



HAL
open science

La reproduction chez l'algue rouge *Gracilaria gracilis* : démographie, interactions biotiques et sélection sexuelle

Emma Lavaut

► To cite this version:

Emma Lavaut. La reproduction chez l'algue rouge *Gracilaria gracilis* : démographie, interactions biotiques et sélection sexuelle. Biologie de la reproduction. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS368 . tel-04365320

HAL Id: tel-04365320

<https://theses.hal.science/tel-04365320>

Submitted on 28 Dec 2023

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.



Thèse de doctorat de Sorbonne Université

Ecole doctorale 227 :

Sciences de la Nature et de l'Homme : Evolution et Ecologie

MNHN – Sorbonne Université

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

La reproduction chez l'algue rouge *Gracilaria gracilis* : démographie, interactions biotiques et sélection sexuelle

Présentée et soutenue publiquement par

Emma Lavaut

Le 27 juin 2023

MEMBRES DU JURY

Agnès MIGNOT	Professeure, Université de Montpellier	Rapporteuse
Stacy A. KRUEGER-HADFIELD	Associate Professor, Université d'Alabama	Rapporteuse
Mathilde DUFAÏ	Professeure, Université de Montpellier	Examinatrice
Xavier VEKEMANS	Directeur de recherche, EPP, Lille	Examinateur
Julien GASPARINI	Professeur, Sorbonne Université, Paris	Président du jury
Marie-Laure GUILLEMIN	Professeure, UACH, Valdivia	Co-directrice
Myriam VALERO	Directrice de recherche, CNRS, Roscoff	Directrice

Remerciements

Qu'est-ce qu'une thèse ? Une expérience, une aventure. Des échecs et des succès. Des larmes et des rires. Des choses qui se brisent et d'autres qui se créent. Un morceau de vie. Une thèse, ce n'est pas seulement apprendre à faire de la recherche. Ce n'est pas seulement apprendre à planifier, organiser, réaliser des expériences, travailler en équipe, savoir s'exprimer ou s'affirmer. C'est grandir, sur le plan professionnel, mais surtout personnel. C'est comprendre que l'on commence seulement à grandir et que cela ne s'arrêtera jamais. Une thèse est une transition, un morceau de vie dans lequel on se perd ou se trouve (ou même les deux). Et cette expérience ne se réalise pas seule. Je voudrais donc remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnée durant ces 4 dernières années, qui m'ont soutenue, qui m'ont aidée à grandir, parfois contre ma volonté, et toutes celles qui m'ont aidée sans le savoir, juste avec un sourire ou un conseil, au bon moment. Tout d'abord, je tiens à remercier les personnes qui m'ont encadrée, officiellement ou officieusement, durant cette thèse : Myriam, Marie-Laure et Christophe. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir choisie comme candidate pour cette thèse. Je me rappelle encore ma réaction lorsque Myriam m'a appelée pour me dire que j'étais retenue. Je n'arrivais pas à croire que j'avais réussi (enfin !) à accéder à ce que je souhaitais faire depuis toujours : une thèse, et j'ai pleuré, de joie et de soulagement. J'ai débarqué en Bretagne, pleine de motivation, d'énergie et d'excitation à l'idée de commencer ce nouveau projet. Je ne mentirai pas en disant que j'ai su garder ce niveau pendant 4 ans... Le Covid étant passé par là, j'ai vu mon sujet de thèse se réorienter (temporairement) vers une direction que... je ne trouvais pas très sexy et qui ne me parlait pas. Je remercie Myriam, qui a su insister, mais pas trop, pour réussir à m'ouvrir sur ces disciplines qui m'étaient inconnues. Malgré un (gros) blocage au début, je peux maintenant dire que je ne m'en sors pas trop mal en génétique des populations et en évolution (même si le chemin est encore long, car il faut bien le dire, la manière de penser des évolutionnistes n'est pas des plus intuitive pour moi !). Myriam, je tiens à te remercier pour ton soutien et ton accompagnement. Je suis heureuse que tu m'aies encadrée et qu'on ait réussi à finir cela ensemble. Tu m'as aidée à grandir et grâce à cela, je pense aujourd'hui réussir à m'affirmer beaucoup plus dans mes paroles, mes idées et mes choix. Christophe, je te remercie pour ton soutien et pour toutes les digressions phycologiques, étymologiques et historiques, autour de ma thèse ou en dehors. Je te remercie pour toutes les connaissances que tu m'as apportées sur les gracilaires et leur reproduction, mais aussi pour toutes les idées, intéressantes, mais qui auraient été très chronophages, sur diverses questions de la thèse (e.g. pourquoi ne pas mesurer la longueur de chaque filament de mucilage de chaque spermatie de chaque mâle ? À la main ...). Marie-Laure, je tiens à te remercier pour ton soutien, ainsi que pour toutes les discussions de réflexion sur les expériences, les questions ou les méthodes. Je tiens à vous remercier tous les trois pour la découverte du Chili, merci de m'avoir permis de m'y rendre malgré un Covid qui est venu tout bouleverser. Cette découverte était exceptionnelle, et je compte bien la poursuivre, rdv là-bas ! Enfin, Myriam et Christophe, je vous remercie de m'avoir fait découvrir cette population de gracilaire, au Cap Gris-Nez, car au-delà des découvertes des paysages (qu'est-ce que c'est beau les côtes anglaises !) et des découvertes culinaires (le welsh, surprenant, lourd, mais idéal après un terrain !), vous m'avez surtout confié la fin de l'histoire avec laquelle vous aviez débuté votre carrière. Et quelle histoire ! Merci de m'avoir fait confiance.

Je voudrais maintenant remercier les membres de mon jury de thèse, les rapportrices Agnès Mignot et Stacy Krueger-Hadfield, ainsi que les examinateurs Mathilde Dufay, Xavier Vekemans et Julien Gasparini. Merci pour votre gentillesse, votre intérêt et vos questions très intéressantes.

Je remercie également mon comité de suivi, Susana Coelho, Pierre-Henri Gouyon, Pablo Saenz-Agudelo, Mickael Le Gac et Frédéric Partensky, pour les discussions intéressantes sur mon projet de thèse.

J'aimerais remercier tout particulièrement Jérôme et Stéphane M. qui m'ont accompagnée, aiguillée, et beaucoup aidée dans la réalisation de toutes mes expériences et analyses. Merci Jérôme pour ton aide et ta patience, il en a fallu beaucoup pour s'occuper de toutes ces algues. Je remercie également le reste de l'équipe de l'IRL pour tous les conseils et l'aide apportés durant ma thèse, au laboratoire comme sur le terrain, ainsi que pour l'ambiance dans le laboratoire. Merci à Aurélien, Barbara, Denis, Emeline, Jean, Lauric, Louise, Lucie, Roman, Stéphane L., ainsi qu'aux stagiaires qui ont participé à mon projet : Antoine, Coline et Hugo. Un merci tout spécial à Antoine, mon coéquipier, sans qui la découverte des pollinisateurs de la mer aurait été plus longue et laborieuse, merci d'avoir partagé cette expérience avec moi.

Je remercie particulièrement Sébastien Colin, pour son expertise en microscopie et sa collaboration sur le projet des pollinisateurs de la mer... Mais aussi pour toutes ces heures à chercher les trichogynes (qui se cachent toujours) ! Merci pour ton aide et ta patience.

Je remercie également Mathilde Dufaÿ pour sa collaboration et pour m'avoir initiée à ce fabuleux sujet qu'est la sélection sexuelle !

Je remercie Susana Coelho pour m'avoir donné l'opportunité de participer (de loin) au projet de séquençage de génome des algues rouges et de recherche de marqueurs du sexe.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui m'ont aidée au travers de discussions, collaboration ou conseils. Merci à Gaétan, Sébastien H. et Dan au CRBM pour les conseils, l'aide et les bricoles de dernière minute sur mes cultures. Merci aux membres de l'équipe Dydiv, particulièrement Claire, Marion, Thierry et Thomas, pour les discussions, conseils de laboratoire, ou prêt de matériel. Merci à Sylvie Rousvoal pour ses conseils en qPCR. Merci à Gwenn et Erwan L. pour leur aide à la plateforme génomique. Merci à Dominique et Martin pour les analyses en cytométrie. Merci à Céline Houbin pour son aide dans l'identification des idiotées. Un énorme merci à Will pour la super photo qui nous a valu la couverture !

Je voudrais remercier les doctorants avec qui j'ai commencé cette aventure : Aurélien, Jérémy, Lisa, Louison, Roman et Yasmine. Je suis heureuse d'avoir partagé cette expérience avec vous, malgré les circonstances particulières, on a réussi à bien s'amuser, merci de m'avoir écoutée quand j'avais besoin de râler (C'est-à-dire tout le temps !) et de bien avoir voulu me suivre jusqu'au bout de la nuit ! ;) Je n'oublierai pas notre escapade à Concarneau et notre super bureau de l'AJC en temps de Covid ! Je remercie aussi toutes les autres personnes que j'ai croisées dans mon aventure : Aline, Sam, Charlotte, Sylvie, Iris, Sonia, Pélagie, Mathilde, Dounia, Guillaume, Valeria... Un merci spécial à toutes les girls, Dounia, Mathilde, Yasmine, Iris, Sonia, Louison, Sylvie, pour toutes nos discussions sur l'amour, les mecs et la vie ! Merci à Pélagie pour avoir partagé ce TP « Gossip » avec moi ! Merci à Aline d'être toujours là malgré un emploi du temps de jet-setteuse ! Je remercie Roman, mon partenaire de labo depuis le début (même si on n'a jamais partagé de paillasse !). Aurélien, je te remercie tout particulièrement, car tu as été le premier à m'accueillir à la station et tu es toujours disponible pour une discussion, sur les algues ou sur la vie !

Un merci infini à Marie ! On aurait pu se rencontrer à la station, mais c'est principalement en dehors qu'est née notre amitié. Je suis très heureuse d'avoir croisé ton chemin, merci pour ces

balades de dernière minute, les soirées entre filles, merci d'avoir été là pour moi dans les moments émotionnellement bancals.

Je m'étais perdue lorsque j'ai commencé cette aventure et j'ai réussi à retrouver une partie de moi durant cette thèse, grâce à la musique. Je voudrais remercier les personnes qui sans le savoir m'ont aidé à me reconnecter avec moi-même. Je remercie Louisa et sa troupe « Conscience et Arts du Spectacle », même si les stages ont été écourtés à cause du Covid, je n'oublierai jamais cette expérience, merci à Sébastien A., qui a su me « voix-r ». Je remercie aussi Yacine, même si je suis très loin d'être une virtuose, ces quelques cours de piano m'ont (r)éveillée, merci infiniment.

Je remercie ma famille sans qui tout ça n'aurait été possible. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu pour me permettre d'en arriver là où je suis aujourd'hui. Je remercie ma bonne étoile d'avoir toujours veillé sur moi et de m'avoir porté chance à chaque étape de mon parcours. Je remercie Taïga pour avoir été tellement reloue ces 2 dernières années, d'avoir toujours demandé à sortir au moment où je ne pouvais pas, de piquer systématiquement ma bouffe, de dormir sur mon pc quand je devais bosser... et d'avoir supporté mes câlinous quand j'en avais besoin.

Je remercie Amine, qui m'a supportée, et était toujours là pour décrocher et m'écouter parler pendant des heures ces 4 dernières années. Même si nous n'avons pas pu être ensemble au même endroit, je ne me sentais pas seule grâce à toi. Tu m'as empêché de sombrer dans la folie de nombreuses fois. Merci d'être toujours là. Je t'aime.

Enfin, je me remercie moi, pour m'être supportée, pour avoir toujours continué même lorsque cela semblait sans issue. Je remercie mon corps de m'avoir portée et mon cerveau de ne pas avoir disjoncté. Je me remercie, car je ne pensais pas pouvoir me faire confiance à ce point sur mes capacités de persévérance et de résilience. Alors merci, merci de résister.

Résumé

Les algues rouges ont un cycle de vie avec une alternance de phases haploïdes et diploïdes, comprenant trois types d'individus : les tétrasporophytes diploïdes et les gamétophytes mâles et femelles haploïdes. Les particularités de leur reproduction sont que: les gamètes mâles ne possèdent pas de flagelle, les gamètes femelles (carpogones) ne sont pas libérés et après fécondation le zygote se développe sur la femelle en une structure appelée cystocarpe. Sans flagelle, le transport des spermatis jusqu'aux gamètes femelles dépend des mouvements d'eau. Les objectifs de la thèse sont d'étudier les conséquences de ce cycle sur le fonctionnement démographique d'une population naturelle par un suivi exhaustif temporel des individus de l'algue rouge *Gracilaria gracilis*, ainsi que les stratégies évolutives mises en place pour favoriser la rencontre des gamètes.

Premièrement, la fréquence, la fertilité et la survie des individus ont été suivies dans le temps et valident les prédictions des modèles démographiques sur le maintien du cycle haploïde-diploïde et sur la dynamique de cette population, caractéristique d'une espèce pérenne. Les résultats confirment la forte survie des individus (la moitié sont encore présents 25 ans après les premiers relevés) et la faible croissance démographique de la population. Ce suivi a permis de mettre en évidence la présence de "variants du cycle": soit haploïdes portant des organes mâles et femelles, soit diploïdes portant tétraspores et des organes mâles et/ou femelles ou encore des tétrasporophytes portant des gamétophytes en épiphytes. Les conséquences évolutives de ces variations (présentes à une fréquence de 5%) sur le maintien du cycle de vie haplo-diplophasique sont discutées et constituent des perspectives de recherche intéressantes. Ce suivi a aussi révélé la présence en très forte fréquence d'isopodes (*Idotea balthica*) mimétiques et agrippés aux frondes de la gracilaire. Cet animal a donc été sélectionné comme modèle susceptible de transporter les gamètes mâles de l'algue jusqu'aux femelles.

Deuxièmement, une approche expérimentale et des observations en microscopie confocale ont permis de mettre en évidence une fécondation assistée par *I. balthica* chez *G. gracilis*. Ce résultat montre, pour la première fois, l'implication d'interactions biotiques dans la dispersion des gamètes d'une algue rouge (similaires à la pollinisation chez les plantes), alors que le dogme était que les fécondations se faisaient uniquement grâce aux mouvements d'eau. Cela interroge sur l'origine de la pollinisation qui pourrait être beaucoup plus ancienne que la radiation des angiospermes. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives de recherche sur la généralisation de cette fécondation assistée par les animaux chez les algues rouges et l'étude des éventuels mutualismes.

Finalement, parmi les mécanismes évolutifs intervenant dans la reproduction, la sélection sexuelle a été largement étudiée chez les animaux, plus rarement chez les plantes et encore moins chez les algues. Pour tester son importance chez la gracilaire, le succès reproducteur et le nombre de partenaires des mâles et femelles ont été estimés grâce à des analyses de paternité effectuées dans la population naturelle. Les résultats ont montré que l'opportunité pour la sélection sexuelle est présente chez *G. gracilis*, espèce où le dimorphisme sexuel est pourtant absent. Chez les plantes, la pollinisation animale a joué un rôle sur leur coévolution avec les insectes et il est supposé que les traits impliqués dans l'attrait des pollinisateurs soient plus susceptibles d'être sous sélection sexuelle. Une autre perspective de la thèse est d'approfondir ce lien entre le rôle des animaux et les traits sous sélection sexuelle chez *G. gracilis*, tels que la phénologie de la reproduction ou la production de mucilage accompagnant la libération des gamètes.

Abstract

Red algae have a sexual life cycle, involving three types of individuals: diploid tetrasporophytes and haploid male and female gametophytes. The particularities of their reproduction are that: i) the male gametes lack a flagellum, ii) the female gametes (carpogons) are not released and iii) after fertilization the zygote develops on the female into a complex structure called a cystocarp. In the absence of a flagellum the transport of spermatia to the female gametes is largely dependent on water movement. This thesis aims to study the consequences of this reproductive cycle on the demographic functioning of a natural population using an exhaustive spatial and temporal survey in the red alga *Gracilaria gracilis*, as well as the evolutionary strategies implemented to enhance the gametes encounter using experimental approaches.

First, the frequency, fertility and survival of the three types of individuals monitored over time validate the predictions of the demographic models on the maintenance of the haploid-diploid cycle and on the dynamics of this population, typical of a perennial species with a generation time of several decades. Results confirm the high survival of individuals (more than half of the individuals are still present 25 years after the first surveys) and the low demographic growth of the population. This demographic and phenological survey also allowed to highlight the presence of individuals named "life cycle variants": either haploids carrying both male and female organs, or diploids carrying tetraspores and/or male and female organs or tetrasporophytes presenting epiphytic male and female gametophytes. The evolutionary consequences that these variations (observed at a frequency of 5%) could have on the maintenance of the haplo-diplophasic life cycle are discussed and constitute interesting research perspectives. Finally, this survey of a natural population revealed the presence in high frequency of an isopod (*Idotea balthica*) that mimics the fronds of the gracilaria. This animal was thus selected as a candidate model to test the transport of the male gametes to the female thallus.

Secondly, an experimental approach combined with confocal microscopy observations allowed to demonstrate the existence of *I. balthica*-mediated fertilization in *G. gracilis*. This result shows, for the first time, the involvement of biotic interactions in the dispersal of gametes of a red alga (similar to pollination in plants), a group of species for which the classical dogma was that fertilizations were only due to water movements. Moreover, this result raises questions about the origin of pollination, which could be much older than the radiation of angiosperms. This work opens new avenues for future studies to verify the widespread occurrence of this animal-mediated fertilization in red algae and to further investigate the algae-animal relationship.

Finally, among the evolutionary mechanisms that influence reproduction, sexual selection has been widely studied in animals but only rarely in plants and even less in algae. To test its importance in gracilaria, the reproductive success and number of mates of male and female individuals were estimated through paternity analyses carried out in the natural population. Results showed that the opportunity for sexual selection is present in *G. gracilis*, a species where sexual dimorphism is absent. In plants, animal pollination has played a role in the coevolution of plants and insects and it is hypothesized that traits involved in pollinator attractiveness are more likely to be under sexual selection. Another new investigation opened by this thesis is to further explore this link between the role of animals and traits under sexual selection in *Gracilaria gracilis*, such as reproductive phenology or mucilage production during gamete release.

TABLE DES MATIERES

Chapitre 1. Introduction générale	16
1.1 Qu'est-ce que le sexe ?	18
1.1.1 L'origine du sexe	18
1.1.2 Le paradoxe du sexe	19
1.1.3 Origine des sexes : évolution de l'anisogamie	23
1.1.3.1 Les types sexuels	23
1.1.3.2 Evolution de l'anisogamie	23
1.1.3.3 Conséquence de l'anisogamie : La sélection sexuelle	25
1.1.4 Le déterminisme du sexe	26
1.2 Évolution des cycles de reproduction et rencontre des gamètes chez les plantes et les algues (lignée verte et Phaeophyceae).	28
1.2.1 Une grande diversité des cycles de reproduction.	28
1.2.2 Variation intraspécifique des cycles de reproduction chez les algues rouges	29
1.2.3 La rencontre des gamètes	30
1.2.3.1 En milieu terrestre : rôle des pollinisateurs	30
1.2.3.2 Dans le milieu aquatique	31
1.2.3.3 Chez les algues rouges	31
1.3 Objectifs et plan de thèse	33
Chapitre 2. Matériel et méthodes	34
2.1 Présentation du modèle biologique: <i>Gracilaria gracilis</i>	36
2.1 Cycle de reproduction	36
2.2 Sites d'étude	38
2.3 Echantillonnage et mesures in situ	39
2.4 Génotypages et analyses de paternités	40
Chapitre 3. Suivis à long terme de la population du Cap Gris Nez : analyse démographique et importance du polymorphisme pour le cycle de reproduction	42
3.1 Introduction	44
3.2 Matériel et méthodes	51
3.2.1 Concordance entre années: identification d'un individu d'après sa position et son génotype multilocus.	51
3.2.2 Estimation des effectifs théoriques à partir du modèle matriciel	51
3.2.3 Paramètres démographiques	52
3.2.4 Calcul des taux vitaux	52

3.1.1	Sexe et ploïdie-ratio _____	52
3.2.5	Fréquence et caractérisation génétique des phénotypes variants du cycle de reproduction. ____	53
3.3	Résultats _____	54
3.3.1	Variation des effectifs de la population entre années _____	54
3.3.2	Estimation des effectifs théoriques à partir du modèle matriciel _____	55
3.3.3	Variation des paramètres démographiques _____	55
3.3.4	Taux vitaux : croissance, survie, recrutement _____	58
3.3.5	Sexe- et ploïdie- ratios _____	60
3.3.6	Fréquence et caractérisation génétique des phénotypes variants du cycle de reproduction. ____	60
3.4	Discussion _____	64
Chapitre 4. Rôle des interactions biotiques dans la reproduction de <i>G. gracilis</i> _____		68
4.1	Introduction _____	70
4.2	Pollinators of the sea : A discovery of animal-mediated fertilization in seaweed. ____	74
4.3	Mutualisme entre <i>Idotea baltica</i> et les <i>Gracilaria gracilis</i> _____	90
4.3.1	Matériels et méthodes _____	91
4.3.1.1	Présentation de l'espèce <i>Idotea balthica</i> _____	91
4.3.1.2	Dénombrement et mesure des idotées _____	91
4.3.1.3	Expérience sur la libération des spermaties _____	92
4.3.2	Résultats _____	93
4.3.2.1	Fréquences des idotées en populations naturelles _____	93
4.3.2.2	Influence des idotées sur la libération des spermaties _____	94
4.4	Discussion _____	96
Chapitre 5. Etude de la sélection sexuelle chez <i>G. gracilis</i> et des traits mâles potentiellement soumis à cette sélection. _____		102
5.1	Introduction _____	104
5.2	Sexual selection in seaweed? Testing Batemans principles in the red alga <i>Gracilaria gracilis</i> _____	108
5.3	Etude des traits mâles candidats à la sélection sexuelle et de la variation du succès de fécondation des mâles _____	125
5.3.1	Matériel et méthode _____	126
5.3.1.1	Analyse de paternité _____	126
5.3.1.1.1	En population naturelle _____	126
5.3.1.1.2	En croisements contrôlés _____	126
5.3.1.2	Estimateurs des succès de fécondation et reproducteur _____	127
5.3.1.3	Traits mâles étudiés _____	129

5.3.1.3.1	Distance aux partenaires	129
5.1.1.1.1	Phénologie de la reproduction des mâles	129
5.3.1.3.2	Biomasse	129
5.3.1.4	Analyses statistiques	130
5.3.2	Résultats	131
5.3.2.1	Analyses de paternités	131
5.3.2.1.1	Gris-Nez Haut juin 2020	131
5.3.2.1.2	Gris-Nez Haut août 2020	132
5.3.2.1.3	Gris-Nez Haut 1995 et 1997	132
5.3.2.1.4	Croisements en laboratoire	133
5.3.2.2	Traits mâles candidats à la sélection sexuelle	135
5.3.2.2.1	La biomasse	135
5.3.2.2.2	La phénologie de la reproduction	136
5.3.2.2.3	Interaction avec les idotées	139
5.3.2.3	Variation du succès de fécondation	141
5.3.2.3.1	Stabilité temporelle	141
5.3.2.3.2	Variabilité entre conditions naturelles et contrôlées	143
5.4	Discussion	146
Chapitre 6.	Conclusion générale et perspectives	153
Références		1611
Annexes		187

Chapitre 1

Introduction générale

1.1 Qu'est-ce que le sexe ?

Le sexe est défini par Roze (2011) comme la recombinaison de deux génomes parentaux dans le génome d'un nouvel individu. Cette définition peut s'appliquer aussi bien à la recombinaison génétique chez les procaryotes qu'à la reproduction sexuée des eucaryotes caractérisée par l'alternance de la syngamie (i.e. la fusion de deux cellules haploïdes pour former un zygote diploïde) et de la méiose (i.e. qui permet le retour à l'état haploïde).

1.1.1 L'origine du sexe

Tout d'abord, il apparaît important de préciser que sexe et reproduction ne sont pas nécessairement liés. Chez les bactéries, les mécanismes tels que la conjugaison, la transformation et la transduction, décrits et étudiés depuis longtemps (voir pour revue Thomas et Nielsen, 2005), sont des processus de transfert de matériels génétiques entre individus qui permettent de générer de nouvelles combinaisons génétiques. De ce point de vue, les bactéries font donc du sexe (Narra et Oschman, 2006), pourtant leur reproduction par bipartition est asexuée.

La découverte d'un cycle sexué pour la première fois chez un unicellulaire décrit jusque-là comme asexué, a permis de soulever la complexité de caractériser l'occurrence de la reproduction sexuée chez les espèces sur la simple base des observations de fusion des gamètes (Levin et King, 2013 ; Umen et Heitman, 2013). La caractérisation de gènes impliqués dans la méiose permettant de détecter la présence de reproduction sexuée, grâce à des outils moléculaires, a alors suscité un réel engouement (Wong et Johnson, 2010 ; Ning et al., 2013 ; Liu et al., 2015). Une analyse phylogénétique en découlant, a montré que ces gènes ont été retrouvés dans tous les groupes majeurs eucaryotes, suggérant que le plus ancien ancêtre des eucaryotes « LECA » (Last Eucaryotic Common Ancestor) était capable de réaliser des méioses, et par extension la reproduction sexuée (Speijer et al., 2015 ; Speijer, 2016). Le sexe méiotique chez les eucaryotes aurait donc une seule origine évolutive.

Les deux processus, méiose et transformation bactérienne, impliquent l'appariement et la recombinaison de tout, ou partie, de chromosomes homologues provenant de 2 organismes différents (Bernstein et al., 2011 ; Bernstein et Berstein, 2013). Chez les bactéries, il a été prouvé que la transformation était utilisée comme un mécanisme de réparation de l'ADN face au stress oxydatif (Michod et al., 2008). Comme la méiose est induite par des stress oxydatifs similaires à ceux induisant la transformation bactérienne (Berstein et Berstein, 2010), cela

suggère une continuité dans la transition évolutive du sexe procaryote au sexe eucaryote. La méiose aurait donc probablement évolué de la transformation bactérienne en tant qu'adaptation à la réparation de l'ADN.

Chez les archées, de même que chez les bactéries, on pratique également le sexe, au sens large, puisque les mécanismes de transfert d'ADN et de recombinaison génétique sont bien connus (Rosenshine et al., 1989 ; Cohan et Aracena, 2012). Cependant, la récente découverte d'un gène homologue à ceux impliqués dans le processus de fusion des gamètes chez les eucaryotes, posent de nouvelles questions sur l'origine du sexe méiotique (Moi et al., 2022).

1.1.2 Le paradoxe du sexe

Les mécanismes de méiose et de recombinaison seraient donc nés d'une nécessité de réparation de l'ADN, notamment face au stress oxydatif (Berstein et Berstein, 2010 ; Bernstein et al., 2011). Ceci peut expliquer l'origine de la reproduction mais ne justifie pas sa persistance dans de nombreuses lignées eucaryotes. Le sexe implique de nombreux coûts pour les organismes qui le pratiquent (voir Encadré 1.1) mais est paradoxalement très répandu dans l'arbre du vivant. C'est pourquoi l'origine et le maintien du sexe a été – et est toujours – l'un des sujets les plus étudiés et débattus en biologie évolutive (voir pour revues: Michod et Levin, 1988; Gouyon et al., 1988; Barton et Charlesworth, 1998; Otto 2009; Roze 2011; Neiman et al., 2017). De nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer ce paradoxe évolutif, car bien que la reproduction sexuée présente des avantages sur le long terme, à l'échelle individuelle, elle semble désavantageuse par rapport à la reproduction asexuée (voir Encadré 1). Alors comment la reproduction sexuée a-t-elle pu se maintenir ?

L'une des plus anciennes hypothèses pour expliquer le maintien du sexe chez les eucaryotes a été avancée par Darwin en 1859 et par Weissman en 1889 et repris au début du 20^{ème} siècle par Morgan (1913), Muller (1932) et Fisher (1930). Selon cette hypothèse, le sexe est bénéfique parce qu'il génère de la variabilité génétique au sein des descendants, permettant une adaptation plus rapide face aux changements de l'environnement en combinant différentes mutations bénéfiques dans le même génome. Cependant, cette hypothèse a été remise en question par Maynard Smith (1971) et Williams (1973), qui soulève que, pour qu'il se maintienne, le sexe devrait créer à la génération suivante plus de combinaisons bénéfiques d'allèles qu'il n'en détruit. Car si la reproduction sexuée peut créer des combinaisons avantageuses, elle peut également créer des combinaisons d'allèles délétères, qui peuvent s'accumuler dans le génome. Et même si le sexe est bénéfique à long-terme, puisqu'il permet l'augmentation en fréquence

des individus avec des combinaisons d'allèles avantageuses, à court terme, il apparaît désavantageux car la valeur sélective (fitness) des individus avec des « bonnes » combinaisons n'est pas suffisante pour compenser celle des individus avec des « mauvaises » combinaisons. Les arguments de Morgan (1913), Muller (1932) et Fisher (1930) sur les bénéfices du sexe paraissent donc insuffisants à Maynard Smith (1971) et Williams (1973) pour contrebalancer les désavantages du sexe à court terme (coût de la recombinaison, Encadré 1.1). Face à ce paradoxe, de nombreux auteurs (dont Hamilton, 1980 ; Lenormand et Otto, 2000) démontrent que lorsque l'environnement est changeant (dans le temps ou dans l'espace), la variation génétique induite par le sexe peut augmenter l'efficacité de la sélection naturelle, et donc favoriser le sexe à court terme.

L'un des coûts majeurs dérivé de l'anisogamie est le « coût de deux du sexe » (Maynard Smith, 1978), ou « coût des mâles » (**Encadré 1.1**). Chez les organismes anisogames, les femelles apportent l'essentiel de leurs ressources au développement du zygote, alors que les mâles ne font qu'apporter la moitié du patrimoine génétique. Si le sexe-ratio est équilibré, seulement la moitié de leurs descendants seront des femelles qui pourront à leur tour produire de nouveaux descendants. À nombre de générations équivalentes, les femelles asexuées produiraient donc deux fois plus de descendants puisque tous leurs descendants (uniquement des femelles) pourraient à leur tour produire des descendants (**Figure 1.1**). De plus, ce coût est associé à celui de la « dilution du génome ». La femelle dilue ses gènes avec ceux provenant du mâle, et notamment ceux en relation avec le cytoplasme et les réserves qu'elle aura synthétisées, et seulement la moitié de sa progéniture (avec un sexe-ratio 1 :1) pourra à son tour le transmettre à la génération suivante (Lewis, 1987).

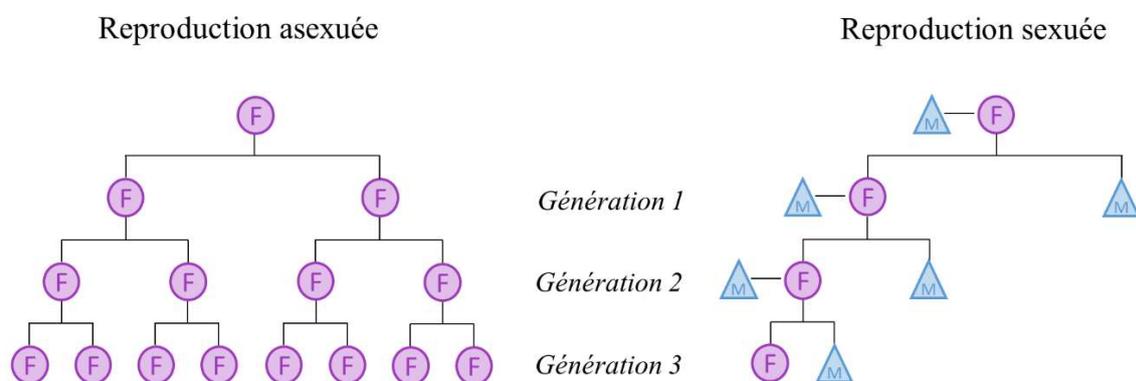


Figure 1.1. Le coût de la production des mâles : désavantage de la reproduction sexuée par rapport à la reproduction asexuée. Les femelles sont indiquées par un F dans un rond rose et mâles par un M dans un triangle bleu.

Une autre explication, de l'origine et du maintien de la reproduction sexuée, a été proposée face à ce coût de produire des mâles et au coût de la recombinaison par Gouyon et al. (1988). Cette hypothèse implique des forces agissant à la fois à long et à court terme. Les forces qui agissent sur l'extinction ou la survie des espèces à long terme dépendent des forces qui déterminent la survie ou l'extinction à court terme. En d'autres termes, les lignées qui contiennent des espèces sexuées qui montrent un avantage à court terme se maintiennent par la sélection entre lignées car elles bénéficient également d'un avantage à long terme par rapport aux lignées qui contiennent des espèces asexuées. La conséquence est que les lignées qui se maintiennent à long terme sont celles qui ne peuvent plus se permettre de perdre le sexe (elles ont un faible taux de transition vers l'asexualité, **Figure 1.2**, Vienne et al., 2013). Le coût de la perte du sexe serait trop désavantageux, contrebalançant les éventuels coûts à court terme.

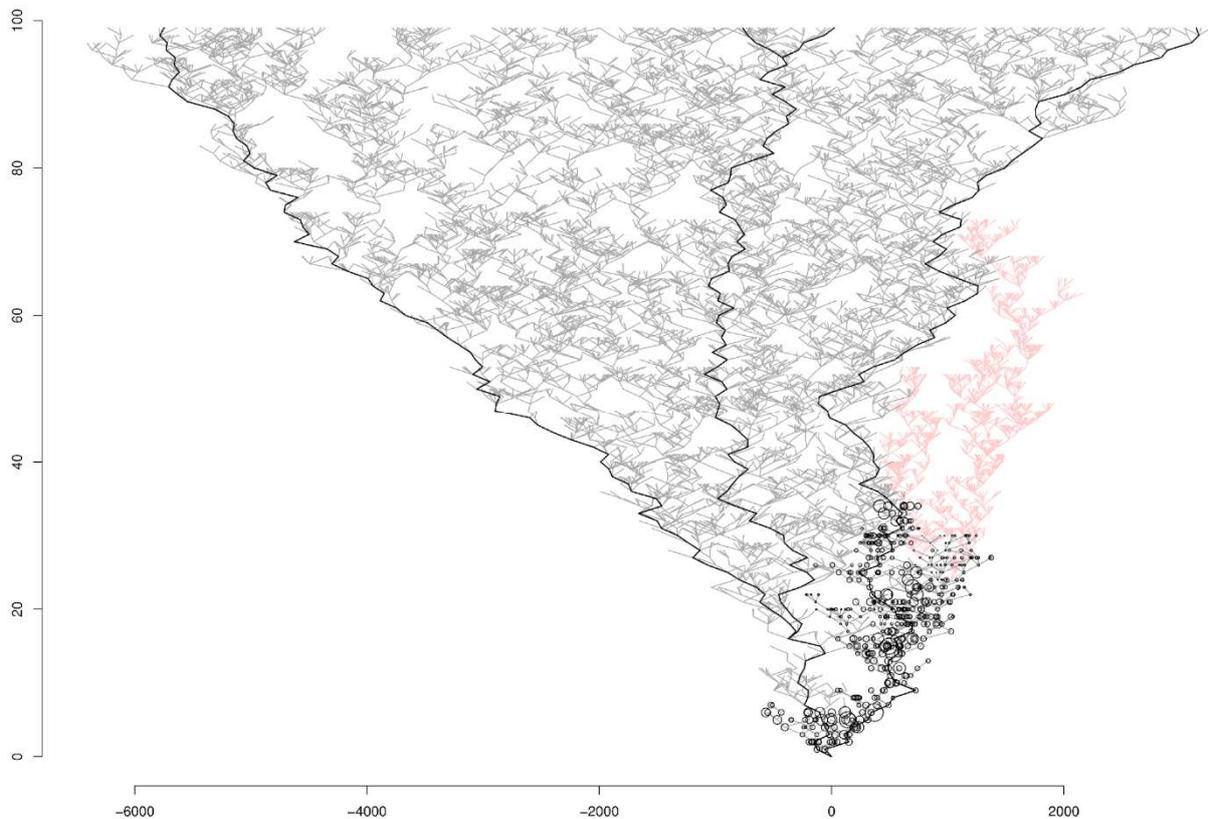


Figure 1.2. Illustration montrant que la sélection entre lignées favorise les lignées sexuées D'après de Vienne et al. (2013). Les cercles représentent la probabilité de transition de la sexualité à l'asexualité. Les lignes noires et grises représentent les formes sexuées, et les lignes rouges les formes asexuées. Les lignées sans cercle ne peuvent plus perdre leur aptitude à faire du sexe. Après 100 générations, les simulations montrent que les lignées présentes sont toutes sexuées et ont perdu la capacité de devenir asexuées ; toutes les lignées asexuées se sont éteintes.

