



HAL
open science

Code-barres génétique des espèces de diatomées épilithiques équatoriennes susceptibles de servir de bioindicateurs de la qualité de l'eau

Isabel Ballesteros, Pablo Castillejo, Adriana Paulina Haro, Cuthy Cristina Montes, Carla Heinrich, Eduardo Alexis Lobo

► To cite this version:

Isabel Ballesteros, Pablo Castillejo, Adriana Paulina Haro, Cuthy Cristina Montes, Carla Heinrich, et al.. Code-barres génétique des espèces de diatomées épilithiques équatoriennes susceptibles de servir de bioindicateurs de la qualité de l'eau. 2020. <hal-02928916>

HAL Id: hal-02928916

<https://hal.science/hal-02928916v1>

Submitted on 3 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Code-barres génétique des espèces de diatomées épilithiques équatoriennes susceptibles de servir de bioindicateurs de la qualité de l'eau

Comptes Rendus Biologies 343 (2020) 41-52.

Isabel Ballesteros ; Pablo Castillejo ; Adriana Paulina Haro ; Cuthy Cristina Montes ; Carla Heinrich ; Eduardo Alexis Lobo

Résumé

L'identification des diatomées est une étape clé dans l'utilisation de ces microorganismes comme bioindicateurs de la qualité de l'eau. Le diagnostic morphologique est une tâche difficile en raison du nombre considérable d'espèces et de leur dimension microscopique. Il est possible de surmonter cette difficulté en utilisant des techniques moléculaires pour compléter le diagnostic. L'objectif principal de ce travail était d'obtenir le code-barre de l'ADN des diatomées épilithiques équatoriennes ayant une large distribution géographique, une niche écologique bien définie et des caractéristiques leur permettant d'être des espèces indicatrices fiables. Des cultures de diatomées unialgales ont été obtenues à partir d'échantillons environnementaux de cours d'eau des Andes équatoriennes. La caractérisation morphologique des cultures a été réalisée sous microscopie MEB. Pour la caractérisation moléculaire, les codes-barres 18SV4 et rbcL ont été séquencés à partir de chaque souche et comparés à la base de données GenBank. Pour chaque code-barres, un arbre phylogénétique a été construit à partir de la méthode ML comprenant des séquences de souches des espèces étudiées, provenant de différents lieux géographiques. Les résultats ayant montré que les cinq espèces suivantes étaient appropriées comme bioindicateurs, elles ont été isolées. *Sellaphora seminulum* (souche JA01b, c), *Nitzschia fonticola* (souche SP02a) et *N. palea* (souche CA01a) sont tolérantes à l'eutrophisation ; *Eolimna minima* (souche CH02a) est un bioindicateur d'eau mésotrophe, et *Achnanthydium minutissimum* (souche JA01a) est un bioindicateur d'eau oligotrophe. La comparaison avec la base de données GenBank des régions de code-barres a supporté leurs identifications morphologiques. Les séquences de code-barres des souches ont montré un pourcentage élevé d'identité génétique avec les séquences signalées dans les bases de données de l'INSDC pour la même espèce. La topologie des arbres phylogénétiques démontre que les diatomées épilithiques de l'Équateur sont étroitement liées à celles des mêmes espèces isolées d'autres régions géographiques. Cette étude est une première tentative d'établir une bibliothèque de référence morphologique et taxonomique moléculaire pour les diatomées néotropicales. Cette étude démontre qu'il serait possible d'utiliser les données de code-barres existantes pour les diatomées afin de développer des instruments moléculaires pour la bioévaluation des écosystèmes aquatiques dans la région andine équatorienne.

1. Introduction

Les diatomées sont un énorme groupe de microalgues contenant plus de 100 000 espèces vivantes [1 , 2]. Beaucoup de travail a été fait pour documenter la diversité et les relations au sein du groupe. En conséquence, la taxonomie au niveau des espèces est devenue adéquate pour soutenir l'utilisation extensive et réussie des diatomées dans la biosurveillance en fonction de leur réponse spécifique aux espèces à leurs changements environnementaux, en particulier la pollution organique et l'eutrophisation, avec un large spectre de tolérance, de conditions oligotrophes à des conditions eutrophes [3 , 4 , 5].

La taxonomie des diatomées est basée presque exclusivement sur les caractéristiques morphologiques des frustules de silice [6] et, même après une formation et une longue expérience, les diatomistes ont souvent du mal à s'entendre sur les identifications. De plus, le traitement morphologique est un processus long et coûteux. En revanche, l'identification basée sur l'ADN a été proposée comme une méthode alternative pour compléter ou même remplacer les méthodes traditionnelles d'identification des espèces [7]. Le code-barres ADN est basé sur des séquences d'ADN liées à des spécimens morphologiquement identifiés. Elle est

considérée comme une approche plus rapide et universellement applicable et a également le potentiel pour des analyses affinées [8 , 9]. Par conséquent, le code-barres ADN mérite un examen attentif comme moyen d'améliorer la fiabilité des identifications et de découvrir des espèces et également d'augmenter la qualité et la quantité d'autres informations taxonomiques. Des méthodes basées sur l'ADN sont utilisées pour évaluer la biodiversité dans des échantillons environnementaux, le soi-disant métabarcodage ADN [10], qui permet de déterminer la présence et l'abondance d'une espèce à partir d'échantillons en vrac de sol, d'eau ou d'air [11]. Plusieurs études ont démontré que le métabarcodage peut être un outil applicable pour la surveillance écologique basée sur les diatomées épilithiques [12 , 13 , 14 , 15 , 16]. Les marqueurs de code à barres préférés dans ces études étaient l'ARNr 18S et le rbcL (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygénase).

La base d'une identification fiable avec des méthodes moléculaires est une bibliothèque de référence complète où les données moléculaires et morphologiques sont liées avec un nom taxonomique. Cependant, la cohérence taxinomique des informations de séquence dans ces bases de données est très faible pour les diatomées [17]. Rimet et coll. [18] a développé la bibliothèque de codes-barres R-syst :: diatom en libre accès (<http://www.rsyst.inra.fr/>) qui comprend les codes-barres des souches de microalgues de la collection de cultures conservée à l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, France). Une autre limite aux approches d'identification basées sur l'ADN est la divergence intraspécifique naturelle du marqueur de code-barres dans les spécimens d'origines géographiques différentes. À ce jour, aucune information sur les séquences de codes à barres n'a été rapportée pour les espèces de diatomées de l'Équateur. Ceci constitue une contrainte à l'application de ces méthodes dans les études de diversité des eaux douces et en biosurveillance.

