade A ITS1 sequences were obtained (GenBank accession numbers EF455494–EF455528). Among the 58 clade C ITS1 sequences, there were 15 variable and 13 parsimony informative positions

Table 2 Specific primers amplifying the different *Symbiodinium* clades 28S DNA

Amplified regions	Primer sequences	Product length (bp)
Clade A 28S DNA	28A-for 5'-ATT GTG GCC TTT AGA CAT ACT ACC-3' 28A-rev 5'-CAA TCC ACA CAC ACC TGA ATC C-3'	504
Clade B 28S DNA	28B-for 5'-GCT GGA AAC CGA TAC ATC TGT G-3' 28B-rev 5'-GTA AAT GCT CAC ACA TAA GCA GTC-3'	408
Clade C 28S DNA	28CD-for 5'-AGT CAC GCT CCT CGG AAT TG-3' 28C-rev 5'-TCA CAG CAG CCT ACA GCA ATC-3'	206
Clade D 28S DNA	28CD-for 5'-AGT CAC GCT CCT CGG AAT TG-3' 28D-rev 5'-TGC CAA CTC ACT CCT AGA CAA G-3'	255

(gaps included) for a total of 367 positions. There was no difference between the four clade D sequences, nor between the three clade A sequences. Phylogenies inferred using three different methods (NJ, MP and ML) were similar in topology and branch supports (data not shown). *Pocillopora* clade C sequences fell in the subclade C1 (sensu van Oppen et al. 2001) and were classified into four groups (named C1.1 to C1.4, see Fig. 1a). The C1.1 group comprised symbionts from *P. damicornis*, *P. meandrina* and *P. eydouxi* sampled in Hawaii, Japan and French Polynesia. Group C1.2 contained all the symbionts of *P. ligulata* and *P. molokensis*, with the symbionts from the latter clustering into a separate group. Group C1.3 was only found in *P. meandrina* and *P. verrucosa* from French Polynesia and from Tonga. The C1.4 group contained most of the symbionts found in the different *Pocillopora* species considered in this study (except *P. ligulata* and *P. molokensis*). *P. damicornis* colonies from Moorea and Tahiti lagoons harbored subclade C1 zooxanthellae and type D1 zooxanthellae (sensu LaJeunesse 2002) at the same time (Fig. 1b). Interestingly, *P. damicornis* colonies collected in Bise (Okinawa, Japan) were found to associate with type A1 (sensu LaJeunesse 2001) (Fig. 1c).

Only 13 colonies were found to harbor more than one ITS sequence simultaneously. The fact that a single host colony can harbor several different sequences may be explained in two ways. First, nrDNA is organized in tandem repeats and may be not homogenized by concerted evolution (Marquez et al. 2003). Thus, an individual cell may contain intragenomic variation (LaJeunesse 2002). Alternatively, each sequence could correspond to a unique zooxanthella type, which implies that several different zooxanthella lineages are present in the same host. The fact that the different sequences found in the same colony can also be found individually in other hosts makes the second explanation more likely.

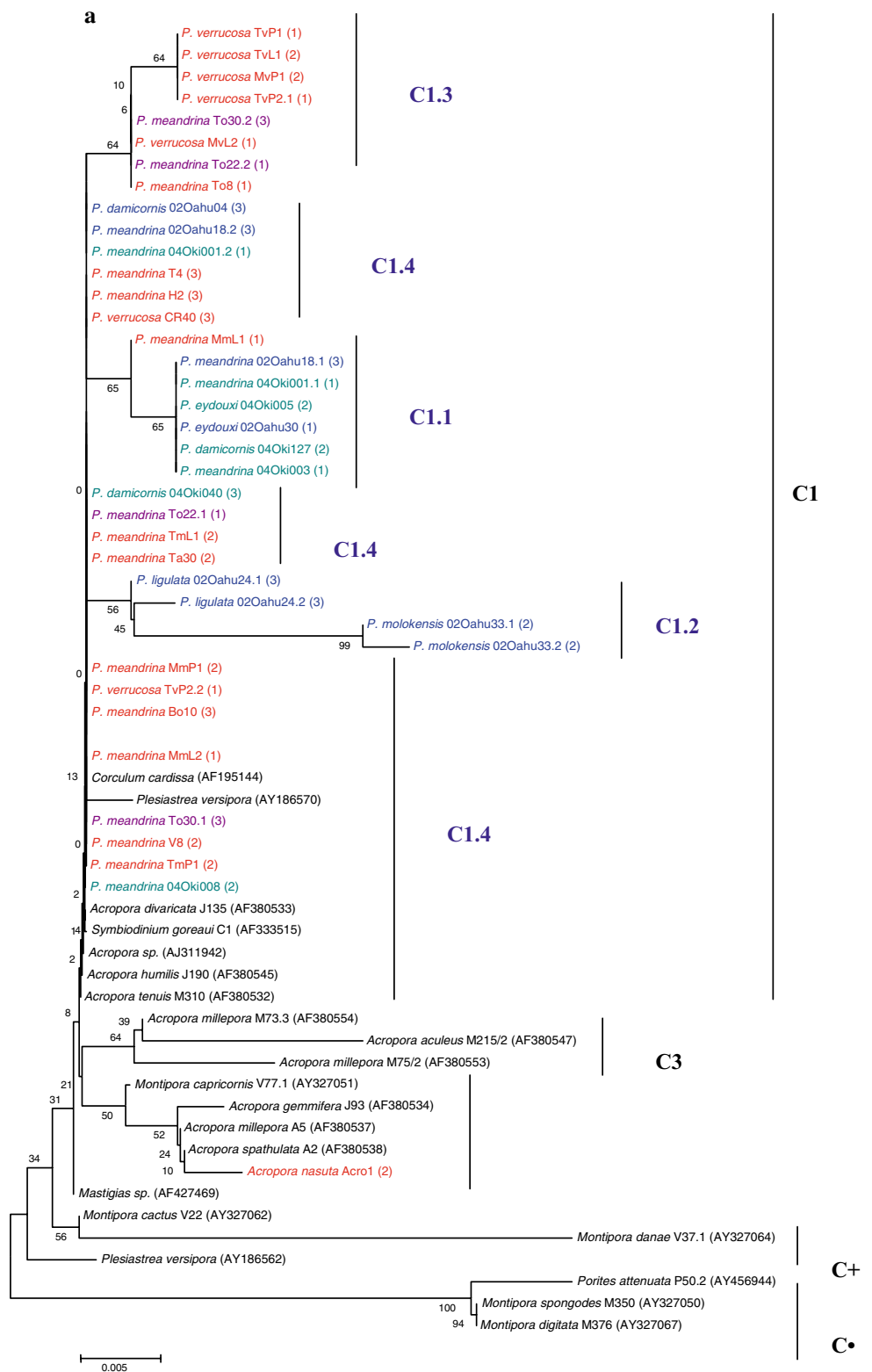
P. meandrina, *P. verrucosa*, *P. damicornis*, *P. eydouxi*, *P. molokensis* and *P. ligulata*, which originated from geographically distant regions (French Polynesia, Tonga, Japan, Hawaii), harbored closely related symbionts belonging to the clade C, particularly subclade C1 ($\theta_{ITS1} = 0.0073$; $\pi_{ITS1} = 0.05315$, with θ and π two estimators of nucleotide

diversity). This may be related to the mode of symbiont transmission in *Pocillopora*. It is frequently thought that maternal transmission results in lower symbiont diversity than horizontal transmission, which permits the acquisition of exogenous (and potentially novel) zooxanthellae every generation. In the case of horizontal transmission, the initial uptake of zooxanthellae by juvenile corals during natural infection may be specific or non-specific, depending on the particular host (e.g., Coffroth et al. 2001; Little et al. 2004). Exclusively vertical transmission, where a correlation between host and symbiont is expected, should result in a coevolution of the host and its symbiont (Diekmann et al. 2003). However, van Oppen (2004) found that zooxanthella diversity was similar for two coral genera differing in their mode of symbiont transmission.