Encadré 1.1 : Les coûts du Sexe (D'après Roze, 2012)

De nombreux coûts importants sont associés à la reproduction sexuée, en particulier :

- Le coût des mâles (ou "double coût du sexe") : dans de nombreuses espèces, les mâles ne fournissent aucune ressource à la génération suivante, mais les femelles sexuelles investissent généralement la moitié de leurs ressources dans la production de mâles. Toutes choses étant égales par ailleurs, les femelles asexuées (qui ne produisent que des descendants femelles) bénéficient d'un double avantage (Maynard, 1971).
- Le coût de la recombinaison (ou de la rupture des combinaisons génétiques favorables) : les génotypes capables de survivre jusqu'à l'âge adulte et de se reproduire prouvent qu'ils sont relativement adaptés à leur propre environnement. La reproduction sexuée peut perturber les combinaisons génétiques bénéfiques et réduire l'aptitude moyenne de la progéniture.
- Coûts associés au processus d'accouplement (ou de la fécondation) : la recherche d'un partenaire peut être coûteuse en temps et en énergie et peut également accroître les risques de prédation et de transmission de parasites. En outre, chez certaines espèces, l'accouplement peut nuire à la femelle et affecter son futur succès reproducteur.

Enfin, un autre type de coût du sexe est celui du coût de la fécondation (Encadré 1.1). Il repose sur la rencontre des gamètes provenant de deux organismes différents (dans le cas où cet organisme n'est pas capable de réaliser de l'autofécondation), et nécessite de trouver un partenaire compatible. Cette recherche a donc un coût, puisqu'elle expose l'individu à un risque de prédation et de contraction de maladie (sexuellement transmissible) plus élevés, ce qui peut engendrer une baisse de fécondité (Daly, 1978 ; Lewis 1987).

1.1.3 Origine des sexes : évolution de l'anisogamie

Comme nous venons de le voir, le paradoxe du sexe est une question qui reste encore largement débattue. Deux autres questions qui sont liées à celle de l'évolution du sexe sont l'évolution des types sexuels et de l'anisogamie. Comment des systèmes avec des types de gamètes différents ont pu apparaître alors même que cela limite la probabilité de rencontre entre des partenaires compatibles ?

1.1.3.1 Les types sexuels

Au moins sept théories ont été avancées pour expliquer l'évolution des types sexuels (Billiard et al., 2011). La première de ces théories suggère que l'apparition de types sexuels serait simplement un sous-produit de l'évolution du système de reconnaissance entre gamètes (Hoekstra, 1982). Cette hypothèse basée sur le fait que le système moléculaire de reconnaissance symétrique entre gamètes, aurait évolué vers un système asymétrique, où une partie des gamètes aurait perdu la molécule réceptrice et l'autre la molécule signal. Une autre de ces théories est que les types sexuels auraient évolué pour éviter le coût de la consanguinité dû à un appariement entre gamètes génétiquement apparentés (Charlesworth et Charlesworth, 1979 ; Uyenoyama, 1988a,b). Une troisième hypothèse est celle du conflit nucléocytoplasmique (Hurst et Hamilton, 1992). Les types sexuels seraient apparus suite à la compétition entre les organelles cytoplasmiques (mitochondrie, chloroplaste) provenant des deux parents provoquant un conflit pouvant réduire la valeur sélective (fitness) du descendant. Cette hypothèse implique l'évolution vers une transmission monoparentale du cytoplasme afin de résoudre ce conflit : l'anisogamie imposant la transmission monoparentale du cytoplasme uniquement via les gamètes de grande taille (Hurst et Hamilton, 1992 ; Billard et al., 2011). Les sept théories (dont les trois décrites ci-dessus) reposent sur l'hypothèse que les types sexuels ont évolué avant l'anisogamie.

1.1.3.2 Evolution de l'anisogamie

Le dimorphisme de la taille des gamètes, avec des grands gamètes femelles et des petits gamètes mâles est retrouvé chez beaucoup d'organismes, chez les animaux, les plantes, les champignons et les algues brunes, rouges et vertes. L'anisogamie aurait évolué depuis l'isogamie, de manière indépendante dans plusieurs lignées eucaryotes (Bell, 1978), dans un contexte dioïque ou monoïque selon les taxa (Henshaw et al., 2023). Trois grandes théories peuvent expliquer cette évolution (Lessels et al., 2009 ; Togashi et Cox, 2011; Lehtonen et

Parker, 2014) : (1) la compétition entre gamètes, (2) la limitation spermatique et (3) le conflit nucléo-cytoplasmique.

(1) La compétition entre gamètes

La première théorie expliquant l'évolution d'un dimorphisme de taille des gamètes (Parker et al., 1972) repose sur l'hypothèse d'un compromis entre taille et nombre de gamètes. Les gamètes de grande taille augmentant la survie de la progéniture, seraient favorisés chez certains individus (les femelles) et permettraient la sélection d'un autre type de gamètes, plus petits, et produits en plus grand nombre (les mâles), parasitant les ressources des gros gamètes (Parker et al., 1972 ; Togashi et Cox, 2011; Lehtonen et Parker, 2014). La compétition entre les gamètes mâles serait à l'origine du maintien de ce dimorphisme de taille.

(2) La limitation spermatique

Le modèle précédent (Parker et al., 1972) supposait que tous les gamètes trouvaient un partenaire et qu'il n'y avait donc pas de sélection pour augmenter leur taux de rencontres. Cependant, lorsque les gamètes sont émis dans l'environnement, la probabilité de leur rencontre peut être très faible, et certains gamètes femelles peuvent rester non fécondés (Levitan, 1993 ; Lessels et al., 2009). Ce scénario est appelé "limitation spermatique", et peut engendrer une sélection pour augmenter le taux de rencontres entre les gamètes, en augmentant soit la motilité, soit la taille du gamète ciblé. Par conséquent, la limitation spermatique a été présentée comme une explication possible de la grande taille des gamètes femelles (Levitan, 1993, 1996, 1998) et de l'anisogamie (Cox et Sethian 1985 ; Dusenbery, 2006).

(3) Le conflit nucléo-cytoplasmique

Lors de la syngamie la cellule fille hérite des organelles (e.g. mitochondrie, chloroplaste) de ses deux parents. La cohabitation de ces organelles génétiquement différentes au sein de la cellule œuf peut générer une course pour leur réplication et/ou l'élimination des organelles d'un des deux parents (Eberhard, 1980). Ce conflit nucléo-cytoplasmique pour l'accès aux ressources de la cellule est susceptible d'entraîner une baisse de sa valeur sélective. Deux scénarios possibles permettent de résoudre ce conflit, soit l'élimination des organelles de l'autre parent (l'hypothèse « kill your partner's cytoplasm »), soit l'élimination de son propre cytoplasme (l'hypothèse « kill your own cytoplasm ») (Lessels et al., 2009 ; Togashi et Cox, 2011), tous deux menant à la transmission uniparentale des organelles. L'anisogamie pourrait donc avoir évolué comme une conséquence de ce conflit nucléo-cytoplasmique, avec un

gamète de grande taille conservant et transmettant son cytoplasme et les petits gamètes ayant éliminé leur organelle avant la fusion.

1.1.3.3 Conséquence de l'anisogamie : La sélection sexuelle

Une des conséquences de l'anisogamie est la sélection sexuelle (Gross, 2006). La sélection sexuelle agit principalement sur les mâles (compétition entre mâles), résultant en l'expression de traits chez les mâles pour accéder aux partenaires, et à un investissement quasi monoparental de la femelle pour la survie de sa descendance (Janicke et al., 2016, **Figure 1.3**). Ce biais de l'investissement parental, peut augmenter la sélection sexuelle chez les mâles par le phénomène de « choix par femelle », puisqu'elle seule peut sélectionner les descendants qui bénéficieront de ses ressources. Ce processus augmente le coût du sexe, d'une part, pour les mâles, qui investissent plus de temps dans les parades nuptiales, la compétition avec les rivaux et qui sont également plus vulnérables face à la prédation du fait de leurs ornements attrayants (Daly, 1978 ; Lewis 1987), d'autre part, cela entraîne un coût lié au maintien du dimorphisme sexuel (Lewis, 1987 ; Gross, 2006).

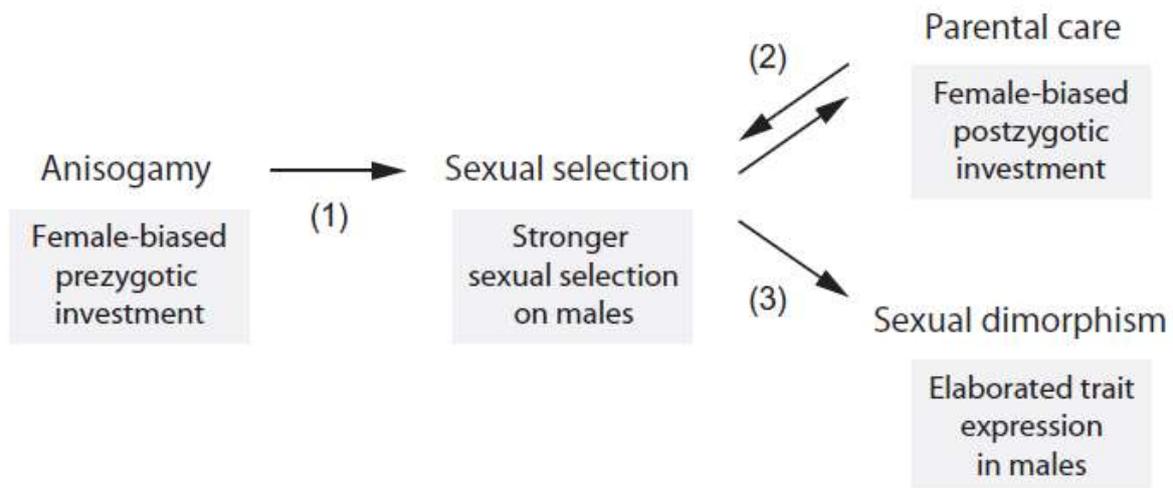


Figure 1.3. D'après Janicke et al., 2016. Schéma illustrant les effets de la sélection sexuelle : (1) La sélection sexuelle est plus forte chez les mâles que chez les femelles, ce qui se traduit par (2) un investissement parental dans la survie de la descendance plus fort chez les femelles et (3) l'expression de traits spécifiques favorisant l'accès aux partenaires chez les mâles. Les flèches indiquent la direction de la causalité.

1.1.4 Le déterminisme du sexe

La façon dont les organismes se reproduisent et comment les sexes séparés sont déterminés et exprimés, a été largement étudiée. Comme la reproduction sexuée implique l'alternance de phases haploïde et diploïde (**Figure 1.4**), le sexe sera soit exprimé en phase haploïde (comme chez les fougères, les mousses et la plupart des algues vertes, brunes ou rouges) soit en phase diploïde (comme chez la plupart des animaux et des spermatophytes) (**Figure 1.4**). Le déterminisme du sexe est le processus par lequel un organisme exprime ses caractères mâles et/ou femelles. Le sexe peut être déterminé génétiquement, environnementalement ou par une interaction de ses deux composantes (Capel, 2017). Dans cette section, seuls les systèmes de déterminisme génétique impliquant des chromosomes sexuels seront évoqués (mais voir pour revue Weber et Capel, 2021 pour les autres systèmes de déterminisme du sexe).

Chez les organismes diploïdes le déterminisme est généralement hétérogamétique (XY, ZW). En revanche, chez les organismes haploïdes le sexe s'exprime en phase haploïde (UV). Chez les organismes à cycles haploïde-diploïdes de type diplobiontique (dominance diploïde, la phase haploïde étant réduite à quelques cellules) le sexe s'exprime en phase diploïde, comme chez *Pistacia vera* (système ZW, Kafkas et al., 2023) ou *Silene latifolia* (système XY, Lebel-Hardenack et al., 2002); chez les organismes à cycle haplodiplobiontique (alternance d'individus haploïdes et diploïdes) le sexe s'exprime en phase haploïde comme chez les algues brunes (système UV, Ahmed et al., 2014) (**Figure 1.4**). La première découverte du chromosome sexuel X date de 1891 (Henking, 1891) et à partir des années 1920 l'implication des systèmes de chromosomes sexuels XX/XY et ZW/ZZ dans le déterminisme du sexe était reconnue (Abbott et al., 2017). La découverte du système UV chez les bryophytes est plus tardive (Allen, 1945). Les systèmes de déterminisme XX/XY et ZZ/ZW ont été bien étudiés chez les animaux (Mittwoch, 1996 ; Capel, 2017) et les angiospermes (Pannell, 2017), mais le système UV reste peu décrit. Il n'a été mis en évidence que très récemment chez les algues brunes (Ahmed et al., 2014) et est encore à l'étude chez les algues rouges (collaborations en cours au sein du consortium Rhodoexplorer: [Lipinska et al. biorxiv 2023](#)).

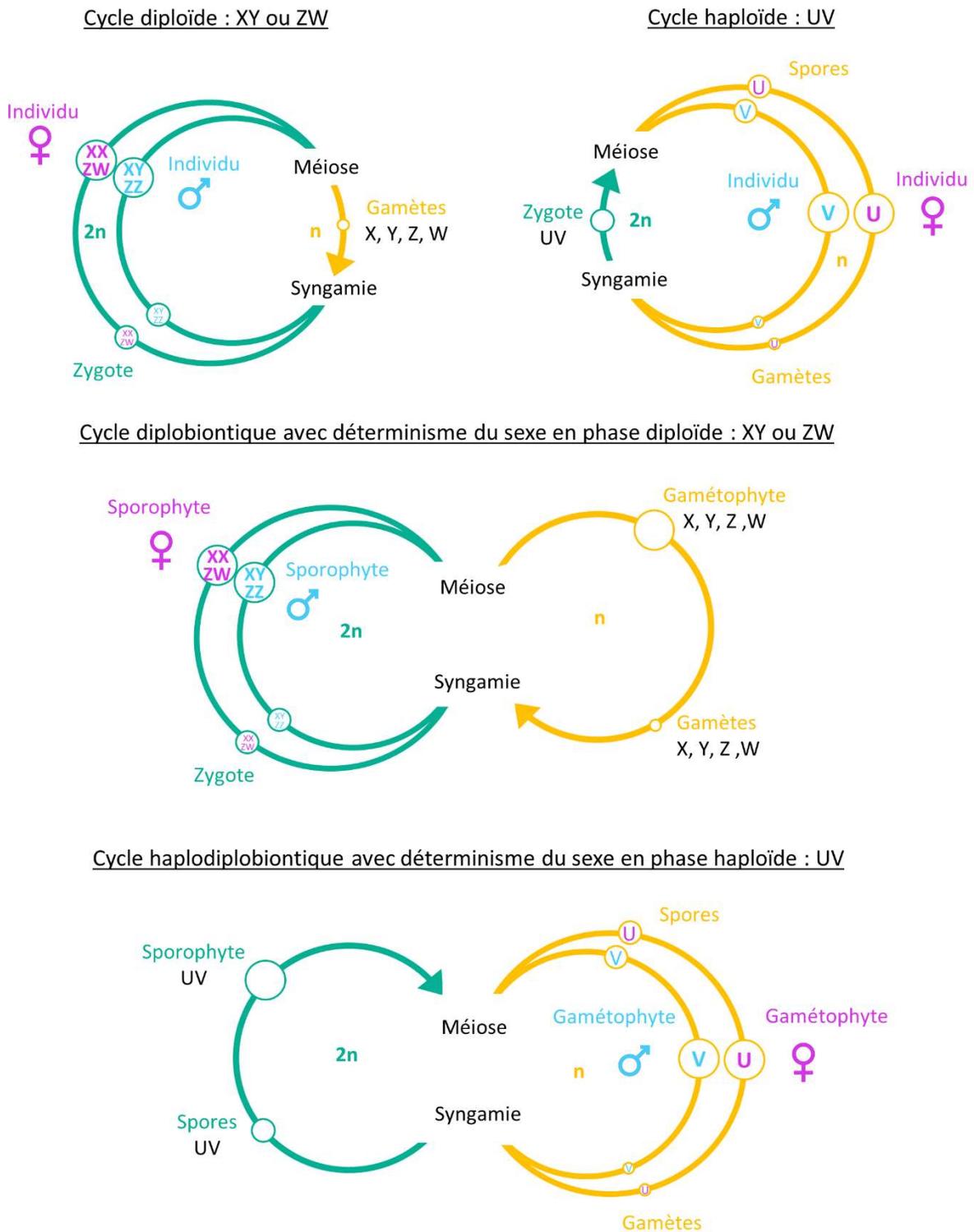


Figure 1.4. Les différents types de cycle de vie chez les espèces sexuées, dépendant de la phase dominante : haploïde, diploïde, ou les deux (haplodiplobiontique), et leur système de détermination du sexe. n = haploïde, $2n$ = diploïde. Figure inspirée de Coelho et al., 2007 et de Coelho et al., 2018.

1.2 Évolution des cycles de reproduction et rencontre des gamètes chez les plantes et les algues (lignée verte et Phaeophyceae).

1.2.1 Une grande diversité des cycles de reproduction.

Les organismes sexués photosynthétiques présentent une très grande diversité de cycles de reproduction (Valero et al., 1992) allant du cycle diploïde (Fucales, Phaeophyceae) au cycle haploïde (Gaunyalacales, Dinophyceae) en passant par les cycles haploïdes-diploïdes ou haplodiplobiontiques (Gracilariales, Rhodophyta). Les cycles haplodiplobiontiques se composent d'un individu diploïde (le sporophyte), et d'individus haploïdes (les gamétophytes) (Willson, 1981). Chez certaines bryophytes, la phase haploïde est dominante, et le sporophyte se développe en épiphyte sur le gamétophyte (During, 1979). A l'inverse, chez les spermatophytes (angiospermes et gymnospermes) les grains de pollen (et dans une moindre mesure les cellules du sac embryonnaire) constituent la phase haploïde réduite (gamétophyte).

La durée relative des phases haploïdes et diploïdes au cours du cycle de reproduction varie considérablement d'une espèce à l'autre. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer l'évolution des cycles de vie haploïdes, diploïdes et haploïdes-diploïdes (pour revue voir Valero et al., 1992; Mable et Otto, 1998; Coelho et al., 2007). Les cycles de vie complexes (haploïdes-diploïdes ou haplodiplobiontiques) que l'on trouve couramment chez de nombreuses espèces d'algues marines, ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur intérêt pour les études écologiques et évolutives (Thornber, 2006). En particulier, la question est de comprendre comment les cycles de vie comportant deux phases de vie libre morphologiquement similaires mais séparées (dans le temps et l'espace), et dont les niveaux de ploïdie différent (haploïdes et diploïdes) ont pu se maintenir et ne pas évoluer soit vers un cycle haploïde, soit vers un cycle diploïde en fonction de l'avantage (ou du coût) de chaque niveau de ploïdie. L'une des théories les plus largement évoquées postule que les espèces haplodiplobiontiques peuvent exploiter une gamme plus large de conditions environnementales car les deux phases de ploïdie utilisent des niches écologiques différentes (Stebbins et Hill, 1980; Willson, 1981). Plus précisément, la théorie de l'évolution prédit que l'existence de différences subtiles mais importantes entre les phases peut être ce qui permet à ces cycles de vie de se maintenir (Thornber, 2006; Rescan et al., 2016; Scott et Rescan, 2017). Les différentes phases d'une même espèce peuvent varier en termes d'abondance, de paramètres démographiques tels que la mortalité et la fécondité. Les variations de la fréquence des

individus haploïdes et diploïdes dans les populations sont dues à des différences dans leur fertilité et leur survie (De Wreede et Klinger, 1988; Santelices, 1990; Richerd et al., 1993a). Avec un sexe-ratio de 1:1, si un nombre égal de spores de chaque génération survit, les gamétophytes devraient légèrement prédominer à l'équilibre démographique (i.e. fréquence des haploïdes $\sqrt{2}/(1+\sqrt{2})$) ou 0.585; Destombe et al., 1989 et Kain et Destombe, 1995) car chez les haploïdes, seules les femelles produisent des spores, ce qui entraîne ce que l'on a appelé le "coût des mâles" (Maynard Smith, 1978). Certains groupes taxonomiques d'algues rouges ont fait l'objet d'une attention particulière sur ces questions (Destombe et al., 1989; Engel et al., 2001, 2004; Krueger-Hadfield et al., 2011; Guillemin et al., 2013, et voir Chapitre 3 de la thèse) alors que notre connaissance de ces propriétés pour les algues brunes reste limitée (Couceiro et al., 2015). Un autre modèle théorique développé par Richerd et al. (1993a) montre que le cycle haploïde-diploïde peut se maintenir face aux cycles haploïdes ou diploïdes grâce à un avantage génétique. En effet, la méiose et la fécondation se produisent deux fois moins souvent dans le cycle haplodiplobiontique (alternance d'individus haploïdes et diploïdes) que dans les cycles haploïdes ou diploïdes, pour le même nombre de générations d'individus. Dans ce cadre, l'existence de variations interspécifiques du cycle de reproduction peuvent avoir un rôle important sur l'évolution des cycles de reproduction (cf Chapitre 3, **Figure 3.2**).

1.2.2 Variation intraspécifique des cycles de reproduction chez les algues rouges

Bien que la présence de chromosomes sexuels de type UV, n'ait pas encore été formellement démontrée chez les algues rouges (Lipinska et al., *en prep*), des marqueurs liés au sexe ont été développés chez plusieurs espèces de gracilaires (*G. gracilis*, Martinez et al., 1999; *G. chilensis*, Guillemin et al., 2012; *G. vermiculophylla*, Krueger et al., 2021) ce qui confirme un système de déterminisme mendélien du sexe (Van der Meer, 1990). Ce dernier auteur émet une première l'hypothèse suggérant que le sexe serait porté par un locus avec deux allèles (un allèle mâle et un allèle femelle). A l'état haploïde (sous forme hémizygote), ces allèles s'exprimeraient respectivement en mâle (production de spermatis par mitoses) et en femelle (production de carpogones par mitoses), en revanche à l'état diploïde (sous la forme hétérozygote) ces allèles s'exprimeraient comme tétrasporophyte (production de spores par méioses) (van der Meer et al., 1984). Cependant, au sein des populations de différentes espèces de gracilaires, comme chez d'autres espèces de Florideophyceae (pour revue voir Maggs et al., 1988), on observe des cas d'individus qui ne suivent pas cette règle et qui sont désignés comme

des variants du cycle. Ces variants ont été observés chez *G. gracilis* (Destombe, 1989), *G. tikvahiae* (Van der Meer, 1984, 1986), *G. domingensis* (Guimares et al., 2003) et *G. caudata* (Marchi et Plastino, 2020). Ces variants du cycle peuvent être hermaphrodites diploïdes, portant des tétraspores ainsi que des organes mâles et femelles, mais également des hermaphrodites haploïdes portant des organes mâles et femelles. Des tétrasporophytes portant des gamétophytes en épiphytes ont également été reportés. Différentes hypothèses ont été avancées pour essayer d'expliquer l'existence de certains variants. Ils pourraient être expliqués soit par la germination des tétraspores directement en organes de reproduction (Cabioch, 1972) soit par l'hypothèse d'une recombinaison mitotique entre locus *mtf* (mating type female) et *mtm* (mating type male) permettant l'expression des caractères mâles ou femelles sous la forme de plages diploïdes homozygotes (chez *G. tikvahiae*, van der Meer et Todd, 1977). Un autre type de variant bisexué (ou hermaphrodite) correspondant à des gamétophytes monoïques portant à la fois des cryptes mâles et des cystocarpes a été rapporté chez *G. gracilis* du Cap Gris Nez. Chez ces individus, aucune section du thalle ne porte de tétraspores. Connu depuis longtemps chez *G. tikvahiae* (van der Meer et al., 1984 ; van der Meer, 1986), ce type de variants bisexuels a également été décrit récemment chez *G. caudata* (Marchi et Plastino, 2020). L'hypothèse de leur existence est qu'il s'agirait de gamétophytes haploïdes dont le déterminisme génétique s'expliquerait par la combinaison de 2 locus (Van der Meer, 1986; Marchi et Plastino, 2020). Le premier locus serait situé dans la région du déterminisme du sexe, avec deux allèles, l'un qui détermine le phénotype mâle, et l'autre le phénotype femelle. L'allèle « sauvage » du second locus inhiberait l'expression femelles chez les mâles, alors que l'allèle muté permettrait l'expression des caractéristiques femelles chez les mâles. Dans cette thèse je me suis intéressée aux variants de *G. gracilis* dans une population naturelle (Chapitre 3). La question était de caractériser non seulement le phénotype mais aussi le niveau de ploïdies et la dynamique de ces variants en population naturelle sur une période de 25 ans.

1.2.3 La rencontre des gamètes

1.2.3.1 En milieu terrestre : rôle des pollinisateurs

La pollinisation, i.e. le transfert du pollen de l'anthere (organe mâle) au stigma (organe femelle) est un processus évolutif central dans la reproduction des angiospermes. La pollinisation peut se faire par des vecteur abiotiques (i.e. l'eau ou le vent) mais la dispersion biotique par les insectes est la plus courante (Ollerton et al., 2011). L'entomophilie serait à l'origine de la diversification des plantes à fleurs (Bao et al., 2019). La coévolution entre les insectes et les

plantes aurait permis la mise en place de systèmes spécifiques, tels que des insectes spécialisés dans la pollinisation de certaines plantes (Johnson et Steiner, 2000), ou des mécanismes tels que l'herkogamie favorisant une séparation spatiale des organes mâles et femelles. Bien que non démontrée, une hypothèse découlant de cette étroite interaction entre les pollinisateurs et les plantes est que les traits plus attrayants pour les pollinisateurs seraient les plus susceptibles d'être sous sélection sexuelle (Delph et Ashman, 2006).

1.2.3.2 Dans le milieu aquatique

Dans le milieu aquatique, la rencontre des gamètes dépend essentiellement des mouvements d'eau et de la capacité des gamètes à se déplacer (Levitan, 1991; Santelices, 2002). En effet, chez beaucoup d'organismes sessiles aquatiques, les gamètes sont flagellés (souvent les mâles), voir les deux (comme chez l'algue brune isogame *Ectocarpus sp.*). Dans certains cas, la production de phéromones sexuelles (chimiotactisme) ou l'attraction par la lumière (phototactisme) peut aider les gamètes mâles à se diriger vers leur partenaire femelle, comme c'est le cas chez certaines algues brunes et vertes (voir pour revue Frenkel et al., 2014). Seuls quelques exemples d'interactions biotiques favorisant les fécondations, ont été mis en évidence, comme par exemple le transport des gamètes mâles par des insectes chez la bryophyte *Bryum argenteum* (Cronberg et al., 2006) ou le transport des grains de pollen chez une angiosperme marine *Thalassia testudinum* par des invertébrés (Tussenbroek et al., 2012, 2016).

1.2.3.3 Chez les algues rouges

Une caractéristique typique des algues rouges est l'absence de flagelle, ce qui suggère que la mobilité rapide des spermatozoïdes a été perdue dans cette lignée. Même si certains gamètes mâles ou spores sont capables de se déplacer et de glisser grâce à des appendices mucilagineux (Pickett-Heaps et al., 2001), il est peu probable que ces processus expliquent à eux seuls les taux de fécondation efficaces observés dans les populations naturelles (Engel et al., 1999 ; Krueger-Hadfield et al., 2015). Chez de nombreuses espèces, l'union des gamètes est facilitée par le trichogyne (**Figure 1.5**), sorte de prolongement du gamète femelle (carpogonium) en forme de poils sur lequel vient se fixer la spermatie et par lequel va transiter le noyau mâle pour accéder au noyau femelle (Pickett-Heaps et West, 1998; Han et al., 2012). Chez certaines algues rouges comme *Antithamnion sp.* les trichogynes peuvent atteindre plus de 50 μm (Kim et Fritz, 1993). Cependant, ces trichogynes ne sont pas présents chez toutes les espèces, c'est le cas par exemple des gracilariales (Xu et al., 2008), et en particulier de notre modèle d'étude

G. gracilis. Ceci suggère l'existence d'autres mécanismes impliqués et favorisant les fécondations chez les algues rouges. Cette question sera abordée dans le Chapitre 4 de ma thèse ou le rôle des interactions biotiques dans la reproduction des algues rouges a été exploré.

Les spermatis de nombreuses espèces excrètent du mucilage qui pourrait faciliter leur transfert grâce aux mouvements d'eau (Broadwater et Scott, 1982; Magruder, 1984; Kim et Fritz, 1993). Chez *G. gracilis*, les analyses de paternités réalisées dans les populations naturelles montrent que 90% des fécondations ont lieu à marée basse lorsque les individus sont immergés dans les cuvettes (Engel et Destombe, 2002), avec donc très peu de mouvements d'eau. Ces analyses de paternité ainsi que des croisements contrôlés en laboratoire montrent également une variation dans le succès reproducteur mâle (Engel et al., 1999, 2002) ce qui pourrait être le signe que la sélection sexuelle opère chez cette espèce. Le Chapitre 5 de cette thèse s'intéresse à la compétition entre individus pour l'accès aux partenaires et en particulier, examine les possibilités de sélection sexuelle chez les algues rouges.

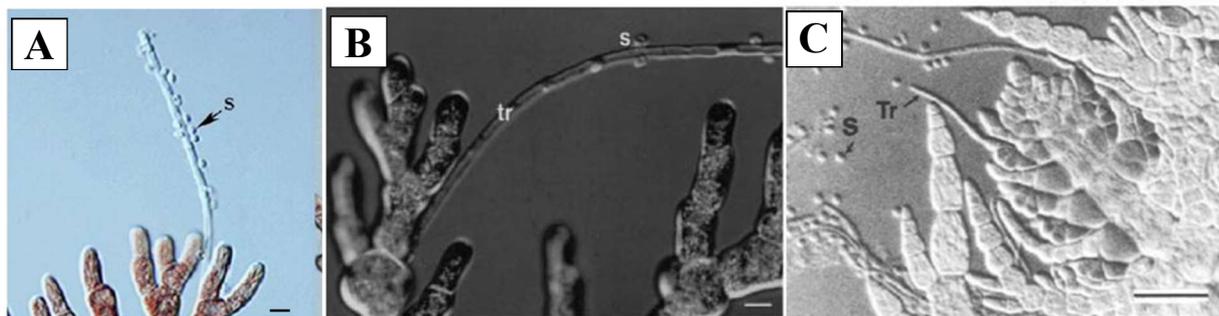


Figure 1.5. Spermatis accrochées au trichogyne chez (A) *Aglaothamnion callophyllidicoda*, extrait de Shim et al., 2012, échelle = 50 μ m; (B) *Aglaothamnion oosumiense*, extrait de Kim et Kim, 1999, échelle = 5 μ m; (C) *Antithamnion nipponicum*, extrait de Kim et Fritz, 1993, échelle = 20 μ m. tr = trichogyne ; s = spermatie

1.3 Objectifs et plan de thèse

Cet état de l'art soulève de nombreuses questions évolutives sur la reproduction sexuée et les modes de reproduction des algues rouges à cycle haplodiplobiontique. L'objectif général de cette thèse est d'étudier les conséquences de ce type de cycle sur le fonctionnement démographique d'une population naturelle de l'espèce *Gracilaria gracilis* par un suivi exhaustif temporel des individus ainsi que sur les stratégies évolutives mises en place pour favoriser la rencontre des gamètes.

Cette thèse est composée de 6 chapitres. Suite à l'introduction générale (Chapitre 1), le Chapitre 2 présente le modèle biologique *Gracilaria gracilis*, ainsi que les caractéristiques des populations étudiées et la méthode de génotypage employée pour obtenir les données utilisées dans les autres chapitres de cette thèse. Les chapitres 3, 4 et 5 constituent le corps de la thèse, les résultats obtenus sont encadrés par une introduction et une discussion propre à chaque chapitre.

Dans le Chapitre 3, les suivis démographiques réalisés pendant 25 ans dans une population naturelle de *G. gracilis* sont utilisés pour valider les prédictions du modèle matriciel construit pour cette espèce en 1995 (Engel et al., 2001), ainsi que pour caractériser les variants et leurs impacts sur le cycle de reproduction haplodiplobiontique.

Dans le Chapitre 4, le rôle de l'isopode *Idotea balthica* dans la dispersion et le transport des gamètes mâles de *G. gracilis* est démontré par une expérience réalisée en laboratoire. Ces résultats ont fait l'objet du premier article de thèse publié dans la revue Science en juillet 2022. Le caractère mutualiste de cette relation est discuté en s'appuyant sur des résultats complémentaires obtenus sur le terrain et en laboratoire.

Dans le Chapitre 5, l'importance de la sélection sexuelle chez les mâles de *G. gracilis* est analysée grâce aux résultats issus des analyses de paternités réalisées en population naturelle en août 2020. Ces analyses font l'objet du deuxième article de thèse en révision dans le journal Proceedings of the Royal Society B. Suite à cette publication, l'absence d'un dimorphisme sexuel clair m'a amenée à rechercher des traits mâles candidats potentiellement sous sélection sexuelle. Les résultats sur l'existence de ces traits sont étudiés et discutés dans ce chapitre.

Enfin, le Chapitre 6 présente les conclusions et les perspectives de ce travail.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

2.1 Présentation du modèle biologique : *Gracilaria gracilis*

Gracilaria gracilis est une algue rouge qui appartient à l'ordre des Gracilariales et à la classe des Floridéophyceae. Cette classe regroupe plus de 95% des espèces actuellement décrites chez les algues rouges et représente un groupe d'organismes qui auraient divergé il y a environ 412 millions d'années (Yang et al., 2016). *Gracilaria* est un des genres les plus cosmopolites et diversifiés des algues rouges (Lyra et al., 2021). Il regroupe environ 200 espèces (Guiry et Guiry, 2023) dont de nombreuses espèces cryptiques qui ne sont identifiables qu'à l'aide d'outils moléculaires, comme notre modèle d'étude, *Gracilaria gracilis* (Guillemin et al., 2008a). Les espèces de gracilaires sont souvent considérées comme des « espèces ingénieuses » de la zone intertidale (Kain et Destombe, 1995; Nyberg et al., 2009; Mott et al., 2022). Ce genre compte aujourd'hui différentes espèces exploitées et cultivées notamment pour la production d'agar (Armisen, 1995 ; Buschmann et al., 2001; Gioele et al., 2017; Mantri et al., 2023), dont au moins une a été domestiquée (Guillemin et al., 2008b; Valero et al., 2017); ainsi qu'une espèce hautement invasive *G. vermiculophylla*, originaire du Japon (Krueger-Hadfield et al., 2017) et observée dans les estuaires d'une grande partie du globe depuis les années 2000 (Bellorin et al., 2004; Rueness, 2005; Krueger-Hadfield et al., 2018). De nombreuses espèces ont été utilisées comme modèle d'étude en génétique pour l'étude de l'héritabilité de traits comme ceux observés chez des variants du cycle de vie ou des mutants phénotypiques : *G. tikvahiae*, *G. sjoestedtii* (van der Meer, 1990), *G. caudata* (Plastino et al., 2004, Marchi et Plastino, 2020) et *G. domingensis* (Plastino et al., 1999). Notre modèle d'étude, l'espèce *Gracilaria gracilis* (anciennement nommée *G. verrucosa*) est le modèle de référence des algues rouges en biologie évolutive pour tester les hypothèses liées à l'évolution de la reproduction, telles que l'alternance des phases haploïdes et diploïdes dans les cycles de vie (Destombe et al., 1989, 1992, 1993 ; Richerd et al., 1993a ; Hughes et Otto, 1999), le système de reproduction et la sélection sexuelle (Richerd et al., 1993b ; Engel et al., 2002).