Dans ce contexte, cette recherche visait à obtenir les codes barres des diatomées épilithiques équatoriennes avec une large distribution géographique, une gamme écologique bien définie et des caractéristiques qui leur permettent d'être des espèces indicatrices fiables [19 , 20 , 21]. Cette étude est un humble premier pas vers le couplage des données morphologiques et moléculaires des diatomées benthiques en Equateur. Nous avons donc étudié la morphologie en tant que caractéristique diagnostique de chaque souche de diatomée unialgal par microscopie électronique optique et à balayage et avons également déterminé le code-barres ADN 18SV4 rRNA [9 , 22] ainsi que rbcL [23 , 24]] afin de jeter les bases d'une bibliothèque de référence. Les souches originales sont conservées en vie dans la collection de diatomées épilithiques de l'Universidad de las Américas. En publiant ces données en ligne, nous contribuons à une bibliothèque de référence taxonomique morphologique et moléculaire pour les diatomées néotropicales, les rendant disponibles pour des études comparatives. Nous prévoyons donc que ce sera une étape clé dans le développement d'un indice de qualité trophique de l'eau basé sur une analyse de biologie moléculaire des diatomées épilithiques en Équateur.

2. Matériels et méthodes

2.1. Collecte d'échantillons

Les échantillons ont été collectés dans le cadre de l'autorisation MAE-DNB-CM-2018-093 concédée par le ministère de l'Environnement de l'Équateur. Des échantillons de diatomées épilithiques ont été collectés dans quatre cours d'eau douce de la région andine de l'Équateur (Figure 1 ; Tableau 1). Trois d'entre eux sont caractérisés comme des paysages de páramo (région sauvage des hautes terres) au volcan Iliniza (SP), au volcan Chimborazo (CH) et au parc national de Cajas (CA). Le quatrième est situé au ruisseau Jambelí, dans la paroisse de Machachi, entouré de mosaïques d'élevage agricole (Tableau 1). Les données de localisation ont été prises avec un navigateur GPS (WGS 84 UTM Zone 17 avec 5 mètres de précision). Le plan d'échantillonnage visait à capturer les espèces indicatrices de cours d'eau vierges (SP, CH et CA) et d'un cours d'eau eutrophique (JA) de la région andine équatorienne (Figure 1).

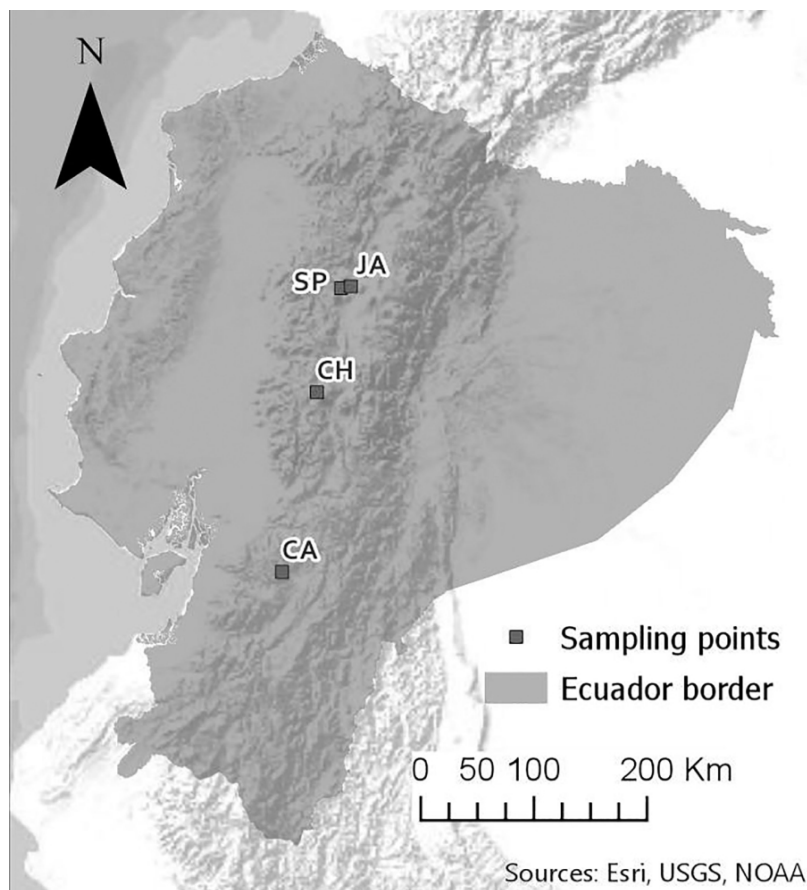


Figure 1. Localisation des sites d'échantillonnage le long des Andes équatoriennes. JA: Rivière Jambeli dans la province de Pichincha. SP: Rivière San Pedro à la réserve écologique d'Illiniza. CH: ruisseau à la réserve écologique du Chimborazo. CA: ruisseau au parc national de Cajas.

Tableau 1. Localisation des cours d'eau échantillonnés dans la région andine centrale de l'Équateur avec coordonnées géographiques, altitude (masl) et code attribué aux échantillons prélevés dans chaque cours d'eau

Code	Province	Description	Latitude	Longitude	Altitude
SP	Pichincha	Illiniza Ecological Reserve	-0.58661	-78.67343	3601 masl
JA	Pichincha	Quito	-0.57296	-78.59418	3162 masl
CH	Chimborazo	Chimborazo Ecological Reserve	-1.41337	-78.86458	3978 masl
CA	Azuay	Cajas National Park	-2.84271	-79.14182	3165 masl

Les variables physiques et chimiques analysées étaient la température de l'eau, le pH, la turbidité, l'oxygène dissous (OD) et la conductivité, mesurés sur le terrain avec un analyseur multiparamétrique, et le nitrate et le phosphate, mesurés en laboratoire. Des échantillons de diatomées ont été frottés sur la surface supérieure de trois à cinq pierres immergées, de 10 à 20 cm de diamètre, à l'aide d'une brosse à dents [25]. Les échantillons de diatomées et d'eau ont été conservés au froid jusqu'à ce qu'ils soient transférés au laboratoire.

2.2. Isolement et culture

Les échantillons environnementaux ont été cultivés sur des plaques de gélose BBM [26] supplémentées avec du silicate de sodium (10 mM) à 15–18°C, une intensité lumineuse de 50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ et un régime clair / sombre de 12/12 h. Des colonies macroscopiques individualisées sur des plaques de gélose ont été inoculées dans des milieux liquides et cultivées jusqu'à ce qu'elles deviennent brunes. Ce processus a été répété jusqu'à l'obtention de cultures unialgales. La réalisation des cultures unialgales a été vérifiée par microscopie optique à l'aide d'un microscope Olympus BX51. Les souches de diatomées ont été maintenues sur des plaques d'agar et du milieu liquide.

2.3. Analyse basée sur la morphologie

Une fraction de chaque culture unialgal a été utilisée pour l'analyse morphologique. Les cellules vivantes ainsi que les frustules nettoyées ont été examinées et photographiées par microscopie optique. Pour éliminer la matière organique, les cellules ont été oxydées avec de l'acide nitrique à 50% à 80°C pendant une heure et rincées plusieurs fois avec H₂O [27]. Lames permanentes ont été montées avec le montage indice de réfraction élevé moyen Naphrax[®]. Pour la numérisation au microscope électronique, quelques gouttes ont été séchées sur des talons et enduites par pulvérisation d'or à l'aide d'un Quorum Tech Q150RES. Les images MEB ont été prises à l'aide d'un microscope électronique à balayage à émission de champ analytique (FE) ultra-haute résolution Tescan MIRA3, fonctionnant à 10 kV.