Samples of *Pocillopora* collected from distant geographic regions and different habitats were found to associate with subclade C1. However, *P. molokensis* and *P. ligulata* from Hawaii associate specifically with C1.2 symbionts. *P. meandrina*, *P. verrucosa*, *P. damicornis* and *P. eydouxi* associate with closely related zooxanthella types belonging to the groups C1.1, C1.3 and C1.4. Members of subclade C1 were found in other studies to associate with very different corals such as *Acropora*, *Fungia*, *Porites* (Fabricius et al. 2004) and *Plesiastrea* (Rodriguez et al. 2003). They are thus considered host-generalists and may be ancestral to symbionts belonging to specialist subclades (LaJeunesse 2005).

Unexpectedly, *P. damicornis* collected from Moorea and Tahiti lagoons harbored clades C and D simultaneously, as observed in the Great Barrier Reef (Ulstrup et al. 2006), whereas *P. verrucosa* and *P. meandrina* collected at the same location were found to associate only with clade C. Conversely, *P. damicornis* collected at Bise (Okinawa, Japan) harbored only type A1 zooxanthellae, suggesting that this species might have co-evolved with this zooxanthella type at this specific (and remote) location (Barneah et al. 2004), or that other symbiont types were not detected due to the small sample size used (3 specimens). Thus, *P. damicornis* seems more capable of associating with several different clades compared to *P. verrucosa* and

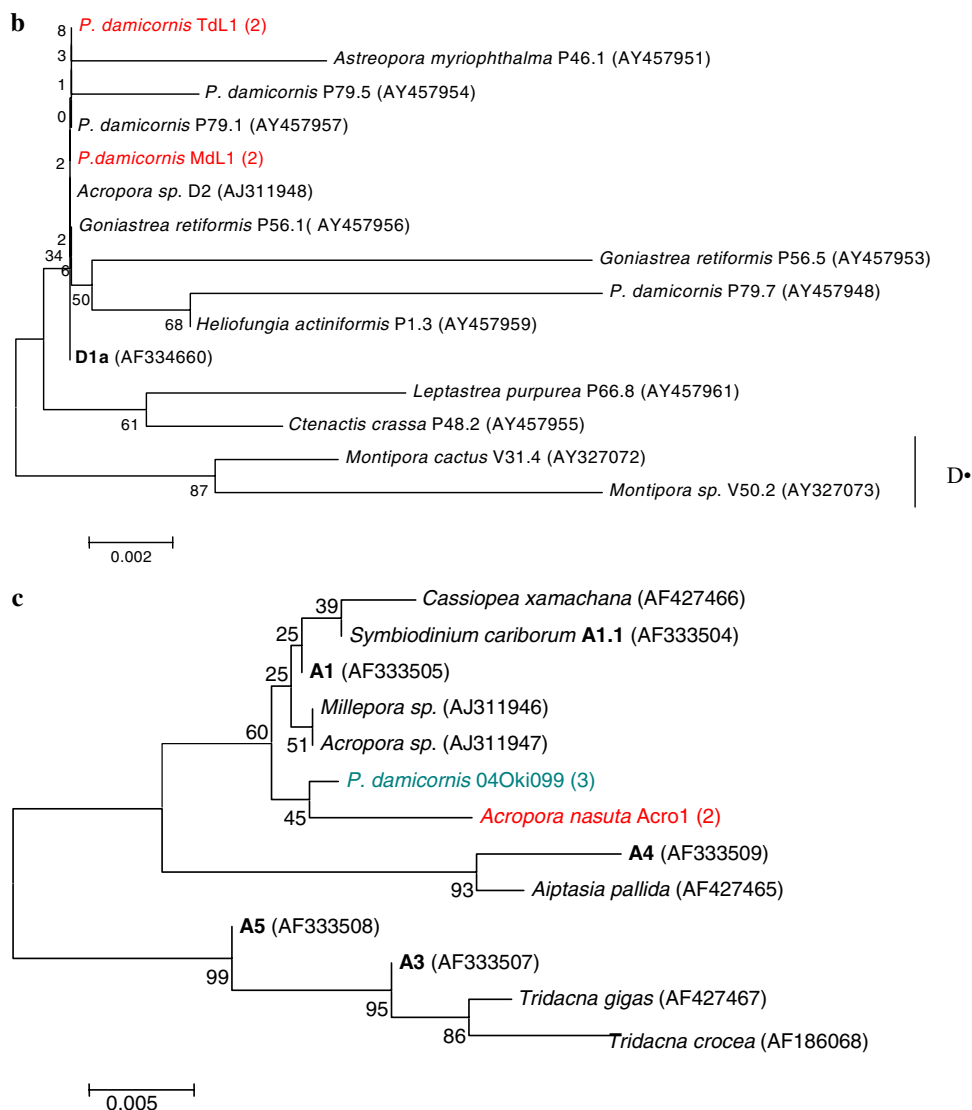
Fig. 1 Neighbor-Joining trees of *Pocillopora* zooxanthellae based on the ITS1 sequences. Bootstrap values are given above the branches. Samples from this study come from French Polynesia (*in red*), from Tonga (*in violet*), from Japan (*in green*) and from Hawaii (*in blue*). Numbers in parentheses are the number of colonies showing identical sequences. Samples of which the sample code is followed by a dot and a number (e.g., *P. verrucosa* TvP2.1) have been reported to exhibit two ITS sequences. **a** Clade C zooxanthellae. Group names which are followed by a dot and a number (e.g., C1.1) are originated from this study, the other from van Oppen et al. (2001) and from Fabricius et al. (2004). **b** Clade D zooxanthellae. Types in bold are from LaJeunesse (2001). The notation D• comes from Fabricius et al. (2004). **c** Clade A zooxanthellae. Types in bold (e.g., A1) are from LaJeunesse studies



P. meandrina. Furthermore, *Acropora nasuta* collected on the outer reef slope of Moorea harbored zooxanthellae belonging to subclades C2 and A1. This shows that these types of symbionts were present and locally available for the hosts inhabiting Moorea, although these types were not

found in the *Pocillopora* species of this region. So these particular associations between coral colonies and zooxanthella symbionts can be the result of recognition mechanisms, either by the symbiont or by the host, the influence of environmental conditions, competition between symbio-

Fig. 1 continued



nts within the host tissues, or a combination of these different mechanisms. The environment does not seem to play a major role, as species sharing the same environmental conditions do not harbor the same zooxanthellae and inversely, as species from different habitats and from distant regions harbor the same zooxanthellae (with exception of *P. damicornis*, which shows a particular geographic association pattern). It appears that host identity (i.e., the internal host environment and/or host-symbiont specificity) might be one of the main factors governing the *Pocillopora*–*Symbiodinium* symbiosis. But these conclusions have to be taken with caution because of the small sample size and the lack of resampling through time of the sampling scheme.

Clades of zooxanthellae have been hypothesized to differ in their thermotolerance (Kinzie et al. 2001), which may contribute to holobiont thermotolerance. Here most *Pocillopora* colonies harbored symbionts belonging to subclade C1 (groups C1.1, C1.3 and C1.4), regardless of their habitat.

Samples were obtained from the outer reef slope (Polynesia and Tonga at 12–15 m depth) as well as lagoon (*P. damicornis* collected in Hawaii, 1–2 m depth). Symbionts belonging to subclade C1 are not structured by depth and can be considered as generalists, since they are found in different habitats and at different depths. Type A1 was found in *A. nasuta* on Moorea outer reef slopes (13 m) and also in *P. damicornis* from Bise (2–3 m), in a pool exposed to high irradiance and high sea-surface temperature during low tide periods. Hence, this clade appears to be adapted to stressful environmental conditions, as previously reported (Kinzie et al. 2001). Clade D was only found in *P. damicornis* from Moorea and Tahiti in shallow lagoons. Clade D symbionts are often found in association with hosts inhabiting turbid waters with variable temperature (van Oppen et al. 2001), chronically warm waters (Fabricius et al. 2004) or in cases where hosts are recovering from a bleaching event (e.g., Baker et al. 2004; van Oppen et al. 2005).

A possible explanation for the association of *P. damicornis* with clades C and D simultaneously, is that *P. damicornis* colonies subjected to bleaching (Gleason 1993) might have reassociated with better adapted zooxanthellae acquired from the environment. However, it is not clearly demonstrated that corals which vertically transmit their symbionts can acquire zooxanthellae from the environment.