2.1 Cycle de reproduction

Gracilaria gracilis possède un cycle de reproduction haplodiplobiontique isomorphe (**Figure 2.1**) où alternent deux types d'individus morphologiquement similaires : le tétrasporophyte diploïde et les gamétophytes haploïdes. Ces derniers sont dioïques et produisent des gamètes par mitoses. Les gamètes mâles sans flagelle, appelés spermatis, sont relâchés dans l'environnement et la fécondation a lieu sur la femelle. Après la fécondation, le zygote diploïde

se développe en parasite sur la femelle pour donner le carposporophyte diploïde entouré d'un tissu maternel haploïde, l'ensemble est appelé cystocarpe (Fredericq et Hommersand, 1989). Le carposporophyte est parfois considéré comme une "phase" distincte dans ce cycle de vie (correspondant à la troisième phase du cycle triphasique des algues rouges) puisqu'il produit lui aussi des spores diploïdes (carpospores). À maturité (au bout de 4 semaines), le carposporophyte qui est le fruit d'une seule fécondation, va libérer progressivement en six à dix semaines (Lefebvre et al., 1987) environ 6000 spores diploïdes, génétiquement identiques (Destombe, 1987) qui se développeront en nouveaux tétrasporophytes. Les individus haploïdes (gamétophytes) et diploïdes (tétrasporophytes) coexistent dans des populations où les individus sont fixés au substrat rocheux par un disque de fixation pérenne portant des thalles dressés cylindriques et caduques ressemblant à des "spaghettis ramifiés". Les structures reproductrices sont uniformément réparties le long de ces thalles dressés (Kling et Bodard, 1987).

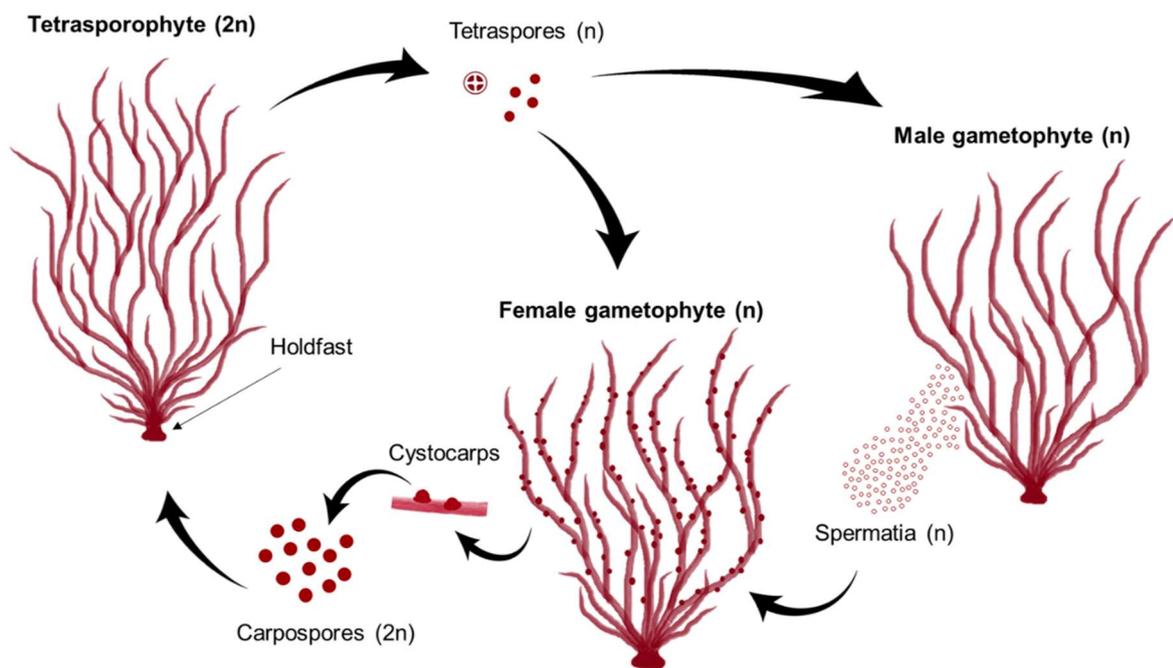


Figure 2.1. Cycle de vie de *Gracilaria gracilis*. Les individus sont fixés au substrat par un disque de fixation pérenne.

2.2 Sites d'étude

L'espèce *Gracilaria gracilis* est retrouvée principalement dans des cuvettes rocheuses sur les côtes européennes. Les individus restent toujours immergés dans l'eau à marée basse. Le premier site d'étude se situe au Cap Gris-Nez (50°53'N, 1°35'E) dans le détroit du Pas de Calais dans le Nord de la France (**Figure 2.2A**). En particulier, nous nous sommes intéressés à l'ensemble des individus de *G. gracilis* localisés dans une cuvette rocheuse d'environ 5 m² (désigné ci-dessous comme population Gris Nez Haut : GNH dans Engel et al., 2001, 2002 ou population 2 dans Destombe et al., 1987, 1989) située à un niveau marégraphique de 2.8m par rapport au zéro hydrographique (**Figure 2.2B**). Elle est isolée des autres cuvettes rocheuses (ou populations) à marée basse (Engel et al., 2004). Cette population GNH a fait l'objet de nombreuses études démographiques et génétiques depuis 1984 (Destombe et al., 1989 ; Engel, 2000). De 1984 à 2006, une dizaine d'échantillonnages exhaustifs de tous les individus présents dans la flaqué ont été réalisés aux marées basses de vives eaux aux environs du solstice d'automne, lorsque les coefficients de marées permettent de travailler dans la population pendant plus de deux heures. Durant ma thèse, j'ai complété cette série d'observations en effectuant un relevé en juin et en août 2020. Le prélèvement effectué en juin 2020, correspond au début de la période de reproduction de *G. gracilis* alors que tous les autres prélèvements ont eu lieu en fin de saison (août à novembre) quand les individus avaient atteint leur pleine croissance et maturité (Destombe et al., 1989). De 1984 à 1990, la position relative (par cartographie de la flaqué réalisée en délimitant des quadrats de 10 cm de côté) et le phénotype de tous les individus (mâle, femelle, tétrasporophyte) présents dans la cuvette ont été collectés. Depuis 1995, la position précise de chaque individu a été cartographiée en utilisant une méthode de triangulation par rapport à deux points fixes (2 vis fixées dans la roche) (**Figure 2.2C**) permettant de positionner de façon précise les individus dans un repère orthonormé (Engel, 2000). Cette cartographie associée à un génotypage de tous les individus en utilisant des marqueurs microsatellites (fingerprint), a permis d'effectuer des suivis temporels de chacun des individus et de confirmer ou non leur présence dans la population (Cf Chapitre 3).

Le deuxième site d'étude est localisé à Locquirec (48°69'N, 3°66'O) en Bretagne Nord, à proximité de la station biologique de Roscoff (**Figure 2.2A**). Dans cette population, seuls les mâles ont été échantillonnés afin de pouvoir travailler sur du matériel biologique frais pour l'observation des gamètes mâles.

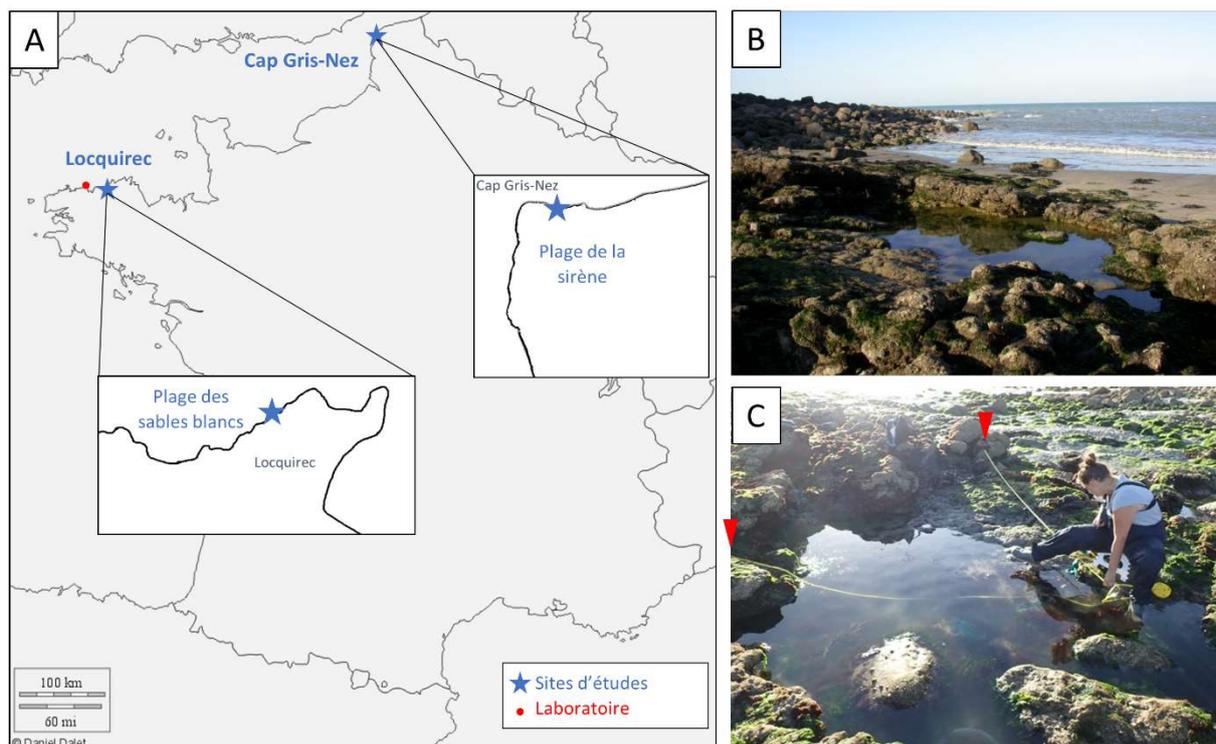


Figure 2.2. Localisation et cartographie des populations étudiées. (A) Localisation des population Gris-Nez-Haut et Locquirec (B) Population Gris-Nez Haut sur l'estran à marée basse et (C) Méthode de triangulation des individus dans la population par rapport à deux points fixes (flèches rouges).

2.3 Echantillonnage et mesures *in situ*

Les mesures *in situ* ont été réalisées uniquement pour les individus de la population Gris-Nez Haut pour chaque année de prélèvement. La longueur maximale et le diamètre maximal du thalle ont été mesurés pour chaque individu. La biomasse totale a été estimée en utilisant la longueur (l) et le diamètre (d) pour calculer le volume cylindrique ($V = \pi \times l \times 0.25d^2$), puisqu'il a été montré que cette méthode non-destructive est un bon *proxi* du poids sec (Aberg, 1990; Engel et al., 2001). Le phénotype des individus (sexe et ploïdie) a été déterminé de retour au laboratoire sous loupe binoculaire par l'identification des structures reproductives : les tétraspores, les cryptes mâles et les cystocarpes, respectivement pour les tétrasporytes, les mâles et les femelles (Figure 2.3). Le phénotypage des individus a également permis d'identifier des individus variants du cycle : soit haploïdes avec des organes mâles et femelles à la fois, soit diploïdes avec des tétraspores et des organes mâles et/ou femelles, soit encore des tétrasporytes avec des gamétophytes mâles et femelles en épiphytes (Cf Chapitre 3). Pour les femelles, les cystocarpes présents sur 10 cm de fronde pour 3 à 5 frondes par individu ont

été dénombrés (sauf en 2000 et en juin 2020); les comptages pour chaque fronde incluent la partie apicale en croissance. À chaque prélèvement exhaustif, un fragment de thalle de chaque individu a été échantillonné dans du silicagel pour les futures analyses génétiques. De plus, en juin et en août 2020, environ 32 cystocarpes par femelles (i.e. entre 12 et 48) ont été aléatoirement disséqués et prélevés. Les cystocarpes, soit 437 en juin et 2021 en août, ont été conservés à -20°C.

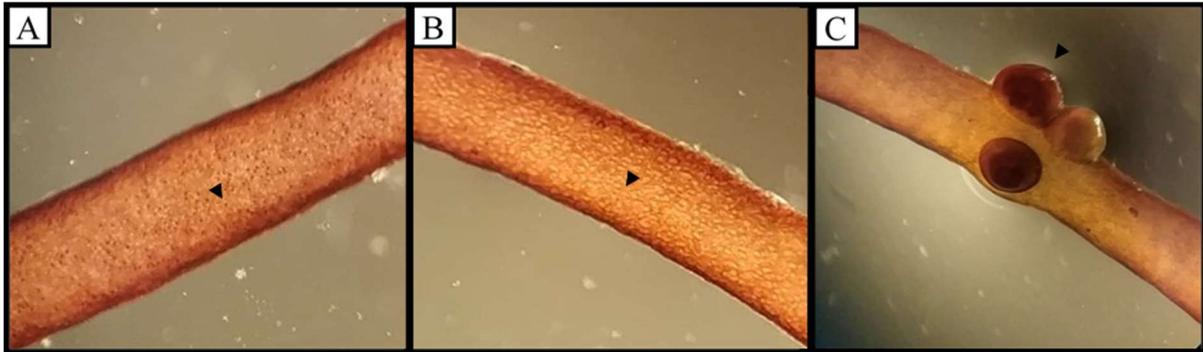


Figure 2.3. Vues externes des organes de reproduction sexuée chez *Gracilaria gracilis*. Portion de fronde de (A) tétrasporophyte avec des tétraspores (flèche), (B) gamétophyte mâle avec cryptes (flèche) et (C) gamétophyte femelle avec cystocarpe (flèche)

2.4 Génotypages et analyses de paternités

Pour chaque individu, l'ADN a été extrait à partir d'approximativement 10 mg de thalle sec en utilisant le kit NucleoSpin® 96 Plant II (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Germany). Pour les cystocarpes, l'ADN a été extrait en utilisant la méthode Chelex (Chelex TM 100 ; Biorad) en utilisant le protocole décrit dans Wattier et al. (1997). Les microsatellites suivants ont été utilisés pour le génotypage des individus : Gv2CT (Wattier et al., 1997); Gg121, Gg155, Gg173, Gg182, Gg202 et Gg216 (Luo et al., 1999); Ggrac_02, Ggrac_03, Ggrac_04, Ggrac_05, Ggrac_08, Ggrac_09 et Ggrac_11 (Mauger et al., soumis). Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume total de 10 µl contenant 2 µl d'ADN diluée au 1:50 (individus) ou non diluée (cystocarpes), 1 X de tampon GoTaq Flexi (Promega), 2 mM de MgCl₂, 150 µM de chaque dNTP, 30 pmol d'amorce forward marquée par fluorescence et 30 pmol d'amorce reverse non-marquée, et 0,35 U de polymérase GoTaq Flexi (Promega). Les amplifications ont été réalisées dans les conditions suivantes : 5 min à 95°C, 30 cycles [30s à 95°C, 30s à 60°C, 30s à 72°C], 10min à 72°C. Ensuite, 2 µL du produit PCR dilué 1:10 ont été ajoutés à 10 µL de tampon composé de 0,5 µL de marqueur de taille SM594 (Mauger et al., 2012) et de 9,5 µL

de formamide Hi-Di, dénaturés 3 min à 95°C, et analysés dans un séquenceur capillaire ABI 3130 XL (Applied Biosystems, USA). Les génotypes des individus ainsi que ceux des cystocarpes ont été analysés manuellement dans Genemapper version 4.0 (Applied Biosystems).

Les génotypes des individus en juin et août 2020 ont été comparés aux génotypes des individus des précédentes années de prélèvements en utilisant 7 microsatellites : Gv2CT, Gg121, Gg155, Gg173, Gg182, Gg202 et Gg216. Cela permet de poursuivre le suivi démographique et génétique initié dans cette population en 1995 (Engel et al., 2001) (Cf Chapitre 3).

Les analyses de paternités ont été réalisées en juin et en août 2020 en utilisant treize microsatellites (Gv2CT, Gg121, Gg155, Gg173, Gg182, Gg216, Ggrac_02, Ggrac_03, Ggrac_04, Ggrac_05, Ggrac_08, Ggrac_09, Ggrac_11), sur les cystocarpes prélevés sur les femelles de la population. Tout d'abord, le génotype paternel de chaque cystocarpe a été retrouvé en soustrayant le génotype haploïde de la mère (qui est connu) au génotype diploïde du cystocarpe pour tous les loci. La paternité a ensuite été attribuée en comparant les génotypes paternels avec ceux des mâles de la population en utilisant l'option Multilocus Matches de GenAlEx ver. 6.5 (Peakall et Smouse, 2006, 2012). Ces analyses de paternité réalisées au cours de ma thèse pourront être comparées à celles effectuées sur les individus de cette même population par Carolyn Engel en 1995 (Engel et al., 1999) et en 1997 (données non publiées ; Engel, 2000) (Cf Chapitre 5).

Chapitre 3

**Suivis à long terme de la population du
Cap Gris Nez : analyse démographique et
importance du polymorphisme pour le
cycle de reproduction**

3.1 Introduction

La démographie s'intéresse aux caractéristiques des individus (e.g. taille, survie, fertilité, longévité, mortalité) au sein des populations pour comprendre comment la variation de ces paramètres peut influencer la taille, la distribution, la structure, et la croissance des populations. L'étude de la dynamique des populations est une approche plus large, englobant l'ensemble des processus environnementaux qui influence les caractéristiques démographiques, tels que la fragmentation de l'habitat, la pollution, les maladies, les activités humaines, et les changements climatiques. Bien que les deux approches soient différentes, elles se complètent et sont souvent utilisées conjointement (Benton et al., 2006). L'étude de la structure démographique et de la dynamique des populations permet de mieux comprendre l'évolution des populations. Les variations de la taille efficace des populations et des taux de migration agissent sur la dérive génétique et la sélection naturelle, et donc sur la structure génétique des populations. Des changements brusques dans la structure génétique peuvent mener à une perte de diversité génétique, une mal-adaptation, l'apparition de maladies génétiques, une plus grande vulnérabilité face aux changements environnementaux. L'étude de ces différents processus permet de retracer l'histoire évolutive d'une population puisque les informations génétiques des individus résultent du cumul de tous les événements passés. D'autre part, la compréhension de tous ces processus peut permettre de concevoir des stratégies de conservation et de gestion pour protéger ces populations.

Les modèles matriciels (Caswell, 1989) sont généralement utilisés pour étudier la démographie des populations et répondre à ces questions écologiques et évolutives associées. Ces modèles permettent, à partir du cycle de vie de l'espèce étudiée, d'intégrer la dynamique et la structure démographique des populations, déterminées par les taux vitaux (mortalité, recrutement, reproduction, croissance) associés aux différents stades (e.g. ploïdies, classes d'âge ou de taille) du cycle de vie. Pour construire ces modèles, des mesures de fertilité, de croissance et de survie moyennes des différents stades du cycle de vie sont effectuées sur le terrain pendant plusieurs années consécutives afin de calculer les probabilités de transition d'un stade à un autre et de projeter le taux de croissance (ou valeur sélective moyenne) de la population à l'équilibre démographique. La projection de ces modèles matriciels permet également d'étudier les conséquences des variations des taux vitaux spécifiques à chaque stade sur la structure démographique de la population et son taux de croissance, et d'estimer le temps de génération

et la durée de vie des individus (Caswell, 1989). L'analyse des perturbations (par des petits changements dans les éléments de la matrice) aide à comprendre comment chaque stade ou paramètre démographique influence la croissance de la population. Les perturbations renseignent donc sur l'action potentielle de la sélection en indiquant quels sont les paramètres qui affectent de façon significative la valeur sélective de la population.

Des bases de données en libre accès, COMPADRE et COMADRE, ont été développées pour permettre de faciliter les analyses comparatives, respectivement, entre espèces végétales (Salguero-Gómez et al., 2015) et entre espèces animales (Salguero-Gómez et al., 2016). Ce projet, initié sur les plantes en 1989 par J. Silvertown et M. Franco, permet de regrouper, pour chaque espèce étudiée, toutes les données démographiques utilisées pour réaliser les modèles matriciels. Cette base de données constitue un outil important pour identifier des stratégies de cycle de vie communes au sein de groupes taxonomiques et permet également d'avoir accès aux prédictions sur les populations de nombreuses espèces, dont des espèces menacées. Elle représente une première étape dans la constitution d'un référentiel international d'informations biologiques, qui pourrait aider dans la gestion de la biodiversité. Dans cette base de données, sont regroupées 429 espèces animales et 792 espèces végétales sur lesquelles ont été utilisés des modèles matriciels. Parmi les espèces végétales, on répertorie : 47% de plantes herbacées pérennes, 20% d'arbres, 9% d'arbustes, 6% de plantes succulentes, 5% de plantes annuelles, 5% d'espèces palmistes, 4% de plantes épiphytes, 2% d'algues (rouges et brunes), et moins de 1% de mousses, fougères, lianes et lichens.

Plus de la moitié des études démographiques utilisant des modèles chez les plantes ont été menées sur une durée de moins de 4 années (Salguero-Gómez et al., 2015), et seulement quelques-unes sur plus de dix ans (e.g. Hobbs et al., 2007, qui a suivi la dynamique d'espèces herbacées de prairie pendant 20 ans). La durée des suivis est donc le facteur qui limite la compréhension des dynamiques démographiques des espèces avec les plus longues durées de vie (Peñuelas et Munné-Bosch, 2010), notamment celles avec une espérance de vie supérieure à une décennie (Ehrlén et Lehtilä, 2002).

Les algues marines brunes, rouges ou vertes présentent des stratégies de cycle de vie très variées, allant des espèces annuelles aux espèces pérennes à très longue durée de vie comme chez certains animaux ou plantes (spermatophytes) (voir pour revues Liu et al., 2017; Vranken et al., 2023). Parmi les 1747 espèces d'algues marines répertoriées en Europe, Vankren et collaborateurs (2023) montrent que le caractère "durée de vie" est relativement bien connu

(Figure 3.1), en particulier chez les algues brunes et vertes (pour tous les ordres) et beaucoup moins chez les algues rouges (seulement 75% des ordres). En revanche, les temps de génération restent quant à eux, globalement très mal connus (Figure 3.1, Vranken et al., 2023), le peu de données disponibles ayant été estimées grâce à l'utilisation des modèles matriciels.

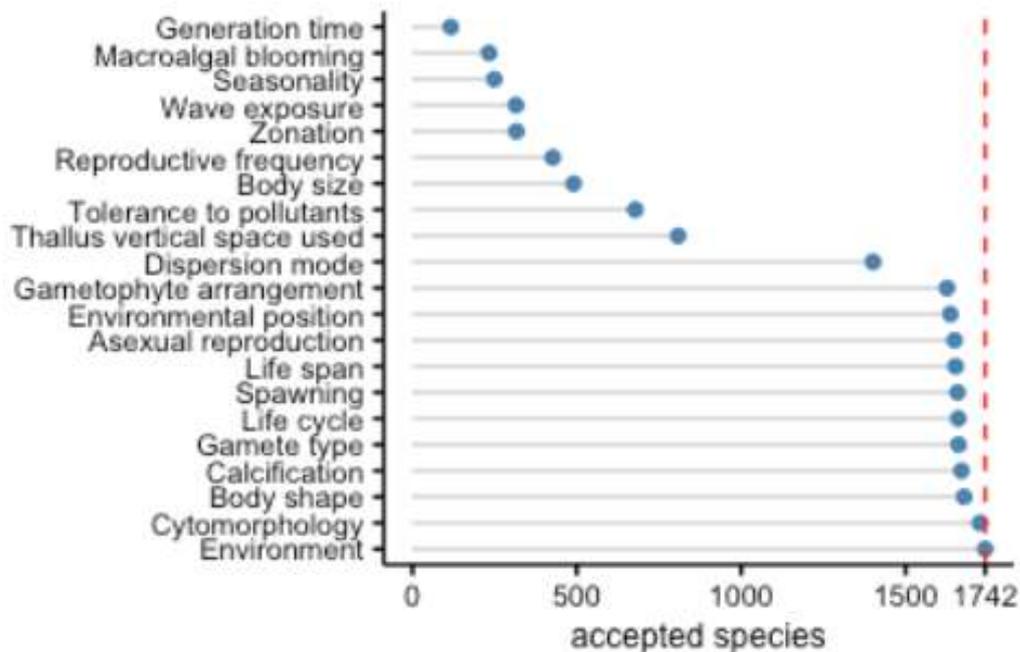


Figure 3.1. D’après Vranken et al. (2023). Nombre d’espèces d’algues marines répertoriées en Europe pour lesquelles on a des informations sur les différents traits considérés dans l’article. La ligne pointillée indique le nombre total d’espèces reconnues taxonomiquement dans la base de données Algaebase (Guiry et Guiry, 2023).

Des modèles matriciels n’ont été développés que sur 14 espèces d’algues (Tableau 3.1), d’après COMPADRE database (Salguero-Gómez et al., 2015). La majorité concerne les algues brunes (11 espèces), alors que cette approche démographique a été menée chez seulement 3 espèces d’algues rouges : *Iridaea splendens* (Ang et al., 1990), *Gelidium sesquipedale* (Santos, 1993 ; Santos et Nyman, 1998) ainsi que sur notre modèle d’étude *Gracilaria gracilis* (Engel et al., 2001) et aucune chez les algues vertes.

Tableau 3.1. Liste des espèces d’algues sur lesquelles des modèles matriciels ont été développés.

Groupe	Ordre	Espèce	Référence(s)
Algues brunes	Fucales	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Aberg, 1990 Araújo et al., 2014
		<i>Cystoseira zosteroides</i>	Capdevila et al., 2016 Capdevila, 2017
		<i>Fucus serratus</i>	Araújo et al., 2014
		<i>Fucus vesiculosus</i>	Ang et De Wreede, 1993
		<i>Sargassum siliquosum</i>	Ang et De Wreede, 1990
	Laminariales	<i>Alaria nana</i>	Pfister et Wang, 2005
		<i>Ecklonia radiata</i>	Lees, 2001
		<i>Laminaria digitata</i>	Chapman, 1993
		<i>Laminaria longicuris</i>	Ang et De Wreede, 1990
		<i>Macrocystis pyrifera</i>	Nyman et al., 1990
		<i>Pterygophora californica</i>	De Wreede, 1986
Algues rouges	Gigartinales	<i>Iridaea splendens</i>	Ang et al., 1990
	Gelidiales	<i>Gelidium sesquipedale</i>	Santos et Nyman, 1998 Vieira et Santos, 2010
	Gracilariales	<i>Gracilaria gracilis</i>	Engel et al., 2001

De même que chez les plantes, les projections de ces modèles démographiques reposent pour la plupart sur des suivis de courte durée (3-4 années), le maximum étant 9 années de suivis chez l’algue brune *Laminaria digitata* (Chapman, 1993). Chez certaines espèces, la durée de vie et le temps de génération estimés par les modèles matriciels sont caractéristiques des espèces pérennes à longue durée de vie. Ces dernières ont été estimées à 60 ans chez l’algue brune *Cystoseira zosteroides* (Capdevila et al., 2016), jusqu’à 120 ans chez une autre algue brune *Ascophyllum nodosum* (Aberg, 1992). Chez l’algue rouge *G. gracilis*, les suivis démographiques effectués dans quatre populations situées dans le Nord de la France (Cap Gris-Nez et Audresselles) entre 1995 et 1998, ont permis d’estimer un temps de génération moyen de 23.9 ans (variant de 12 à 42 ans suivant les années et les populations) et une durée de vie de plus de 55 ans (Engel et al., 2001). La dynamique des populations de cette algue rouge est donc typique des espèces pérennes à longue durée de vie (Silvertown et al., 1993; Alvarez-Buylla et al., 1996) avec des taux de croissance des populations stables dans le temps et proches mais légèrement supérieurs à un, des très forts taux de survie des individus (0.96 en moyenne, ce qui

signifie que 36% des individus d'une même cohorte devrait théoriquement survivre au moins 25 ans et 10% au moins 55 ans) et un très faible recrutement (5.2 recrues par stade et par an). Comme chez d'autres espèces à longue durée de vie, la fertilité contribuerait peu à la croissance de la population et la survie des individus reproducteurs serait le paramètre démographique le plus important chez *G. gracilis*. Cependant, chez les espèces à temps de génération long, la convergence vers le comportement asymptotique est longue, et on peut donc s'attendre à des déviations de la structure à l'équilibre. Une des faiblesses du modèle matriciel déterministe est que les populations sont toujours dans un état transitoire par rapport à l'équilibre prédit, alors que la croissance des populations peut ne pas être stable dans le temps. Il est donc intéressant de confronter les attendus de ces modèles avec des suivis à long terme des populations.

Le modèle matriciel à deux sexes, construit pour *G. gracilis* (Engel et al., 2001) prend en compte les différentes phases du cycle de vie triphasique de cette espèce : les tétrasporophytes, les gamétophytes mâles et femelles et les carposporophytes (ou cystocarpes) (Cf **Figure 2.1**, Chapitre 2). L'originalité de cette approche permettait d'analyser l'effet des perturbations sur les dynamiques des sexe- et ploïdie- ratios dans ces populations. Plus généralement, ce modèle teste empiriquement les attendus du modèle théorique de Richerd et al. (1993a) sur l'évolution et le maintien du cycle haploïde-diploïde. Ce dernier modèle postule que les espèces haploïdes-diploïdes réduisent le coût du sexe (coût de produire des mâles), car les tétrasporophytes peuvent produire des descendants sans avoir à subir le coût du sexe. À durée de vie égale entre individus (haploïdes et/ou diploïdes), l'avantage du cycle haploïde-diploïde sur les autres cycles haploïdes et diploïdes est de ne produire des mâles qu'une fois sur deux. Cet avantage est de deux lorsque le sexe-ratio est de 1 : 1, mais il diminue lorsque le sexe-ratio est biaisé en faveur des femelles (ou inversement, il augmente lorsque le sexe-ratio est biaisé en faveur des mâles). Ce modèle prédit donc que le maintien du cycle haplo-diploïde n'est possible que lorsque le ratio des valeurs sélectives (fitness) haploïdes et diploïdes se trouve dans l'intervalle décrit par la fréquence des femelles et son inverse (**Figure 3.2**).

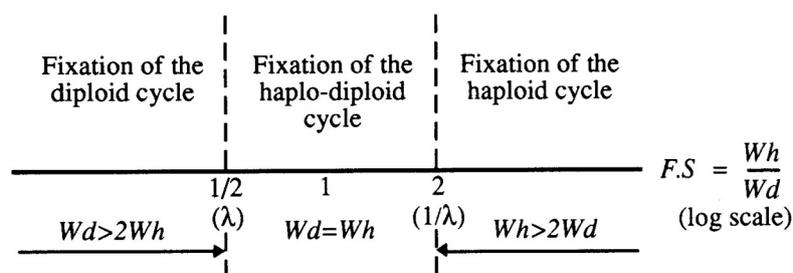


Figure 3.2. Conditions de maintien des trois différents cycles de vie, en fonction du rapport des fitness haploïdes/diploïdes (W_h/W_d), dans une population polymorphe pour le cycle avec

un sex-ratio 1 : 1 ou en fonction de la fréquence des femelles (λ) ; la première échelle est celle du sex-ratio 1 : 1 et entre parenthèses, l'échelle est celle de la fréquence des femelles. F: fertilité haploïde/diploïde; S: survie haploïde/diploïde; Wh: fitness haploïde; Wd: fitness diploïde. D'après Richerd et al. (1993a)

Les sexe- et ploidie- ratios observés au sein des différentes populations de *G. gracilis* dans le nord de la France par Engel et al. (2001) ne varient pas dans le temps. En revanche, des déviations importantes de ces ratios ont été observées entre populations (de 0.30 à 0.60 pour la fréquence de femelles et de 0.45 à 0.60 pour la fréquence des diploïdes). Seules les deux populations du Cap Gris Nez montraient des sexe-ratios biaisés toujours en faveur des mâles et seule une population d'Audresselle montre un excès de diploïdes par rapport à leur fréquence attendue à l'équilibre démographique de $1/(1+\sqrt{2})$ ou 0.41, c'est-à-dire lorsque les haploïdes et les diploïdes ont une valeur sélective égale et que les sexe-ratios sont égaux à 1:1 (Destombe et al., 1989; Thornber et Gaines, 2004). L'analyse démographique de Engel et al. (2001) a montré que les populations de gracilaires étaient plutôt homogènes et que leur probabilité d'extinction était vraisemblablement très faible.

Par ailleurs, différents variants phénotypiques du cycle ont été décrits chez *Gracilaria gracilis* et plus particulièrement dans les populations situées au Cap Gris-Nez (Destombe et al., 1989 ; Kain et Destombe, 1995 ; Engel, 2000). Quatre phénotypes ont été décrits (**Figure 3.3**, d'après Destombe et al., 1989): 1) individus tétrasporophytes portant des gamétophytes nains mâles (emg) et femelles (efg) en épiphytes, correspondant à la germinations de spores haploïdes dans le thalle (EG) ; 2) individus tétrasporophytes portant des germinations mâles, femelles et des tétrasporophytes (et) en épiphytes (EGT) ; 3) phénotype montrant des appareils reproducteurs mâles et des tétraspores sur le même individu (TM : tétrasporophyte mâle encore appelé reproduction en phase mixte) et 4) phénotype hermaphrodite portant à la fois des tétraspores, des organes de reproductions mâles et des gamètes femelles fécondés ou cystocarpes (B : tétrasporophyte bisexué). Destombe et collaborateurs (1989) ont observé à plusieurs reprises ces phénotypes variants dans la même population, sans démontrer formellement qu'ils correspondaient bien à un même génotype ni connaître l'importance de la composante génétique ou environnementale dans l'expression de ces phénotypes.

Quelle est l'importance de ces variants qui conduisent tous à la suppression du stade haploïde individualisé et à la réduction de la phase haploïde ? Si ces variants ont des bases génétiques, peuvent-ils amener à l'évolution vers un cycle diploïde ? Par ailleurs, ces variants ont comme conséquence de modifier la durée de vie des gamétophytes (passant de gamétophytes pérennes à gamétophytes annuelles) et on peut s'interroger sur les conséquences au niveau de la structure

démographique et génétique des populations (Destombe et al., 1989 ; Engel, 2000 ; Krueger-Hadfield et Hoban, 2016 ; Krueger-Hadfield et al., 2019 ; Stoeckel et al., 2021a).

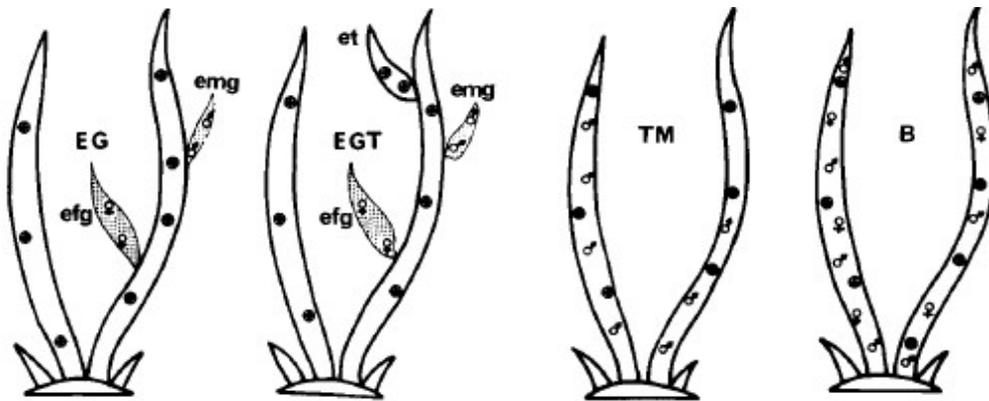


Figure 3.3. Les 4 phénotypes variants observés dans les populations du Cap Gris Nez d’après Destombe et al. (1989). EG : tétrasporophyte avec gamétophytes épiphytes mâles (emg) et femelles (efg) ; (TM) tétrasporophyte mâle ; (B) tétrasporophyte bisexué ; (EGT) tétrasporophyte portant des gamétophytes nains mâles et femelles en épiphytes (emg et efg) ainsi que des tétrasporophytes en épiphytes (et), ♂= crypte mâle, ♀= gamète femelle fécondé, ● = tétraspores.

Les objectifs de ce chapitre sont de tester les prévisions du modèle matriciel développé pour *G. gracilis* en effectuant un suivi à long terme (25 ans) de la population Gris Nez Haut. En effet, le modèle proposé par Engel et al. (2001), a été développé à l’aide d’estimations de paramètres démographiques obtenus sur 3 années consécutives d’observations et on peut s’interroger sur 1) la stabilité des paramètres mesurés (survie, recrutement, sexe-ratio, ploïdie-ratio) et 2) sur la résilience de la population face au changement global observé dans cette région (pollution, augmentation de la température, anthropisation, Pierre, 2015). Par ailleurs, l’évolution de la fréquence des variants au sein des populations sera étudiée afin de mieux comprendre leur dynamique au sein de la population.