L'identification des espèces a été réalisée à l'aide d'un microscope Olympus BX-40 selon les références taxonomiques suivantes [4 , 28 , 29 , 30].

Tableau 2. Identité de séquence du parent le plus proche de chaque souche isolée trouvée dans GenBank en utilisant BLASTn

Strain	18SV4	% identity	N hits	Closest match	rbcL	% identity	N hits	Closest match
CA01a	<i>Nitzschia palea</i>	99–100%	37	KU341755.1	<i>Nitzschia palea</i>	98–100%	104	HF675122
CH02a	<i>Eolimna minima</i>	95–100%	7	KM084877.1	<i>Eolimna minima</i>	95–97%	3	KM084939.1
JA01a	<i>Achnanthydium minutissimum</i>	93–100%	24	KY863464	<i>Achnanthydium minutissimum</i>	97–100%	15	KY863482.1
JA01b	<i>Sellaphora seminulum</i>	93–100%	6	KR150677.1	<i>Sellaphora seminulum</i>	95–100%	4	KM084937.1
JA01c	<i>Sellaphora seminulum</i>	93–100%	5	KR150677.1	<i>Sellaphora seminulum</i>	95–100%	4	KM084937.1
SP02a	<i>Nitzschia fonticola</i>	90–98%	3	AJ867022.1	<i>Nitzschia fonticola</i>	99–100%	4	HF675068.1

2.4. Analyse moléculaire

Une seconde fraction de chaque culture unialgal a été utilisée pour extraire l'ADN génomique total. Les cellules ont été mises en culot par centrifugation de 1 ml de milieu de culture à 8000 g pendant 2 min et dissociées en utilisant des billes de céramique par vortex. La méthode d'extraction a ensuite été réalisée selon Edwards et al. [31]. Les régions d'ARNr rbcL et 18SV4 ont été soumises à une amplification par PCR en utilisant GoTaq[®] Green Master Mix de Promega avec 0,2 µM de chaque amorce. La région V4 de l'ARNr 18S a été amplifiée avec la paire d'amorces DIV4for / DIV4rev3 [13 , 32]. Les amorces utilisées pour le fragment rbcL étaient Diat_rbcL_708F [33] et l'amorce inverse R3 [34]. Les paires d'amorces sélectionnées amplifient un fragment d'environ 300 pb et ont été utilisées précédemment pour l'analyse de métabarcodage d'ADN [12 , 14 , 24]. Le régime de PCR comprenait une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, puis 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 45 s, un recuit à 50°C pendant 45 s, un allongement à 72°C pendant 30 s et un allongement final à 72°C pendant 2 min. Les réactions de séquence ont été réalisées avec un analyseur génétique Applied Biosystems[®] 3130. Les séquences ont été éditées avec le logiciel MEGA 7 [35] et critiquées la base de données GenBank du NCBI (National Center for Biotechnology Information). Des séquences de souches des espèces étudiées provenant de différents emplacements géographiques ont été téléchargées à partir de GenBank (Tableaux supplémentaires S1 et S2) et alignées avec des séquences de codes-barres de souches équatoriennes en utilisant l'algorithme musculaire [36]. *Bolidomonas pacifica* a été utilisé comme taxon externe, en raison de sa proximité génétique avec les diatomées [37]. Les extrémités des alignements ont été coupées pour minimiser les caractères manquants. Les topologies d'arbre et les longueurs de branche ont été calculées séparément pour les deux marqueurs avec la méthode du maximum de vraisemblance (ML) en utilisant la distance Tamura-Nei [38] avec des taux distribués gamma entre les sites suivi d'un test statistique des topologies arborescentes avec 500 répliques bootstrap.

3. Résultats

Cinq espèces de bio-indicateurs appropriées ont été échantillonnées dans la région andine équatorienne (tableau 1): *Sellaphora seminulum* (Grunow) D. G. Mann (souche JA01b, c), *Nitzschia fonticola* (Grunow) Grunow (souche SP02a) et *N. palea* (Kützing) W. Smith (souche CA01a) sont tolérantes à l'eutrophisation; *Eolimna minima* (Grunow) Lange-Bertalot (souche CH02a) est un bioindicateur mésotrophe de l'eau et

Achnanthis minutissimum (Kützing) Czarnecki (souche JA01a) est un bioindicateur oligotrophique de l'eau. La comparaison avec la base de données GenBank des régions de codes-barres obtenues a soutenu l'identification morphologique. Les résultats de dynamitage contre NCBI sont présentés dans le tableau 2. *N. palea* a eu le plus de succès (37 séquences pour 18SV4; 104 pour rbcL) suivis de *A. minutissimum* (24 séquences pour 18SV4; 15 pour rbcL). Les numéros d'accès GenBank pour les séquences d'ARNr et de rbcL 18SV4 de cette étude sont respectivement MN589666-MN589670 et MN603956-MN603960.

La souche JA01b présente des valves linéaires avec des sommets arrondis. La zone axiale est étroite, linéaire. La zone centrale est large, rectangulaire. Le raphé est filiforme avec les fissures terminales incurvées du même côté de la valve avec des pores centraux distincts. Les stries sont rayonnées, multisériées et plus éloignées et courbées près de la zone centrale, avec 2 ou 3 stries plus courtes. Les aréoles sont arrondies. Dimensions de la vanne: Longueur: 9–12 μ m; Largeur: 3–3,5 μ m, 20–22 stries sur 10 μ m (Figure 2 i – l). Ce résultat est conforme à la description de *S. séminulum* [39]. La description morphologique de la souche JA01c correspond également à *S. séminulum* bien que sa longueur varie de 6 à 10 μ m et la largeur atteint jusqu'à 4,5 μ m (figure 2 m – p). Ainsi, la déformation JA01c présente une forme de valve elliptique tandis que JA01b a des valves linéaires. Malgré les différences morphologiques, les deux souches ont une identité de 100% pour les séquences 18SV4 et rbcL. Le nombre de séquences 18S et rbcL pour le séminulum de *Sellaphora* dans la base de données GenBank est rare. Il existe des souches du bassin genevois [32] de Séoul et de la Réunion [40] avec une homologie de 98% avec 18SV4 et rbcL. Evans et coll. [41] et Kermarrec et al. [24] ont décrit deux souches de *S. séminulum* du Royaume-Uni et de l'île de Mayotte dans l'archipel de Komora, avec une homologie inférieure à 95%. Il existe un troisième cas dans la GenBank pour une souche de Berlin qui présente 100% d'identité avec rbcL, mais moins de 95% avec 18SV4 [17].