In conclusion, this study demonstrated that (1) most corals of the genus *Pocillopora* associate with zooxanthellae that are weakly differentiated from each other, all belonging to subclade C1, (2) no particular pattern of zooxanthellae depth zonation is observed in subclade C1, (3) *P. damicornis* is more flexible than other corals of the genus *Pocillopora* by harboring symbionts belonging to clades A, C and D.

Acknowledgments We thank Scott R. Santos for helpful advice, valuable comments and corrections. H. Magalon received a Docteur-Ingénieur fellowship from the CNRS.

References

- Baker A (2003) Flexibility and specificity in coral–algal symbiosis: diversity, ecology and biogeography of *Symbiodinium*. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 34:661–689
- Baker A, Starger CJ, McClanahan TR, Glynn PW (2004) Coral's adaptive response to climate change. Nature 430:741
- Barneah O, Weis VM, Perez SF, Benayahu Y (2004) Diversity of dinoflagellate symbionts in Red Sea soft corals: mode of symbiont acquisition matters. Mar Ecol Prog Ser 275:89–95
- Clark AG (1990) Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. Mol Biol Evol 7:111–122
- Coffroth MA, Santos SR (2005) Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. Protist 156:19–34
- Coffroth MA, Santos SR, Goulet TL (2001) Early ontogenetic expression of specificity in a cnidarian–algal symbiosis. Mar Ecol Prog Ser 222:85–96
- Diekmann OE, Olsen JL, Stam WT, Bak RPM (2003) Genetic variation within *Symbiodinium* clade B from the coral genus *Madracis* in the Caribbean (Netherlands Antilles). Coral Reefs 22:29–33
- Fabricius KE, Mieog JC, Colin PL, Idip D, van Oppen MJ (2004) Identity and diversity of coral endosymbionts (zooxanthellae) from three Palauan reefs with contrasting bleaching, temperature and shading histories. Mol Ecol 13:2445–2458
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783–791
- Gleason MG (1993) Effects of disturbance on coral communities: bleaching in Moorea, French Polynesia. Coral Reefs 12:193–201
- Glynn PW, Gassman NJ, Eakin CM, Cortes J, Smith DB, Guzman HM (1991) Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama and Galapagos Islands (Ecuador). I. Pocilloporidae. Mar Biol 109:355–368
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp 41:95–98
- Harii S, Kayanne H, Takigawa H, Hayashibara T, Yamamoto M (2002) Larval survivorship, competency periods and settlement of two brooding corals, *Helipora coerulea* and *Pocillopora damicornis*. Mar Biol 141:39–46
- Hirose M, Kinzie RA III, Hidaka M (2000) Early development of zooxanthella-containing eggs of the corals *Pocillopora verrucosa* and *P. eydouxi* with special reference to the distribution of zooxanthellae. Biol Bull 199:68–75
- Hirose M, Kinzie RA III, Hidaka M (2001) Timing and process of entry of zooxanthellae into oocytes of hermatypic corals. Coral Reefs 20:273–280
- Hunter CL, Morden CW, Smith CM (1997) The utility of ITS sequences in assessing relationships among zooxanthellae and corals. Proc 8th Int Coral Reef Symp 2:1599–1602
- Kinzie RA III, Takayama M, Santos SR, Coffroth MA (2001) The adaptive bleaching hypothesis: experimental tests of critical assumptions. Biol Bull 200:51–58
- Kruger A, Schleyer MH (1998) Sexual reproduction in the coral *Pocillopora verrucosa* (Cnidaria: Scleractinia) in KwaZulu-Natal, South Africa. Mar Biol 132:703–710
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics 12:1244–1245
- LaJeunesse TC (2001) Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a “species” level marker. J Phycol 37:866–880
- LaJeunesse TC (2002) Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. Mar Biol 141:387–400
- LaJeunesse TC (2005) “Species” radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the Miocene–Pliocene transition. Mol Biol Evol 22:570–581
- LaJeunesse TC, Trench RK (2000) Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). Biol Bull 199:126–134
- Little AF, van Oppen MJ, Willis BL (2004) Flexibility in algal endosymbioses shapes growth in reef corals. Science 304:1492–1494
- Magalon H, Samadi S, Richard M, Adjeroud M, Veuille M (2004) Development of coral and zooxanthella-specific microsatellites in three species of *Pocillopora* (Cnidaria, Scleractinia) from French Polynesia. Mol Ecol Notes 4:206–208
- Magalon H, Baudry E, Husté A, Adjeroud M, Veuille M (2006) High genetic diversity of the symbiotic dinoflagellates in the coral *Pocillopora meandrina* from the South Pacific. Mar Biol 148:913–922
- Marquez LM, Miller DJ, MacKenzie JB, van Oppen MJ (2003) Pseudogenes contribute to the extreme diversity of nuclear ribosomal DNA in the hard coral *Acropora*. Mol Biol Evol 20:1077–1086
- Rodriguez LM, Chang SJ, Song JI (2003) Specificity of two temperate dinoflagellate–anthozoan associations from the north-western Pacific Ocean. Mar Biol 143:1193–1199
- Rowan R, Powers DA (1991) A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal–algal symbiosis. Science 251:1348–1351
- Rowan R, Knowlton N (1995) Intraspecific diversity and ecological zonation in coral–algal symbiosis. Proc Natl Acad Sci USA 92:2850–2853
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Meth Mol Cell Biol 132:365–386
- Santos SR, Coffroth MA (2003) Molecular genetic evidence that dinoflagellates belonging to the genus *Symbiodinium* Freudenthal are haploid. Biol Bull 204:10–20
- Santos SR, Taylor DJ, Kinzie RA III, Hidaka M, Sakai K, Coffroth MA (2002a) Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences. Mol Phylogenet Evol 23:97–111
- Santos SR, Taylor DJ, Kinzie RA III, Sakai K, Coffroth MA (2002b) Evolution of length variation and heteroplasmy in the chloroplast rDNA of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyta) and a novel insertion in the universal core region of the large subunit rDNA. Phycologia 41:311–318
- Santos SR, Gutiérrez-Rodríguez C, Coffroth MA (2003) Phylogenetic identification of symbiotic dinoflagellates via length hetero-

- plasmy in domain V of chloroplast large subunit (cp23S)-rDNA sequences. *Mar Biotechnol* 5:134–140
- Savage AM, Trapido-Rosenthal H, Douglas AE (2002) On the functional significance of molecular variation in *Symbiodinium*, the symbiotic algae of Cnidaria: photosynthetic response to irradiance. *Mar Ecol Prog Ser* 244:27–37
- Sier CJS, Olive PJW (1994) Reproduction and reproductive variability in the coral *Pocillopora verrucosa* from the Republic of Maldives. *Mar Biol* 118:713–722
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978–989
- Swofford DL (2001) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Takabayashi M, Santos SR, Cook CB (2004) Mitochondrial DNA phylogeny of the symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyta). *J Phycol* 40:160–164
- Tchernov D, Gorbunov MY, de Vargas C, Narayan Yadav S, Milligan AJ, Häggblom M, Falkowski PG (2004) Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13531–13535
- Trench RK (1993) Microalgal–invertebrate symbioses: a review. *Endocyt Cell Res* 9:135–175
- Ulstrup KE, Berkelmans R, Ralph PJ, van Oppen MJ (2006) Variation in bleaching sensitivity of two coral species across a latitudinal gradient on the Great Barrier Reef: the role of zooxanthellae. *Mar Ecol Prog Ser* 314:135–148
- van Oppen MJ (2004) Mode of zooxanthella transmission does not affect zooxanthella diversity in acroporid corals. *Mar Biol* 144:1–7
- van Oppen MJ, Palstra FP, Piquet AM, Miller DJ (2001) Patterns of coral–dinoflagellate associations in *Acropora*: significance of local availability and physiology of *Symbiodinium* strains and host-symbiont selectivity. *Proc R Soc Lond B* 268:1759–1767
- van Oppen MJ, Mieog JC, Sanchez A, Fabricius KE (2005) Diversity of algal endosymbionts (zooxanthellae) in octocorals: the roles of geography and host relationships. *Mol Ecol* 14:2403–2417
- Veron J (2000) Corals of the world, vol 2. Australian Institute of Marine Science, Townsville