3.2 Matériel et méthodes

Les méthodes de prélèvements, phénotypage pour le sexe et la ploïdie ainsi que le génotypage, sont décrites dans le Chapitre 2.

3.2.1 Concordance entre années : identification d'un individu d'après sa position et son génotype multilocus.

Le suivi démographique des individus a été réalisé dans la population Gris Nez Haut (GNH) (voir Chapitre 2), où des études antérieures ont montré que la maturité reproductive, la croissance et la production de cystocarpes atteignent un maximum en août-septembre (Destombe, 1987 ; Destombe et al., 1988, 1989). Les campagnes de relevés ont été effectuées tout d'abord en 1984, 1985 et 1990 puis en 1995, 1996, 1997, 1998, 2000, 2001, 2003, 2006, en juin et en août 2020, un relevé supplémentaire a été réalisé en août 2021 pour ré-échantillonner les variants du cycle. Les données sur la cartographie des individus, leur phénotype et leur génotype, obtenues à partir de 1995, ont été utilisées pour estimer les taux de survie et le recrutement des individus. Certains individus qui étaient identifiés au début du suivi puis qui n'ont pas été recensés pendant une ou plusieurs années, alors qu'ils ont été retrouvés les années suivantes, ont été considérés comme des individus « dormants ». En effet, le terme « dormant » a été choisi car ces individus étaient toujours vivants mais difficiles à observer à certaines dates, probablement parce qu'ils étaient soit ensablés lors de l'échantillonnage, soit présents sous forme de disque de fixation sans que les frondes n'aient pu se développer. Ces individus dormants ont été pris en compte dans l'effectif réel de la population. En 2020, l'ensemble des individus trouvés en juin et en août a été considéré. Par souci de simplification, les individus qui n'ont pas été retrouvés en juin ou en août 2020 ont été considérés comme morts.

3.2.2 Estimation des effectifs théoriques à partir du modèle matriciel

Les effectifs théoriques attendus en 2020 ont été calculés en utilisant les valeurs des taux de croissances asymptotiques estimées à partir du modèle matriciel de Engel et al. (2001) pour les 3 années de suivis de la population du Cap Gris Nez haut (GNH) de 1995 à 1998. Pour chaque intervalle de temps, Engel et al. (2001) avait estimé un taux de croissance moyen encadré par une valeur minimale et maximale. J'ai calculé la moyenne sur les trois intervalles de temps pour estimer le taux asymptotique moyen (ainsi que sa valeur minimale et maximale) pour projeter à partir de l'effectif de 1995, l'effectif attendu de la population en 2020.

3.2.3 Paramètres démographiques

La biomasse des individus (mâles, femelles et tétrasporophytes) a été estimée par leur volume cylindrique ($V = \pi \times l \times 0.25d^2$) en utilisant la longueur (l) et le diamètre (d) mesurés sur le terrain ; le succès de fécondité des femelles par le nombre de cystocarpes produits par centimètre de thalle et leur fertilité (ou succès reproducteur) par le nombre total de cystocarpes produits sur une saison de reproduction par femelle (voir Chapitre 2).

3.2.4 Calcul des taux vitaux

Comme les prélèvements n'ont pas été réalisés à intervalles de temps réguliers, plusieurs intervalles ont été définis afin de pouvoir comparer les taux vitaux. Des intervalles courts de trois ans (1997-2000, 2000-2003, 2003-2006) ainsi que des intervalles longs de 11 et 14 ans (1995-2006 et 2006-2020) ont été définis.

Le taux de croissance instantanée, le taux de survie et le taux de recrutement ont été calculés selon les formules suivantes pour les intervalles de 3 ans :

$$\text{Taux de croissance instantanée} = \frac{\text{Effectif de la population } t_{n+3}}{\text{Effectif de la population } t_n}$$

$$\text{Taux de survie} = \frac{\text{Nombre de survivants à } t_{n+3}}{\text{Effectif de la population } t_n}$$

$$\text{Taux de recrutement} = \frac{\text{Nombre de recrues à } t_{n+3}}{\text{Effectif de la population } t_n}$$

Le même principe de calcul a été utilisé pour les intervalles plus longs.

3.1.1 Sexe et ploïdie-ratio

Les sexes et ploïdies ratios ont été estimés par la fréquence des femelles et la fréquence des diploïdes pour chaque année de relevés.

$$\text{Sexe-ratio} = \frac{\text{Nombre de femelles}}{\text{Nombre de femelles et de mâles}} \quad \text{Ploïdie-ratio} = \frac{\text{Nombre de diploïdes}}{\text{Nombre total d'individus}}$$

Les écarts des sexe-ratio par rapport à la valeur attendue 1:1 ont été testé par un test binomial.

Les écarts des ploïdie-ratio par rapport à la valeur attendue 1: $\sqrt{2}$ ont été testé par un test du χ^2 .

A chaque relevé, les variants diploïdes et haploïdes ont été comptabilisés.

3.2.5 Fréquence et caractérisation génétique des phénotypes variants du cycle de reproduction.

Les différents phénotypes variants observés en 2020 et 2021 ont été décrits phénotypiquement et leur niveau de ploïdie défini grâce à leur génotype. Après l'échantillonnage sur le terrain, certains individus ont été conservés en culture, afin de suivre dans le temps l'expression de leur phénotype variant. Les individus variants ont également pu être suivis dans le temps sur le terrain, grâce à leurs coordonnées dans la population et leur génotype. Comme les phénotypes des variants ne sont pas stables dans le temps (voir plus loin), deux fréquences ont été calculées à chaque relevé, d'une part la fréquence d'observation des phénotypes variants (observation directe au temps t basée sur la phénologie), et d'autre part, la fréquence des individus qui ont présenté au moins une fois un phénotype variant lors des observations dans la population (génotype de l'individu variant observé au temps t même si pas d'observation directe du phénotype variant via la phénologie durant le relevé). Cette deuxième fréquence permet d'estimer la fréquence réelle des variants dans la population, même s'il n'exprime pas leur phénotype variant.

3.3 Résultats

3.3.1 Variation des effectifs de la population entre années

Au total 542 individus différents ont été observés dans la population entre 1995 et 2020, dont 133 femelles, 165 mâles, 219 tétrasporophytes, 18 variants du cycle et 7 individus végétatifs (**Tableau 3.2**). Sur les individus recensés sur au moins 3 relevés (219 individus au total), le temps moyen par individu passé en dormance est de $14 \pm 1\%$. Ces résultats confirment les valeurs obtenues précédemment dans cette même population ainsi que dans d'autres populations du Nord de la France (Engel, 2000). Sur ces 219 individus, 42% n'ont jamais été en dormance. Cinq individus ont été dormants pour toutes les campagnes de prélèvement réalisées entre 1998 et 2020. Ces individus étaient donc ensablés ou sous forme de disque (sans fronde) pour toutes les campagnes intermédiaires.

Tableau 3.2. Effectif de la population pour chaque année de recensement. N_T : Nombre de tétrasporophytes ; N_M : Nombre de mâles ; N_F : Nombre de femelles ; N_V : Nombre de variants du cycle dans la population ; N_I : Nombre d'individus indifférenciés (végétatifs). * d'après Destombe et al. (1989), ** relevés compilés juin-août-septembre d'après Destombe et Richerd (données non publiées). # relevés publiés dans Engel et al. (2001). Les individus relevés en 1985 et 1990 sont donnés à titre de comparaison, cependant, comme ils n'ont pas été génotypés, ils n'ont pas été pris en compte dans le calcul des effectifs totaux.

Année de recensement	N_T	N_M	N_F	N_V	N_I	Total
1985*	41	32	27	5	8	113
1990**	61	42	28	6	0	137
1995#	63	53	30	8	0	154
1996#	70	57	35	9	0	171
1997#	72	59	38	10	0	179
1998#	79	65	45	10	1	200
2000	93	72	56	10	2	233
2001	103	84	56	10	1	254
2003	84	60	53	10	0	207
2006	78	56	42	11	2	189
2020	119	88	78	14	2	301
Total d'ind. différents (1995-2020)	219	165	133	18	7	542

3.3.2 Estimation des effectifs théoriques à partir du modèle matriciel

Les taux de croissance asymptotiques (λ) de la population GNH estimés avec les modèles matriciels en 1996, 1997 et 1998 (Engel et al., 2001) sont indiqués dans le **Tableau 3.3**. L'effectif théorique de la population estimée pour 2020 varie de 289 ± 41 individus à 3189 ± 724 individus avec un taux moyen de 1010 ± 191 . L'effectif observé de la population en 2020 était de 305 individus et correspond aux projections basses de λ estimées par le modèle.

Tableau 3.3. Estimation des effectifs théoriques de la population en 2020 à partir des taux de croissances asymptotiques calculés par le modèle matriciel (Engel et al., 2001).

	Taux de croissance intrinsèque (λ)		
	λ_{\min}	λ_{moyen}	λ_{\max}
1995-1996	1.03	1.09	1.14
1996-1997	1.00	1.04	1.08
1997-1998	1.04	1.09	1.15
Moyenne	1.02 ± 0.01	1.07 ± 0.02	1.12 ± 0.03
Effectif estimé de la population en 2020	289 ± 41	1010 ± 191	3189 ± 724

3.3.3 Variation des paramètres démographiques

Variation temporelle

Les biomasses moyennes de toutes les mesures réalisées au cours des 9 campagnes sur les individus étaient de $27.4 \pm 1.9 \text{ cm}^3$ pour les mâles, de $40.0 \pm 3.2 \text{ cm}^3$ pour les femelles et de 53.7 ± 3.2 pour les tétrasporophytes. Les biomasses varient dans le temps mais avec les mêmes tendances globales quel que soit le sexe ou la ploïdie (**Figure 3.4**). Les biomasses les plus faibles sont observées en 1995, 2001 et juin 2020. Entre 1995 et 2006, le succès de fécondation moyen chez les femelles subit une faible, mais constante, diminution, allant de 2.0 à 1.3 cystocarpes par centimètres de thalle (**Figure 3.5**). Il était de 1.6 ± 0.5 en septembre 1985 (Destombe, 1987). En 2020 cette valeur est nettement supérieure avec en moyenne 2.6 cystocarpes par centimètre de thalle (**Figure 3.5**). Chez les femelles, la variation du succès de fécondation ne suit pas la même tendance que la variation de la biomasse, et ne semble donc pas affectée de la même manière par les fluctuations environnementales (**Figure 3.4 et 3.5**).

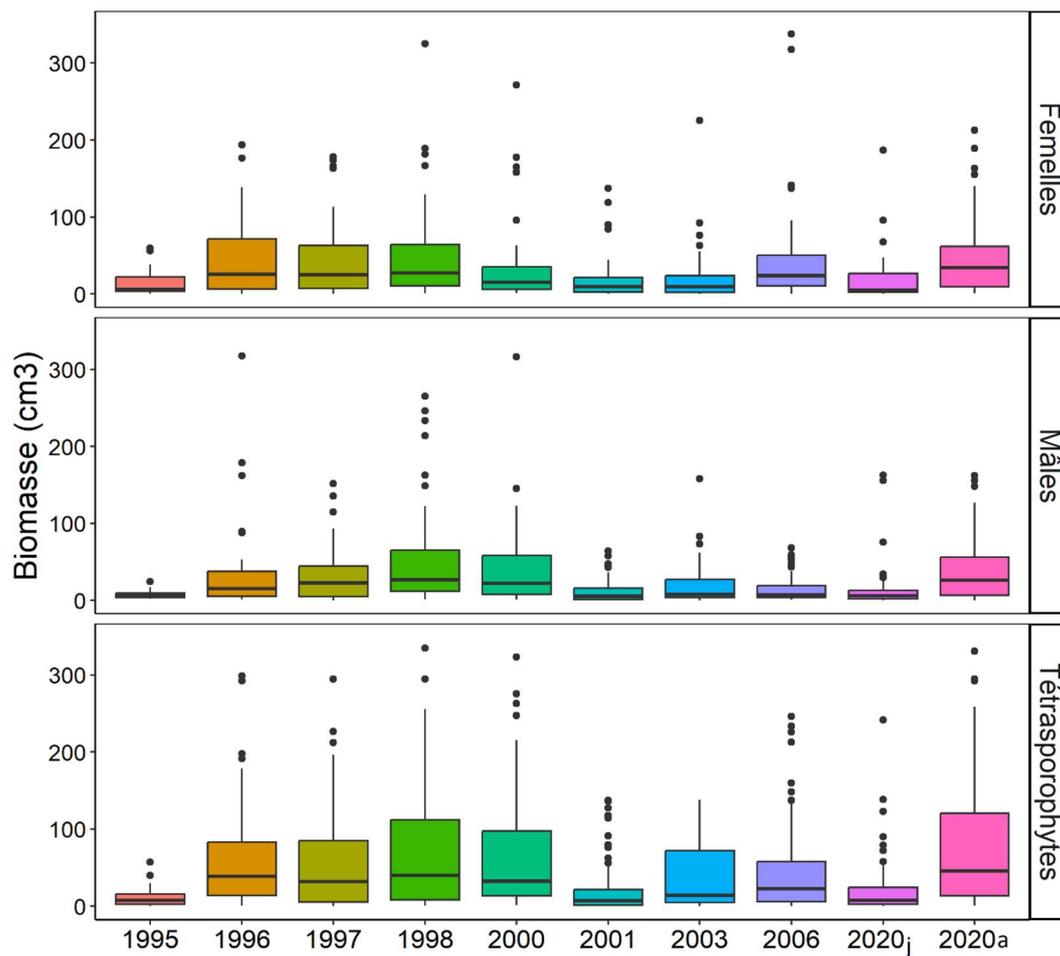


Figure 3.4. Distribution de la biomasse des individus (en cm^3) pour les femelles, les mâles et les tétrasporophytes pour les différentes années de recensement.

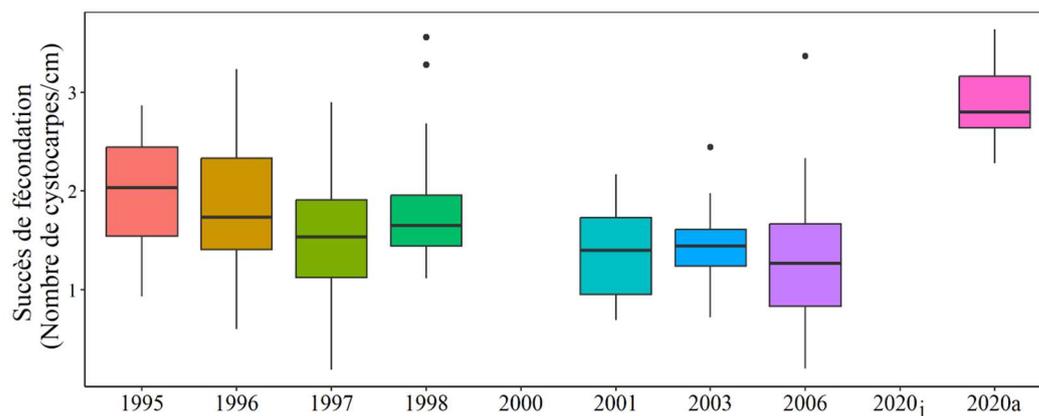


Figure 3.5. Distribution du succès de fécondation des femelles (nombre de cystocarpes/cm de thalle) pour les différentes années de prélèvements. Aucune mesure n'a été réalisée en 2000 et en juin 2020.

Variation individuelle

Pour chaque femelle et chaque paramètre démographique (i.e. biomasse, succès de fécondation et succès reproducteur), la distribution des observations entre relevés est représentée par une boîte à moustache dans la **Figure 3.6**. La moyenne des paramètres démographiques varie non seulement d'une femelle à l'autre mais aussi d'un relevé à l'autre différemment selon les femelles (**Figure 3.6**). Les femelles avec une biomasse moyenne plus élevée sont aussi celles qui présentent la plus grande variance entre relevés (cf : F19, F22 et F24, **Figure 3.6**). On retrouve le même résultat pour le succès reproducteur. En revanche, même si le succès de fécondation moyen varie également très fortement entre les femelles, la variance entre relevés est plus stable et plus élevée que pour les deux autres paramètres (**Figure 3.6**). La variation du succès reproducteur est plus fortement influencée par la biomasse que par la fécondité. D'autre part, la variation interannuelle de la fécondation suggère une plus forte influence de la composante environnementale (biotique ou abiotique) sur le nombre de fécondations par rapport à la biomasse des individus.

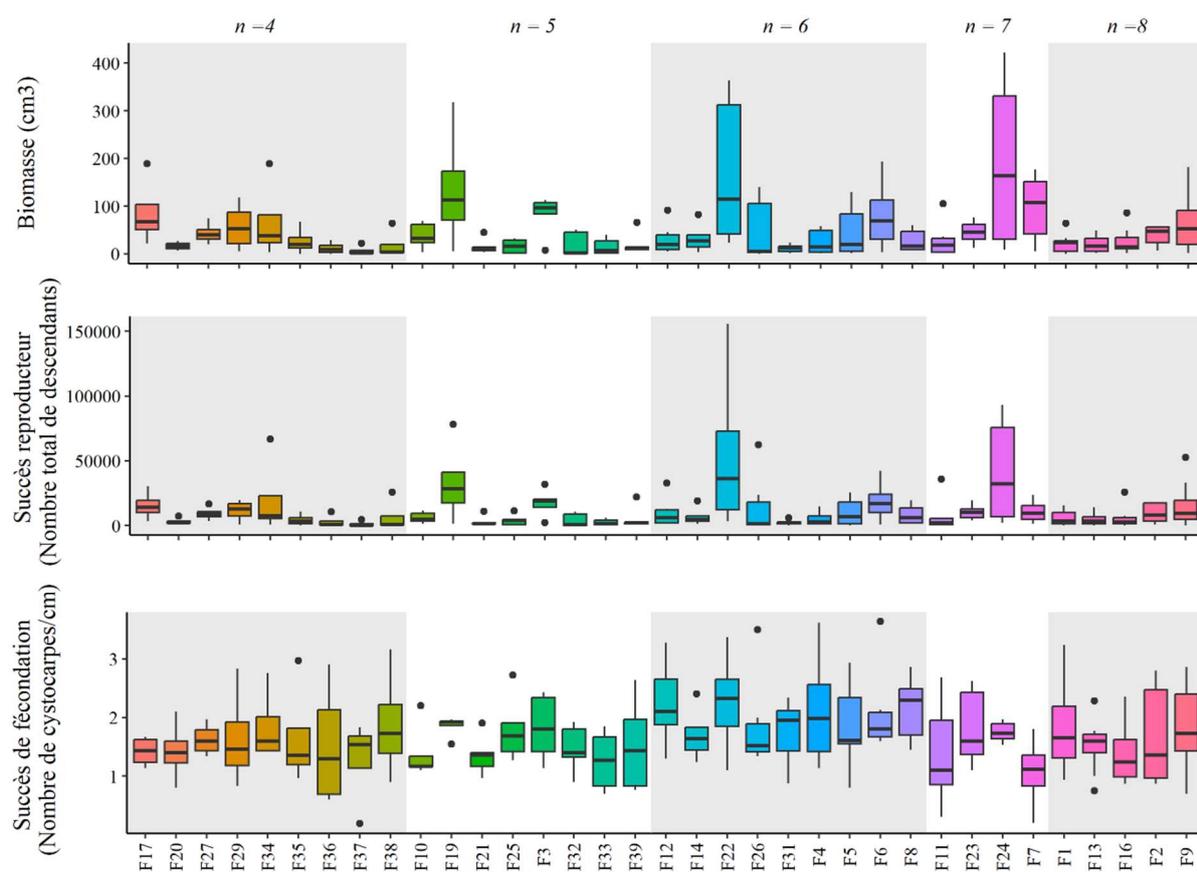


Figure 3.6. Distribution en boîte à moustache de la biomasse, du succès reproducteur et du succès de fécondation pour chaque femelle. n : nombre de relevés pour lesquels les paramètres ont été mesurés. La moyenne est indiquée par le trait.

3.3.4 Taux vitaux : croissance, survie, recrutement

Le taux de croissance instantanée est supérieur à 1 entre 1997 et 2000 puis il est inférieur à 1 de 2000 à 2003 et de 2003 à 2006 (**Figure 3.7**). L'effectif de la population augmente entre 1995 et 2001, allant de 154 à 254 individus puis diminue pour atteindre 207 individus en 2003 et 189 individus en 2006 (**Tableau 3.2**). Entre 1997 et 2000 le taux de survie des individus est de 0.94 et le taux de recrutement est de 0.35 (Tableau 3.4). Ces deux taux chutent ensuite entre 2000 et 2006, avec un taux de survie entre 0.73 et 0.76, et un taux de recrutement, qui diminue de moitié, compris entre 0.14 et 0.15 (**Tableau 3.4**).

Cependant, le taux de croissance est supérieur à 1 entre 1995 et 2006, ce qui montre que les fluctuations observées sur les échelles temporelles courtes (3 ans) ne semblent pas avoir d'impact sur la croissance de la population sur une échelle plus longue, supérieure à 10 ans (**Figure 3.7**). Sur la période 2006-2020 le taux de croissance est plus élevé qu'entre 1995 et 2006, respectivement de 1.6 contre 1.2 (**Figure 3.7**). Un changement de dynamique semble avoir lieu entre ces deux périodes, avec un taux de survie plus important entre 1995 et 2006, de 0.78 contre 0.61 entre 2006 et 2020, tandis que le taux de recrutement augmente entre 2006 et 2020, de 0.97 contre 0.44 entre 1995 et 2006 (**Tableau 3.4**).

Ces taux de croissance instantanée sont variables entre types d'individus, que ce soit sur les périodes d'observations courtes ou longues, avec la croissance des femelles toujours supérieure, et celle des mâles et tétrasporophytes, sauf pour la période 2003-2006 où l'inverse est observé (**Figure 3.7**). Ceci s'accompagne d'une baisse du taux de survie pour les femelles sur la même période, qui est de 0.68 (**Tableau 3.4**).

Enfin, par rapport au relevé de la population en 1995, 57% des individus sont toujours présents 25 ans plus tard (en 2020), dont 53% des femelles, 49% des mâles, 65% des tétrasporophytes et 63% des variants du cycle.

Tableau 3.4. Taux de survie et de recrutement par intervalles de recensement.

	Intervalles courts			Intervalles longs	
	1997-2000	2000-2003	2003-2006	1995-2006	2006-2020
Taux de survie					
Mâles	0.90	0.72	0.80	0.68	0.66
Femelles	1.00	0.80	0.68	0.87	0.55
Tétrasporytes	0.94	0.70	0.79	0.79	0.62
Variants	1.00	0.90	1.00	1.00	0.73
Total	0.94	0.73	0.76	0.78	0.61
Taux de recrutement					
Mâles	0.32	0.11	0.13	0.38	0.91
Femelles	0.47	0.14	0.11	0.53	1.31
Tétrasporytes	0.36	0.19	0.17	0.44	0.91
Variants	0.00	0.10	0.10	0.38	0.55
Total	0.35	0.15	0.14	0.44	0.97

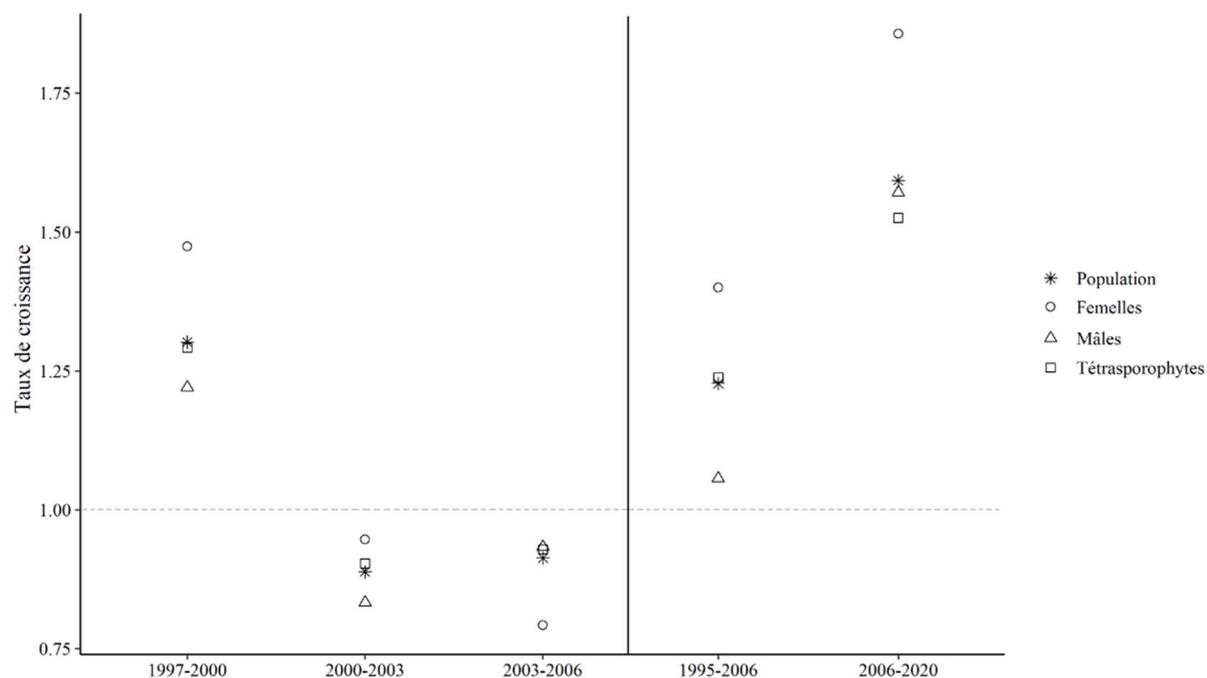


Figure 3.7. Taux de croissance instantanée de la population pour les différents intervalles de recensements considérés.

3.3.5 Sexe- et ploïdie- ratios

Les sexes ratios sont équilibrés pour toutes les années sauf entre 1995 et 1998 (comme reporté dans Engel et al., 2001) et 2001 (**Tableau 3.5**). Le ploïdie-ratio est toujours à l'équilibre démographique (**Tableau 3.5**).

Tableau 3.5. Sexe- et ploïdie ratio dans la population pour chaque année de recensement.

	Mâles	Femelles	Haploïdes	Diploïdes	Sexe-ratio	Ploïdie-ratio
1985	32	27	59	41	0.46	0.41
1990	42	28	70	61	0.40	0.47
1995	53	30	84	70	0.36*	0.45
1996	57	35	93	78	0.38*	0.46
1997	59	38	98	81	0.39*	0.45
1998	65	45	112	88	0.41	0.44
2000	72	56	131	103	0.44	0.44
2001	84	56	142	112	0.40*	0.44
2003	60	53	114	93	0.47	0.45
2006	56	42	101	88	0.43	0.47
2020	88	78	171	130	0.47	0.43
Total	165	133	308	234	0.45	0.43

3.3.6 Fréquence et caractérisation génétique des phénotypes variants du cycle de reproduction.

Plusieurs types de variants ont été décrits en 2020 et 2021 (**Figure 3.8**). Tout d'abord, des variants hermaphrodites haploïdes (homozygotes sur 13 locus) avec des organes reproducteurs mâles (cryptes) et des gamètes femelles fécondés (cystocarpes) ont été observés (**Figure 3.8 A**). Ces variants haploïdes présentaient des phénotypes variés allant d'un phénotype plutôt mâle, comme l'individu sur la **Figure 3.8 B** qui ne présentait que 2 cystocarpes mais était couvert de cryptes mâles, à un phénotype plutôt femelle avec très peu de cryptes mâles et beaucoup de cystocarpes (**Figure 3.8 C**). Les structures mâles et femelles sont réparties sur tout le thalle puisqu'on retrouve des cryptes mâles et des cystocarpes dans la même zone, observables sur une même coupe au microscope (**Figure 3.8 D,E**). Des variants diploïdes (hétérozygotes à plusieurs locus) portant des tétraspores et organes reproducteurs mâles ont également été observés (**Figure 3.8 F**).

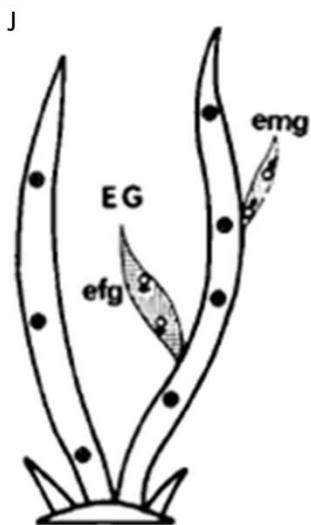
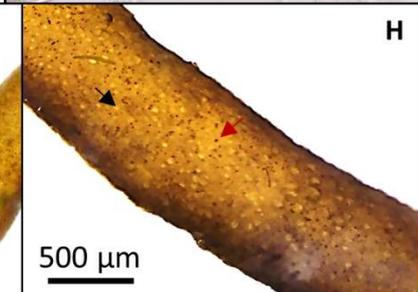
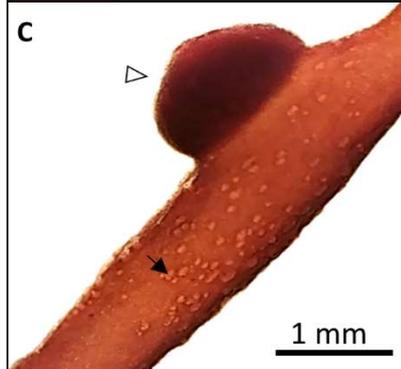
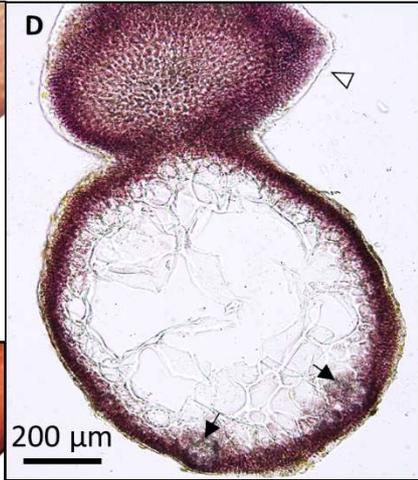
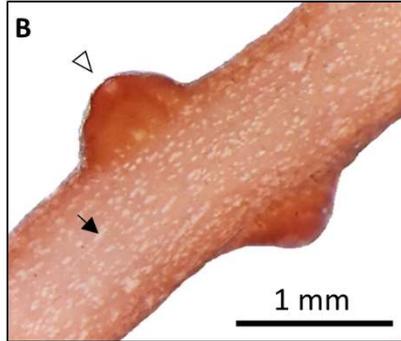
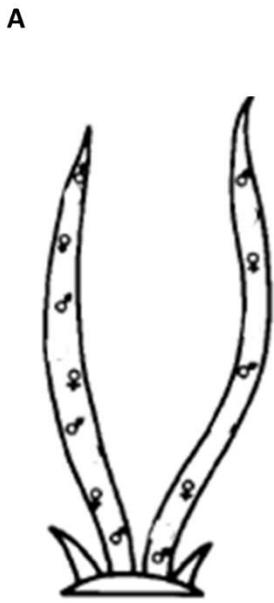


Figure 3.8. Phénotypes variants. (A) Hermaphrodite haploïdes avec (B) un phénotype plutôt mâle avec des nombreuses cryptes et peu de cystocarpes ou avec (C) un phénotype plutôt femelle avec peu de cryptes et plus de cystocarpes. (C) coupe transversale d'un hermaphrodite haploïde portant un cystocarpe et des cryptes mâles (E). (B) Hermaphrodite diploïdes avec (G) un phénotype en mosaïque où les organes sporophytiques et gamétophytiques s'expriment par plages ou avec (H) un phénotype homogène où les structures sporophytiques et gamétophytiques sont réparties de manière homogène sur le thalle. (I) coupe transversale d'un hermaphrodite diploïde présentant une crypte mâle à côté d'une tétrade en formation. (J) et (K)Tétrasporyte portant des gamétophytes mâles et femelles en épiphytes. (L) coupe transversale d'un gamétophyte épiphyte en formation sur un thalle de tétrasporophyte. Les flèches noires indiquent les cryptes mâles, les flèches rouges indiquent les tétraspores et les triangles blancs indiquent les structures femelles (cystocarpes. Les représentation (A), (F) et (J) sont tirés de Destombe et al., 1989. (EG) tétrasporophyte portant des gamétophytes nains mâles et femelles en épiphytes (emg et efg), ♂= crypte mâle, ♀= gamète femelle fécondé, ●= tétraspores.

Ces phénotypes peuvent être sous forme de mosaïque avec des plages de structures sporophytiques et des plages de structures gamétophytiques (**Figure 3.8 G**) ou présenter un mélange homogène de ces structures sur le thalle (**Figure 3.8 H,I**). Trois des individus qui possédaient un phénotype tétrasporophyte-mâle (phase mixte) après quelques semaines de culture ont développé des cystocarpes (carpogones fécondés). Nous pensons donc que tous ces individus produisent des gamètes mâles et femelles mais que les carpogones n'étant détectables qu'après fécondation, ceux-ci n'ont pas été observés sur le terrain. Enfin, des tétrasporophytes (génotype diploïde pour au moins 2 des loci) portant des gamétophytes mâles et femelles en épiphytes ont été observés (**Figure 3.8. J,K,L**).

Grâce aux coordonnées et aux génotypes, les variants ont pu être suivis dans la population. Dans le **Tableau 3.6**, sont indiqués le nombre de variants observés, c'est-à-dire identifiés uniquement sur la base de leur phénotype, ainsi que le nombre de variants réellement présents, c'est-à-dire identifiés d'après leur génotype et leurs coordonnées cartographiques d'individus. La fréquence d'observation des individus variants est de 0.008 ± 0.004 , tandis que la fréquence réelle des variants est de 0.050 ± 0.002 . Ceci est parfaitement en accord avec la fréquence de 5% de variants dans les populations naturelles décrite dans la littérature (Destombe et al., 1989). La différence entre la fréquence observée et la fréquence réelle est que sur toutes les années de prélèvement, le phénotype variant n'a été observé qu'une seule fois pour un même individu (**Tableau 3.8**), sauf pour 2 hermaphrodites haploïdes qui ont été retrouvés en 2020 et en 2021. La plus grande proportion de phénotypes variants observés a été enregistrée en 2020, cela est sans doute dû au fait qu'un effort particulier a été réalisé cette année-là pour trouver les variants.

Tableau 3.6. Nombre et fréquence des variants observés et géotypés dans la population.

Année de recensement	Total	Nv Obs.	Nv Gen.	Frq. Obs.	Frq. Gen.
1995	154	2	8	0.013	0.052
1996	171	1	9	0.006	0.053
1997	179	1	10	0.006	0.056
1998	200	2	10	0.010	0.050
2000	233	0	10	0	0.043
2001	254	0	10	0	0.039
2003	207	0	10	0	0.048
2006	189	0	11	0	0.058
2020	301	12	14	0.040	0.047
Moyenne (± se)				0.008 (± 0.004)	0.050 (± 0.002)

Tableau 3.7. Phénotype des individus variants pour chaque année de recensement. F : Femelle, M : Mâle, T : Tétrasporyte, MF : Mâle-Femelle (Hermaphrodite haploïde), TM/TMF : Tétrasporyte-mâle/femelle (Hermaphrodite diploïdes), TGis : Tétrasporyte avec germination in situ (gamétophytes en épiphytes). Le phénotype variant est indiqué en rouge dans le tableau. n.s : individus non-échantillonnés. *Hermaphrodites diploïdes ayant formé des cystocarpes après la mise en culture.