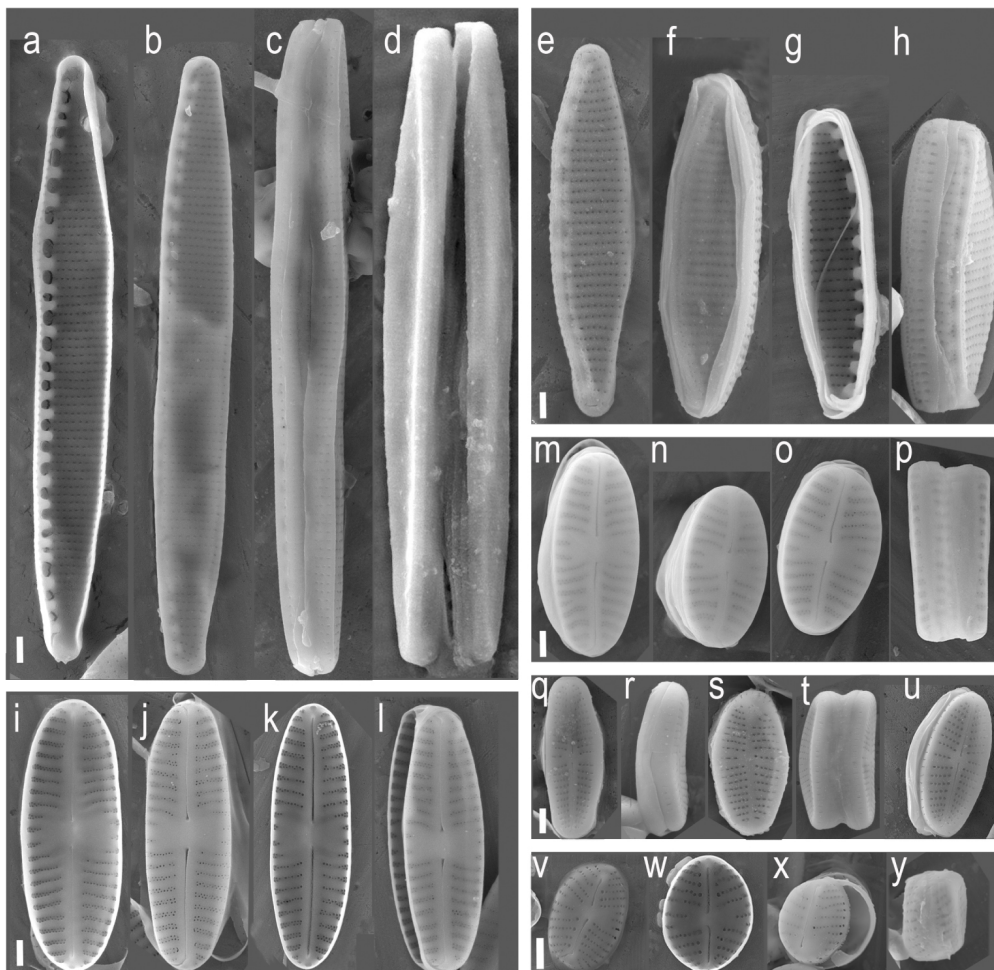


Figure 2. Diatomées isolées sous SEM: a – d: souche CA01a (*N. palea* (Kützing) W. Smith); e – h: souche SP02 (*Nitzschia fonticola* (Grunow) Grunow); a, i – l: souche JA01b (*Sellaphora Seminulum* (Grunow) D. G. Mann); m – p: JA01c (*Séminulum Sellaphora* (Grunow) D. G. Mann); q – t, u: JA01a (*Séminulum* de *Sellaphora* (Grunow) D. G. Mann); v – y: CH02a (*Eolimna minima* (Grunow) Lange-Bertalot). Barre d'échelle = 1 μ m .

Les traits morphologiques de la souche SP02 correspondent à l'espèce *Nitzschia fonticola* [42]: valves linéaires-lancéolées, apex fortement arrondis, excentrique, raphé marginal, stries unisériées sur la face

valvaire et bisériate dans le canal du raphé, fibules pratiquement équidistantes, sauf en la zone centrale qui présente deux fibules plus éloignées les unes des autres. Dimensions de la vanne: Longueur: 15–18 μm ; largeur: 2,5–3 μm ; 10–14 fibules sur 10 μm (Figure 2 e – h). Les séquences obtenues à partir de cette souche ont une identité plus élevée avec les séquences *rbcL* (99–100%) qu'avec les séquences 18SV4 (90–98%) téléchargées sur la GenBank. Il n'y a pas de souche décrite comme *N. fonticola* avec les deux codes-barres *rbcL* et 18SV4 signalés. Les séquences correspondant à *rbcL* appartiennent à des souches collectées au Royaume-Uni, en Espagne et à la Réunion [17 , 40] tandis que 18SV4 correspond à une seule séquence (de France, données non publiées) avec plus de 98% de similitude. Il existe deux autres séquences pour 18SV4 avec moins de 90% de similitude à partir de micro-organismes isolés de biofilms karstiques en Allemagne (données non publiées).

La souche CA01a, décrite comme *Nitzschia palea* [43], présente des valves linéaires-lancéolées, des apex rostraux, du raphé excentrique, des stries unisériées marginales très fines, des fibules équidistantes incluant la paire centrale. Dimensions de la vanne: Longueur: 25–27 μm ; largeur: 2,8–3 μm ; 16 fibules sur 10 μm (Figure 2 a – d). Il existe de nombreuses séquences pour *N. palea* [32 , 37 , 44] dans la GenBank de partout dans le monde, la plupart avec plus de 99% d'identité avec la souche CA01a pour les codes à barres *rbcL* et 18SV4.

La souche CH02a montre des valves elliptiques avec des apex arrondis. La zone axiale est étroite, linéaire. La zone centrale est peu étendue, légèrement rectangulaire, limitée par la taille irrégulière des stries médianes. Le raphé est filiforme, droit, avec des extrémités proximales légèrement fléchies. Les pores centraux sont petits. Les stries sont rayonnées, unisériées, de tailles irrégulières près de la zone centrale, composées d'aréoles arrondies (Figure 2 v – y). Dimensions de la vanne: Longueur: 6–10 μm ; Largeur: 3–4 μm ; 25–26 vergetures à 10 μm . Ceci est cohérent avec la description morphologique d' *E. Minima* [45]. La correspondance la plus proche avec les deux codes-barres appartient à l' *Eolimnagenes*, mais il n'est pas identifié au niveau de l'espèce [17]. Il existe d'autres souches rapportées avec une correspondance d'identité de 99% pour 18SV4 décrites comme *Eolimna*, *Sellaphora* et *Navicula minima* , qui sont des synonymes homotypiques. La séquence *rbcL* obtenue a montré une similitude de 96% avec une souche identifiée comme *E. minima* d'Allemagne [17].

Les traits morphologiques de JA01a sont cohérents avec *Achnantidium minutissimum* [46]. Il montre des valves linéaires-lancéolées, des extrémités arrondies et rostrées, une zone axiale étroite, linéaire, s'élargissant vers le centre, un raphé droit, des fissures terminales filiformes et courbes, des stries rayonnantes, plus largement espacées dans la zone centrale de la valve. Dimensions de la vanne: Longueur: 6–7 μm ; Largeur: 2–3 μm ; 30–32 stries sur 10 μm . (Figure 2 q – u). Les résultats d'explosion pour les deux codes-barres montrent une identité de 98 à 100% avec *A. minutissimum* d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Nord [9 , 32 , 37 , 40]. Il existe quelques souches du Japon et de l'île de la Réunion qui ont moins de 96% d'identité pour 18SV4 (données non publiées).