Bibliographie générale

- Alvarez, I. & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 417-434.
- Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
- Bazin, E., Glemin, S. & Galtier, N. (2006). Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*, 312(5773), 570-572.
- Bensch, S. & Åkesson, M. (2005). Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology*, 14(10), 2899-2914.
- Bernard, H. M. (1903). The family Poritidae. I, the genus *Goniopora*. *Catalogue of the madreporarian corals in the British Museum (Natural History)*. 4, 1-206, pl. 201-214.
- Bernard, H. M. (1905). The family Poritidae. II, the genus *Porites*, part I. *Porites* of the Indo-Pacific region. *Catalogue of the madreporarian corals in the British Museum (Natural History)*. 5, 1-303, pl. 301-335.
- Bernard, H. M. (1906). The family Poritidae. II, the genus *Porites*, part II. *Porites* of the Atlantic and West Indies with the European fossil forms. The genus *Goniopora*, a supplement to Vol. 4. *Catalogue of the madreporarian corals in the British Museum (Natural History)*. 6, 1-173, pl. 171-117.
- Bourne, D. G. & Munn, C. B. (2005). Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environmental Microbiology*, 7(8), 1162-1174.
- Brackel, W. H. (1977). Corallite variation in *Porites* and the species problem in corals. *Proceedings of the 3rd International Coral Reef Symposium*, 1, 457-462.
- Brazeau, D. A., Gleason, D. F. & Morgan, M. E. (1998). Self-fertilization in brooding hermaphroditic Caribbean corals: evidence from molecular markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 231(2), 225-238.
- Bryan, S. E., Cook, A., Evans, J. P., Colls, P. W., Wells, M. G., Lawrence, M. G. et al. (2004). Pumice rafting and faunal dispersion during 2001-2002 in the Southwest Pacific: record of a dacitic submarine explosive eruption from Tonga. *Earth and Planetary Science Letters*, 227(1-2), 135-154.

- Buss, L. W. (1982). Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(17), 5337-5341.
- Carricart-Ganivet, J. P. & Reyes-Bonilla, H. (1999). New and previous records of scleractinian corals from Clipperton Atoll, eastern Pacific. *Pacific Science*, 53(4), 370-375.
- Carturan, D., Boussuges, A., Vanuxem, P., Bar-Hen, A., Burnet, H. & Gardette, B. (2002). Ascent rate, age, maximal oxygen uptake, adiposity, and circulating venous bubbles after diving. *Journal of Applied Physiology*, 93(4), 1349-1356.
- Catala, R. (1964). *Carnaval sous la mer*. Paris: R. Sicard.
- Ceppellini, R., Curtoni, E. S., Mattiuz, P. L., Miggiano, V., Scudeller, G. & Serra, A. (1967). Genetics of leukocyte antigens: a family study of segregation and linkage. In E. S. Curtoni, P. L. Mattiuz & R. M. Tosi (Eds.), *Histocompatibility testing 1967* (pp. 149-187). København, Denmark: Munksgaard.
- Chen, C. A., Chang, C.-C., Wei, N. V., Chen, C.-H., Lein, Y.-T., Lin, H.-E. et al. (2004). Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in scleractinian corals. *Zoological Studies*, 43(4), 759-771.
- Chen, C. A., Odorico, D. M., Tenlohuis, M., Veron, J. E. N. & Miller, D. J. (1995). Systematic relationships within the Anthozoa (Cnidaria: Anthozoa) using the 5'-end of the 28S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4(2), 175-183.
- Chen, C. A., Wallace, C. C. & Wolstenholme, J. (2002). Analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene supports a two-clade hypothesis of the evolutionary history of scleractinian corals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(2), 137-149.
- Chess, J. R., Hobson, E. S. & Howard, D. F. (1997). Interactions between *Acanthaster planci* (Echinodermata, Asteroidea) and scleractinian corals at Kona, Hawai'i. *Pacific Science*, 51(2), 121-133.
- Cho, S., Mitchell, A., Regier, J., Mitter, C., Poole, R., Friedlander, T. et al. (1995). A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor-1 alpha recovers morphology-based tree for heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution*, 12(4), 650-656.
- Clode, P. L. & Marshall, A. T. (2003). Variation in skeletal microstructure of the coral *Galaxea fascicularis*: effects of an aquarium environment and preparatory techniques. *Biological Bulletin*, 204(2), 138-145.

- Cortés, J. (1997). Biology and geology of eastern Pacific coral reefs. *Coral Reefs*, 16(5), S39-S46.
- Cox, R. A. (1968). The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods in Enzymology*, 12(2), 120-129.
- Cronn, R., Cedroni, M., Haselkorn, T., Grover, C. & Wendel, J. F. (2002). PCR-mediated recombination in amplification products derived from polyploid cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2 - 3), 482-489.
- Cuif, J.-P., Lecointre, G., Perrin, C., Tillier, A. & Tillier, S. (2003). Patterns of septal biomineralization in Scleractinia compared with their 28S rRNA phylogeny: a dual approach for a new taxonomic framework. *Zoologica Scripta*, 32(5), 459-473.
- Culligan, K. M., Meyer-Gauen, G., Lyons-Weiler, J. & Hays, J. B. (2000). Evolutionary origin, diversification and specialization of eukaryotic MutS homolog mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Research*, 28(2), 463-471.
- Dana, J. D. (1846). *United States Exploring Expedition. Vol. VII. Zoophytes*. Philadelphia: C. Sherman.
- Diekmann, O. E., Bak, R. P. M., Stam, W. T. & Olsen, J. L. (2001). Molecular genetic evidence for probable reticulate speciation in the coral genus *Madracis* from a Caribbean fringing reef slope. *Marine Biology*, 139(2), 221-233.
- Doyle, J. J. (1995). The irrelevance of allele tree topologies for species delimitation, and a non-topological alternative. *Systematic Botany*, 20(4), 574-588.
- Duerden, J. E. (1902). Recent results on the morphology and development of coral polyps. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 47, 93-111.
- Durham, J. W. & Barnard, J. L. (1952). Stony corals of the eastern Pacific collected by the Velero III and Velero IV. *Allan Hancock Pacific Expeditions*, 16, 1-110.
- Ehrenberg, C. G. (1834). *Die Corallenthiere des Rothen Meeres physiologisch untersucht und systematisch verzeichnet*. Berlin: gedruckt in der Druckerei der K. Akademie der Wissenschafte.
- Ellis, J. & Solander, D. (1786). *The natural history of many curious and uncommon zoophytes, collected from various parts of the globe*. London: White & Son.
- Esper, E. J. C. (1794-1797). *Fortsetzungen der Pflanzenthiere in Abbildungen nach der Natur mit Farben erleuchtet nebst Beschreibungen*. Nürnberg: Raspeschen Buchh.
- Estoup, A., Jarne, P. & Cornuet, J.-M. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11(9), 1591-1604.

- Fadlallah, Y. H. (1985). Reproduction in the coral *Pocillopora verrucosa* on the reefs adjacent to the industrial city of Yanbu (Red Sea, Saudi Arabia). *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress*, 4, 313-318.
- Fautin, D. G. (1988). Importance of nematocysts to actinian taxonomy. In D. A. Hessinger & H. M. Lenhoff (Eds.), *The Biology of Nematocysts* (pp. 487-500). San Diego: Academic Press.
- Fautin, D. G. (2002). Reproduction of Cnidaria. *Canadian Journal of Zoology*, 80, 1735-1754.
- Fisk, D. A. & Done, T. J. (1985). Taxonomic and bathymetric patterns of bleaching in corals, Myrmidon Reef (Queensland). *Proceedings of the 5th International Coral Reef Society Congress, Tahiti*, 6, 149-154.
- Flot, J.-F. & Adjeroud, M. (sous presse). Les coraux de Clipperton. In L. Charpy (Ed.), *Clipperton: environnement et biodiversité d'un microcosme océanique*. Paris: MNHN.
- Flot, J.-F., Ozouf-Costaz, C., Tsuchiya, M. & van Woesik, R. (2006). Comparative coral cytogenetics. *Proceedings of the 10th International Coral Reef Symposium*, 1, 4-8.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Forskål, P. (1775). *Descriptiones animalium, avium, amphibiorum, piscium, insectorum, vermium; quae in itinere orientale observavit*: Mölleriaulae Typographi, Hauniae.
- Forsman, Z. H., Guzman, H. M., Chen, C. A., Fox, G. E. & Wellington, G. M. (2005). An ITS region phylogeny of *Siderastrea* (Cnidaria: Anthozoa): is *S. glynni* endangered or introduced? *Coral Reefs*, 24(2), 343-347.
- Frank, U., Oren, U., Loya, Y. & Rinkevich, B. (1997). Alloimmune maturation in the coral *Stylophora pistillata* is achieved through three distinctive stages, 4 months post-metamorphosis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 264(1378), 99-104.
- Fukami, H., Budd, A. F., Levitan, D. R., Jara, J., Kersanach, R. & Knowlton, N. (2004a). Geographic differences in species boundaries among members of the *Montastraea annularis* complex based on molecular and morphological markers. *Evolution*, 38(2), 324-337.
- Fukami, H., Budd, A. F., Paulay, G., Solé-Cava, A., Chen, C. A., Iwao, K. et al. (2004b). Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. *Nature*, 427, 832-835.