ID	1995	1996	1997	1998	2000	2001	2003	2006	2020	2021
MF1	F	F	F	F	F	F	F	F	MF	MF
MF2									MF	MF
MF3									M	MF
TM1	T	T	T	TM	T	T	<i>n.s.</i>	T	T	<i>n.s.</i>
TM2	T	T	T	T	V	T	T	<i>n.s.</i>	TM	<i>n.s.</i>
TM3	T	T	T	T	T	T	T	T	TM	<i>n.s.</i>
TM4	TM	T	T	T	T	T	<i>n.s.</i>	T		
TM5	TM	T	T	T	<i>n.s.</i>	T	T	T		
TM6	T	TM	T	T	T	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	T		
TM7		T	T	T	<i>n.s.</i>	T	<i>n.s.</i>	T	TM	<i>n.s.</i>
TM8			TM	T	T					
TM9						M	M	M	TM	<i>n.s.</i>
TM10								T	TMF*	<i>n.s.</i>
TM11									TMF*	<i>n.s.</i>
TM12									TM	<i>n.s.</i>
TM13									TMF*	<i>n.s.</i>
TGis1	T	T	T	TGis	<i>n.s.</i>	T	T	T	T	<i>n.s.</i>
TGis2									TGis	<i>n.s.</i>

3.4 Discussion

Dans ce chapitre, nos résultats valident les projections du modèle réalisé sur les données de 1995 à 1998 dans la population GNH (Engel et al., 2001). D'une part, au moins 57% des individus présents en 1995 sont toujours dans la population en 2020. Lors de leur premier recensement en 1995 ces individus étaient matures puisqu'ils présentaient des frondes portant des structures de reproduction (tetrasporophytes ou gamétophytes), or chez *G. gracilis*, comme le temps de génération a été estimé à 24 ans (Engel et al. 2001) et que les individus ne sont pas matures avant au moins 7 ans (Destombe, communication personnelle) on pourrait supposer que certains de ces individus étaient déjà dans la population bien avant 1995, et auraient donc au minimum 32 ans. Cela est en accord avec le modèle matriciel qui prévoyait que 36% des individus devraient théoriquement survivre au moins 25 ans et 10% au moins 55 ans. Les relevés de 1985 dans cette même population (Destombe et al. 1989), même s'il n'est pas possible d'identifier génétiquement les individus car les marqueurs génétiques chez cette espèce n'ont été mis au point que 12 ans plus tard (Wattier et al., 1997), confirment que la population était déjà présente en 1985. C'est la première fois que des observations sur le long terme permettent de vérifier les attendus d'un modèle théorique sur une algue rouge. D'autre part, l'effectif de la population en 2020 est de 305 individus et correspond aux projections basses (289 ± 41 individus) du modèle matriciel (Engel et al., 1999). Cependant, les estimations hautes de l'effectif de la population projetées pour 2020 prédisent un maximum de 3189 ± 724 individus. Cette grande variation dans l'estimation est sans doute due à l'une des principales faiblesses du modèle matriciel déterministe, utilisé ici, qui est de considérer la croissance de la population comme étant stable dans le temps.

Par ailleurs, dans notre étude l'estimation des taux de survie et recrutement peuvent être biaisés, car tous les individus n'ont pas été prélevés à chaque échantillonnage. En effet, nous avons mis en évidence un certain nombre de "dormants" au sein de la population c'est-à-dire des individus qui ne présentaient pas de fronde visible. Les individus de *G. gracilis* sont composés d'un disque de fixation pérenne et de frondes dressées qui portent les organes de reproduction. Les disques de fixation, dépourvus de rhizoïdes, sont constitués de petites cellules à section rectangulaire (Oliveira, 1968). Ces disques présentent une croissance marginale et leur taille peut atteindre jusqu'à 35 mm de diamètre (Destombe, 1987). A partir de ce disque se développent des frondes annuelles de grande taille pouvant atteindre 45 cm de long sur lesquelles se forment les organes de reproduction. Il semblerait donc, que comme chez

certaines fougères (*Botrychium* spp.) chez qui les gamétophytes et les sporophytes “non émergents” peuvent exister pendant de nombreuses années sous terre avant de produire la première fronde (Campbell, 1921 ; Muller, 1993 ; Lesica et Ahlenslager, 1995), les individus de gracilaire pourraient survivre sous forme de disque sous le sable sans se reproduire. Dans notre étude, le taux de dormance semble relativement stable dans le temps et dans l’espace (Engel et al., 1999) et son effet a été négligé dans le reste de la discussion.

Nous montrons à de courtes échelles de temps (3 ans) que le taux de croissance de la population peut subir de fortes fluctuations, puisqu’entre 2000 et 2006 la population décroît. Chez les espèces pérennes à longue durée de vie, la fertilité contribue peu à la croissance, et c’est la survie des individus reproducteurs qui serait le plus important (Silvertown et al., 1993 ; Alvarez-Buylla et al., 1996). Une fois de plus, nos résultats confirment cela puisqu’on a observé une baisse de survie des individus, et plus particulièrement chez les femelles, associée à la baisse de la croissance de la population. Bien que la fertilité des individus (estimée par la biomasse des individus) et leur fécondité varient d’une année à l’autre, elles ne suivent cependant pas les mêmes tendances que les taux de survie et de croissance, et elles ne semblent donc pas avoir d’impact sur le taux de croissance. Le fort taux de survie des espèces pérennes est souvent associé à un faible taux de recrutement, ce qui est le cas entre 1995 et 2006. Cependant, même faible, ce taux de recrutement a un effet déterminant sur la croissance de la population et sur le long terme pour le maintien de la population (Reed et al., 1988 ; Gotelli, 1991 ; Ang et De Wreede, 1993). Nous pouvons voir un effet de la variation du taux de recrutement, puisqu’il est diminué de moitié après 2000 et, associé à la baisse de survie, participe sans doute également à la chute du taux de croissance de la population. Entre 2006 et 2020, une autre dynamique est observée dans la population avec un taux de survie plus faible et un taux de recrutement qui double par rapport à la période entre 1995 et 2006. Il serait intéressant d’étudier si ces variations peuvent être le reflet de fluctuations environnementales. En effet, la population se trouve haut sur l’estran et cet habitat est soumis à de fortes pressions, dont notamment l’érosion des falaises (Pierre, 2015). Cette érosion du littoral pourrait avoir un impact direct sur la structuration physique de l’habitat (ensevelissement, ensablement). Cela peut impacter la population directement, par exemple si les individus reproducteurs passent plus de temps ensablés. De plus, même si le recrutement est faible dans la population du GNH, on sait que 8% à 10% des fécondations se réalisent avec des mâles extérieurs à la population (Engel et al., 1999 ; Chapitre 5). Il y a donc un échange génétique faible, mais non-négligeable, avec les autres populations.

L'originalité du modèle construit pour *G. gracilis* (Engel et al., 2001) était qu'il permettait, en prenant en compte toutes les phases du cycle de vie, d'analyser les dynamiques des sexe- et ploïdie- ratios, par rapport aux attendus du modèle de Richerd et al. (1993a). Nous confirmons ici les résultats d'Engel et al. (2001) en montrant que les ploïdie-ratios sont stables et à l'équilibre sur plus de 25 ans. Les sexe-ratios, qui étaient biaisés en faveur des mâles entre 1995 et 1998, sont un peu plus variables puisque l'on retrouve un sexe-ratio biaisé en faveur des mâles également en 2001, mais en dehors de ces années le sexe-ratio est équilibré. Bien que la valeur attendue des sexe-ratios soit de 1 :1, car c'est la proportion de spores haploïdes mâles et femelles issus de la méiose, ce ratio peut être différent de l'attendu parmi les adultes, notamment s'il existe des variations environnementales qui biaisent la survie ou la mortalité d'un des sexes. Engel et al., (2001) avait avancé que les sexe-ratios biaisés en faveur des mâles observés entre 1995 et 1998 étaient probablement dus à une différence de survie des juvéniles ou une différence de prédation (par les herbivores) entre les mâles et les femelles.

Ces suivis démographiques ont également permis de caractériser les variants du cycle. Les variants les plus fréquents sont les hermaphrodites diploïdes, qui sont également les plus décrits chez les algues rouges de l'ordre des Ceramiales, dans le genre *Ceramium* (Lewis, 1909 ; Drew, 1934, 1943; Dixon, 1960), et dans le genre *Polysiphonia* (Yamanouchi, 1906 ; Edelstein et MacLachlan, 1967; Lawson et Russell, 1967; Cheung et al., 1984) ainsi que dans l'ordre des Gracilariales (Van Der Meer et Todd, 1977; Destombe et al., 1989). Une des hypothèses proposées pour expliquer l'existence de ces variants est l'occurrence de recombinaisons mitotiques au sein du thalle d'un tétrasporophyte, conduisant à la formation de structures mâles ou femelles (Van Der Meer et Todd, 1977). Ce type de variant pourrait engendrer l'apparition d'individus polyploïdes puisque les gamètes produits par ces organes de reproduction chez *G. tikvahiae* se sont révélés diploïdes (van der Meer, 1977, 1986). Selon ces auteurs, cette polyploïdie pourrait jouer un rôle dans les processus de spéciation chez les algues rouges (van der Meer, 1977). Le deuxième type de variant correspondant à des individus hermaphrodites haploïdes, que nous avons observés dans notre étude pour la première fois chez *G. gracilis*, a déjà été observé chez *G. caudata* (Marchi et Plastino, 2020) et *G. tikvahiae* (Van der Meer, 1984). Ces variants seraient le résultat de l'interaction de deux locus, l'un situé dans la zone du déterminisme du sexe et l'autre dans une région autosomique capable de modifier l'expression du sexe (Marchi et Plastino, 2020). Ces variants, par le biais de l'autofécondation, pourraient alors produire des zygotes diploïdes homozygotes à tous les locus, dont le locus du sexe, qui pourrait résulter en l'apparition de gamétophytes diploïdes. De même que pour les

hermaphrodites diploïdes, l'une des conséquences serait la production de gamètes diploïdes. Le dernier variant observé était un tétrasporophyte portant des gamétophytes en épiphytes, ce phénotype a été décrit chez d'autres espèces de Gracilaires (Bird et al., 1977 ; Oliveira et Plastino, 1984). Chez ces variants, la phase haploïde est réduite, puisque les gamétophytes n'ont pas à s'installer dans la population, et se reproduisent en moins d'une année. Ces variants pourraient donc boucler le cycle plus rapidement et, si ceux-ci sont déterminés génétiquement, leur fréquence devrait augmenter dans les populations (Richerd, 1993a). A terme, on devrait donc observer une augmentation du nombre de diploïdes dans les populations (la phase haploïde étant réduite aux gamétophytes épiphytes), mais ceci n'a pas été observé dans nos suivis. Enfin, la fréquence de tous les variants dans la population, en moyenne de 5%, est stable au cours du temps, ce qui est en accord avec les précédentes observations (Destombe et al., 1989). Le fait que ces variants soient retrouvés chez d'autres espèces du même genre, et chez des algues rouges d'autres genres, et que leur fréquence ne semble pas augmenter dans les populations, montre que leur présence n'affecte pas la stabilité du cycle haploïde-diploïde; il est donc fort probable que ces variations soient plutôt phénotypiques que génétiques.

En conclusion, nous montrons dans ce chapitre, grâce à un suivi sur le long-terme, que les caractéristiques démographiques de *G. gracilis* correspondent bien à celles d'une espèce pérenne à longue durée de vie. Malgré des fluctuations de certains paramètres démographiques sur des courtes échelles, la population semble stable à long terme, avec une croissance faible mais une forte survie des individus, puisque 57% des individus ont survécu entre 1995 et 2020. Cependant, le modèle utilisé repose sur l'hypothèse que les populations sont fermées, mais il se peut que les taux de recrutements estimés soient en fait dus aux migrants provenant d'autres populations. Or, entre 2006 et 2020, nous avons montré un taux de recrutement très important (97%). Il est donc nécessaire d'étudier la structure génétique de ces populations, afin d'évaluer l'importance de ces migrations au cours du temps chez cette espèce, et mieux comprendre la dynamique de cette population.

Chapitre 4

Rôle des interactions biotiques dans la reproduction de *Gracilaria gracilis*

4.1 Introduction

Par définition, les petits gamètes sont mâles et les gros gamètes sont femelles et trois théories principales expliquent l'évolution de l'anisogamie indépendamment dans de multiples branches de l'arbre des eucaryotes (Randerson et Hurst, 2001 ; Lessels, Snook, et Hosken, 2009 ; Togashi et Cox, 2011). La première est la compétition spermatique, qui fait référence à la compétition entre les mâles pour avoir accès à la femelle. La seconde est la limitation spermatique, qui illustre le fait que certains ovules femelles ne sont jamais fécondés, dû à la probabilité de rencontres des gamètes relativement faibles. La troisième est le conflit intracellulaire, ou conflit nucléo-cytoplasmique, résultant de la compétition entre l'ADN nucléaire et l'ADN cytoplasmique, qui peut avoir un impact sur la taille de la cellule. Ces théories impliquent l'interaction de différentes pressions de sélection influençant la taille des gamètes. Les facteurs pouvant favoriser une diminution de la taille du gamète sont : l'augmentation du nombre de gamètes (en baissant le coût énergétique de leur production), une mobilité facilitée, et une exclusion de l'ADN cytoplasmique d'un des parents, éliminant ainsi le conflit intracellulaire (Lessels, Snook, et Hosken, 2009). A l'inverse, les facteurs favorisant une augmentation de la taille du gamète sont d'une part une augmentation de la fitness du zygote (plus de réserves énergétiques) et d'autre part une plus grande probabilité de rencontres (grâce à sa surface plus importante) (Lessels, Snook, et Hosken, 2009). L'interaction de ces facteurs résultent en une diversification des gamètes mâles tellement unique morphologiquement que l'on peut facilement identifier le genre d'un individu, voire l'espèce selon le cas, rien qu'en observant la forme de ses gamètes (Pitnick et al., 2009 ; Landry et al., 2003).

Chez la majorité des organismes sexués, les gamètes mâles sont flagellés et motiles tandis que les gamètes femelles sont peu mobiles (Werner et Simmons, 2008 ; Bondarenko et Cosson, 2019). Chez les quelques taxa présentant des gamètes mâles non flagellés, il a été supposé que cette absence résultait d'une perte des flagelles (Morrow, 2004 ; Brawley et al., 2017 ; Bhattacharya et al., 2018). Cette évolution est apparue indépendamment au moins 36 fois à travers l'arbre du vivant, allant des algues aux poissons (Morrow, 2004 ; Pitnick et al., 2009). En s'appuyant sur la théorie qui propose que la compétition spermatique est l'une des plus importantes forces qui modèlent le phénotype du gamète mâle (Parker 1970), Morrow (2004) émet l'hypothèse que la perte de flagelle serait associée à l'élimination de la compétition spermatique en tant que pression de sélection. Sur les 36 occurrences connues de perte de

flagelle, dans 11 cas, un mécanisme alternatif de mobilité a été sélectionné, comme par exemple la mise en place de pseudopodes, la contraction de filaments cytoplasmiques, ou encore une projection acrosomique (e.g. chez des nématodes : Ward et Carrel, 1979 ; Roberts et Stewart, 2000). Dans ces 11 cas, la présence de compétition spermatique a été mise en évidence. Sur 19 cas où aucun mécanisme alternatif de mobilité n'a été mis en place, il s'est avéré qu'il n'y avait pas de compétition spermatique (i.e., ces groupes présentent une stratégie de reproduction monoandre et les femelles se reproduisent avec un seul mâle durant un cycle reproducteur), démontrant ainsi que l'absence de compétition spermatique favoriserait la perte du flagelle.

Cependant, chez les Rhodophytes cette hypothèse ne se confirme pas. En effet, les gamètes mâles des algues rouges n'ont pas de flagelle mais plusieurs études suggèrent l'existence de compétition spermatique (Engel et al., 1999, 2002 ; Santelices, 2002, Chapitre 5 de cette thèse). En effet, chez *Gracilaria gracilis*, il a été montré que le succès reproducteur mâle ne pouvait pas être expliqué uniquement par la distance parcourue par le gamète mâle pour trouver un partenaire (Engel et al., 1999, Chapitre 5 de cette thèse). Richerd et collaborateurs (1993b) et Engel et collaborateurs (2002) ont mis en évidence l'existence de multiples facteurs prouvant que les fécondations n'ont pas lieu de manière aléatoire, tels que des succès reproducteurs différents entre mâles, ou une sélection du partenaire mâle par les femelles encore appelée choix par la femelle. Morrow (2004) souligne que l'absence de flagelle, malgré la présence de compétition spermatique, chez les Rhodophytes ne correspondrait pas à la même histoire évolutive. En effet, selon lui cela pourrait s'expliquer par le fait que toutes les structures centriolaires et flagellaires sont absentes chez les Rhodophytes. Ainsi l'absence de flagelle serait due à une contrainte évolutive et non à une perte de celui-ci au cours de l'évolution. Cependant, Bhattacharya et collaborateurs (2018) a récemment mis en évidence l'existence de gènes nécessaires à la formation des centrioles chez les algues rouges, suggérant que le flagelle aurait aussi été perdu dans ce groupe, mais très tôt au cours de leur évolution.

Plusieurs auteurs se sont interrogés sur les conséquences de cette absence de flagelle, chez les algues rouges notamment sur une possible limitation de la rencontre des gamètes (Searles, 1980 ; Brawley et Johnson, 1992 ; Engel et al., 1999). En effet, la fécondation, comme pour les plantes à fleurs, a lieu sur la femelle et les spermatis non-mobiles relâchées dans l'environnement sont dépendantes de l'eau pour être dispersées. Ces auteurs ont émis différentes hypothèses sur les mécanismes évolutifs mis en place pour compenser ce désavantage reproductif. Searles (1980) suggère que le cystocarpe (organe de multiplication du zygote), une autre caractéristique du cycle des algues rouges, se serait développée au cours de

l'évolution pour compenser le faible nombre de fécondations. Brawley et Johnson (1992), dans leur article de revue, décrivent l'existence de mucilage produit par les spermaties comme un mécanisme potentiel permettant le transport et un meilleur accrochage aux trichogynes des gamètes femelles (carpogones). Enfin, Engel et collaborateurs (1999) ont montré que les gamètes mâles n'étaient pas un facteur limitant de la fertilité femelle chez *G. gracilis*. Jusqu'à présent, aucune hypothèse sur l'importance des facteurs biotiques dans le succès de rencontre des gamètes chez les algues rouges n'a été étudiée, le dogme étant que dans le milieu marin, les rencontres entre gamètes dépendent essentiellement des mouvements d'eau (Brawley and Johnson, 1992).

Ce dogme a été récemment levé chez l'angiosperme marine *Thalassia testudinum* (l'herbe à tortue), où il a été montré que des invertébrés marins transportaient le pollen des fleurs mâles vers les fleurs femelles (Van Tussenbroek et al., 2016). Cette découverte permet de s'interroger sur l'existence d'interactions biotiques et leur rôle dans la fécondation chez d'autres groupes marins. Dans ce chapitre, nous nous sommes demandés si certains invertébrés pouvaient favoriser la rencontre des gamètes chez *G. gracilis*. Plusieurs cas de relations mutualistes entre les macroalgues et les invertébrés herbivores de l'intertidal rocheux ont déjà été décrits (voir pour revue : Aguilera, 2011). Par exemple, Mancinelli et Rossi (2001) ont montré que les herbivores *Idotea balthica*, *Sphaeroma serratum*, et *Gammarus insensibilis*, avaient un impact positif sur la photosynthèse et la croissance de l'algue rouge *Gracilaria gracilis*, en nettoyant la surface de l'algue lorsqu'ils se nourrissent des épiphytes. Ce même type d'interaction mutualiste a été démontré pour de nombreuses espèces d'algues rouges encroûtantes, en effet la survie et la croissance très lente de ces algues est augmentée en présence d'animaux qui limitent le développement des épiphytes (e.g. association positive entre des amphipodes du genre *Protohyale* et *Corallina officinalis* ou des chitons du genre *Choneplax* et *Porolithon pachydermum*; Littler, Littler et Taylor 1995; Berthelsen et Taylor, 2014) ou qui contrôlent la croissance de compétiteurs à développement rapide comme les ulves (effet positif des patelles du genre *Patella* sur l'algue *Ralfsia verrucosa*; McQuaid et Froneman, 1993). L'effet régulateur des petits herbivores associés aux algues rouges sur leur communauté d'épiphytes peut être très bénéfique pour l'hôte en augmentant sa valeur sélective. En effet, un suivi de trois mois sur le terrain a montré que les individus de l'algue rouge *Rhodomela latrinx* couverts d'épiphytes survivent trois fois moins que les individus "nettoyés" et qu'ils présentent également deux fois plus de structures reproductives en fin de saison (D'Antonio, 1985). Le mutualisme entre macroalgues et herbivores est peut-être plus complexe encore. Des études sur l'algue rouge

Mazzaella laminarioides suggèrent l'implication des amphipodes du genre *Hyale* dans la dispersion de carpospores émises par les gamétophytes femelles (Buschmann et Bravo, 1990 ; Buschmann et Vergara, 1993). Les relations entre les macrophytes et les herbivores qui s'en nourrissent peuvent ainsi aller au-delà d'une simple relation trophique. Lors de nos campagnes de terrain, nous avons fréquemment observé, en association avec les gracilaires, les isopodes du genre *Idotea* qui se nourrissent des épiphytes en surface des thalles. Ces isopodes étaient les candidats parfaits pour tester l'existence d'une interaction biotique favorisant la fécondation chez *Gracilaria gracilis*. Dans la première partie de ce chapitre, une approche expérimentale montrant le rôle des idotées dans la fécondation des gracilaires est présentée sous la forme d'un article publié dans Science. Cette expérience a été menée en collaboration avec Antoine Faure que j'ai co-encadré avec Myriam Valero lors de son Master II (Faure, 2021). Par la suite, nous avons cherché à mieux comprendre le mutualisme entre les deux espèces. Ces résultats sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre. Ils ont été obtenus dans le cadre du stage IntechMer d'Hugo Berrenger que j'ai co-encadré avec Christophe Destombe (Berrenger, 2022).

4.2 Pollinators of the sea: A discovery of animal-mediated fertilization in seaweed.

L'article suivant présente l'expérience réalisée pour tester le rôle potentiel des idotées dans la rencontre des gamètes de *G. gracilis*, ainsi que les résultats et conclusions issus de celle-ci. Nous avons placé des algues mâles et femelles dans des aquariums, en présence ou en absence d'idotées. Le succès de la fécondation a été estimé par le nombre de cystocarpes par cm de thalle. Les résultats sont très clairs puisqu'on dénombre vingt fois plus de fécondations en présence d'idotées. Dans une deuxième expérience, des algues femelles seules (sans algues mâles) ont été placées dans un aquarium soit en absence (expérience témoin), soit en présence d'idotées préalablement incubées avec des algues mâles. Cette dernière expérience montre que les fécondations réalisées sont dues aux spermaties transportées par les idotées. Ces résultats ont été confirmés grâce à des images en microscopie confocale montrant les spermaties accrochées sur le corps et les pattes de l'idotée. Les isopodes de l'espèce *Idotea balthica* favorisent donc la dispersion des spermaties grâce aux turbulences qu'elles engendrent lors de leurs déplacements mais également grâce à un transport des spermaties des mâles vers les femelles. C'est la première fois qu'une fécondation favorisée par des animaux est mise en évidence chez une algue. Cette découverte questionne sur l'histoire évolutive des relations végétaux-animaux. En effet, elle remet en question la période (au début du Protérozoïque ou à la transition entre Protérozoïque et le Phanérozoïque) et l'habitat (marin ou terrestre) où aurait pu apparaître ces premières relations végétaux-animaux. Nos résultats interrogent également sur l'existence d'un mutualisme entre l'algue et l'idotée, c'est la question que nous abordons dans la deuxième partie de ce chapitre.

SPECIES INTERACTIONS

Pollinators of the sea: A discovery of animal-mediated fertilization in seaweed

E. Lavaut¹, M.-L. Guillemin^{1,2}, S. Colin^{3,4}, A. Faure¹, J. Coudret¹, C. Destombe¹, M. Valero^{1*}

The long-held belief that animal-mediated pollination is absent in the sea has recently been contradicted in seagrasses, motivating investigations of other marine phyla. This is particularly relevant in red algae, in which female gametes are not liberated and male gametes are not flagellated. Using experiments with the isopod *Idotea balthica* and the red alga *Gracilaria gracilis*, we demonstrate that biotic interactions dramatically increase the fertilization success of the alga through animal transport of spermatia on their body. This discovery suggests that animal-mediated fertilization could have evolved independently in terrestrial and marine environments and raises the possibility of its emergence in the sea before plants moved ashore.

Animal-mediated pollination in plants is believed to have originated more than 140 million years ago (1) [although this date still sparks debate (2)]. Insect pollination is the most common form of fertilization in flowering plants (3) and is usually the unintended consequence of an animal's feeding activity. Although extensively studied on land, a demonstration of animal pollination in the marine environment was made in 2012 when foraging marine invertebrates were shown to carry and transfer pollen grains from male to female flowers in the seagrass *Thalassia testudinum* K.D. Koenig (4, 5). This finding contradicted the long-held belief that animal-mediated pollination is absent in the sea (6) and raised the question of its presence in other marine life, particularly in seaweeds.

We investigated whether animal-mediated dissemination of male gametes occurs in seaweed. This question is particularly relevant in Florideophyceae because male gametes are not flagellated or motile, similar to pollen grains, and fertilization takes place on a remote female organ. The sperm (spermatia) cannot swim to attach to the trichogyne (the female receptive structure) and are typically thought to be dispersed only passively through water flows (7).

The marine isopod *Idotea balthica* (Pallas, 1772) is commonly found firmly gripped to the red alga (Fig. 1A and movie S1) *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) M. Steentoft, L.M. Irvine & W.F. Farnham. Using two sets of experi-

ments, we tested whether *I. balthica* facilitates male gamete dispersal and fertilization in this red alga species either indirectly, through the creation of water turbulence when swimming, or directly, by carrying spermatia on their bodies. Mating in *G. gracilis* occurs when spermatia released into the environment (Fig. 1B) encounter a trichogyne on the female thallus, where fertilization takes place. After fertilization, the zygote develops on the female alga into a complex structure visible to the naked eye called a cystocarp (fig. S1). We therefore used the number of cystocarps per centimeter of thallus as a proxy of fertilization success.

In the first set of experiments, virgin reproductive-female thalli were placed in calm seawater aquaria 15 cm apart from reproductive-male thalli, either in the presence or absence of *idotea* isopods (Fig. 2, A and B, respectively). Fertilization success was about 20 times higher in the presence of *idoteas* than without (Wilcoxon rank-test, $n = 5$ replicates, $P = 0.031$) (Fig. 2C). In the second set of experiments, virgin females were placed in aquaria with or without *idoteas* that had been preincubated with reproductive-male thalli (Fig. 2, D and E, respectively). To control for the possibility that sperm contamination by the operator during animal transfer led to fertilization events, we performed at the beginning of the experiment shown in Fig. 2E a mock transfer that involved plunging the instruments used to handle *idoteas*. Only two cystocarps were detected—and in only one replicate—after the mock transfer (an average 0.002 cystocarp/cm) (table S1), indicating that such sperm contamination by the operator was negligible. Fertilization success rate reached 0.11 cystocarp/cm of thallus in the presence of incubated *idoteas* (Wilcoxon rank-test, $n = 5$ replicates, $P = 0.028$) (Fig. 2F), confirming direct gamete transport by isopods. *Idoteas* were imaged by use of confocal laser scanning microscopy to demonstrate that they were indeed carrying spermatia. The presence of spermatia was revealed with staining (Fig. 1C). The cuticles of the animals were studded with

spermatia (Fig. 1D, fig. S2, and movie S2), mainly adhering to the setae of pereopods (Fig. 1E and movie S2) and on the margin segments (Fig. 1F and movie S2) because of the sticky nature of the sperm mucilage (fig. S3).

Our results demonstrate for the first time that biotic interactions dramatically increase the probability of fertilization in a seaweed. The observation of mucilage-embedded spermatia attached to *idotea* body parts after visiting male gametophytes suggests that *idotea* may serve as “pollinators” in *G. gracilis* upon subsequent visits to female individuals (movie S1). If we draw a parallel with the Cox-Knox postulates that define criteria for determination of pollinators of flowering plants (8), our results are sufficient to prove that *idoteas* are efficient gamete vectors.

This discovery is particularly relevant in Rhodophyta because male gametes are not flagellated and have a short life span (9), and more than 75% of species are dioicous (having male and female structures on different individuals), which means that fertility success is distance dependent and limited by mate density (10). Syngamy in red algae is expected to be relatively rare compared with that of marine organisms that possess external fertilization, the synchronous release of motile gametes, and chemotaxis (such as invertebrates and brown seaweeds), unless compensatory mechanisms increase sperm production, sperm transfer, or zygote survival. Searles hypothesized that the evolution of a life history in which the female nurtures and protects the zygote is probably a response to low rates of fertilization in both plants and red algae (the cystocarps) (7). Despite debate concerning the compensatory allocation of resources for zygote survival in red algae, the possibility of a biotic interaction that facilitates fertilization success in this group had not been previously explored. In particular, animal-mediated transport of spermatia in red algae could dramatically increase fertilization success in calm rock pools (a condition that was mimicked by our experimental conditions) at low tide, when most fertilizations have been detected (11). However, the relative importance of animal-mediated transport versus water movements in fertilization success was not tested. Intertidal seaweed could combine the advantages of both water and animal dispersal of male gametes when alternating between low- and high-tide conditions.

Although *I. balthica* grazes on other seaweed, it does not feed directly on *Gracilaria* but rather eliminates epiphytes at the surface of the thallus while protecting itself from predators (12–14). We suggest that the relationship could be mutually beneficial. For *I. balthica*, the seaweed provides shelter, and epiphytic diatoms found adhering to the surface of the thallus, whose frustules (or thecae)

¹International Research Laboratory (IRL) 3614, Evolutionary Biology and Ecology of Algae, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Sorbonne Université, Pontificia Universidad Católica de Chile, Universidad Austral de Chile, CS 90074, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff, France. ²Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas, Núcleo Milenio MASH, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, 567 Valdivia, Chile. ³Unité Mixte de Recherche (UMR) 8227, Laboratory of Integrative Biology of Marine Models, CNRS, Sorbonne Université, CS 90074, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff, France. ⁴BioOptics facility, Max Planck Institute (MPI) for Biology Tübingen, Max-Planck-Ring 5, 72076 Tübingen, Germany.

*Corresponding author. Email: myriam.valero@sb-roscoff.fr

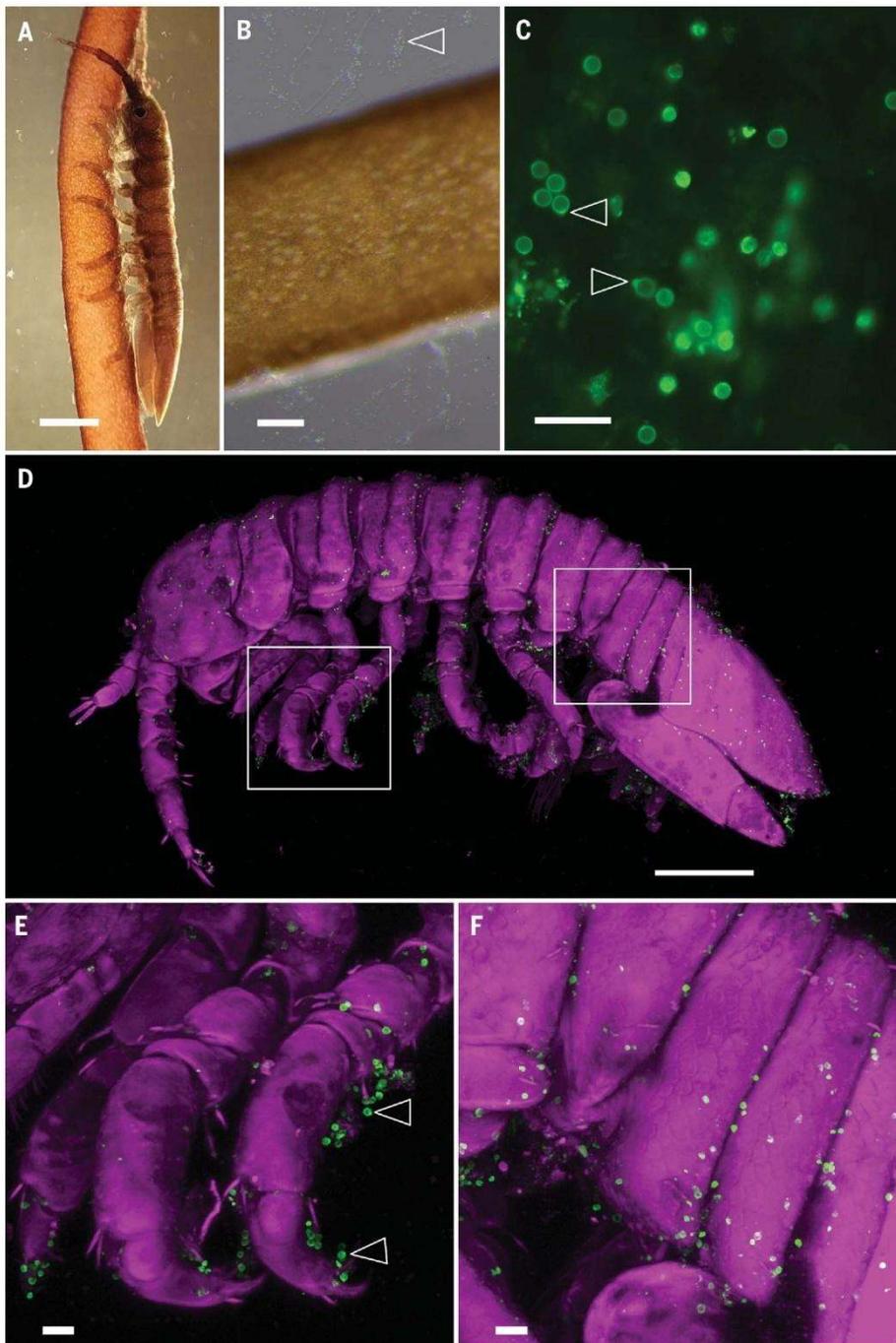


Fig. 1. The idoteas carry spermata of *G. gracilis* on their bodies. (A) *I. balthica* firmly clinging to the reproductive-male thallus of *G. gracilis* (oblique illumination, macroscopy) (movie S1). The light spots on the thallus correspond to the male conceptacles. (B) Release of spermata (arrowhead) at the surface of the reproductive-male thallus (oblique illumination, macroscopy). (C) Spherical spermata about 4.5 μm in diameter (arrowheads) with their noticeable bump [epifluorescence microscopy, staining with the lectine Concanavalin A conjugated to the fluorochrome (AlexaFluor488); ConA-AF488 binds to specific carbohydrates (24) on the surface of the cell and mucilage]. (D) Three-dimensional reconstruction from confocal laser scanning microscopy of a young specimen of *I. balthica* collected on a reproductive-male gametophyte of *G. gracilis* (tegument of the isopod was fixed and stained with calcofluor white, and the spermata was stained with ConA-AF488 (figs. S2 and S3 and movie S2)). (E) Close-up of (D) right inset, showing location of spermata on the setae of pereiopods. (F) Close-up of (D) left inset, showing location of spermata on the margin of segments (arrows). Scale bars, (A) 1 mm; (B) and (D) 200 μm ; and (C), (E), and (F) 20 μm .

are found in the feces of idoteas (fig. S4), appear to be an important food source. In return, *G. gracilis* benefits through increased growth rate owing to reduced fouling (15) and improved reproductive success. The benefit of animal-mediated “pollination” may be particularly important in species such as *G. gracilis* with funnel-shaped trichogynes that do not protrude from the surface of the thallus (16), making fertilization more difficult compared with that of other Rhodophyta such as *Bostrychia moritziana* (17), which have elongated trichogyne (about 100 μm long). As in flowering

plants in which ambophily (adaptation to both wind and animal pollination) appears to be more important than previously reported (18), our results demonstrate that in addition to the well-established role of water movement (7, 9, 10), animal-mediated fertilization is also present in the sea. This observation opens up new unexplored avenues of research aimed at understanding the ecology of these interactions.