Les arbres phylogénétiques ont été construits sur la base des régions 18SV4 et *rbcL* séparément en raison du manque de souches avec les deux séquences de codes à barres déposées dans les bases de données INSDC. Les analyses phylogénétiques comprennent des séquences représentatives de chaque espèce provenant de différents emplacements géographiques rapportés précédemment. Dans la phylogénie, les deux séquences de codes à barres de la même espèce se sont regroupées en un seul clade (figures 3 et 4). Les clades au niveau de l'espèce sont bien supportés statistiquement. De courtes branches dans les clades d'espèces signifient une faible divergence entre les souches équatoriennes et leurs souches homologues. Dans l'arbre phylogénétique basé sur la région 18SV4 (figure 3), les séquences de *N. fonticola* sont dans le même clade que *E. minima* et *S. seminulum* mais séparé de *N. palea* . Cependant, les bifurcations représentant la relation entre les espèces ne sont pas bien supportées par les valeurs bootstrap. Néanmoins, dans la phylogénie de *rbcL* (figure 4), les séquences appartenant aux genres *Nitzschia* se sont regroupées. *E. minima* et *S. seminulum* sont regroupés dans le même clade dans les deux analyses phylogénétiques.

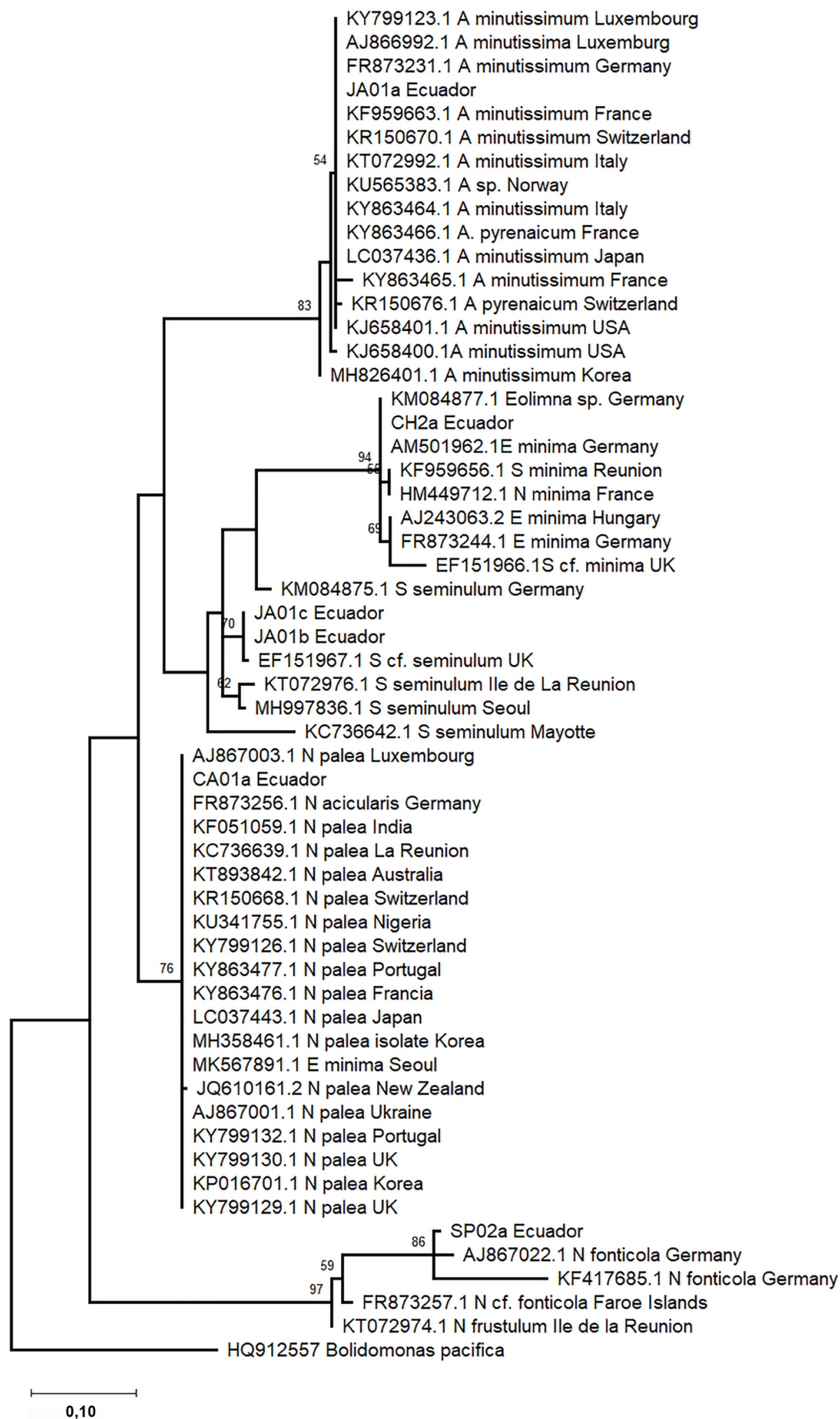


Figure 3. Phylogramme construit à l'aide de séquences d'ARNr 18SV4. Le phylogramme a été construit en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance avec le protocole Tamura-Nei. Les valeurs numériques aux nœuds des branches indiquent des valeurs de bootstrap supérieures à 50%. Le numéro d'accèsion et l'origine géographique sont indiqués pour chaque séquence (tableau supplémentaire S1).