- Fukami, H. & Knowlton, N. (2005). Analysis of complete mitochondrial DNA sequences of three members of the *Montastraea annularis* coral species complex (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia). *Coral Reefs*, 24(3), 410-417.
- Fukui, Y. (1993). Chromosomes of the sea anemone *Haliplanella luciae* (= *H. lineata*) (Coelenterata: Actiniaria). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73, 971-973.
- Fukui, Y. (1996). Karyotype of the sea anemone *Aiptasiomorpha* sp. (Anthozoa, Actiniaria) from Japan. *Biological Bulletin*, 190(1), 6-7.
- Garthwaite, R. L., Potts, D. C., Veron, J. E. N. & Done, T. J. (1994). Electrophoretic identification of poritid species (Anthozoa, Scleractinia). *Coral Reefs*, 13(1), 49-56.
- Garza, J., Slatkin, M. & Freimer, N. (1995). Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology and Evolution*, 12(4), 594-603.
- Gattuso, J.-P., Pichon, M. & Jaubert, J. (1991). Physiology and taxonomy of scleractinian corals: a case study in the genus *Stylophora*. *Coral Reefs*, 9(4), 173-182.
- Glynn, P. W. & Ault, J. S. (2000). A biogeographic analysis and review of the far eastern Pacific coral reef region. *Coral Reefs*, 19(1), 1-23.
- Glynn, P. W., Gassman, N. J., Eakin, C. M., Cortes, J., Smith, D. B. & Guzman, H. M. (1991). Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama, and the Galapagos Islands (Ecuador) I. Pocilloporidae. *Marine Biology*, 109, 355-368.
- Glynn, P. W., Veron, J. E. N. & Wellington, G. M. (1996). Clipperton Atoll (eastern Pacific): oceanography, geomorphology, reef-building coral ecology and biogeography. *Coral Reefs*, 15(2), 71-99.
- Gravier, C. (1911). Les récifs de coraux et les Madréporaires de la baie de Tadjourah (Golfe d'Aden). *Annales de l'Institut d'Océanographie*, 2(3), 1-101, pl. 101-112.
- Harper, J. L. (1977). *Population biology of plants*. London, New York, San Francisco: Academic Press.
- Harrison, P. L. (1985). Sexual characteristics of scleractinian corals: systematic and evolutionary implications. *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress*, 4, 337-342.
- Harrison, P. L., Babcock, R. C., Bull, G. D., Oliver, J. K., Wallace, C. C. & Willis, B. L. (1984). Mass spawning in tropical reef corals. *Science*, 223(4641), 1186-1189.

- Hatta, M., Fukami, H., Wang, W. Q., Omori, M., Shimoike, K., Hayashibara, T. et al. (1999). Reproductive and genetic evidence for a reticulate evolutionary history of mass-spawning corals. *Molecular Biology and Evolution*, 16(11), 1607-1613.
- Hayashibara, T., Kimura, T. & Hatta, M. (2000). Changes of cnida composition during planula development of a reef-building coral *Acropora nasuta*. *Galaxea, Journal of the Japanese Coral Reef Society*, 2, 39-42.
- Head, S. M. (1983). An undescribed species of *Merulina* and a new genus and species of siderastroid coral from the Red Sea. *Journal of Natural History*, 17, 419-435.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences*, 270, 313-321.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences*, 270, S96-S99.
- Hedin, M. C. & Maddison, W. P. (2001). Phylogenetic utility and evidence for multiple copies of elongation factor-1 alpha in the spider genus *Habronattus* (Araneae: Salticidae). *Molecular Biology and Evolution*, 18(8), 1512-1521.
- Hertlein, L. G. & Emerson, W. K. (1957). Additional notes on the invertebrate fauna of Clipperton Island. *American Museum novitates*, 1859, 1-9.
- Heyward, A. J. (1985a). Chromosomes of the coral *Goniopora lobata* (Anthozoa: Scleractinia). *Heredity*, 55, 269-271.
- Heyward, A. J. (1985b). Comparative coral karyology. *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress*, 6, 47-51.
- Heyward, A. J. & Collins, J. D. (1985). Fragmentation in *Montipora ramosa*: the genet and ramet concept applied to a reef coral. *Coral Reefs*, 4(1), 35-40.
- Hidaka, M. (1985). Tissue compatibility between colonies and between newly settled larvae of *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*, 4(2), 111-116.
- Hidaka, M. (1992). Use of nematocyst morphology for taxonomy of some related species of scleractinian corals. *Galaxea*, 11, 21-28.
- Hidaka, M., Miyasaki, I. & Yamazato, K. (1987). Nematocyst characteristic of the sweeper tentacles of the coral *Galaxea fascicularis* (Linnaeus). *Galaxea*, 6, 195-207.
- Hidaka, M., Yurugi, K., Sunagawa, S. & Kinzie, R. A. (1997). Contact reactions between young colonies of the coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*, 16(1), 13-20.

- Highsmith, R. C. (1980). Burrowing by the bivalve mollusc *Lithophaga curta* in the living reef coral *Montipora berryi* and a hypothesis of reciprocal larval recruitment. *Marine Biology*, 56(2), 155-162.
- Hirose, M., Kinzie, R. A. & Hidaka, M. (2000). Early development of zooxanthella-containing eggs of the corals *Pocillopora verrucosa* and *P. eydouxi* with special reference to the distribution of zooxanthellae. *Biological Bulletin*, 199(1), 68-75.
- Hirose, M., Kinzie, R. A. & Hidaka, M. (2001). Timing and process of entry of zooxanthellae into oocytes of hermatypic corals. *Coral Reefs*, 20(3), 273-280.
- Hoelzer, G. A. (1997). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees revisited. *Evolution*, 51(2), 622-626.
- Jackson, J. B. C. & Coates, A. G. (1986). Life cycles and evolution of clonal (modular) animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 313(1159), 7-22.
- Jarman, S. N., Ward, R. D. & Elliott, N. G. (2002). Oligonucleotide primers for PCR amplification of coelomate introns. *Marine Biotechnology*, 4(4), 347-355.
- Jokiel, P. L. (1989). Rafting of reef corals and other organisms at Kwajalein Atoll. *Marine Biology*, 101(4), 483-493.
- Jokiel, P. L. (1990). Transport of reef corals into the Great Barrier Reef. *Nature*, 347, 665-667.
- Kang, D., Miyako, K., Kai, Y., Irie, T. & Takeshige, K. (1997). In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15275-15279.
- Kenyon, J. C. (1993). Chromosome numbers in ten species of the coral genus *Acropora*. *Proceedings of the 7th International Coral Reef Symposium*, 1, 471-475.
- Kenyon, J. C. (1997). Models of reticulate evolution in the coral genus *Acropora* based on chromosome numbers: parallels with plants. *Evolution*, 51(3), 756-767.
- Ketchum, J. T. & Reyes Bonilla, H. (2001). Taxonomía y distribución de los corales hermatípicos (Scleractinia) del Archipiélago de Revillagigedo, México. *Revista de Biología Tropical*, 49(3-4), 803-848.
- Kinzie, R. A. (1993). Spawning in the reef corals *Pocillopora verrucosa* and *P. eydouxi* at Sesoko Island, Okinawa. *Galaxea*, 11, 93-105.
- Kleemann, K. (1980). Boring bivalves and their host corals from the Great Barrier Reef. *Journal of Molluscan Studies*, 46(1), 13-54.