Animal pollination is generally thought to have originated during the Mesozoic for gymnosperms and angiosperms and was believed absent in mosses and ferns, in which fertiliza-

tion is restricted to water (19–21). However, transport of male gametes by animals has been demonstrated recently in mosses, antedating animal-mediated pollination at the early phase of land colonization (~450 million years ago) (21). The discovery of animal-mediated fertilization in Florideophyceae, whose origin was estimated to be between 817 million and 1049 million years ago (22), suggests that it could have arisen with the diversification of the metazoan some 650 million years ago (23), even before plants moved ashore. However, we cannot rule out that different animal-mediated fertilization

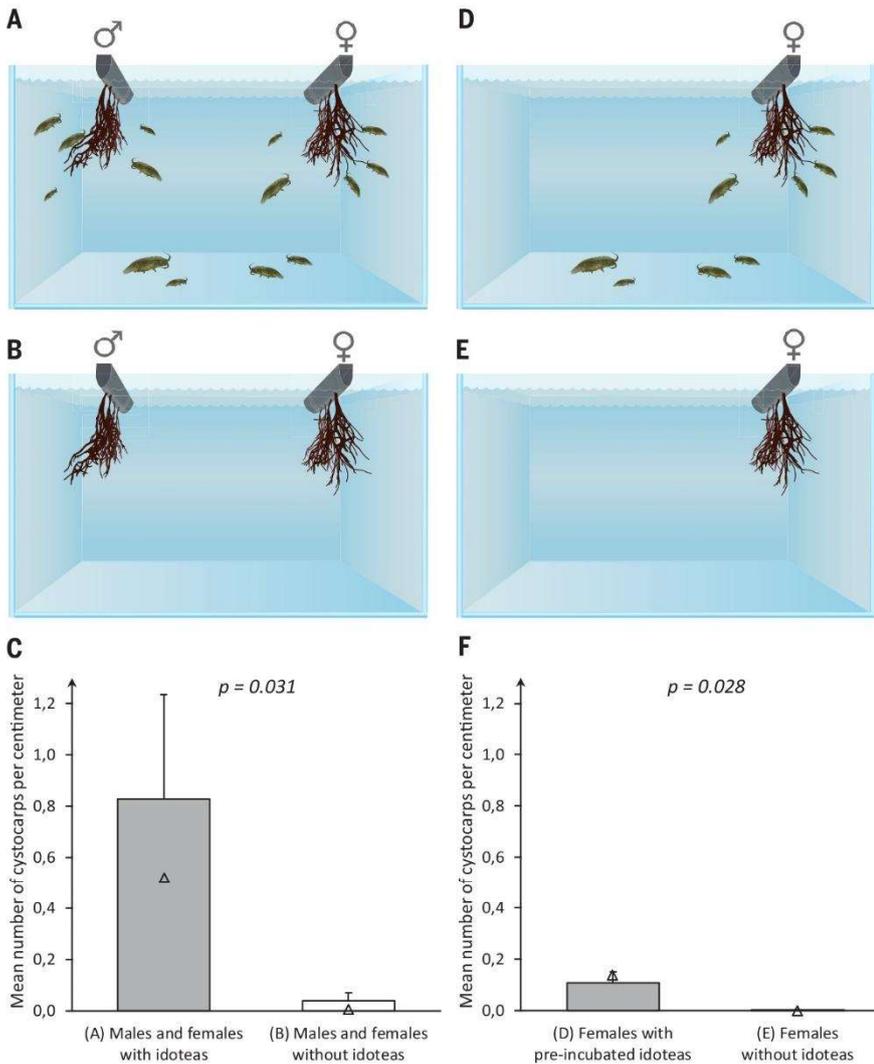


Fig. 2. Impact of idoteas on fertilization success. (A and B) Aquarium containing (A) male and female *Gracilaria gracilis* with 20 *Idotea balthica* (movie S1) and (B) male and female *G. gracilis* without *I. balthica*. (C) Comparison of the mean number of cystocarps as a proxy of fertilization success between experiments shown in (A) and (B). (D) Females of *G. gracilis* with 20 *I. balthica* preincubated with male gametophytes. (E) Negative control with females of *G. gracilis* and mock transfer of idoteas. (F) Comparison of the mean number of cystocarps between experiments (D) and (E). Values represented on the graph are the means and the standard error for the five replicates. Medians are indicated with a triangle. *P* values are indicated on the graph (unilateral rank test of Wilcoxon for paired samples). [Aquarium illustrations by E. Mardones]

mechanisms evolved independently and repeatedly in terrestrial and marine environments.

REFERENCES AND NOTES

- D. A. Grimaldi, M. S. Engel, *Evolution of the Insects* (Cambridge Univ. Press, 2005).
- C. J. van der Kooij, J. Ollerton, *Science* **368**, 1306–1308 (2020).
- J. D. Ackerman, *Plant Syst. Evol.* **222**, 167–185 (2000).
- B. I. van Tussenbroek, L. Monroy-Velazquez, V. Solis-Weiss, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **469**, 1–6 (2012).
- B. I. van Tussenbroek et al., *Nat. Commun.* **7**, 12980 (2016).
- G. J. Vermeij, R. K. Grosberg, *Integr. Comp. Biol.* **50**, 675–682 (2010).
- R. B. Searles, *Am. Nat.* **115**, 113–120 (1980).
- J. Ollerton, *Pollinators and Pollination: Nature and Society* (Pelagic Publishing, 2021).
- C. Destombe, J. Godin, J.-M. Remy, *Hydrobiologia* **204–205**, 219–223 (1990).
- C. R. Engel, R. Wattier, C. Destombe, M. Valero, *Proc. Biol. Sci.* **266**, 1879–1886 (1999).
- C. R. Engel, C. Destombe, *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **82**, 189–192 (2002).
- T. M. Bell, E. E. Sotka, *Oecologia* **170**, 383–393 (2012).
- C. F. Aumack, C. D. Amsler, J. B. McClintock, B. J. Baker, *J. Phycol.* **47**, 36–41 (2011).
- C. D. Amsler, J. B. McClintock, B. J. Baker, *J. Phycol.* **50**, 1–10 (2014).
- G. Mancinelli, L. Rossi, *Mar. Biol.* **138**, 1163–1173 (2001).
- S. Fredericq, M. H. Hommersand, *J. Phycol.* **25**, 213–227 (1989).
- S. M. Wilson, J. D. Pickett-Heaps, J. A. West, *Eur. J. Phycol.* **37**, 509–522 (2002).
- C. Larue, E. Austruy, G. Basset, R. J. Petit, *Bot. Lett.* **168**, 348–372 (2021).
- S. D. Klavins, D. W. Kellogg, M. Krings, E. L. Taylor, T. N. Taylor, *Evol. Ecol. Res.* **7**, 479–488 (2005).
- T. Bao, B. Wang, J. Li, D. Dilcher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 24707–24711 (2019).
- N. Cronberg, R. Natcheva, K. Hedlund, *Science* **313**, 1255–1255 (2006).
- E. C. Yang et al., *Sci. Rep.* **6**, 21361 (2016).
- D. H. Erwin et al., *Science* **334**, 1091–1097 (2011).
- S. H. Kim, G. H. Kim, *Hydrobiologia* **398/399**, 81–89 (1999).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Broquet, T. Comtet, P. H. Gouyon, M. Hossaert, C. Houbin, D. Roze, and R. D. Sepúlveda for fruitful discussion on the first steps of this study; S. Loisel for his help in construction of the aquaria; and S. Mauger for sequencing. We thank the light microscopy facilities from the Station Biologique de Roscoff (SBR) and the MPI for Biology Tübingen for providing access to confocal laser scanning microscopes. We thank G. Schires and the Center of Marine Biology Resources facilities from the SBR for providing access to the aquariological structure for seaweed cultivation. We thank D. Inouye, J. Ollerton, and an anonymous reviewer for comments that have improved this article. **Funding:** This work was supported by a Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) PhD fellowship to E.L.; core funding to M.V., C.D., and M.-L.G. from the IRL 3614, Evolutionary Biology and

Ecology of Algae, CNRS and Sorbonne Université; the International Research Network (IRN), Diversity and Biotechnology of Marine Algae, CNRS; and Gobierno de Chile, Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) #1170541 to M.-L.G. **Author contributions:** E.L., C.D., M.-L.G., and M.V. designed the experiment; E.L., C.D., A.F., and M.V. performed the field sampling; E.L., J.C., and A.F. conducted the laboratory work; E.L., A.F., and M.V. performed the statistical analyses; S.C. designed and conducted the CLSM experiment, analyzed the imaging data, and prepared the corresponding figures; E.L., S.C., C.D., M.-L.G., and M.V. wrote and revised the manuscript, with further edits from all authors; M.-L.G. and M.V. obtained the funding; and M.V. designed and supervised the project, with C.D. and M.-L.G. **Competing interests:** The authors declare no competing interests. **Data availability:** All data used in the analyses are available in the paper or the supplementary materials. **License information:** Copyright © 2022 the authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original US government works. <https://www.science.org/about/science-licenses-journal-article-reuse>

SUPPLEMENTARY MATERIALS

science.org/doi/10.1126/science.abo0661
Materials and Methods
Figs. S1 to S4
Tables S1 and S2
References (25–30)
MDAR Reproducibility Checklist
Movies S1 to S2

Submitted 17 February 2022; accepted 16 June 2022
10.1126/science.abo0661



Supplementary Materials for

Pollinators of the sea: A discovery of animal-mediated fertilization in seaweed

E. Lavaut *et al.*

Corresponding author: M. Valero, myriam.valero@sb-roscoff.fr

Science **377**, 528 (2022)
DOI: 10.1126/science.abo6661

The PDF file includes:

Materials and Methods
Figs. S1 to S4
Tables S1 and S2
References

Other Supplementary Material for this manuscript includes the following:

MDAR Reproducibility Checklist
Movies S1 to S2

Materials and Methods

Seaweed material:

Gracilaria gracilis has a haplo-diplophasic life cycle with isomorphic male and female (haploid) gametophytes and tetrasporophytes (diploid). Tetrasporophytes produce haploid spores from meiotic divisions that develop into dioecious male and female gametophytes. Spermata (non-flagellated male gametes) are released into the environment while female gametes remain on the female. After fertilization, the zygote is retained on the female and develops into diploid sporogenous tissue protected and nurtured by the parental female thallus. This complex structure visible to the naked eye (about 1 mm in diameter) on the surface of the female thallus is called the cystocarp (Fig. S1). Thousands of diploid spores are released by a cystocarp into the environment to give rise to new diploid tetrasporophyte individuals. Fertilization success is easily quantified by direct counts of cystocarps number per unit of female length.

Both male and female gametophytes of *G. gracilis* were collected from the Cap Gris-Nez (northern France, 50°53'N, 1°35'E). To obtain unfertilized virgin thalli, females were grown for six months at room temperature in 2L flasks of enriched seawater (PES 1mL/L; Provasoli, 1957), under a photoperiod of 12:12, and a light intensity of 45 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Reproductive males were harvested one week prior to the experiments and maintained in culture under a 16:8 photoperiod, with a light intensity of 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and a controlled temperature of 16°C. To confirm spermata production, males were incubated in 500mL of seawater for 30 minutes, and Pluronic™ F-68 (Gibco™, ref:24040032) was added to a 50 mL subsample to maintain cell integrity and reduce the attachment of the cell to the container surface. The preparation was filtered at 0.4 μm . The filter was stained with 50 μL of Concanavalin A (conjugated with Alexa Fluor™ 488, Invitrogen™, Fisher Scientific) at 0.1 mg/mL, left to stand for 20 minutes and then rinsed with 0.2 μm filtered seawater. Gamete presence was confirmed by observation under a LEICA DMI8 fluorescence microscope, objective HC PL FLUOTAR 63x/1.30 OIL and a filter cube for AlexaFluor 488 (Ex480/40 nm BS 505 nm Em 527/30 nm), CCD Camera DFC3000G (Leica).

Animal material:

Idotea balthica were collected on *G. gracilis* thalli from Locquirec (Brittany, France, 48°69'N, 3°66'O). The animals were kept in 10L oxygenated aquaria containing *Ulva lactuca* and *Palmaria palmata* for grazing and *G. gracilis* as shelter.

Verification of species taxonomic status:

Species determination was first done using morphological characters and then verified using the mitochondrial gene COI (cytochrome oxidase subunit 1) for the isopod *I. balthica* and the chloroplast gene *rbcL* (ribulose bisphosphate carboxylase large subunit) for the seaweed *G. gracilis*. Sequences were obtained for four *I. balthica* and four *G. gracilis* (two males and two females used in the experiments) following published protocols (25, 26, respectively). Sequences were deposited in Genbank under accession numbers ON239274 to ON239277 for *I. balthica* and ON328328 to ON328331 for *G. gracilis*. In addition, voucher specimens were deposited in the Museum National d'Histoire Naturelle collections (MNHN, Paris, France) under voucher codes MNHN-IU-2021-7259, MNHN-IU-2021-7341, MNHN-IU-2021-6903 and MNHN-IU-2021-

6631 for *I. balthica* and PC0616710 to PC0616713 for *G. gracilis*. The *rbcL* sequences are from the voucher specimens.

Fertilization experiment:

Prior to the experiment, various reproductive fragments of thallus –approximately 10cm long– were taken from eight females and ten males. Groups of male and female thallus fragments were attached to plastic clips (Fig. 2) in order to move the algae easily in and out of the experimental aquaria. All male groups were similar and contained ten thallus fragments, each selected from a different male (the identity of experimental males is given in Table S2). For female groups, three thallus fragments from three randomly selected females were attached to a plastic clip (the identity of experimental females is given in Table S2).

Idotea balthica of varying sizes (1 to 3 centimeters) were isolated 24 hours before the experiments in a 2L oxygenated tank placed in the dark. A synthetic shelter was provided, and *Palmaria palmata* was used as a food source. The animals were then incubated with the clip of 10 selected reproductive males of *G. gracilis* (see above) for two hours. After incubation, animals were transferred to the experimental aquaria using a tea strainer and a brush. The tea strainer containing the animals was rinsed once in filtered seawater to limit the transport of spermatia by remaining seawater before placing 20 *I. balthica* in each experimental aquarium with a clean brush. The experiments were initiated right after the transfer of the isopods to the experimental aquaria.

Four different experimental conditions were established to test the role of *I. balthica* in *Gracilaria gracilis* fertilization (Fig. 2, Table S1). In the first two experimental conditions, males and females of *G. gracilis* were placed about 15 cm from each other in 2L experimental aquaria with or without *I. balthica* for one hour. This distance represents the natural environment where 50% of fertilizations occur between males and females separated by less than 33 cm (10) (Fig. 2A, 2B respectively, Movie S2). The other two experimental conditions correspond to *G. gracilis* females placed alone in 2L experimental aquaria with or without *I. balthica* preincubated with male gametophytes for one hour (Fig. 2D, 2E, respectively). At the beginning of this last experiment, a mock transfer was done to control for possible contamination of tanks by sperm not attached to the isopods. This involved plunging the tea strainer into the experimental aquaria after rinsing with filtered seawater. All experiments were performed in calm seawater to minimize the effect of exogenous water movements on gamete transport and to test only for the effect of isopod activity. All the experiments were replicated five times. After the experiments, each group of female thallus fragments was cultured independently in a 250 mL flask of enriched seawater under constant agitation, under a photoperiod of 12:12 at room temperature. The position of flasks in the culture chamber was randomized every two days. After three weeks, the number of cystocarps (i.e., successful fertilizations) was reported for each thallus fragment (Table S1).

Non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed-rank tests (one-sided), using the R-package *wilcox.test* (R Core Team 2021), were used to test for differences in numbers of cystocarps observed per centimeter of female thallus between experiments with and without *idotea*. Tests were performed independently for each pair of experiments (i.e., males and females *G. gracilis* without or with *I. balthica* and females of *G. gracilis* without or with *I. balthica* preincubated with males).

Confocal laser scanning microscopy (CLSM):

Mounting and fluorescent labeling. Idotea and algae were mounted in glass-bottom (#1.5H) microscopy dishes IBIDI (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) with the appropriate buffer (PBS for fixed specimens, seawater media for live imaging). The labeling/mounting protocols were optimized to reduce specimen manipulation as much as possible. All labeling and washing steps were performed in microcentrifuge tubes with either seawater (live imaging) or PBS (fixed samples).

Observation of male gametes on specimens of *I. balthica*. Isopods were incubated and collected on fertile male gametophytes of *G. gracilis* and then fixed with 4% formaldehyde. The chitinous tegument of the isopod was stained with calcofluor white (CFW, magenta) 0.2 mg/mL final (3h). In contrast, the conjugate Concanavalin A-AlexaFluor488 (ConA-AF488) 0.1 mg/mL final (10 min) was used to label specific carbohydrates (24) of the spermatia of *G. gracilis* and their mucilaginous projection (Fig.1 and Fig. S2).

Observation of live spermatia (Fig. S3). the conjugated ConA-AF488, 0.1 mg/mL final (10 min), was used to label carbohydrates of the spermatia of *G. gracilis* and their mucilaginous projection. Hoechst33342 (Molecular Probes®, H21492) at 5 µM was used for staining DNA (>30 min, no washing) and nuclei. Chloroplasts were localized from the autofluorescence of chlorophyll (red) and/or phycoerythrin (cyan).

Observation of live epiphyte organisms at the surface of *G. gracilis* (Fig. S4). The staining of the surface of the algae and cellular membranes of epiphytes (green) was achieved with DiOC6(3) (Molecular Probes®, D-273) at 1.5 µM final (>30 min, no washing). Hoechst33342 (Molecular Probes®, H21492) at 5 µM was used for staining DNA (>30 min, no washing) and nuclei (Blue). Chloroplasts were localized from the autofluorescence of chlorophyll (red) and/or phycoerythrin (cyan). Epiphytic diatoms at the surface of the thallus were morphologically identified as *Cocconeis scutellum* (27).

Microscopes. CLSM acquisitions were conducted on either a Leica inverted TCS SP8 equipped with a compact light supply unit (solid-state lasers 405/488/552/638 nm), LIAchroics beam splitter, regular PMTs detector, and objectives HC PL APO 40x/1.10 W motCORR CS2, HC PL APO 20x/0.75 IMM CORR CS2), or a Zeiss inverted LSM 780, equipped with the laser beamlines (DPSS 405nm, Argon 488nm, Diode 561nm and 633nm), a 32 channel GaAsP array detector, and objectives C-Apochromat 10x/0.45 W, LD LCI Plan-Apochromat 25x/0,8 Imm Korr DIC and LD C-Apochromat 40x/1,1 W Korr.

Image acquisitions. All multidimensional Z-stacks were acquired with water immersion objectives, averaging (2 to 4 times). The fluorescence channels were acquired sequentially when necessary to avoid crosstalk (e.g., Hoechst or Calcofluor white with AlexaFluor 488). The signal acquisition was oversampled in the optical axis to allow reliable 3D-reconstructions. The pinhole diameter was set to match Airy1 value at the lowest fluorescence wavelength. The spectral settings for excitation and detection of fluorescence emission are: Hoechst, Ex405 / Em 420-470; CFW, Ex405 / Em 420-470; ConA-AF488 Ex488 / Em 500-520; DiOC6(3) Ex 488 / Em 500-520; Phycoerythrin Ex552 or 561 / Em 570-600; Chlorophyll Ex488 and/or638 / Em 680-700.

Image processing. 3D reconstructions from multidimensional Z-stacks, contrast adjustments, and rendering were performed with Imaris (8.0.2, Bitplane). False colors were used to distinguish different channels in the images: Hoechst or CFW, blue; DiOC6(3) or Cona-AF488, green; Phycoerythrin, cyan; Chlorophyll, red. In Figure 1, the contrast of the isopod body (CFW, counterstaining) was not adjusted linearly (gamma 2) better visualizing the external morphology of the host. The figures present snapshots of the 3D-models, and snapshot resolution is not directly correlated with raw image resolution. General image manipulations (cropping, drawing, scaling) were executed with Fiji (28), and figures were built with the FigureJ module (29), which may resize pixels. Some large specimens of idotea were acquired as a mosaic of positions which were stitched together with the proprietary software of the microscope manufacturer (either LasX, Leica, or Zen, Zeiss). The figures S4D and 4E are Z-stack where the Depth of Focus had been extended by Sobel Projection from the transmitted light channel (CLIJ2 module, 30).

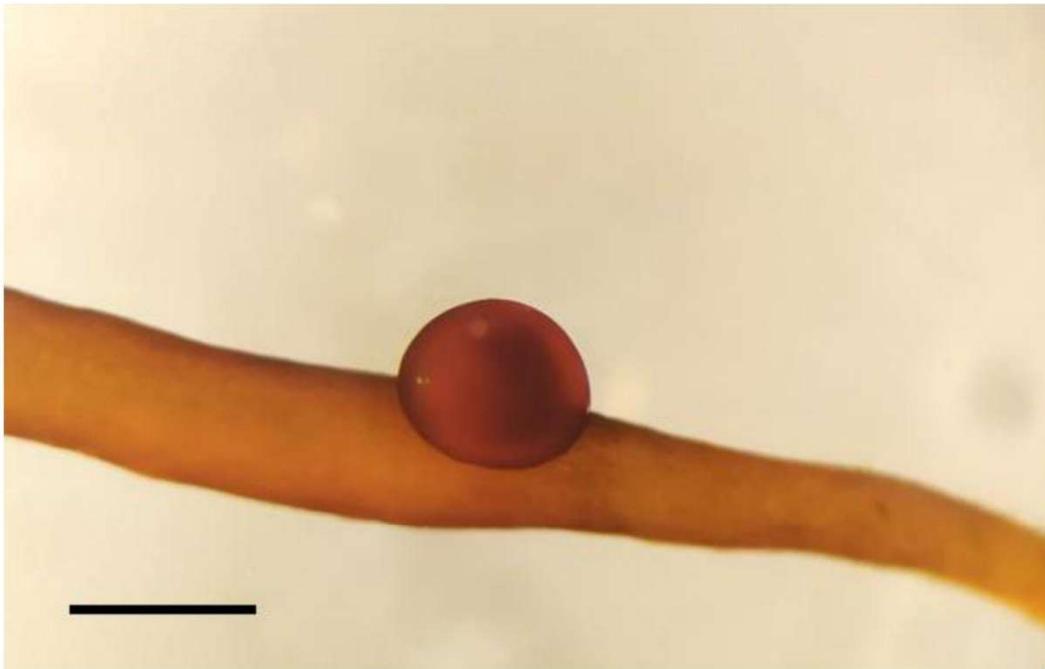


Fig. S1. Macroscopic view of a cystocarp on the surface of the *G. gracilis* female thallus

Fertilization occurs in the female thallus, where the zygote then develops into a diploid sporogenous tissue, protected and nurtured by the parental haploid female thallus. This complex structure called cystocarp corresponds to a single fertilization event. The scale bar is 1mm.

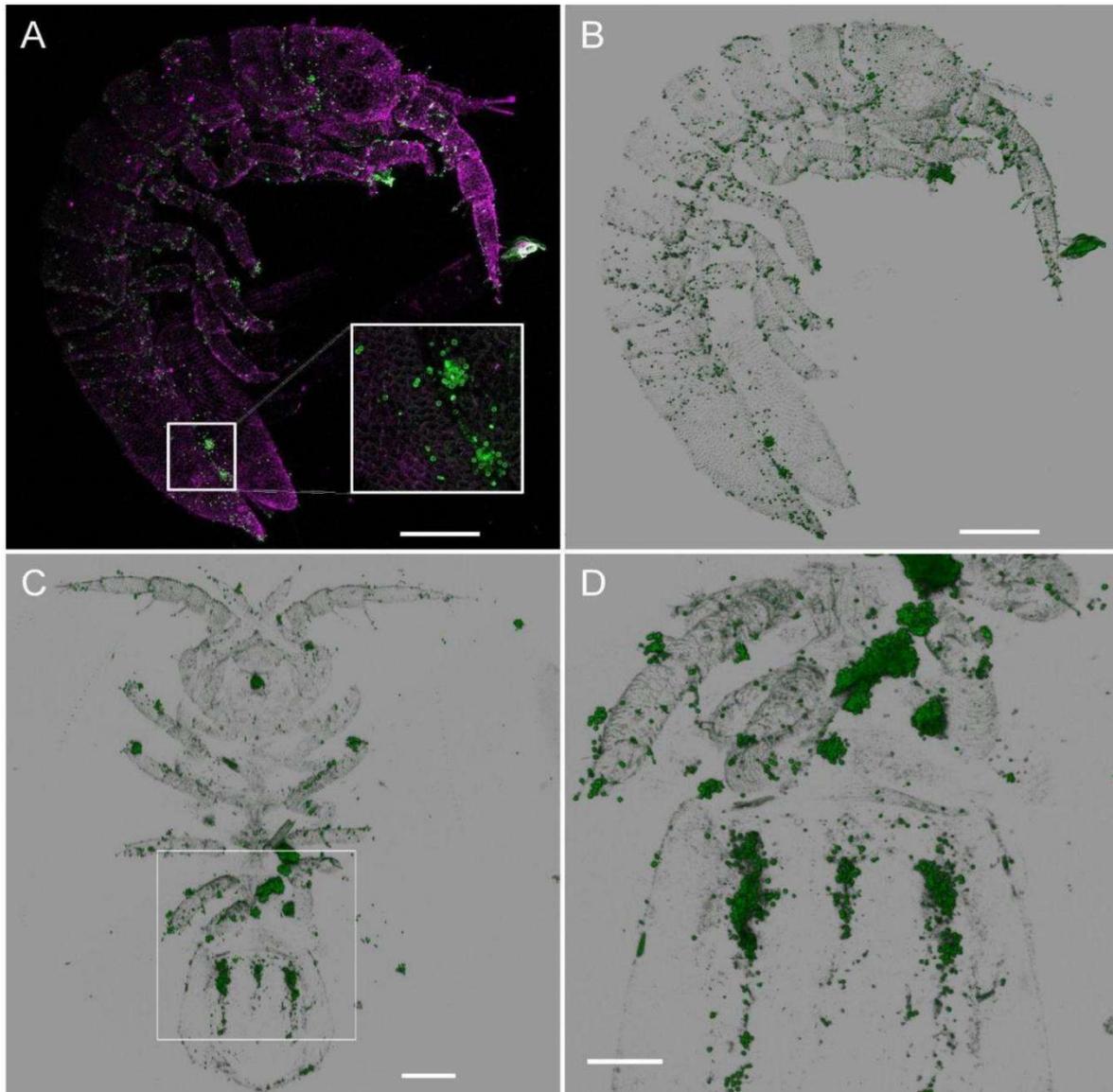


Fig. S2. Other views of *I. balthica* harboring *G. gracilis* male gametes (3D reconstructions of fixed specimens).

The sperm of *G. gracilis* are distributed over the entire surface of the body and aggregate mainly on the pereopods, pleopods, and around the joints of exoskeleton segments. (A) A maximum projection rendering of the specimen with a close-up on the tail (pleopods). (B) A solid rendering of the green channel reveals the sperm and a limited staining of the chitinous teguments of the host by ConA-AF488. (C) Ventral views of another specimen. (D) Close-up of C-inset. The 3D model was reconstructed from a mosaic of CLSM Z-stack acquisitions with a 20x water immersion objective. Scale bars are 200µm in panels (A), (B), (C), and 100µm in panel (D)

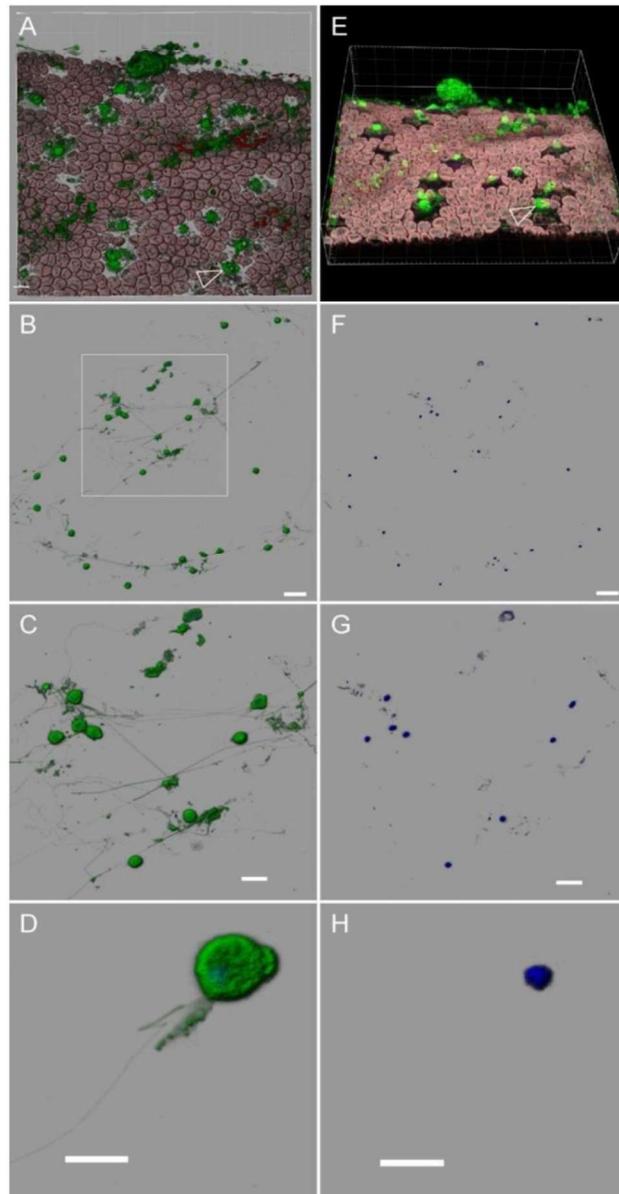


Fig. S3. The male gametes of *G. gracilis* are produced and released at the surface of the thallus.

(A) and (E) (tilted view) is a 3D reconstruction of a surface area from a live specimen of male gametophyte of *G. gracilis* imaged by means of CLSM. They illustrate the release of male gametes (ConA-AF488 staining, green) at the surface of the thallus (chloroplasts of cortical cells are pink as chlorophyll fluorescence, red, colocalizes with the phycoerythrin fluorescence, cyan). (B), (C) and (D): The mucilage surrounding the gametes is stained with ConA-AF488 (green), and it is also detected at the surface of the male conceptacles. These sites are depigmented since spermatia, and spermatangial parent cells do not show active chloroplasts. Arrows indicate conceptacle ostioles (in green). There is an ‘empty’ space between cortical cell chloroplasts and these greenish spots since the external cell wall is not visible. The spermatia show trailing mucilaginous appendages (mucus extensions) visible in (B), (C), and (D) (gametes alive). (F), (G) and (H): The staining of the DNA with Hoechst 33342 (blue) reveals the nuclei. (D) typical spherical morphology of the spermatia, circa 4.5 μ m in diameter, with their noticeable bump and external trailing mucilaginous appendages. Scale bars are 10 μ m in panels (A), (E), (B), (F), (C), (G), and 5 μ m in panels (D) and (H).

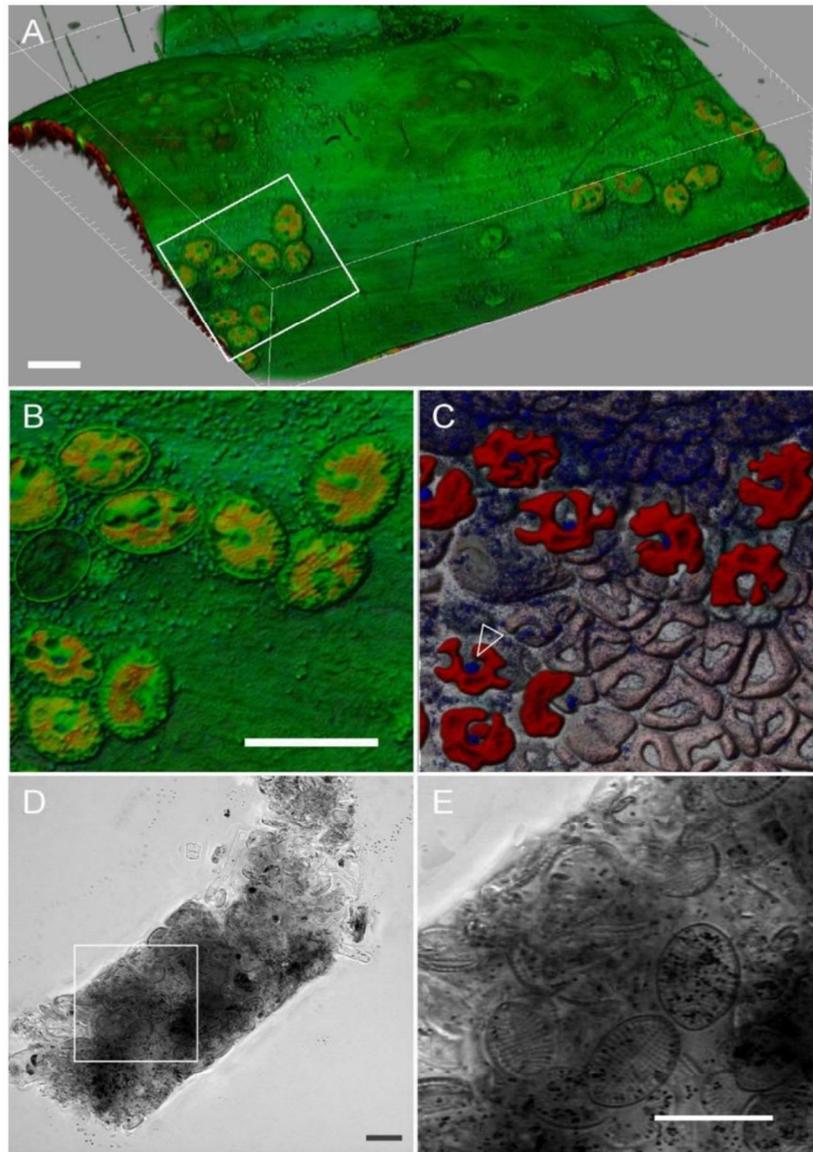


Fig. S4. Epiphytic diatoms on the red alga female contribute to the diet of the isopod.

Epiphytic organisms on the surface of the female thallus of *G. gracilis* sampled in the field (coccioid or filamentous bacteria, multicellular algae and diatoms). (A) Solid rendering of a 3D-reconstruction from a CLSM acquisition of a live specimen of female *G. gracilis*. The staining of the surface of the algae and cellular membranes of epiphytes (green) was achieved with DiOC6(3). Chloroplasts were localized from the fluorescence of chlorophyll (red) and/or phycoerythrin (cyan). Hoechst was used for staining DNA (Blue) with a limited diffusion into the cortical cells of *G. gracilis*. (B) Close-up of a diatom patch in A-inset showcases the presence of monoraphid diatoms. (C) Nuclei and chloroplasts (arrowhead) of diatoms are visible after removing the green channel. The chloroplasts of the cortical cells of *G. gracilis* look pinkish as they display both chlorophyll (red) and phycoerythrin (cyan) fluorescence. (D) Fecal pellets of *I. balthica* reared with *G. gracilis* revealed a large number of diatom frustules (close-up (E) identified morphologically as *Cocconeis scutellum* (27). Scale bars are 20 μ m.

Table S1. Number of cystocarps, thalli length, and fertility success from each of the five replicates in the four experimental conditions. Total, mean and standard error (SE) of the number of cystocarps, thalli length and fertility success, and median fertility success are also given.

		Males and females	Males and females with idoteas	Females	Females with idoteas
<i>Replicate 1</i>	Number of cystocarps	2	24	0	3
	Thalli length (cm)	329.5	427.5	347.7	396.7
	Number of cystocarps/cm	0.01	0.06	0.00	0.01
<i>Replicate 2</i>	Number of cystocarps	6	83	0	3
	Thalli length (cm)	273.0	408.5	434.2	443.6
	Number of cystocarps/cm	0.02	0.20	0.00	0.01
<i>Replicate 3</i>	Number of cystocarps	43	634	2	38
	Thalli length (cm)	262.7	276.5	206.4	273.6
	Number of cystocarps/cm	0.16	2.29	0.01	0.14
<i>Replicate 4</i>	Number of cystocarps	3	338	0	84
	Thalli length (cm)	402.7	315.3	325.8	375.0
	Number of cystocarps/cm	0.01	1.07	0.00	0.22
<i>Replicate 5</i>	Number of cystocarps	0	182	0	50
	Thalli length (cm)	296.5	350.2	267.5	308.4
	Number of cystocarps/cm	0.00	0.52	0.00	0.16
<i>Total</i>	Number of cystocarps	54	1261	2	178
	Thalli length (cm)	1564.4	1778.0	1581.6	1797.3
	Number of cystocarps/cm	0.035	0.709	0.001	0.099
<i>Mean (SE)</i>	Number of cystocarps	10.8 (8.1)	252.2 (109.3)	0.4 (0.4)	35.6 (15.3)
	Thalli length (cm)	312.9 (25.2)	355.6 (28.2)	316.3 (38.4)	359.5 (30.6)
	Number of cystocarps/cm	0.040 (0.031)	0.829 (0.405)	0.002 (0.002)	0.108 (0.043)
<i>Median</i>	Number of cystocarps/cm	0.007	0.520	0.000	0.139

Table S2. Identities of males and females used in each replicate.