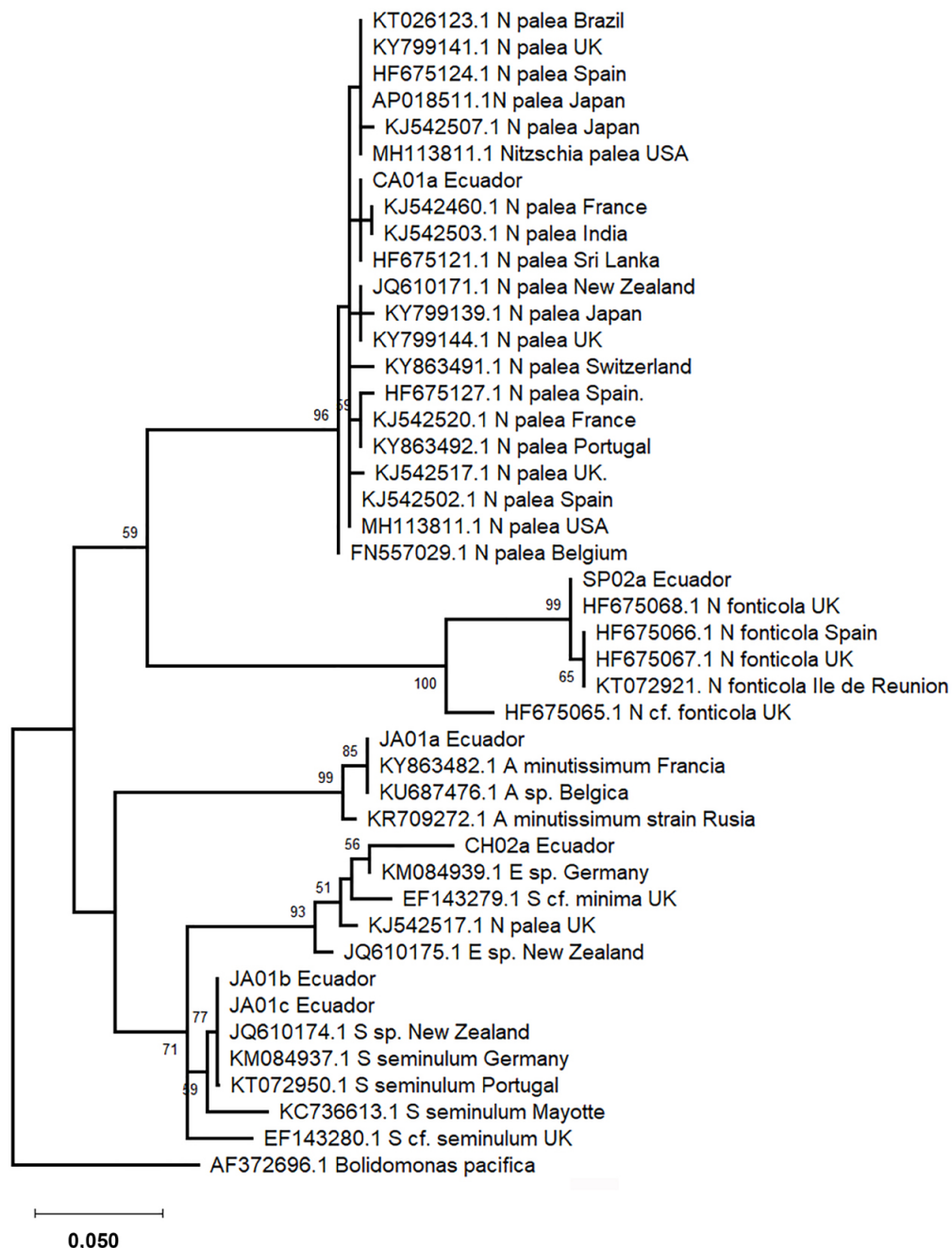


Figure 4. Phylogramme construit à l'aide de séquences *rbcL*. Le phylogramme a été construit en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance avec le protocole Tamura-Nei. Les valeurs numériques aux nœuds des branches indiquent des valeurs de bootstrap supérieures à 50%. Le numéro d'accèsion et l'origine géographique sont indiqués pour chaque séquence (tableau supplémentaire S2).

4. Discussion

À notre connaissance, cette étude est la première tentative d'établir une bibliothèque de référence de codes à barres pour les diatomées épilithiques des cours d'eau andins de l'Équateur. Cinq souches considérées comme des bio-indicateurs de la qualité de l'eau ont été cultivées et séquencées pour les codes-barres *rbcL* et 18SV4. *N. palea*, *N. fonticola* et *S. seminulum* sont tolérants à la pollution organique et à l'eutrophisation. *N. palea* se trouve régulièrement en aval des stations d'épuration des eaux usées [47]. *E. minima* est abondant dans les eaux mésotrophes. *A. Le seminulum* est une petite diatomée monoraphidé des rivières oligo / mésosaprobie [47]. Ces espèces sont très importantes d'un point de vue écologique, car elles font souvent partie des espèces benthiques les plus abondantes dans les systèmes d'eau douce. De plus, *N. palea*, *A. minutissimum* et *E. minima* ont été utilisés pour évaluer la sensibilité aux herbicides [37 , 48] et aux métaux [49].

L'occurrence et / ou l'abondance de diatomées épilithiques pour définir l'état écologique à travers des caractéristiques morphologiques présente certaines limites [7]. L'utilisation de séquences d'ADN pourrait

potentiellement atténuer ces limitations [50]. Les séquences de codes-barres des souches présentées ici ont un pourcentage élevé d'identité avec les séquences rapportées dans les bases de données INSDC pour la même espèce. Par conséquent, le code-barres ADN, basé sur 18SV4 et rbcL, apparaît comme un outil utile pour l'identification des espèces de diatomées dans les cours d'eau andins. Néanmoins, nous avons constaté qu'il existe des séquences signalées pour la même espèce avec une divergence d'au moins 5%. Cela pourrait être dû à une identification inexacte, car il y a de mauvaises circonscriptions et un manque d'informations fiables sur les minima des épithètes et « séminulum » même s'ils sont apparemment bien établis et souvent mentionnés dans la littérature écologique et taxonomique [51 , 52 , 53]. Par exemple, *E. minima* peut à peine être identifié en utilisant la microscopie optique (LM) et le manque d'illustrations d'un microscope électronique à balayage (MEB) est un obstacle majeur [7]. De plus, il existe des problèmes d'identification dérivés de l'isolement et de la culture, qui sont nécessaires pour obtenir des codes-barres, étant donné que certaines espèces subissent une réduction de la taille des cellules en culture [54]. Cela pourrait être le cas pour *S. Seminulumsouches*, JA01b et c, de tailles différentes mais identiques pour les séquences rbcL et 18SV4. Cela confirme la nécessité de bibliothèques de références de codes à barres qui couplent des données morphologiques et moléculaires pour des analyses comparatives [12 , 17].

L'utilité des codes-barres 18SV4 et rbcL pour évaluer les relations phylogénétiques dans les diatomées a été largement prouvée [6 , 17 , 18 , 55 , 56]. La topologie des arbres phylogénétiques démontre que les diatomées épilithiques de l'Équateur présentent une parenté étroite avec celles des mêmes espèces isolées d'autres régions géographiques. Cela pourrait signifier une faible variabilité phylogéographique des diatomées. Cependant, le clade *E. minima* présente les divergences les plus élevées, mais cela pourrait être dû à des problèmes d'identification liés à cette espèce. Les genres clades sont congruents avec l'analyse précédente où *Sellaphora* appartient à un groupe avec *Eolimna* [17] et ceux-ci sont séparés de *Nitzschia* et *Achnantidium* [18].

Cette recherche met en évidence les aspects complémentaires de la taxonomie classique et du code-barres ADN. Toutes les séquences de référence présentées ici sont liées à des images morphologiques détaillées afin d'initier une bibliothèque de référence complète de codes à barres pour les diatomées dans la région néotropicale. En outre, cette étude démontre qu'il serait possible d'utiliser les données de codes à barres existantes pour les diatomées pour développer des outils moléculaires pour la bio-évaluation des écosystèmes aquatiques dans la région andine équatorienne.

Remerciements

Cette étude a été financée par l'Universidad de Las Américas [numéro de subvention: BIO.IBR.19.05], Quito, Équateur. L'accès aux ressources de la collection a été accordé au moyen de l'Accord-cadre pour l'accès aux ressources génétiques: MAE-DNB-CM-2018-0093 célébré entre le ministère de l'Environnement de l'Équateur et l'Universidad de Las Américas, Équateur. Merci à Miguel Martínez-Fresneda Mestre pour son aide avec les cartes.