- Kolinski, S. & Cox, E. F. (2003). An update on modes and timing of gamete and planula release in Hawaiian scleractinian corals with implications for conservation and management. *Pacific Science*, 57(1), 17-27.
- Krempf, A. (1919). Sur un stade primitif, essentiel, non encore reconnu dans le développement des Anthozoaires. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*, 169, 39-42.
- Krempf, A. (1920). Sur les principales modalités du développement et des relations de l'Orthosepte et du Stérigmatosepte dans l'ensemble du groupe des Anthozoaires. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*, 170.
- Kruger, A. & Schleyer, M. H. (1998). Sexual reproduction in the coral *Pocillopora verrucosa* (Cnidaria: Scleractinia) in KwaZulu-Natal, South Africa. *Marine Biology*, 132, 703-710.
- Laborel, J. (1970). Madréporaires et Hydrocoralliaires récifaux des côtes brésiliennes. Systématique, écologie, répartition verticale et géographique. Résultats scientifiques de la campagne Calypso. *Annales de l'Institut d'Océanographie*, 9(47), 171-229.
- Lamarck, J.-B. d. M. d. (1816). *Histoire naturelle des animaux sans vertèbres, présentant les caractères généraux et particuliers de ces animaux, leur distribution, leurs classes, leurs familles, leurs genres, et la citation des principales espèces qui s'y rapportent; précédée d'une introduction offrant la détermination des caractères essentiels de l'animal, sa distinction du végétal et des autres corps naturels, enfin, l'exposition des principes fondamentaux de la zoologie. Tome second.* Paris: Verdière.
- Lang, J. (1971). Interspecific aggression by scleractinian corals. 1. The rediscovery of *Scolymia cubensis* (Milne Edwards & Haime). *Bulletin of Marine Science*, 21(4), 952-959.
- Lang, J. C. (1984). Whatever works: the variable importance of skeletal and of non-skeletal characters in scleractinian taxonomy. *Palaeontographica Americana*, 54, 18-44.
- Lewis, J. B. & Price, W. S. (1975). Feeding mechanisms and feeding strategies of Atlantic reef corals. *Journal of Zoology, London*, 176, 527-544.
- Linnaeus, C. (1735). *Systema naturæ, sive, regna tria naturæ systematice proposita per classes, ordines, genera, & species: Lugduni Batavorum.*
- Linsley, B. K., Messier, R. G. & Dunbar, R. B. (1999). Assessing between-colony oxygen isotope variability in the coral *Porites lobata* at Clipperton Atoll. *Coral Reefs*, 18(1), 13-27.

- Lirman, D. (2000). Fragmentation in the branching coral *Acropora palmata* (Lamarck): growth, survivorship, and reproduction of colonies and fragments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 251(1), 41-57.
- Loya, Y., Sakai, K., Yamazato, K., Nakano, Y., Sambali, H. & Van Woesik, R. (2001). Coral bleaching: the winners and the losers. *Ecology Letters*, 4(2), 122-131.
- Magalon, H., Samadi, S., Richard, M., Adjeroud, M. & Veuille, M. (2004). Development of coral and zooxanthella-specific microsatellites in three species of *Pocillopora* (Cnidaria, Scleractinia) from French Polynesia. *Molecular Ecology Notes*, 4, 206-208.
- Maier, E., Tollrian, R. & Nürnberger, B. (2001). Development of species-specific markers in an organism with endosymbionts: microsatellites in the scleractinian coral *Seriatopora hystrix*. *Molecular Ecology Notes*, 1, 157-159.
- Márquez, L. M., Mackenzie, J. B., Takabayashi, M., Smith, C. R. & Chen, C. A. (2002). Difficulties in obtaining microsatellites from acroporid corals. *Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium*, 1, 139-143.
- Mason, P. E., Neilson, G. W., Dempsey, C. E., Barnes, A. C. & Cruickshank, J. M. (2003). The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution. *PNAS*, 100(8), 4557-4561.
- Maté, J. (2003). Ecological, genetic, and morphological differences among three *Pavona* (Cnidaria: Anthozoa) species from the Pacific coast of Panama. *Marine Biology*, 142(3), 427-440.
- Matthai, G. (1914). A revision of the recent colonial *Astraeidae* possessing distinct corallites. *Transactions of the Linnean Society of London. Series 2, Zoology*, 17, 1-140.
- Matthai, G. (1923). Histology of the soft parts of *astroid* corals. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 67(101-122), 7-8.
- McClanahan, T. R., Baird, A. H., Marshall, P. A. & Toscano, M. A. (2004). Comparing bleaching and mortality responses of hard corals between southern Kenya and the Great Barrier Reef, Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 48(3-4), 327-335.
- Medina, M., Collins, A. G., Takaoka, T. L., Kuehl, J. V. & Boore, J. L. (2006). Naked corals: skeleton loss in Scleractinia. *PNAS*, 103(24), 9096-9100.
- Meroz, E., Brickner, I., Loya, Y., Peretzman-Shemer, A. & Ilan, M. (2002). The effect of gravity on coral morphology. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 269, 717-720.
- Meyerhans, A., Vartanian, J.-P. & Wain-Hobson, S. (1990). DNA recombination during PCR. *Nucleic Acids Research*, 18(7), 1687-1691.

- Miller, D. J. & van Oppen, M. J. H. (2003). A 'fair go' for coral hybridization. *Molecular Ecology*, 12(4), 805-807.
- Miller, K. J. & Howard, C. G. (2004). Isolation of microsatellites from two species of scleractinian coral. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 11-13.
- Milne Edwards, H. & Haime, J. (1857). *Histoire naturelle des coralliaires (Tome 2)*. Paris: Roret.
- Moore, W. S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49(4), 718-726.
- Moore, W. S. (1997). Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees, a reply to Hoelzer. *Evolution*, 51(2), 627-629.
- Mumby, P. J., Chisholm, J. R. M., Edwards, A. J., Clark, C. D., Roark, E. B., Andrefouet, S. et al. (2001). Unprecedented bleaching-induced mortality in *Porites spp.* at Rangiroa Atoll, French Polynesia. *Marine Biology*, 139(1), 183-189.
- Niiyama, H. (1944). A study on chromosomes in hydra. *Cytologia*, 13, 204-209.
- Ormond, R. F. G., Hanscomb, N. J. & Beach, D. H. (1976). Food selection in the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* (L.). *Marine Behaviour and Physiology*, 4(93-105).
- Pallas, P. S. (1766). *Elenchus zoophytorum sistens generum adumbrationes generaliores et specierum cognitarum succinctas descriptiones cum selectis auctorum synonymis*: Hagæ (F. Varrentrapp).
- Palumbi, S. & Baker, C. (1994). Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*, 11(3), 426-435.
- Pamilo, P. & Nei, M. (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5(5), 568-583.
- Paruntu, C. P., Hidaka, K. & Hidaka, M. (2000). Developmental changes in cnida composition of the coral *Pocillopora damicornis*. *Galaxea, Journal of the Japanese Coral Reef Society*, 2, 23-28.
- Paulay, G. & Benayahu, Y. (1999). Patterns and consequences of coral bleaching in Micronesia (Majura and Guam) in 1992-1994. *Micronesica*, 31(2), 109-124.
- Pineda-Krch, M. & Lehtilä, K. (2004). Costs and benefits of genetic heterogeneity within organisms. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(6), 1167-1177.
- Pont-Kingdon, G., Okada, N. A., Beagley, C. T., Watkins-Sims, C. D., Cavalier-Smith, T., Clark-Walker, G. D. et al. (1998). Mitochondrial DNA of the coral *Sarcophyton glaucum* contains a gene for a homologue of bacterial MutS: a possible case of gene