Replicates	Female identities	Male identities
1	32, 125, 173	3, 240, 54, 151, 20, 87, 9, 12, 61, 181
2	23, 30, 163	3, 240, 54, 151, 20, 87, 9, 12, 61, 181
3	32, 163, 249	3, 240, 54, 151, 20, 87, 9, 12, 61, 181
4	30, 86, 125	3, 240, 54, 151, 20, 87, 9, 12, 61, 181
5	23, 86, 163	3, 240, 54, 151, 20, 87, 9, 12, 61, 181

References and Notes

1. D. A. Grimaldi, M. S. Engel, *Evolution of the Insects* (Cambridge Univ. Press, 2005).
2. C. J. van der Kooi, J. Ollerton, The origins of flowering plants and pollinators. *Science* **368**, 1306–1308 (2020).
3. J. D. Ackerman, Abiotic pollen and pollination: Ecological, functional, and evolutionary perspectives. *Plant Syst. Evol.* **222**, 167–185 (2000).
4. B. I. van Tussenbroek, L. Monroy-Velazquez, V. Solis-Weiss, Meso-fauna foraging on seagrass pollen may serve in marine zoophilous pollination. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **469**, 1–6 (2012).
5. B. I. van Tussenbroek, N. Villamil, J. Márquez-Guzmán, R. Wong, L. V. Monroy-Velázquez, V. Solis-Weiss, Experimental evidence of pollination in marine flowers by invertebrate fauna. *Nat. Commun.* **7**, 12980 (2016).
6. G. J. Vermeij, R. K. Grosberg, The great divergence: When did diversity on land exceed that in the sea? *Integr. Comp. Biol.* **50**, 675–682 (2010).
7. R. B. Searles, The strategy of the red algal life history. *Am. Nat.* **115**, 113–120 (1980).
8. J. Ollerton, *Pollinators and Pollination: Nature and Society* (Pelagic Publishing, 2021).
9. C. Destombe, J. Godin, J.-M. Remy, Viability and dissemination of spermatia of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* **204-205**, 219–223 (1990).
10. C. R. Engel, R. Wattier, C. Destombe, M. Valero, Performance of non-motile male gametes in the sea: Analysis of paternity and fertilization success in a natural population of a red seaweed, *Gracilaria gracilis*. *Proc. Biol. Sci.* **266**, 1879–1886 (1999).
11. C. R. Engel, C. Destombe, Reproductive ecology of an intertidal red seaweed, *Gracilaria gracilis*: Influence of high and low tides on fertilization success. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **82**, 189–192 (2002).
12. T. M. Bell, E. E. Sotka, Local adaptation in adult feeding preference and juvenile performance in the generalist herbivore *Idotea balthica*. *Oecologia* **170**, 383–393 (2012).
13. C. F. Aumack, C. D. Amsler, J. B. McClintock, B. J. Baker, Impacts of mesograzers on epiphyte and endophyte growth associated with chemically defended macroalgae from the western Antarctic peninsula: A mesocosm experiment. *J. Phycol.* **47**, 36–41 (2011).
14. C. D. Amsler, J. B. McClintock, B. J. Baker, Chemical mediation of mutualistic interactions between macroalgae and mesograzers structure unique coastal communities along the western Antarctic Peninsula. *J. Phycol.* **50**, 1–10 (2014).
15. G. Mancinelli, L. Rossi, Indirect, size-dependent effects of crustacean mesograzers on the Rhodophyta *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss: Evidence from a short-term study in the Lesina Lagoon (Italy). *Mar. Biol.* **138**, 1163–1173 (2001).
16. S. Fredericq, M. H. Hommersand, Proposal of the gracilariales ord. Nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. *J. Phycol.* **25**, 213–227 (1989).

17. S. M. Wilson, J. D. Pickett-Heaps, J. A. West, Fertilization and the cytoskeleton in the red alga *Bostrychia moritziana* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* **37**, 509–522 (2002).
18. C. Larue, E. Austruy, G. Basset, R. J. Petit, Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): An integrated approach. *Bot. Lett.* **168**, 348–372 (2021).
19. S. D. Klavins, D. W. Kellogg, M. Krings, E. L. Taylor, T. N. Taylor, Coprolites in a Middle Triassic cycad pollen cone: Evidence for insect pollination in early cycads? *Evol. Ecol. Res.* **7**, 479–488 (2005).
20. T. Bao, B. Wang, J. Li, D. Dilcher, Pollination of Cretaceous flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 24707–24711 (2019).
21. N. Cronberg, R. Natcheva, K. Hedlund, Microarthropods mediate sperm transfer in mosses. *Science* **313**, 1255–1255 (2006).
22. E. C. Yang, S. M. Boo, D. Bhattacharya, G. W. Saunders, A. H. Knoll, S. Fredericq, L. Graf, H. S. Yoon, Divergence time estimates and the evolution of major lineages in the florideophyte red algae. *Sci. Rep.* **6**, 21361 (2016).
23. D. H. Erwin, M. Laflamme, S. M. Tweedt, E. A. Sperling, D. Pisani, K. J. Peterson, The Cambrian conundrum: Early divergence and later ecological success in the early history of animals. *Science* **334**, 1091–1097 (2011).
24. S. H. Kim, G. H. Kim, Cell-cell recognition during fertilization in the red alga, *Aglaothamnion oosumiense* (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Hydrobiologia* **398/399**, 81–89 (1999).
25. M. Panova, A. Nygren, P. R. Jonsson, S. Leidenberger, A molecular phylogeny of the north-east Atlantic species of the genus *Idotea* (Isopoda) with focus on the Baltic Sea. *Zool. Scr.* **46**, 188–199 (2017).
26. C. F. Gurgel, S. Fredericq, Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): A critical assessment based on rbcL sequence analyses. *J. Phycol.* **40**, 138–159 (2004).
27. S. Wang, G. Wang, F. Weinberger, D. Bian, M. Nakaoka, M. Lenz, Anti-epiphyte defenses in the red seaweed *Gracilaria vermiculophylla*: Non-native algae are better defended than their native conspecifics. *J. Ecol.* **105**, 445–457 (2017).
28. J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
29. J. Mutterer, E. Zinck, Quick-and-clean article figures with FigureJ. *J. Microsc.* **252**, 89–91 (2013).
30. R. Haase, L. A. Royer, P. Steinbach, D. Schmidt, A. Dibrov, U. Schmidt, M. Weigert, N. Maghelli, P. Tomancak, F. Jug, E. W. Myers, CLIJ: GPU-accelerated image processing for everyone. *Nat. Methods* **17**, 5–6 (2020).

4.3 Mutualisme entre *Idotea balthica* et les *Gracilaria gracilis*

L'article précédent suggère que les relations entre *G. gracilis* et *I. balthica* seraient de type mutualiste à bénéfices réciproques : l'algue produisant abris et nourriture pour l'idotée tandis que l'idotée augmente le succès de fécondation et la croissance de l'algue. L'espèce *Idotea balthica* se rencontre parmi les algues marines fixées ou flottantes dans les zones intertidales et subtidales très peu profondes sous toutes les latitudes tempérées (Naylor, 1955). En mer Baltique, *I. balthica* à l'âge adulte se nourrit essentiellement sur l'algue brune *Fucus vesiculosus* (Nicotri, 1980 ; Salemaa, 1987 ; Jormalainen et al., 2001), une algue commune dans l'océan Atlantique Nord. En dehors de la mer Baltique, l'écologie et la biologie d'*I. balthica* restent peu étudiées (Mancinelli et Rossi, 2001 ; Bell et Sotka, 2012). Il était donc important d'étudier la répartition des idotées dans le milieu naturel, afin de mieux comprendre leur histoire de vie et leur préférence éventuelle vis-à-vis des macroalgues. Il s'agissait en particulier d'étudier leur fréquence et leur taille sur différentes espèces de macroalgues.

Par ailleurs, comme nous avons mis en évidence la présence de spermaties à la surface de la carapace des idotées, nous nous sommes demandés si ces isopodes pouvaient participer mécaniquement à la libération des gamètes mâles en broutant, par frottement ou par l'effet de leur ventilation branchiale, facilitant ainsi la sortie des spermaties. Pour tester cette hypothèse, nous avons mis en place au laboratoire une expérience réalisée dans le cadre du stage IntechMer d'Hugo Berrenger. Celle-ci consistait à compter le nombre de spermaties libérées en présence ou en absence d'idotées. Ces observations et expériences ont été mises en place afin d'approfondir la nature et la spécificité de la relation entre *G. gracilis* et *I. balthica*.

4.3.1 Matériels et méthodes

4.3.1.1 Présentation de l'espèce *Idotea balthica*

Idotea balthica est un isopode qui possède un corps long, ovale, et aplati dorso-ventralement. À maturité cette espèce présente un dimorphisme de taille entre sexes, les femelles sont plus petites que les mâles (Vesakoski et al., 2008). Sa couleur varie du jaunâtre au brun rouge avec parfois des taches blanches et des lignes blanches longitudinales (Salemaa, 1987). Le péréion (thorax) est formé de 7 segments thoraciques identiques et le pléon (l'abdomen) de 3 segments abdominaux. Les péréiopodes sont munis de crochets et de soies (Poore, 2001) qui leur confèrent la possibilité de s'agripper fermement aux algues. *Idotea balthica* se rencontre essentiellement sur des végétaux fixés à la roche ou dans le sable (*Fucus vesiculosus*, *Zoostera marina*, *Gracilaria gracilis*, *Ulva lactuca*, etc...) ainsi que sur des algues en épaves non fixées (Nicotri, 1980). Elle présente une activité de nage maximale au crépuscule, se déplaçant d'algues en algues (Mancinelli et Rossi, 2001).

Idotea balthica se caractérise par un polychromatisme important. Cette variation d'origine génétique peut aussi être influencée par certains facteurs environnementaux (Hargeby et al., 2004). En effet, la consommation de certaines algues peut affecter la couleur de l'intestin et des fluides corporels. La phase de mue, elle, modifie la transparence de la chitine. En outre *Idotea*, comme beaucoup d'autres crustacés, peut changer sa couleur tégumentaire qui sera déterminée par les informations visuelles de l'environnement, influençant la dispersion ou l'agrégation de pigments de mélanine dans les chromatophores des téguments (Suneson, 1947 ; Needham, 1974). Par conséquent, ces animaux pourraient être capables de se camoufler activement en fonction du support sur lequel ils se trouvent (Salemaa, 1987). Les femelles se trouvant le plus souvent sur les parties basales de l'algue, une partie moins exposée au soleil et donc plus colorée, leur carapace est donc de couleur souvent plus foncée que celle des mâles (Jormalainen et al., 2001). Une différence de fréquences des morphotypes de couleur a été montrée entre les sexes en mer Baltique (Jormalainen et al., 1995).

4.3.1.2 Dénombrement et mesure des idotées

Les idotées ont été échantillonnées sur différentes espèces d'algues dans des cuvettes rocheuses de la côte Nord-Est de l'île Callot (43°13'15.95", 5°22'29.08") en Bretagne. Une centaine

d'individus de *G. gracilis* a été prélevée au hasard dans deux sites séparés par une centaine de mètres puis mis dans des sacs en plastique individuels afin de conserver la faune associée. Pour chacun de ces deux sites, 3 lots d'une trentaine d'autres espèces d'algues ont également été prélevées. Le premier lot était composé de *Fucus serratus* (Linné, 1753), le second d'*Ulva sp.* (Linné, 1753) et le troisième de diverses espèces d'algues brunes et rouges en épaves. Au laboratoire, les algues ont été mises individuellement dans un bain d'eau douce pendant quelques minutes afin de récolter les idotées, puisque ce traitement leur permet de se décrocher du thalle plus facilement. Le nombre d'idotées par individu hôte a été compté puis les isopodes ont été remis dans de l'eau de mer. Après le dénombrement, deux échantillons d'une centaine d'idotées chacun, ont été tirés au hasard, l'un provenant du lot de *G. gracilis* et l'autre provenant d'un lot d'algues composées de *Fucus serratus*, d'*Ulva sp.* et d'algues en épaves. Les idotées ont ensuite été endormies dans un bain d'eau saturée en CO₂, puis elles ont été placées sur un papier millimétré afin de les mesurer. La taille des idotées de chacun des deux lots a été mesurée en prenant en compte la longueur totale du corps, c'est-à-dire de la tête au telson sans tenir compte des antennes. Après avoir été mesurées, les idotées ont été replacées dans l'eau de mer pour leur réveil.

4.3.1.3 Expérience sur la libération des spermatis

Six individus mâles de *G. gracilis* ont été récoltés dans la population de Locquirec juste avant le début de l'expérience. Des fragments de chaque mâle d'égale longueur ont été répartis dans six aquariums d'eau de mer de 1.5 L, renouvelée quotidiennement, avec un bulleur et sous une photopériode 12:12. Dans trois de ces aquariums, les mâles ont été incubés avec des idotées en nombre différent : un aquarium avec 10 idotées, un aquarium avec 15 idotées et un aquarium avec 20 idotées. Dans les trois autres aquariums, les mâles ont été incubés seuls, sans idotées. L'expérience a duré 30 jours et les spermatis ont été dénombrées tous les 5 jours à partir du premier jour d'incubation. Pour cela 100mL d'eau ont été prélevés dans chaque aquarium puis filtrés sur 3µm. Puis 50 µL de concanavaleine A (couplée à un fluorochrome AlexaFluor488) à 0.1 mg/mL ont été ajoutés. Après 20 min les filtres ont été rincés et observés au microscope à fluorescence LEICA DMi8. Les spermatis ont été dénombrées sur 20 champs. Le nombre de gamètes libérés depuis le début de l'expérimentation a ensuite été calculé pour chaque temps d'expérimentation (i.e., de T0 à T30).

4.3.2 Résultats

4.3.2.1 Fréquences des idotées en populations naturelles

Le nombre d'idotées observées sur le terrain varie en fonction du substrat. Sur 2422 idotées échantillonnées, 86% ont été trouvées sur *G. gracilis*, 5.5% ont été isolées à partir d'algues en épaves, 4.5% sur *Fucus serratus* et 3.5% sur les Ulves (**Tableau 4.1**). La densité des idotées exprimée par rapport à la masse d'algues fraîches est d'en moyenne 1.92 idotées/g chez *G. gracilis*, soit trente fois plus que chez *Fucus serratus*, avec en moyenne 0.07 idotées/g, et vingt fois plus que chez *Ulva sp.*, avec en moyenne 0.10 idotées/g (**Tableau 4.1**). La densité moyenne est de 0.34 idotées/g dans les épaves et est donc plus élevée que chez *F. serratus* et *Ulva sp.* Chez *G. gracilis*, il y a en moyenne $15,98 \pm 18,93$ idotées par individu. Il y a une grande disparité dans la distribution des idotées avec 10% d'individus n'abritant aucune idotée tandis que plus de 15% en présentent au moins 40.

Tableau 4.1. Distribution du nombre d'idotées et leur densité selon le type de substrat.

	<i>G. gracilis</i>	<i>F. serratus</i>	<i>Ulva sp.</i>	Epaves
Nombre d'idotées	2091	111	86	134
Masse d'algue (g)	1091	1650	885	400
Densité d'idotées (Nb. ind. /g)	1.92	0.07	0.10	0.34

L'analyse de la taille des idotées réalisée sur un total de 238 individus (dont 109 prélevées sur *G. gracilis* et 129 sur les autres algues (*F. serratus*, *Ulves* et épaves) montrent que les idotées accrochées à *G. gracilis* sont significativement plus petites ($x = 5,3 \pm 2.94$ mm) que celles rencontrées sur les autres algues ($x = 9.25$ mm $\pm 5,73$) (Anova $F=43,03$, $P<0.0001$ (**Figure 4.1**)).

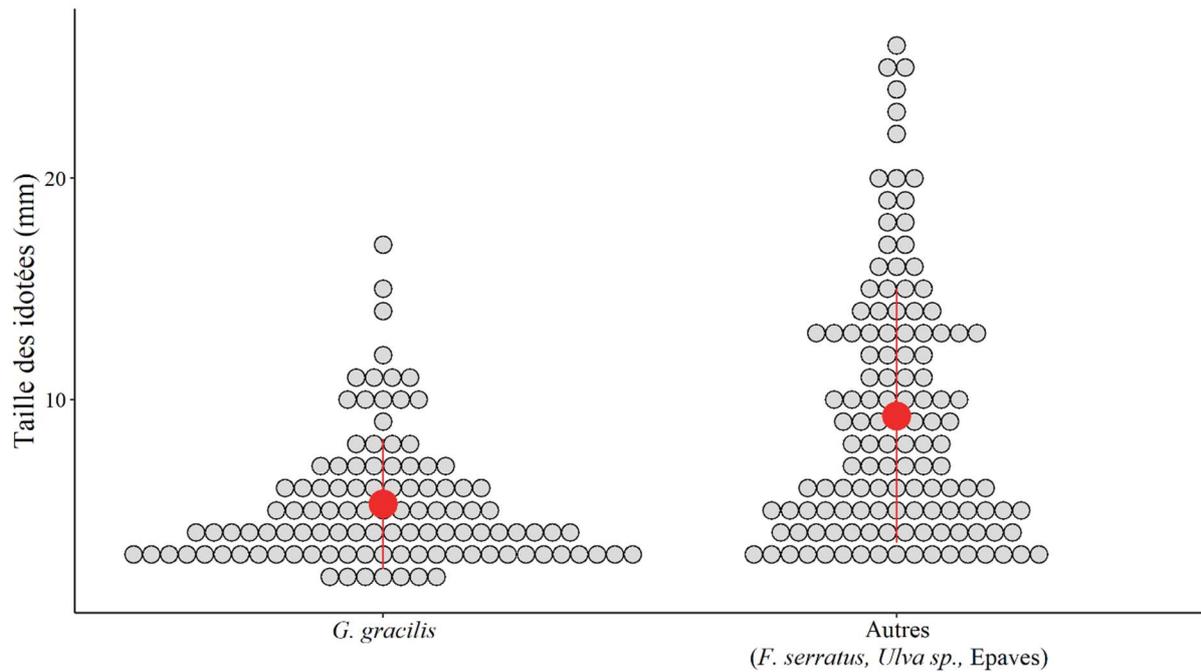


Figure 4.1. Distribution des tailles d’idotées selon leur substrat : *G. gracilis* ou les autres algues (*F. serratus*, *Ulva sp.*, algues en épave)

4.3.2.2 Influence des idotées sur la libération des spermatis

Les résultats obtenus dans cette expérience montrent que la présence d’idotées favorise la libération des spermatis. En effet, il existe une différence significative entre le nombre de spermatis libérées par jour dans les aquariums avec et sans idotées (Kruskal-Wallis, $X^2 = 39.986$, $ddl = 1$, $p < 0.001$). Notamment, après 5 jours d’incubation, la production de spermatis augmente fortement en présence d’idotées, tandis qu’en leur absence elle se stabilise (**Figure 4.2**). Par ailleurs, le nombre de spermatis libérées tend à augmenter avec le nombre d’idotées présentes dans les aquariums (**Figure 4.3**).

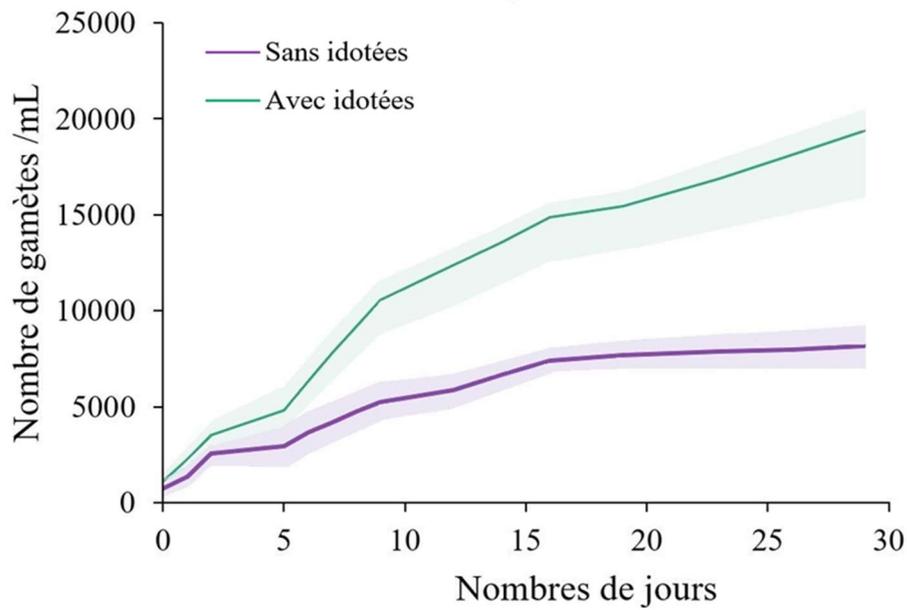


Figure 4.2. Nombre de gamètes produits cumulés sur une période de 30 jours pour un groupe de 6 mâles de *Gracilaria gracilis* avec ou sans idotées.

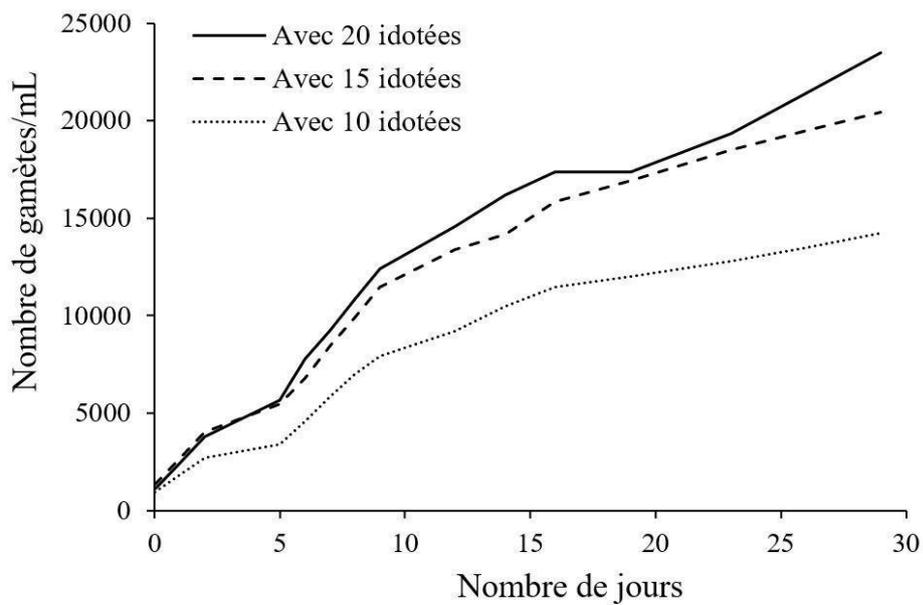


Figure 4.3. Nombre de gamètes produits cumulés sur une période de 30 jours pour un groupe de 6 mâles de *Gracilaria gracilis* avec 10, 15 ou 20 idotées.

4.4 Discussion

Dans ce chapitre nous montrons, pour la première fois, que la rencontre des gamètes chez l'algue rouge *G. gracilis* peut être favorisée par l'isopode *I. balthica*. En effet, la présence d'idotées augmente le nombre de fécondations et les spermatis sont transportées directement par l'isopode en adhérant à sa cuticule. Cette découverte remet en question l'histoire évolutive des relations mutualistes animaux/végétaux liées au transport de gamètes mâles de ces derniers. En effet, une hypothèse souvent émise est que la pollinisation animale serait apparue avec la radiation des angiospermes, il y a 140 millions d'années (Van der Kooi et Ollerton, 2020). Cette hypothèse a toutefois été critiquée car le pollen de dizaines d'espèces de cycadales, un groupe de plantes phylogénétiquement proches des gymnospermes ayant divergé il y a quelque 250 millions d'années, est aussi transporté par les animaux (Toon et al., 2020 ; Van der Kooi et Ollerton, 2020). La divergence de ce groupe reste toutefois très postérieure à la colonisation du milieu terrestre par les plantes qui s'est produite lors de la transition entre le Précambrien et le Phanérozoïque (il y a 600-500 millions d'années ; Heckman et al., 2001 ; Magallón et Hilu, 2009), ne remettant donc pas en cause une origine de la pollinisation en milieu terrestre. Or, nos résultats montrent que de telles relations existent en milieu marin entre une algue rouge et un invertébré marin. Les Florideophycées se sont différenciées il y a environ 900 millions d'années (Yang et al., 2016) et les premiers animaux pluricellulaires il y a environ 650 millions d'années (Erwin et al., 2011) soit bien avant la colonisation du milieu terrestre par les plantes. Ceci suggère donc que le rôle des animaux dans la fécondation des végétaux pourrait avoir évolué en milieu marin. L'existence de relations très anciennes entre des végétaux et des animaux transportant leur gamètes dans le groupe des Archaeplastida (i.e., le groupe incluant algues rouges, algues vertes et plantes) et prenant leur origine dans un milieu aquatique, est appuyée par les observations réalisées chez les algues rouges (notre étude; Lavaut et al., 2022), les mousses (Cronberg et al., 2006; Shortlidge et al., 2021), les plantes sans fleurs (e.g. les cycades; Toon et al., 2020) et les plantes à fleurs (Ollerton et al., 2011). Chez les algues rouges, les mousses et les cycades, la fécondation se fait en présence d'eau (Paolillo, 1981). L'origine des algues rouges étant plus ancienne que la radiation des grands groupes d'animaux (500 millions d'années antérieure à "l'explosion du Cambrien" ; Erwin et al., 2011), on pourrait faire l'hypothèse que les gamètes mâles des rhodophytes ont tout d'abord été transportés seulement par les mouvements d'eau. Il est toutefois à noter que l'origine des animaux est encore très controversée et que plusieurs études phylogénétiques (Wang et al., 1999 ; Heckman et al., 2001) ainsi que des travaux basés sur de nouvelles interprétations du registre fossile (Budd

et Jensen, 2000 ; Fedonkin, 2003 ; Cohen et al., 2009) proposent que les premiers animaux seraient apparus bien avant le Cambrien. Des dates de divergence entre nématodes et arthropodes remontant à environ 1000 millions d'années ont par exemple été proposées (Wang et al., 1999 ; Heckman et al., 2001). La période initiale de transport des gamètes des algues rouges, sans l'aide des animaux, aurait donc pu être plus courte que ce que laissent supposer les études les plus restrictives sur la diversification des animaux. Il est toutefois possible que toutes ces relations végétaux/animaux soient récentes et aient évolué indépendamment en parallèle dans les grands groupes d'Archaeplastida. L'existence d'évolution indépendante et convergente dans différents groupes d'Archaeplastida a été montrée pour d'autres traits comme la multicellularité ou l'architecture du génome de leur chloroplastes (Parfrey et Lahr, 2013 ; Lee et al., 2016). Si certaines associations entre plantes et pollinisateurs hautement spécialisées sont très stables durant de longues périodes de temps (comme la relation mutualiste entre les Ficus et les guêpes pollinisatrices de la famille des Agaoninae, ininterrompue depuis de plus de 60 millions d'années ; Rønsted et al., 2005), les relations entre pollinisateurs généralistes et leurs plantes hôtes peuvent être beaucoup plus labiles (Althoff et al., 2012 ; Trøjelsgaard et al., 2013). Nos résultats ne permettent pas pour le moment de répondre à ces questions mais des expériences futures pourraient être menées pour tester la potentielle histoire évolutive des relations entre algues rouges et animaux marins transporteurs de gamètes. Par exemple, il serait intéressant de tester si ces relations existent dans tous ou une majorité des grands ordres d'algues rouges (voir Yang et al., 2016), cela pourrait nous renseigner sur leur ancienneté et nous permettre d'estimer une date d'origine. Des études testant les interactions entre différentes paires d'espèces algues/animaux pourraient aussi nous permettre de savoir si ces relations sont spécifiques à *G. gracilis* et *I. balthica* ou si elles sont générales et impliquent de nombreuses espèces d'animaux marins dans la reproduction des algues rouges.

Nos résultats, conjointement à ceux d'études écologiques menées sur le terrain et en laboratoire et portant sur l'écologie des Idotées (Nicotri, 1980 ; Mancinelli et Rossi, 2001 ; Hargeby et al., 2004 ; Vesakoski et al., 2008), nous permettent de proposer que la relation entre *G. gracilis* et *I. balthica* serait de type mutualiste à bénéfices réciproques. Les idotées se nourrissant des épiphytes de l'algue rouge pourraient avoir un impact positif sur sa photosynthèse et sa croissance et leur capacité à transporter les gamètes mâles pourrait également augmenter le succès reproducteur de l'algue ; il est possible qu'en retour les idotées utilisent l'algue en tant qu'habitat, protection contre les prédateurs et "garde-manger" (i.e., substrat sur lequel pousse les épiphytes).

En mer Baltique, les idiotées sont trouvées essentiellement sur *Fucus vesiculosus* (Schaffelke et al., 1995 ; Malm, 1999). En Bretagne, nos résultats montrent qu'elles sont préférentiellement associées à *G. gracilis*. En particulier, nos observations montrent que *G. gracilis* héberge les plus petits individus, correspondant d'une part aux cohortes des premiers stades de développement d'*I. balthica* et aux femelles adultes, en revanche les plus grands individus (probablement des mâles) sont trouvés sur *Fucus serratus*. Ceci est en accord avec les expérimentations menées par Vesakoski et collaborateurs (2008) qui démontrent un trade-off spécifique au sexe, c'est-à-dire une différence de compromis entre les risques et les ressources, les femelles se dissimulant plus que les mâles tandis que ces derniers montreraient des comportements plus risqués, comme nager entre les algues durant la journée. Nos résultats confirment par ailleurs les observations de Naylor (1955), qui montraient que les juvéniles d'*Idotea granulosa* se trouvaient essentiellement sur une algue rouge (*Palmaria palmata*) et les adultes sur différentes espèces d'algues brunes. Ces observations vont dans le sens de notre hypothèse selon laquelle les gracilaires offriraient un abri contre les prédateurs, car les idiotées de petites tailles et de couleur rouge sombre s'accrochent et se dissimulent plus facilement dans une gracilaire que celles de grandes tailles. Enfin les expériences complémentaires que nous avons réalisées au laboratoire suggèrent que la présence d'idotées chez *G. gracilis* favorise la libération des gamètes. En effet, dans notre étude, l'effet des isopodes est détectable dès le début de l'expérience ce qui suggère une influence directe de ces derniers. De plus, la proportionnalité entre le nombre d'idotées et le nombre de gamètes libérés suggère que cette action est essentiellement mécanique. Comment expliquer cet effet ? Différentes hypothèses non exclusives peuvent être avancées. Premièrement, on peut supposer que les idiotées en broutant le biofilm et les microorganismes à la surface de l'algue ou en circulant le long de celui-ci, en s'y accrochant fermement, vont nettoyer les ostioles des cryptes mâles et favoriser la libération des spermaties. La photo en microscopie confocale (réalisée par Sébastien Colin) de la surface d'un thalle mâle de *G. gracilis* montre clairement que les spermaties sont libérées par un ostiole qui se forme au-dessus des cryptes mâles (**Figure 4.4**).

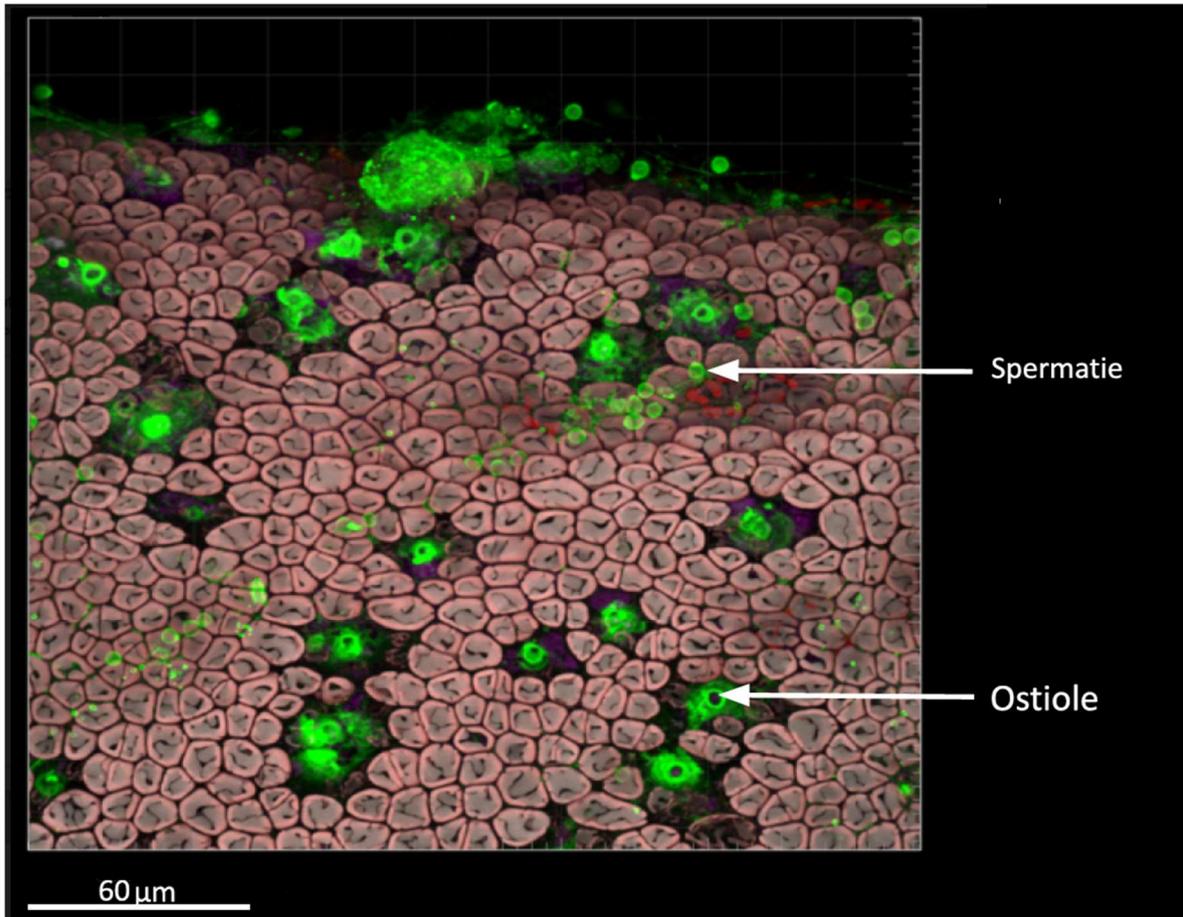


Figure 4.4. Reconstruction 3D de la surface du thalle d'un gamétophyte mâle de *G. gracilis*. Le mucilage entourant les spermatis, et également accumulé autour de l'ouverture des ostioles, est révélé par une coloration à la ConA-AF488. D'après Lavaut et al., 2022, Fig. S3A.