Données supplémentaires

Des informations complémentaires pour cet article sont disponibles sur le site Web de la revue sous <https://doi.org/10.5802/crbiol.2> ou auprès de l'auteur.

Bibliographie

1. D. G. Mann; J. Droop Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms, *Hydrobiologia*, Volume 336 (1996) no. 1–3, pp. 19-32
2. D. Mann; P. Vanormelingen An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species, *J. Eukaryot. Microbiol.*, Volume 60 (2013) no. 4, pp. 414-420
3. M. Kelly; L. King; B. Ní Chatháin The conceptual basis of ecological-status assessments using diatoms, *Biol. Environ. Proc. R. Irish Acad.*, Volume 109 (2009) no. 3, pp. 175-189
4. E. A. Lobo; C. G. Heinrich; M. Schuch; C. E. Wetzel; L. Ector Diatoms as bioindicators in rivers, *River Algae*, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 245-271
5. E. A. Lobo; M. Schuch; C. G. Heinrich; A. B. da Costa; A. Dupont; C. E. Wetzel; L. Ector Development of the Trophic Water Quality Index (TWQI) for subtropical temperate Brazilian lotic

- systems, *Environ. Monit. Assess.*, Volume 187 (2015) no. 6, 354 pages
6. B. Beszteri; E. Acs; J. Makk; G. Kovács; K. Márialigeti; K. T. Kiss Phylogeny of six naviculoid diatoms based on 18S rDNA sequences, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Volume 51 (2001) no. Pt 4, pp. 1581-1586
 7. D. Hering; A. Borja; J. I. Jones; D. Pont; P. Boets; A. Bouchez; K. Bruce; S. Drakare; B. Hänfling; M. Kahlert; F. Leese; K. Meissner; P. Mergen; Y. Reyjol; P. Segurado; A. Vogler; M. Kelly Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive, *Water Res.*, Volume 138 (2018), pp. 192-205
 8. P. D. N. Hebert; S. Ratnasingham; J. R. Dewaard Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Proc. Biol. Sci.*, Volume 270 (2003) no. Suppl 1, p. S96-S99
 9. J. Zimmermann; R. Jahn; B. Gemeinholzer Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols, *Org. Divers. Evol.*, Volume 11 (2011) no. 3, pp. 173-192
 10. F. Pompanon; E. Coissac; P. Taberlet Metabarcoding a new way to analyze biodiversity, *Biofutur*, Volume 319 (2011), pp. 30-32
 11. K. M. Ruppert; R. J. Kline; M. S. Rahman Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA, *Glob. Ecol. Conserv.*, Volume 17 (2019) (e00547)
 12. D. Mora; N. Abarca; S. Proft; J. H. Grau; N. Enke; J. Carmona; O. Skibbe; R. Jahn; J. Zimmermann Morphology and metabarcoding: a test with stream diatoms from Mexico highlights the complementarity of identification methods, *Freshw. Sci.*, Volume 38 (2019) no. 3, pp. 448-464
 13. L. Apothéloz-Perret-Gentil; A. Cordonier; F. Straub; P. Esling; J. Pawlowski Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring, *Mol. Ecol. Resour.*, Volume 17 (2017) no. 6, pp. 1231-1242
 14. V. Vasselon; F. Rimet; K. Tapolczai; A. Bouchez Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France), *Ecol. Indic.*, Volume 82 (2017), pp. 1-12
 15. J. Zimmermann; G. Glückner; R. Jahn; N. Enke; B. Gemeinholzer Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies, *Mol. Ecol. Resour.*, Volume 15 (2015) no. 3, pp. 526-542
 16. L. Kermarrec; A. Franc; F. Rimet; P. Chaumeil; J. M. Frigerio; J. F. Humbert; A. Bouchez A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms, *Freshw. Sci.*, Volume 33 (2014) no. 1, pp. 349-363
 17. J. Zimmermann; N. Abarca; N. Enke; O. Skibbe; W. H. Kusber; R. Jahn Taxonomic reference libraries for environmental barcoding: a best practice example from diatom research, *PLoS ONE*, Volume 9 (2014) no. 9 (e108793)
 18. F. Rimet; P. Chaumeil; F. Keck; L. Kermarrec; V. Vasselon; M. Kahlert; A. Franc; A. Bouchez R-Syst.: diatom: an open-access and curated barcode database for diatoms and freshwater monitoring, *Database* (2016), pp. 1-21 (baw016)
 19. V. Geissler Experimentelle Untersuchungen zur Variabilität der Schalenmerkmale bei einigen zentralen Süßwasser-Diatomeen, *Nova. Hedwig. Beih.*, Volume 73 (1982), pp. 211-246
 20. M. Schuch; M. Oliveira; E. A. Lobo Spatial response of epilithic diatom communities to downstream nutrient increases, *Water Environ. Res.*, Volume 87 (2015) no. 6, pp. 547-558
 21. P. Castejón; S. Chamorro; L. Paz; I. Carrillo; J. Salazar; J. C. Navarro; C. Heinrich; E. A. Lobo Response of epilithic diatom communities to environmental gradients along an Ecuadorian Andean River, *C. R. Biol.*, Volume 341 (2018) no. 4, pp. 256-263
 22. J. Pawlowski; F. Lejzerowicz; L. Apothéloz-Perret-Gentil; J. Visco; P. Esling Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: time for change, *Eur. J. Protistol.*, Volume 55 (2016), pp. 12-25
 23. M. L. MacGillivray; I. Kaczmarek Survey of the efficacy of a short fragment of the *rbcl* gene as a supplemental DNA barcode for diatoms, *J. Eukaryot. Microbiol.*, Volume 58 (2011) no. 6, pp. 529-536
 24. L. Kermarrec; A. Franc; F. Rimet; P. Chaumeil; J. F. Humbert; A. Bouchez Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms, *Mol. Ecol. Resour.*, Volume 13 (2013) no. 4, pp. 607-619
 25. H. Kobayashi; S. Mayama Most pollution-tolerant diatoms of severely polluted rivers in the vicinity of Tokyo, *J. Phycol.*, Volume 30 (1982), pp. 188-196
 26. R. A. Andersen; J. A. Berges; P. J. Harrison Recipes for freshwater and seawater media, *Algal Culturing Techniques* (R. A. Andersen, ed.), Elsevier Academic Press, London, 2005, pp. 429-538

