

Pour les *Charetea fragilis*, ces relevés seront, si cela est possible, réalisés avec Jean Le Bail du Conservatoire national botanique de Brest (CBNB) dans le cadre du partenariat entre le CBNB et Cap Atlantique. Les Characées observés et prélevés dans les différentes communautés végétales étudiées feront l'objet d'une double détermination morphologique à la fois par Bretagne Vivante et par le CBNB qui possède l'autorisation de prélèvement d'espèce protégée comme *Tolypella salina*. Les critères morphologiques des différents échantillons prélevés seront mesurés pour chaque critère discriminant lorsque cela sera possible. Une partie des échantillons prélevés pour le genre *Tolypella* dans les bassins étudiés fera en parallèle l'objet d'une étude génétique (voir ci-après).

Il pourra être pertinent, en fonction des observations réalisées lors des relevés physico-chimiques, de réaliser un second relevé sur les végétations aquatiques. En effet chaque bassin est susceptible d'accueillir, la même année, plusieurs associations végétales qui se succèdent dans le temps. En cas d'assèchement, les groupements pionniers des vases exondées feront aussi l'objet d'un relevé. Chaque bassin fera donc l'objet d'un à 3 relevés phytosociologiques.

Les relevés phytosociologiques seront réalisés lors des relevés physicochimiques soit en avril, soit en mai en fonction de la période optimum d'expression des différents groupements végétaux. La période sera notamment choisie en fonction de la maturité des Characées de façon à pouvoir mesurer les critères discriminants sur les organes fructifères.

II- 5 – Méthode d'étude génétique du statut d'espèce de *Tolypella salina*

De façon à confirmer le statut taxonomique de *Tolypella salina* dans les salines de Guérande, les variants génétiques d'un nombre suffisant d'individus (≥ 20), identifiés morphologiquement (Bretagne Vivante et CBNB), seront étudiés sur les marqueurs appropriés:

- une sous-unité ribosomiale (LSU et/ou SSU), pour les replacer dans la phylogénie profonde des Charophyceae ;
- un marqueur de gène chloroplastique (Rubisco) pour replacer l'espèce *T. salina* dans la phylogénie des Tolypelles de Perez et al. (2014, 2017);
- un espaceur intergénique des sous-unités ribosomiales (ITS1 et/ou ITS2), pour identifier différentes espèces ou lignées s'il y a ;

Les analyses génétiques seront menées en collaboration avec le Muséum National d'Histoire Naturelle (Tony Robinet, Station marine de Concarneau). Il est prévu de collecter les tissus in

situ sur des spécimens vivants, au printemps 2019 (au moment de la fructification) sur les bassins étudiés.

Les séquençages seront effectués à Concarneau avant la fin de l'été 2019. L'ADN de 20 à 30 individus de *T. salina*, choisis sur critères morphologiques et populationnels, ainsi que de quelques *T. glomerata*, sera extrait (CTAB + chloroforme isoamylol), puis amplifié par PCR sur les marqueurs retenus, et séquencé sur séquenceur ABI 3130 (Sanger) et/ou MiSeq (Illumina) selon le cas. L'alignement des séquences obtenues devrait permettre:

- de confirmer par la génétique le niveau de la distinction taxonomique entre *T. salina* et *T. glomerata* (notamment la *var. littorea* (et éventuellement *T. nidifica*);
- de confirmer par la génétique que les différences morphologiques au sein des populations de *T. salina* de Loire-Atlantique sont bien des écotypes d'une même espèce ;
- de déposer pour la première fois les séquences de *T. salina* dans GenBank (sur le serveur international NCBI*).

* NCBI Le *National Center for Biotechnology Information* est un institut national américain pour l'information biologique moléculaire, donnant accès à la base de données génomiques "GenBank".

Exemple de séquence déposée (*T. glomerata* sur un gène chloroplastique) :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ395784.1>