- transfer from the nucleus to the mitochondrion. *Journal of Molecular Evolution*, 46(4), 419-431.
- Pont-Kingdon, G., Okada, N. A., Macfarlane, J. L., Beagley, C. T., Wolstenholme, D. R., Cavalier-Smith, T. et al. (1995). A coral mitochondrial *mutS* gene. *Nature*, 375.
- Quelch, J. J. (1886). *Report on the reef corals collected by H.M.D. Challenger during the years 1873-76. Scientific results of the voyage of the Challenger.*
- Rahat, A., Rahat, M. & Searle, J. B. (1985). A simple method for the preparation of hydra chromosome spreads: introducing chromosome counts into hydra taxonomy. *Experientia*, 41, 282-283.
- Randall, R. H. (1976). Some problems in reef coral taxonomy. *Micronesica*, 15(1), 151-156.
- Réaumur, R. A. F. d. (1710). Du mouvement progressif et de quelques autres mouvements de diverses espèces de coquillages, orties, et étoiles de mer. *Mémoires de l'Académie Royale des Sciences*, 1732, 439-490.
- Reyes Bonilla, H. & Carricart-Ganivet, J. P. (2000). *Porites arnaudi*, a new species of stony coral (Anthozoa: Scleractinia: Poritidae) from oceanic islands of the eastern Pacific Ocean. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 113, 561-571.
- Ridgway, T. (2002). Testing the applicability of molecular genetic markers to population analyses of scleractinian corals. *Symbiosis*, 33(3), 243-261.
- Ridgway, T. (2005). Allozyme electrophoresis still represents a powerful technique in the management of coral reefs. *Biodiversity and Conservation*, 14(1), 135-149.
- Romano, S. L. & Cairns, S. D. (2000). Molecular phylogenetic hypotheses for the evolution of scleractinian corals. *Bulletin of Marine Science*, 67(3), 1043-1068.
- Romano, S. L. & Palumbi, S. R. (1996). Evolution of scleractinian corals inferred from molecular systematics. *Science*, 271(5249), 640-642.
- Romano, S. L. & Palumbi, S. R. (1997). Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16S ribosomal gene region in scleractinian corals. *Journal of Molecular Evolution*, 45(4), 397-411.
- Rosen, B. R. & Taylor, J. D. (1969). Reef coral from Aldabra: new mode of reproduction. *Science*, 166(3901), 119-121.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. & Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. 5(5), 355-362.
- Rowan, R., Knowlton, N., Baker, A. & Jara, J. (1997). Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature*, 388(6639), 265-269.

- Sachet, M.-H. (1962a). Geography and land ecology of Clipperton Island. *Atoll Research Bulletin*, 86, 1-134.
- Sachet, M.-H. (1962b). Monographie physique et biologique de l'île de Clipperton. *Annales de l'Institut d'Océanographie*.
- Saito, S., Tamura, K. & Aotsuka, T. (2005). Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*, 171(4), 1695-1705.
- Sammarco, P. W. (1982). Polyp bail-out: an escape response to environmental stress and a new means of reproduction in corals. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 57-65.
- Schuhmacher, H. & Zibrowius, H. (1985). What is hermatypic? *Coral Reefs*, 4(1), 1-9.
- Scribner, K. T. & Pearce, J. M. (2000). Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. In A. J. Baker (Ed.), *Molecular Methods in Ecology* (pp. 235-273). London: Blackwell Science Limited.
- Severance, E. G., Szmant, A. M. & A. Karl, S. (2004). Microsatellite loci isolated from the Caribbean coral, *Montastraea annularis*. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 74-76.
- Shearer, T. L., van Oppen, M. J. H., Romano, S. L. & Wörheide, G. (2002). Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*, 11(12), 2475-2487.
- Shlesinger, Y., Goulet, T. L. & Loya, Y. (1998). Reproductive patterns of scleractinian corals in the northern Red Sea. *Marine Biology*, 132(4), 691-701.
- Shlesinger, Y. & Loya, Y. (1985). Coral community reproductive patterns: Red Sea versus the Great Barrier Reef. *Science*, 228(4705), 1333-1335.
- Sier, C. J. S. & Olive, P. J. W. (1994). Reproduction and reproductive variability in the coral *Pocillopora verrucosa* from the Republic of Maldives. *Marine Biology*, 118(4), 713-722.
- Steiner, S. C. C. (1991). Sperm morphology of scleractinians from the Caribbean. *Hydrobiologia*, 216-217(1), 131-135.
- Steiner, S. C. C. & Cortés, J. (1996). Spermatozoan ultrastructure of scleractinian corals from the eastern Pacific: Pocilloporidae and Agariciidae. *Coral Reefs*, 15(2), 143-147.
- Stimson, J. S. (1978). Mode and timing of reproduction in some common hermatypic corals of Hawaii and Enewetak. *Marine Biology*, 48(2), 173-184.
- Stobart, B. (2000). A taxonomic reappraisal of *Montipora digitata* based on genetic and morphometric evidence. *Zoological Studies*, 39(3), 179-190.

- Stobart, B. & Benzie, J. A. H. (1994). Allozyme electrophoresis demonstrates that the scleractinian coral *Montipora digitata* is two species. *Marine Biology*, 118, 183-190.
- Stoddart, J. A. (1983). Asexual production of planulae in the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 76(3), 279-284.
- Stolarski, J. & Roniewicz, E. (2001). Towards a new synthesis of evolutionary relationships and classification of Scleractinia. *Journal of Paleontology*, 75(6), 1090-1108.
- Tseng, C.-C., Wallace, C. C. & Chen, C. A. (2005). Mitogenomic analysis of *Montipora cactus* and *Anacropora matthai* (cnidaria; scleractinia; acroporidae) indicates an unequal rate of mitochondrial evolution among Acroporidae corals. *Coral Reefs*, 24(3), 502-508.
- Underwood, J. N., Souter, P. B., Ballment, E. R., Lutz, A. H. & Van Oppen, M. J. H. (2006). Development of 10 polymorphic microsatellite markers from herbicide-bleached tissues of the brooding pocilloporid coral *Seriatopora hystrix*. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 176-178.
- van Oppen, M. J., Catmull, J., McDonald, B. J., Hislop, N. R., Hagerman, P. J. & Miller, D. J. (2002a). The mitochondrial genome of *Acropora tenuis* (Cnidaria; Scleractinia) contains a large group I intron and a candidate control region. *Journal of Molecular Evolution*, 55(1), 1-13.
- van Oppen, M. J. H. (1999). Atypically low rate of cytochrome *b* evolution in the scleractinian coral genus *Acropora*. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences*, 266, 179-183.
- van Oppen, M. J. H., Koolmees, E. M. & Veron, J. E. N. (2004). Patterns of evolution in the scleractinian coral genus *Montipora* (Acroporidae). *Marine Biology*, 144(1), 9-18.
- van Oppen, M. J. H., McDonald, B. J., Willis, B. & Miller, D. J. (2001). The evolutionary history of the coral genus *Acropora* (Scleractinia, Cnidaria) based on a mitochondrial and a nuclear marker: reticulation, incomplete lineage sorting, or morphological convergence? *Molecular Biology and Evolution*, 18(7), 1315-1329.
- van Oppen, M. J. H., Willis, B. L., Van Rheede, T. & Miller, D. J. (2002b). Spawning times, reproductive compatibilities and genetic structuring in the *Acropora aspera* group: evidence for natural hybridization and semi-permeable species boundaries in corals. *Molecular Ecology*, 11(8), 1363-1376.
- van Oppen, M. J. H., Willis, B. L., Van Vugt, H. & Miller, D. J. (2000). Examination of species boundaries in the *Acropora cervicornis* group (Scleractinia, Cnidaria) using nuclear DNA sequence analyses. *Molecular Ecology*, 9(9), 1363-1373.