27. M. G. Potapova; D. F. Charles Benthic diatoms in USA rivers: distributions along spatial and environmental gradients, *J. Biogeogr.*, Volume 29 (2002) no. 2, pp. 167-187
28. D. Metzelin; H. Lange-Bertalot Tropical Diatoms of South America II. Special remarks on biogeographic disjunction, *Iconogr. Diatomol.*, Volume 18 (2007), pp. 1-877
29. D. Metzelin; F. Las García-Rodríguez Las diatomeas Uruguayas, División de Relaciones y Actividades Culturales (DI.R.A.C), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 2003, pp. 1-207
30. U. Rumrich; H. Lange-Bertalot; M. Rumrich Diatomeen der Anden. Von Venezuela bis Patagonien (Feuerland), *Iconogr. Diatomol.*, Volume 9 (2000), pp. 1-649
31. K. Edwards; C. Johnstone; C. Thompson A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis, *Nucleic Acids Res.*, Volume 19 (1991) no. 6, 1349 pages
32. J. A. Visco; L. Apothéoz-Perret-Gentil; A. Cordonier; P. Esling; L. Pillet; J. Pawlowski Environmental monitoring: inferring the diatom index from next-generation sequencing data, *Environ. Sci. Technol.*, Volume 49 (2015) no. 13, pp. 7597-7605
33. K. R. Stoof-Leichsenring; L. S. Epp; M. H. Trauth; R. Tiedemann Hidden diversity in diatoms of Kenyan Lake Naivasha: a genetic approach detects temporal variation, *Mol. Ecol.*, Volume 21 (2012) no. 8, pp. 1918-1930
34. K. Bruder; L. K. Medlin Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in the naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*, *Nova. Hedwigia.*, Volume 85 (2007) no. 3-4, pp. 331-352
35. S. Kumar; G. Stecher; K. Tamura MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.*, Volume 33 (2016) no. 7, pp. 1870-1874
36. R. C. Edgar MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.*, Volume 32 (2004) no. 5, pp. 1792-1797
37. S. M. Esteves; F. Keck; S. F. P. Almeida; E. Figueira; A. Bouchez; F. Rimet Can we predict diatoms herbicide sensitivities with phylogeny? Influence of intraspecific and interspecific variability, *Ecotoxicology*, Volume 26 (2017) no. 8, pp. 1065-1077
38. K. Tamura; M. Nei Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, *Mol. Biol. Evol.*, Volume 10 (1993), pp. 512-526
39. S. Blanco; C. Cejudo-Figueiras; I. Álvarez-Blanco; E. Bécares; L. Hoffmann; L. Ector (Atlas de las Diatomeas de la cuenca del Duero, Diatom atlas of the Duero Basin. 2010)
40. F. Keck; F. Rimet; A. Franc; A. Bouchez Phylogenetic signal in Diatom ecology: perspectives for aquatic ecosystems biomonitoring, *Ecol. Appl.*, Volume 26 (2016) no. 3, pp. 861-872
41. K. M. Evans; A. H. Wortley; G. E. Simpson; V. A. Chepurnov; D. G. Mann A molecular systematic approach to explore diversity within the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta), *J. Phycol.*, Volume 44 (2008) no. 1, pp. 215-231
42. R. Trobajo; D. G. Mann; V. A. Chepurnov; E. Clavero Taxonomy, life cycle, and auxosporulation of *Nitzschia fonticola* (Bacillariophyta), *J. Phycol.*, Volume 42 (2006), pp. 1353-1372
43. E. Mora; D. Jiménez; J. Cantoral Epilithic diatoms in the Upper Laja River Basin, Guanajuato, Mexico, *Rev. Mex. Biodivers.*, Volume 86 (2015), pp. 1024-1040
44. F. Rimet.; R. Trobajo; D. G. Mann; L. Kermarrec; A. Franc; I. Domaizon; A. Bouchez When is sampling complete? The effects of geographical range and marker choice on perceived diversity in *Nitzschia palea* (Bacillariophyta), *Protist*, Volume 165 (2014) no. 3, pp. 245-259
45. G. Moser; H. Lange-Bertalot; D. Metzeltin Insel der Endemiten Geobotanisches Phänomen Neukaledonien (Island of endemics New Caledonia - a geobotanical phenomenon), *Bibl. Diatomol.*, Volume 38 (1998), 464 pages
46. M. Potapova; P. B. Hamilton Morphological and ecological variation within the *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex, *J. Phycol.*, Volume 43 (2007) no. 3, pp. 561-575
47. H. Van Dam; A. Mertens; J. Sinkeldam A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands, *Neth. J. Aquat. Ecol.*, Volume 28 (1994) no. 1, pp. 117-133
48. S. Moisset; S. Kim Tiam; A. Feurtet-Mazel; S. Morin; F. Delmas; N. Mazzella; P. Gonzalez Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, Volume 22 (2015) no. 6, pp. 4046-4055
49. S. Kim Tiam; A. Feurtet-Mazel; F. Delmas; N. Mazzella; S. Morin; G. Daffe; P. Gonzalez Development of q-PCR approaches to assess water quality: effects of cadmium on gene expression of the diatom *Eolimna minima*, *Water Res.*, Volume 46 (2012) no. 4, pp. 934-942
50. J. Pawlowski; M. Kelly-Quinn; F. Altermatt; L. Apothéoz-Perret-Gentil; P. Beja; A. Boggero; A. Borja; A. Bouchez; T. Cordier; I. Domaizon; M. J. Feio; A. F. Filipe; R. Fornaroli; W. Graf; J. Herder; B. van der Hoorn; J. I. Jones; M. Sagova-Mareckova; C. Moritz; J. Barquín; J. J. Piggott; M. Pinna; F.

- Rimet; B. Rinkevich; C. Sousa-Santos; V. Specchia; R. Trobajo; V. Vasselon; S. Vitecek; J. Zimmerman; A. Weigand; F. Leese; M. Kahlert Science of the Total Environment The future of biotic indices in the ecogenomic era : integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems, *Sci. Total Environ.*, Volume 638 (2018), pp. 1295-1310
51. E. A. Lobo; H. Kobayasi Shannon's diversity index applied to some freshwater diatom assemblages in the sakawa river system, *Jpn. J. Phycol.*, Volume 38 (1990), pp. 229-243
 52. P. Siver; P. B. Hamilton Diatoms of North America: the Freshwater Flora of Waterbodies on the Atlantic Coastal Plain, *Iconogr. Diatomol.*, Volume 22 (2011), pp. 1-916
 53. J. Zelezná-Wieczorek Diatom flora in springs of Lodz Hills (Central Poland), Biodiversity, Taxonomy, and Temporal Changes of Epipsammic Diatom Assemblages in Springs Affected by Human Impact (A. Witkowski, ed.) (Diatom Monographs), Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein, 2011, 419 pages
 54. J. S. Ki; S. Y. Cho; T. Katano; S. W. Jung; J. Lee; B. S. Park; S. H. Kang; M. S. Han Comprehensive comparisons of three pennate diatoms, *Diatoma tenuae*, *Fragilaria vaucheriae*, and *Navicula pelliculosa*, isolated from summer Arctic reservoirs (Svalbard 79° N), by fine-scale morphology and nuclear 18S ribosomal DNA, *Polar Biol.*, Volume 32 (2009) no. 2, pp. 147-159
 55. C. Santhosh Kumar; V. A. Prabu; C. P. Kumar DNA Barcode Genes (rbcL, 18s rRNA and ITS Phylogeny) in *Skeletonema costatum* Grevelli (Cleve, 1873), *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, Volume 4 (2015) no. 9, pp. 195-203
 56. L. Guo; Z. Sui; S. Zhang; Y. Ren; Y. Liu Comparison of potential diatom 'barcode' genes (The 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Volume 65 (2015) no. 4, pp. 1369-1380