- van Oppen, M. J. H., Wörheide, G. & Takabayashi, M. (2002c). Nuclear markers in evolutionary and population genetic studies of scleractinian corals and sponges. *Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium, 1*, 131-138.
- Vaughan, T. W. (1907). Recent Madreporaria of the Hawaiian Islands and Laysan. *Bulletin of the US National Museum, 49(9)*, 1-427, pl. 421-496.
- Vaughan, T. W. & Wells, J. W. (1943). Revision of the sub-orders, families and genera of the Scleractinia. *Geological Society of America Special Papers, 44*, 1-363, pl. 361-351.
- Veron, J. E. N. (1995). *Corals in space and time: the biogeography & evolution of the Scleractinia*. Sydney, Australia: University of New South Wales Press.
- Veron, J. E. N. (2001). Reflections. *Atoll Research Bulletin, 494*, 108-117.
- Veron, J. E. N., Odorico, D. M., Chen, C. A. & Miller, D. J. (1996). Reassessing evolutionary relationships of scleractinian corals. *Coral Reefs, 15(1)*, 1-9.
- Veron, J. E. N. & Pichon, M. (1976). Scleractinia of eastern Australia. I. Families Thamnasteriidae, Astrocoeniidae, Pocilloporidae. *Australian Institute of Marine Science Monograph Series, 1*, 1-86.
- Veron, J. E. N. & Pichon, M. (1980). Scleractinia of eastern Australia. III. Families Agaricidae, Siderastreidae, Fungiidae, Oculinidae, Merulinidae, Mussidae, Pectiniidae, Caryophylliidae, Dendrophyllidae. *Australian Institute of Marine Science Monograph Series, 4*, 1-422.
- Veron, J. E. N. & Pichon, M. (1984). Scleractinia of eastern Australia. IV. Family Poritidae. *Australian Institute of Marine Science Monograph Series, 5*, 1-159.
- Veron, J. E. N., Pichon, M. & Wijsman-Best, M. (1977). Scleractinia of eastern Australia. II. Families Faviidae, Trachyphyllidae. *Australian Institute of Marine Science Monograph Series, 3*, 1-233.
- Veron, J. E. N. & Stafford-Smith, M. (2000). *Corals of the world*: Australian Institute of Marine Science.
- Veron, J. E. N. & Wallace, C. (1984). Scleractinia of eastern Australia. V. Family Acroporitidae. *Australian Institute of Marine Science Monograph Series, 6*, 1-446.
- Vollmer, S. V. & Palumbi, S. R. (2002). Hybridization and the evolution of reef coral diversity. *Science, 296(5575)*, 2023-2025.
- Wang, W., Omori, M., Hayashibara, T., Shimoike, K., Hatta, M., Sugiyama, T. et al. (1995). Isolation and characterization of a mini-collagen gene encoding a nematocyst capsule protein from a reef-building coral, *Acropora donei*. *Gene, 152(2)*, 200.

- Ward, S. (1992). Evidence for broadcast spawning as well as brooding in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 112(4), 641-646.
- Wellington, G. M., Glynn, P. W. & Veron, J. E. N. (1995). Clipperton Island: a unique atoll in the eastern Pacific. *Coral Reefs*, 14(3), 162.
- Wells, J. W. (1956). Scleractinia. In R. C. Moore (Ed.), *Treatise on Invertebrate Paleontology* (pp. 328-444). Lawrence: Geological Society of America and University of Kansas Press.
- Wells, J. W. (1966). Evolutionary development in the scleractinian family Fungiidae. *Symposia of the Zoological Society of London*, 16, 223-246.
- Wells, J. W. (1971a). Note on the scleractinian corals *Scolymia lacera* and *S. cubensis* in Jamaica. *Bulletin of Marine Science*, 21(4), 960-963.
- Wells, J. W. (1971b). Notes on Indo-Pacific scleractinian corals. Part 7, *Catalaphyllia*, a new genus of reef corals. *Pacific Science*, 25, 368-371.
- Wijsman, H. J. & Wijsman-Best, M. (1973). A note on the chromosomes of some madreporarian corals from the Mediterranean (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia: Dendrophyllidae, Caryophyllidae, Faviidae). *Genen en Phaenen*, 16(2), 61-64.
- Wijsman-Best, M. (1972). Systematics and ecology of New Caledonian Faviinae (Coelenterate - Scleractinia). *Bijdragen tot de Dierkunde*, 42(1), 3-90.
- Williams, E. H. J. & Bunkley-Williams, L. (1990). The world-wide coral reef bleaching cycle and related sources of coral mortality. *Atoll Research Bulletin*, 335, 1-71.
- Willis, B. L., Babcock, R. C., Harrison, P. L. & Wallace, C. C. (1997). Experimental hybridization and breeding incompatibilities within the mating systems of mass spawning reef corals. *Coral Reefs*, 16, S53-S65.
- Wood Jones, F. (1907). On the growth-forms and supposed species in corals. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 518-556.
- Wood Jones, F. (1910). *Corals and atolls*. London: Lovell, Reeve and Co.
- Yonge, C. M. (1968). Review lecture: Living corals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 169(1017), 329-344.
- Yu, W., Rusterholtz, K. J., Krummel, A. T. & Lehman, N. (2006). Detection of high levels of recombination generated during PCR amplification of RNA templates. *BioTechniques*, 40(4), 499-507.

VERS UNE TAXONOMIE MOLÉCULAIRE DES CORAUX DU GENRE *POCILLOPORA*

Résumé

Les espèces de coraux du genre *Pocillopora* sont notoirement difficiles à identifier en raison des spectaculaires variations morphologiques observées au sein des 17 espèces supposées. Cette incertitude taxonomique pose problème pour étudier la physiologie et l'écologie de ce genre-clef, et rend difficile l'évaluation de son statut de conservation.

Pour tenter d'y remédier, des marqueurs moléculaires permettant de tester la délimitation morphologique des espèces de *Pocillopora* ont été recherchés dans les génomes mitochondrial et nucléaire. Les génomes mitochondriaux complets de deux individus présentant des morphologies contrastées ont été séquencés, ce qui a permis de détecter la présence d'un nouvel ORF (cadre ouvert de lecture) de fonction inconnue, d'une région de contrôle putative et peut-être d'une seconde origine de réplication. Cet ORF et la région de contrôle putative se sont révélés beaucoup plus variables que le reste du génome mitochondrial et j'ai donc pu les utiliser pour étudier la structure génétique de populations de coraux du genre *Pocillopora* échantillonnées en diverses localités de l'océan Pacifique (Okinawa, Philippines, Nouvelle Calédonie, Hawaii, Clipperton et Mexique).

Une méthodologie nouvelle pour le séquençage direct de mélanges d'haplotypes a par ailleurs été mise au point et appliquée au développement et à l'analyse de quatre marqueurs nucléaires : l'ITS2 et des introns des gènes de la calmoduline, du facteur d'élongation-1 α et de la sous-unité β de l'ATP synthétase. De façon inattendue, pour chaque marqueur nucléaire étudié plus de deux séquences différentes ont été détectées dans certains échantillons. Malgré leur variabilité plus importante, ces marqueurs nucléaires sont apparus moins informatifs que les marqueurs mitochondriaux car la plupart des groupes d'haplotypes nucléaires mis en évidence ne correspondent pas à des groupes d'individus.

L'ensemble des résultats suggère que le nombre d'espèces de *Pocillopora* est bien inférieur à ce que la variation morphologique laissait supposer, et remet en question l'hypothèse d'un centre de biodiversité du genre localisé dans le Pacifique Est.

Abstract

Corals of the genus *Pocillopora* (17 putative species) are notoriously difficult to identify down to species level due to spectacular, supposedly intraspecific variations in morphology. The lack of a reliable taxonomic framework hampers physiological and ecological studies of these tropical keystone organisms and makes it difficult to assess their conservation status.

In the present study, the complete mitochondrial genomes of two individuals of contrasting morphologies were sequenced, revealing the presence of a novel ORF of unknown function, a putative control region and possibly a second origin of replication. The ORF and the putative control region were found to be much more variable than the rest of the mitochondrial genome and were used to study the genetic structure of *Pocillopora* populations collected across the Pacific Ocean (Okinawa, Philippines, New Caledonia, Hawaii, Clipperton, Mexico).

A novel method was discovered allowing for direct sequencing of haplotype mixtures and applied to the development and analysis of four nuclear sequence markers: the ITS2 region and introns of the genes encoding calmodulin, elongation factor-1 α and the ATP synthase β subunit. Unexpectedly, for each nuclear marker more than two different sequences were detected in some individuals. In spite of their higher variability, nuclear markers were found to be less informative than mitochondrial ones as most groups of nuclear haplotypes did not correspond to groups of individuals.

Overall, these results suggest that the number of *Pocillopora* species may be far less than inferred from morphology and challenge the hypothesis of an eastern Pacific center of biodiversity for this genus.