Cette ouverture a la taille d'un gamète et on peut penser qu'il peut s'obstruer facilement. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi les gamétophytes mâles reproducteurs conservés en culture pendant plusieurs semaines sous faible agitation cessent de produire des gamètes (observations personnelles). Deuxièmement, on peut supposer que les mouvements d'eau et/ou les vibrations engendrées par la ventilation branchiale des idotées pourraient favoriser la libération des spermatis. De tels effets mécaniques existent chez les angiospermes, la pollinisation par bourdonnement qui favorise le transfert du pollen est un phénomène répandu chez plus de 20 000 espèces de plantes (De Luca et al., 2013). Les vibrations transmises du corps du pollinisateur à la fleur secouent les grains de pollen à l'intérieur des anthères, provoquant leur éjection forcée à travers les pores terminaux et sur le corps de l'abeille (Buchmann et Hurley, 1978). Ce comportement est connu sous le nom de pollinisation par bourdonnement, produit lorsque l'abeille fait vibrer son corps (Buchmann, 1983). De même, les vibrations ou les rapides mouvements d'eau engendrés par les cinq paires de pléopodes à

l'intérieur de la chambre branchiale chez les idotées pourraient jouer un rôle similaire. L'activité des isopodes sur *G. gracilis* pourrait servir de facilitateur indirect. En effet, en s'activant sur le thalle mâle, les visiteurs pourraient induire et favoriser la libération des spermaties emportées ensuite par les courants d'eau. Ce système serait comparable à l'ambophilie observée chez certaines plantes qui étaient autrefois considérées comme pollinisées uniquement par le vent ou par les insectes et qui ont été récemment identifiées comme étant pollinisées à la fois par le vent et par les insectes (Gong et al., 2015). Par conséquent, l'ambophilie pourrait représenter une adaptation à différents environnements qui varient selon certaines conditions privilégiant la pollinisation par le vent, d'autres par les animaux (Wang et al., 2017). L'ambophilie pourrait être un système flexible, dans des lieux ouverts où les pollinisateurs animaux sont rares, la pollinisation par le vent pourrait être plus fréquente et plus fiable (Totland et Sottocornola, 2001). En revanche, dans les habitats fermés où les pollinisateurs animaux sont fréquents, la pollinisation animale pourrait garantir la reproduction (Culley et al., 2002). Un tel système permettrait de maximiser les fécondations chez certaines algues rouges qui, comme *G. gracilis*, occupent les cuvettes rocheuses soumises à l'alternance des marées et restent immergées à marée basse, passant la moitié de leur temps en milieux fermés (marées basses) et l'autre moitié en milieux ouverts (marées hautes). C'est un résultat remarquable, car il démontre que les idotées augmentent la production de gamètes et donc le succès reproducteur des mâles. Ce mécanisme pourrait être particulièrement efficace chez des algues rouges se reproduisant préférentiellement à marée basse comme *G. gracilis* (Engel et Destombe, 2002). Afin d'explorer toutes les facettes de cette relation mutualiste, des expériences supplémentaires pourraient être menées pour tester s'il existe des signaux entre les deux partenaires. Dans ce cadre, il serait particulièrement intéressant de déterminer si les idotées se retrouvent plus fréquemment sur les gracilaires lors de la période de reproduction de l'algue. Des expériences de choix pourraient également être conduites en laboratoire dans le but de démontrer si la gracilaire offre un habitat préférentiel pour se cacher des prédateurs par rapport aux autres hôtes comme les *Fucus*.

En outre, cette découverte offre des pistes pour l'exploration de traits mâles sous sélection sexuelle. Chez les plantes, il est généralement admis que les traits floraux attirant les pollinisateurs sont plus susceptibles d'être sous sélection sexuelle. Déterminer les traits des gracilaires qui pourraient attirer les idotées (tels que les signaux chimiques) ou faciliter le transport des spermaties par les idotées (tels que le mucilage) pourrait permettre de détecter des traits sous-sélection (Cf Chapitre 5).

Chapitre 5

**Etude de la sélection sexuelle chez
G. gracilis et des traits mâles
potentiellement soumis à cette sélection.**

5.1 Introduction

La sélection sexuelle résulte de la compétition entre les individus pour l'accès aux partenaires et/ou à leurs gamètes (Hosken et House, 2011). Historiquement développée pour expliquer le dimorphisme sexuel des caractères sexuels secondaires chez les espèces animales (Darwin, 1871), la théorie de la sélection sexuelle postule que l'anisogamie devrait conduire à une forte compétition entre les mâles pour l'accès aux femelles et aux ovules. En effet, chez les espèces anisogames, le coût de la production des gamètes est différent selon le sexe, la femelle produit des gamètes de grandes tailles et contenant une importante quantité de ressources alors que le mâle produit des gamètes plus petits et contenant peu de ressources (Bateman, 1948; Trivers, 1972). De par cette asymétrie d'investissement entre les sexes, la fonction femelle est limitée principalement par l'accès aux ressources. Par contre, les gamètes femelles sont une ressource rare et donc limitante pour les mâles (Bateman, 1948 ; Trivers 1972). Par conséquent, selon la théorie de la sélection sexuelle, tout trait qui augmente l'accès aux partenaires sexuels femelles devrait considérablement affecter le succès reproducteur des mâles (Dewsbury, 2005). La sélection sexuelle a été quantifiée chez un grand nombre d'espèces animales à l'aide des principes de Bateman (Bateman, 1948) qui postulent que : (i) l'opportunité de sélection I, c'est-à-dire la variance du succès reproducteur ; (ii) l'opportunité de sélection sexuelle I_s , c'est-à-dire la variance du nombre de partenaires (i.e. le « mating success ») et (iii) le gradient de Bateman, c'est-à-dire la pente de la régression du succès reproducteur en fonction du nombre de partenaires sont plus grand chez le sexe soumis à sélection sexuelle (généralement le mâle).

Bien qu'il soit admis que la sélection sexuelle devrait être plus forte chez les mâles dans toute espèce anisogame (Arnold, 1994), Darwin lui-même ne la considérait pas comme une force sélective majeure chez les plantes et certains grands groupes d'invertébrés (Darwin, 1871). En effet, il existe plusieurs difficultés potentielles liées à l'application aux plantes des concepts de sélection sexuelle comme le fait que, dans la majorité des cas, il n'existe de dimorphisme sexuel "spectaculaire" (i.e. l'équivalent des armements et ornements chez les vertébrés), le fait que le choix du partenaire paraissait impossible chez des êtres non "pensants" et enfin le fait qu'une grande majorité des plantes sont hermaphrodites (environ 90% ; Barrett et Hough, 2013). Chez les hermaphrodites simultanés, les fonctions mâle et femelle sont combinées dans le même organisme et il n'existe pas de dimorphisme sexuel. Il a donc longtemps été considéré que l'hermaphroditisme était incompatible avec la sélection sexuelle, car aucune compétition intrasexuelle ne pouvait se produire chez ces organismes (Grant, 1995 ; mais voir l'étude de

Péliissié et al., 2012, par exemple, qui contredit cet argument). La sélection sexuelle chez les angiospermes a ainsi fait l'objet d'un débat acharné (Arnold, 1994 ; Grant, 1995). La sélection sexuelle chez les angiospermes est aujourd'hui largement reconnue comme une force évolutive possible tant pour les espèces monoïques mais aussi pour les espèces dioïques et hermaphrodites (Moore et Pannell, 2011 ; Barrett et Hough, 2013). La présence dans de nombreuses espèces de dimorphisme sexuel qui suggère un effet fort de la sélection sur les traits liés à l'attrait des pollinisateurs ou ceux qui permettent un plus fort investissement dans la reproduction chez les mâles (Hodgins et Barrett, 2008 ; Briscoe Runquist et al., 2017 ; Paterno et al., 2020), constitue un argument en faveur de l'existence d'une sélection sexuelle chez les plantes. Néanmoins, les principes de Bateman n'ont été testés que chez trois espèces d'angiospermes, où la sélection sexuelle s'est avérée plus forte chez les mâles (Tonnabel et al., 2019 ; Kwok and Dorken, 2022 ; Barbot et al., 2023). Une seule étude a été réalisée chez une plante non-phanérogame, une mousse ne présentant pas de dimorphisme sexuel (Johnson and Shaw, 2016), suggérant la possibilité d'une sélection sexuelle plus forte chez les mâles, mais sans que cela n'entraîne nécessairement l'évolution de caractères sexuellement dimorphiques.

Chez les plantes, certains traits ont été associés à une augmentation du succès reproducteur mâle et ont été interprétés comme potentiellement sous sélection sexuelle, ceci est le cas en particulier pour les traits qui augmentent la capacité d'une plante à exporter son pollen (Delph et Ashman, 2006). Il a par exemple été montré que la taille et l'architecture des plantes peuvent influencer la production de pollen et/ou sa distance de dispersion et ainsi jouer sur le succès reproducteur mâle. En effet, les plantes entomogames de plus grandes tailles et portant plus de fleurs attirent plus de pollinisateurs alors que le pollen des grandes plantes est plus facilement dispersé par le vent chez les anémogames (de Jong et Klinkhamer, 1994 ; Klinkhamer et al., 1997 ; Delph et Ashman, 2006 ; Pickup et Barrett, 2012). Certaines caractéristiques des fleurs, ont aussi été associées à une plus forte attraction des pollinisateurs (par exemple, taille des fleurs ou taille de l'inflorescence, production de nectar et de parfum) alors que d'autres ont été impliquées dans la manière de distribuer le pollen (la maturation échelonnée des anthères peut par exemple permettre la distribution du pollen de manière plus homogène et sur un temps plus long, maximisant ainsi le nombre d'individus - animaux - différents qui participent à la pollinisation) (Moore et Pannell, 2011; Tonnabel et al., 2019). Chez les espèces entomogames, des différences entre individus pour ces caractéristiques peuvent avoir des conséquences importantes sur la fréquentation des pollinisateurs, la compétition entre mâles pour l'accès aux femelles et l'évolution du dimorphisme sexuel (Barrett et Hough, 2013). D'autres traits, plutôt liés à la phénologie de la floraison (Bullock

et al., 1983) ou à la quantité de pollen produit (Schoen et Stewart, 1986) ont été liés à la capacité des mâles à atteindre les gamètes femelles. Enfin, certains caractères en relation avec la morphologie ou la biochimie des grains de pollen pourraient aussi être sous sélection sexuelle. Les grains de pollen présentent en effet des morphologies complexes et très diverses (leurs parois cellulaires forme souvent des papilles, ouvertures et autres épines ou crêtes à leur surface ; Wang et Dobritsa, 2018) et ils sont souvent couverts de fluides visqueux (par exemple le “pollenkitt” ou l’élastoviscine ; Pacini et Franchi, 2020). L’idée que ces caractéristiques pourraient avoir un effet sur la capacité de transport des grains de pollen par le vent (via des effets sur l’aérodynamique des grains de pollen) ou par des pollinisateurs (via des effets sur la capacité à se coller de manière effective sur les pollinisateurs) a été avancée (Wang et Dobritsa, 2018 ; Lynn et al., 2020 ; Pacini et Franchi, 2020).

Les plantes sont des organismes sessiles et cela oblige le pollen ou les gamètes mâles à être dispersés dans l’environnement par l’intermédiaire de pollinisateurs ou de facteurs abiotiques. Dans le cas des organismes sessiles, on pourrait donc s’attendre à ce qu’une partie de la variance en termes de nombre de partenaires ne soit pas déterminée par des caractères héréditaires, mais plutôt par la localisation géographique de l’individu par rapport à ses partenaires potentiels. De nombreuses études ont exploré l’impact de la localisation géographique sur le succès reproducteur des mâles et/ou des femelles (Oddou-Muratorio et al., 2006 ; Isagi et al., 2007 ; De Cauwer et al., 2010a, 2010b), mais sans lier explicitement leurs résultats à la sélection sexuelle.

Comme les plantes, les algues rouges sont sessiles et anisogames (Dixon, 1973). Les gamètes mâles sont libérés dans l’eau et les fécondations ont lieu sur les femelles. Dans ce groupe d’organismes, les gamètes mâles ne sont pas flagellés et nous avons récemment démontré que la fécondation par l’intermédiaire d’un animal augmente le succès de la fécondation (Lavaut et al., 2022, voir Chapitre 4). Chez *G. gracilis*, le succès de la fécondation des mâles présente une forte variance qui ne peut être expliquée uniquement par la distance parcourue par le gamète mâle pour trouver une partenaire ni par la taille des mâles (Engel et al., 1999). Ces observations suggèrent qu’il pourrait y avoir une compétition entre les mâles ou un choix des femelles, signe d’une sélection sexuelle (Engel et al., 2002, 1999). Cependant, jusqu’à présent, chez cette algue, les principes de Bateman n’ont pas été testés pour déterminer si la sélection sexuelle était plus marquée chez les mâles.

L’objectif de ce chapitre consiste à déterminer si les gamétophytes mâles ou femelles sont soumis à la sélection sexuelle chez *G. gracilis*, et le cas échéant, d’explorer quels traits des individus

peuvent être sélectionnés par ce processus. Dans une première partie, l'occurrence de la sélection sexuelle est testée en se basant sur les trois indices de Bateman, estimés grâce aux résultats des analyses de paternité réalisées dans la population du Cap Gris Nez. Les analyses des indices de Batman ont été effectuées en collaboration avec Mathilde Dufay (CEFE, CNRS) et les résultats ont été rédigés sous forme d'un article qui a été soumis dans Proc Royal Soc London. Cet article montre qu'il existe une possibilité de sélection sexuelle chez *G. gracilis* s'exerçant probablement sur des traits mâles, alors que cette espèce ne présente pas de dimorphisme sexuel. Les résultats montrent que des traits environnementaux, non héréditaires, comme la localisation géographique des individus, expliquent en partie la plus grande variance du succès de fécondation observée chez les mâles par rapport aux femelles. Suite à cet article, il était donc important de rechercher s'il existait des caractères héréditaires capables d'augmenter l'accès des individus mâles aux partenaires femelles malgré l'absence de dimorphisme sexuel évident. C'est ce que nous présentons dans la deuxième partie de ce chapitre où nous avons évalué :

- (1) L'effet de la biomasse des mâles, mesurée durant la pleine saison de reproduction (août) dans la population de GNH, sur le nombre de partenaires et le succès reproducteur.
- (2) Le rôle de la phénologie de la reproduction (durée de fertilité) des mâles sur la variation du nombre de partenaires grâce à des analyses de paternité réalisées en juin et en août dans la même population.
- (3) L'impact des interactions biotiques avec *I. balthica* sur la variation du succès de fécondation des mâles grâce à des croisements contrôlés en laboratoire
- (4) La variabilité du succès de fécondation des mâles en conditions contrôlées au laboratoire, ce qui permet de s'affranchir de la position géographique des individus

La stabilité temporelle du succès de fécondation des mâles *in situ* a aussi été testée en utilisant les échantillonnages temporels effectués dans la population du Gris Nez (Engel, 2000).

5.2 Sexual selection in seaweed? Testing Batemans principles in the red alga *Gracilaria gracilis*

Dans l'article suivant, soumis au journal *Proceeding of the Royal Society B (Biological Sciences)*, nous testons l'occurrence de la sélection sexuelle chez *G. gracilis* en utilisant les trois principes de Bateman. Ces trois principes postulent que (i) la variance du succès reproducteur et (ii) la variance du nombre de partenaires (c'est-à-dire le « mating success ») sont plus grandes chez les mâles et (iii) que la relation entre le succès reproducteur et le nombre de partenaires (le gradient de Bateman) est également plus forte chez les mâles que chez les femelles. Pour cela, nous avons calculé le succès reproducteur et le nombre de partenaires des mâles et des femelles de la population naturelle GNH, à partir des analyses de paternité réalisées en août 2020. Les résultats montrent que 92% des fécondations ont lieu entre les partenaires de cette population. La variance du nombre de partenaires est significativement plus grande chez les mâles que chez les femelles et le gradient de Bateman n'est positif que chez les mâles. Nous montrons que la distance par rapport aux potentiels partenaires femelles explique une part de la variance du nombre de partenaires chez les mâles, mais pas toute la variance. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la sélection sexuelle se produit chez *G. gracilis*, probablement sur des traits mâles, que nous n'avons pas mesuré dans cet article, mais qui seront l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

Research



Cite this article: Lavaut E, Valero M, Mauger S, Guillemain ML, Destombe C, Dufay M. 2023 Sexual selection in seaweed? Testing Bateman's principles in the red alga *Gracilaria gracilis*. *Proc. R. Soc. B* **290**: 20231668. <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.1668>

Received: 25 July 2023

Accepted: 21 August 2023

Subject Category:

Evolution

Subject Areas:

evolution, plant science, ecology

Keywords:

Bateman gradient, paternity analyses, sessile marine organisms, mating and reproductive success, haploid diploid life cycle, dioicous species

Authors for correspondence:

M. Valero

e-mail: myriam.valero@sb-roscoff.fr

M. Dufay

e-mail: mathilde.dufay@cefe.cnrs.fr

Electronic supplementary material is available online at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.6824001>.

Sexual selection in seaweed? Testing Bateman's principles in the red alga *Gracilaria gracilis*

E. Lavaut¹, M. Valero¹, S. Mauger¹, M. L. Guillemain^{1,2}, C. Destombe¹ and M. Dufay³

¹IRL EBEA 3614, Evolutionary Biology and Ecology of Algae, CNRS, Sorbonne Université, Pontificia Universidad Católica de Chile, Universidad Austral de Chile, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff cedex, France

²Núcleo Milenio MASH, Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

³CEFE, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

EL, 0000-0001-6821-5647; MV, 0000-0002-9000-1423; SM, 0000-0002-8779-1516; MLG, 0000-0001-5703-7662; CD, 0000-0001-5656-9659; MD, 0000-0003-3981-7109

In anisogamous species, sexual selection is expected to be stronger in males. Bateman's principles state that the variance in (i) reproductive and (ii) mating success is greater for males, and (iii) the relationship between reproductive success and mating success (the Bateman gradient) is also stronger for males than for females. Sexual selection, based on Bateman's principles, has been demonstrated in animals and some angiosperms, but never in a seaweed. Here we focus on the oogamous haploid-diploid rhodophyte *Gracilaria gracilis* in which previous studies have shown evidence for non-random mating, suggesting the existence of male–male competition and female choice. We estimated mating and reproductive success using paternity analyses in a natural population where up to 92% of fertilizations occurred between partners of that population. The results show that the variance in mating success is significantly greater in males than in females and that the Bateman gradient is positive only in males. Distance to female partners also explains a minor part of the variance in male mating success. Although there is no evidence for sexual dimorphism, our study supports the hypothesis that sexual selection occurs in *G. gracilis*, probably on male traits, even if we cannot observe, characterize or quantify them yet.

1. Introduction

Sexual selection arises from competition among individuals for the access to mates and/or to their gametes [1]. Historically developed to explain the sexual dimorphism of secondary sexual traits in animal species [2], sexual selection theory postulates that anisogamy should lead to strong competition among males for the access to females and ovules [3]. Therefore, under this postulate, any trait that increases the successful access to female mating partners should greatly affect male reproductive success [4]. This theory thus constitutes a satisfying explanation for the frequently observed male-biased sexual dimorphism in several categories of traits, including ornaments and armaments (but see [5]). Sexual selection in both sexes has been quantified in a large number of animal species using metrics derived from Bateman's principles [6]: (i) the opportunity for selection *I* (i.e. the variance in relative reproductive success); (ii) the opportunity for sexual selection *I_s*, i.e. the variance relative in mating success and (iii) the Bateman gradient (i.e. the slope of the regression of relative reproductive success as a function of relative mating success [7]). The sex associated with the highest value of these three metrics is considered as the one under stronger sexual selection. A recent meta-analysis focusing on animals indeed shows that both the Bateman gradient and the opportunity for sexual selection are more often higher in males

[8]. Although this trend appears stronger in species with male-biased sexual dimorphism in terms of morphological or behavioural traits (i.e. males developing large body, bright colours or exuberant and acrobatic courtship displays), a number of studies have reported stronger sexual selection, or opportunities of sexual selection, in males within species in which no sexual dimorphism has been documented [8].

The use of these metrics of sexual selection has been largely biased towards animals, mainly vertebrates and non-sessile invertebrates [8]. Although it has been acknowledged that stronger sexual selection in males should occur in any anisogamous species [9], very few studies have attempted to directly verify this prediction in other anisogamous eukaryotes which typically lack copulation and for which cognitive traits (such as those involved in partner choice behaviours, *sensu stricto*) usually play no role in sexual selection. Therefore, these anisogamous eukaryotes, such as plants, provide stimulating study models for the empirical test of sexual selection. Sexual selection in angiosperms, although once fiercely debated [9,10], is now widely recognized as a possible evolutionary force, which may indeed be stronger through the male function of hermaphrodites or in male individuals in dioecious species, at least when pollen supply is not limiting [11–13]. Among the arguments in favour of the existence of sexual selection in plants, the occurrence of male-biased sexual dimorphism in dioecious plant species (e.g. males with larger or more numerous flowers than females) suggests that selection through the male function to attract pollinators or to invest in reproduction may be indeed stronger [14–16]. Nevertheless, Bateman's metrics have been estimated and compared between males and females in only three angiosperm species. In all three cases, sexual selection was found to be stronger in males, and results were at least partly consistent with the sexual dimorphism documented in these species [17–19]. Nonflowering plant species have been investigated even less on the topic of sexual selection. Only one study carried out on a non-sexually dimorphic moss, estimated Bateman gradients and found evidence for a steeper relationship between reproductive and mating success in male gametophytes [20]. These results suggest a potential for stronger sexual selection in males of this anisogamous species, but this does not appear to have driven the evolution of sexually dimorphic traits. Noteworthy, this particular study was performed in a population with an extreme male-biased sex ratio, a feature that has been found to be associated with higher opportunities for sexual selection and higher Bateman gradients in males [21].

One situation in which stronger opportunity for sexual selection in males would not be associated with sexual dimorphism is when variation in mating success is not determined by heritable traits. In plants, their inability to move forces pollen or male gametes to disperse in the environment via pollinators or abiotic factors, so that the exact spatial location of individuals is likely to be a strong determinant of mating success. Several studies have explored the impact of geographical location and of local sex ratio on male and/or female reproductive success [22–26], but without explicitly linking their results to sexual selection. Like plants and some animals, red algae are sessile and anisogamous [27]. Male gametes are released in the water and fertilizations occur on the females, which is referred as spermcast mating for sessile marine invertebrates [28]. In red algae, male gametes are non-flagellated and we recently demonstrated that

isopod-mediated fertilization increases fertilization success [29]. In Florideophyceae, after fertilization, the diploid zygote divides mitotically in a diploid structure, protected and nourished by the parental female haploid gametophyte [30]. These characteristics of the reproductive life cycle suggest that fertilization success in this group may be driven by different selection pressures between males and females (i.e. competition between males for access to females or selective cystocarp abortion by the females) [31]. In the dioecious red alga *Gracilaria gracilis*, male fertilization success shows high variance [31,32], suggesting that there may be male–male competition or female choice, a sign of sexual selection. However, to date in this alga, the relationship between reproductive success and mating success has not been tested to determine if the Bateman gradient is steeper in males. Here, we compare potentials for sexual selection among male and female gametophytes in *G. gracilis* by estimating the three Bateman indexes in a natural population characterized by a balanced sex ratio. We also explore the role of individual location, relative to individuals of the other sex, on the variation of mating success in both males and females. The investigation of Bateman principles in species outside the clades classically studied for sexual selection should help to understand how and when anisogamy triggers differences in the magnitude of sexual selection between sexes, and when such differences can drive the evolution of sexual dimorphism.

2. Material and methods

(a) Study species

Populations of the rhodophyte *Gracilaria gracilis* are patchily distributed in the intertidal zone on rocky shores. Individuals occupying rock pools remain immersed at ebb tide. Its life cycle is haploid-diploid, including male and female haploid gametophytes and diploid tetrasporophytes (figure 1). Tetrasporophytes produce haploid spores via meiosis that develop into dioecious male and female gametophytes. This species is characterized by a highly specialized type of oogamous reproduction [26]. Spermata (non-flagellated male gametes) are released into the environment, but female gametes (carpogonium) are retained on the female gametophyte. After fertilization, the zygote remains on the female gametophyte and develops into diploid sporogenous tissue (gonimoblast) protected and nurtured by the parental female thallus, forming a complex, macroscopic post-fertilization structure called the cystocarp. The cystocarp is fully mature approximately one month after fertilization. One fertilization event gives rise to thousands of identical diploid spores that, after release, can germinate into new tetrasporophyte individuals [33]. The tetrasporophyte, female gametophyte and male gametophyte individuals are considered isomorphic, even though males are slightly smaller than females and tetrasporophytes [34]. Both haploid and diploid individuals are long-lived [35]. The thallus is formed of a few erect deciduous main axes, irregularly branched, reaching up to 30 cm long, arising from a small perennial discoid holdfast, fixing the individual to the bedrock. Previous studies have shown that the reproductive period occurs from March to September with cystocarp production peaking in August–September [33,36]. Individuals less than 8 cm in length are generally non-reproductive.

(b) Study population and sampling

The study population was located on the coast of the North Sea at Cape Gris-Nez (in the Strait of Dover region, northern France,

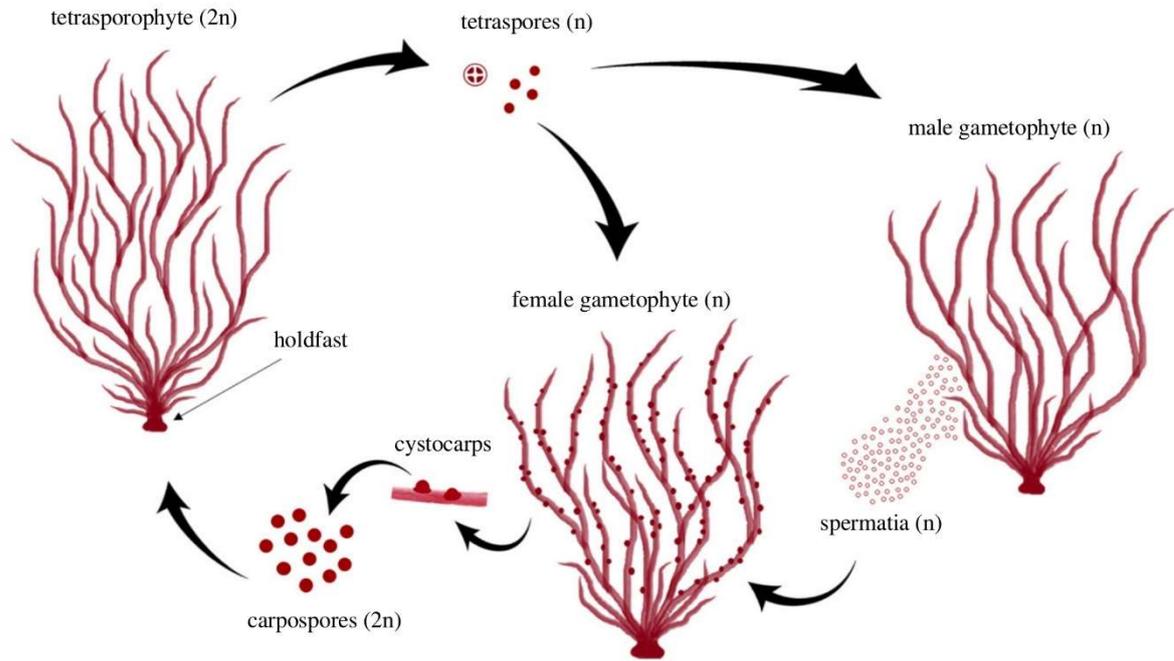


Figure 1. Life cycle of *Gracilaria gracilis*. The individuals are fixed to the rocky substrate via a perennial holdfast. The deciduous erect thalli decay after reproduction in late autumn and grow back from the holdfast in spring. Diploid tetrasporophytes produce haploid spores from meiosis that develop into dioicous male and female haploid gametophytes. Spermatia (non-flagellated male gametes) are released into the water column. After fertilization, the zygote is retained on the female and develops into a complex, macroscopic post-fertilization structure: the cystocarp. One fertilization gives rise to thousands of identical diploid carpospores that, after release and germination, grow into new tetrasporophyte individuals.

50°53'N, 1°35'E) in a pool of approximately 5 m² isolated from other populations at low tide [31,33]. In August 2020, every individual in the rock pool was sampled and spatially mapped relative to a pair of fixed points. Maximum thallus length and maximum diameter, measured using all the thalli emerging from the holdfast, were recorded for each individual to estimate biomass [35]. Several branches of each individual were sampled and examined under a dissecting microscope to establish the sexual phenotype (tetrasporophyte, female or male gametophyte) of each individual based on the observed reproductive structures. Of a total of 238 reproductive individuals sampled, 97 tetrasporophytes, 70 females and 71 males were identified (figure 2). There was a balanced sex ratio (1:1). For every female, cystocarps were counted on the 10 cm distal extremity of five branches. Thallus fragments were excised from each individual for DNA extraction. An average of 32 large cystocarps (ranging from 12 to 48 cystocarps) were randomly sampled and dissected from each female and stored at -20°C.

(c) DNA extraction and microsatellite genotyping

For individuals, DNA extraction was performed on approximately 10 mg of dried thallus tissue using the NucleoSpin 96 Plant II kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. For cystocarps, DNA extraction was performed using the Chelex method (Chelex TM 100; Biorad, Hercules, California), following the protocol described in Wattier *et al.* [37]. All male and female gametophyte individuals as well as the sampled cystocarps were genotyped using 13 microsatellite loci: Gv2CT [37], Gg121, Gg155, Gg173, Gg182, Gg216 [38], Ggrac_02, Ggrac_03, Ggrac_04, Ggrac_05, Ggrac_08, Ggrac_09, Ggrac_11 [39]. PCR was performed in a total volume of 10 µl containing 2 µl of DNA template diluted 1:50 (gametophytes) or not diluted (cystocarps), 1× GoTaq Flexi buffer (Promega Corporation), 2 mM MgCl₂, 150 µM of each dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 30 pmol of forward fluorescent-labelled primer, 30 pmol of reverse primer (Eurofins

MWG Operon, Germany), and 0.35 U GoTaq Flexi Polymerase (Promega Corporation). Amplifications were carried out under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s, followed by a final extension of 72°C for 10 min. Next, 2 µl of the diluted PCR product 1:10 was added to 10 µl of loading buffer made up of 0.5 µl of the SM594 size standard [40] and 9.5 µl of Hi-Di formamide, denatured at 95°C for 3 min, and run in an ABI 3130 XL capillary sequencer (Applied Biosystems, USA). Genotypes were scored manually in Genemapper version 4.0 (Applied Biosystems). The gametophytes being haploid, for each cystocarp, we were able to deduce the paternal genotype by subtracting the maternal genotype from the diploid cystocarp genotype across all loci using the Multilocus Matches option in GenAlEx ver. 6.5 [41,42].

(d) Reproductive and mating success

Mating and reproductive success were estimated on the 50 females (out of the 70 initially present in the population; see figure 2) for which there was sufficient information (i.e. estimated biomass, cystocarp count per centimetre, and more than 24 cystocarps genotyped).

Mating success is the total number of mating partners per individual. In this study, we estimated the genetic mating success, i.e. the number of individuals of the other sex with which at least one zygote was produced, based on the results of the parentage assignment (electronic supplementary material, table S1). Slightly unequal numbers of cystocarps were genotyped across females, which may cause an artificial overestimation of mating success for females associated with a higher sampling effort. Mating success for both sexes was thus estimated using a bootstrapping procedure in which we resampled 24 genotyped offspring (cystocarps) 1000 times for each female. The genetic mating success for each individual was calculated from each resampling and, in further analyses, the mean 'individual' mating success value was used.

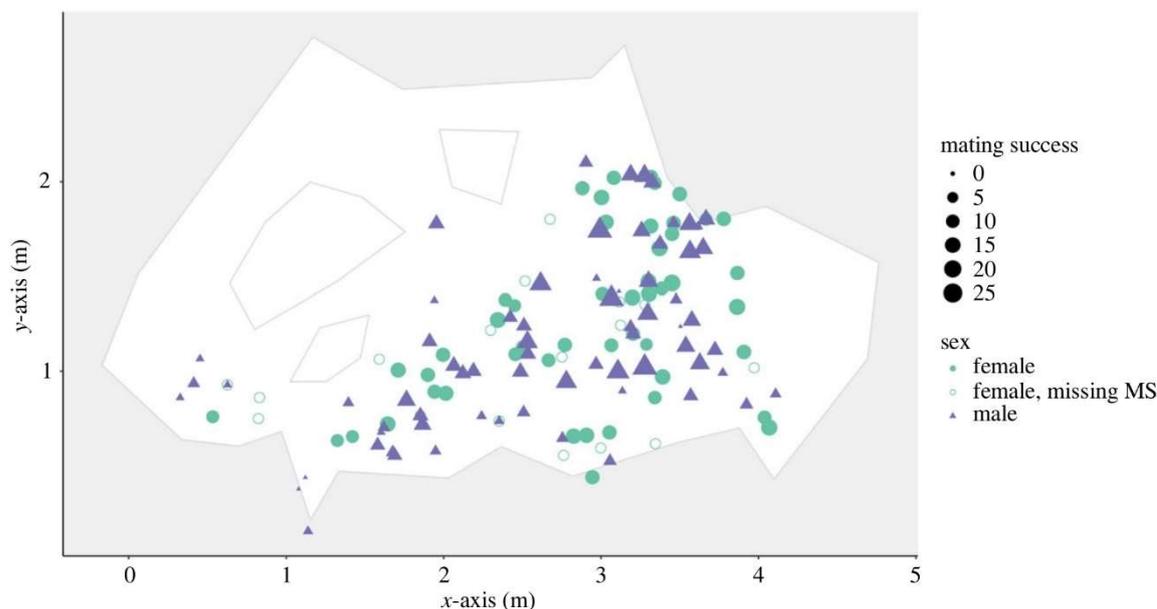


Figure 2. Map of the Cape Gris-Nez intertidal rock pool showing the locations of the 71 male (triangles) and the 70 female (circles) gametophyte individuals sampled within the population (the tetrasporophyte individuals are not shown). Mating success (i.e. the numbers of sexual partners) is proportional to filled symbol size. Females with missing information that were not included in Bateman analyses are indicated with open circles. The rock pool edges are shown in grey. The polygons within the rock pool indicate the presence of rocks.

Female reproductive success is the total number of offspring a female produces. We estimated the female reproductive success by multiplying the mean number of cystocarps per cm^3 counted on 5 branches by the total volume of the individual (electronic supplementary material, table S2) as a proxy for individual biomass [34].

Male reproductive success is the total number of offspring a male sires. Male reproductive success can thus be estimated as the proportion of each female's cystocarps sired by that male, as determined from the parental assignment (electronic supplementary material, table S1), multiplied by female reproductive success and summed over all surveyed females (electronic supplementary material, table S3). At each sampling step of the bootstrapping procedure performed for estimating mating success described above, we calculated the proportion of cystocarps sired by each male in all male-female pairs, to obtain an estimate of male reproductive success for each male individual. The mean value of male reproductive success resulting from the bootstrapping procedure was retained as an estimate of male reproductive success.

The relative reproductive and mating success of females and males were calculated by dividing the obtained values for each individual by the respective mean for each sex (electronic supplementary material, tables S2 and S3).

(e) Distance to partners

To estimate the effect of distance on variation in male and female mating success, the distance of each individual to all potential mating partners (i.e. individuals of the other sex) was calculated using individual geographic coordinates within the population. The mean of these distances was used as a proxy for the potential access to mating partners (electronic supplementary material, tables S2 and S3).

(f) Statistical analyses

All analyses were performed using R statistical software (v 4.0.3; R Core Team 2020) [43]. Function `lm()` was used for all

the linear regression analysis. Function `leveneTest()` was used for Levene tests. The complete script of bootstrapping procedure and path analyses are available in Dryad (see data availability section).

(i) Bateman's metrics

We quantified the strength of sexual selection in each sex using Bateman's metrics [44–46]. First, we estimated the standardized variance in reproductive success, I and in mating success I_s . I and I_s were calculated by dividing respectively the variance of reproductive and mating success by the square of their mean value. We tested for differences in reproductive and mating success variances between sexes using Levene's test. In addition, we estimated the slope of the linear regression of relative reproductive success as a function of relative mating success (Bateman gradient), on each sex separately. We then analysed the whole dataset with a linear model that tested for the effect of mating success and of the interaction between mating success and sex. Because uneven sampling between males and females may artificially increase the estimates of variance and the statistical power of the estimate of the Bateman gradient in males, a bootstrapping procedure was used to (i) compare both I and I_s between males and females, and (ii) test for the Bateman gradient in males, based on a subsample of 50 males only.

(ii) Distance to partners

A linear regression of relative mating success over the mean distance to potential partners was tested for males and females separately. A similar model was built, this time to test the effect of distance to partners on reproductive success, again testing males and females separately. Finally, we built a multiple linear regression of relative reproductive success over relative mating success and distance to potential partners (i.e. the equivalent of a partial Bateman gradient), to test whether any detected effect of the distance to partners on reproductive success was mediated through an impact of distance on mating success.

(iii) Path analyses: indirect effects of distance and biomass on mating and reproductive success

In addition, we used a pathway analysis approach (structural equation modelling; see also [47]), in order to dissect direct from indirect effects of distance to potential mating partners on reproductive success. More precisely, we tested whether the distance to potential partners affected mating success and whether this had an indirect effect on reproductive success, while testing the relationship between mating and reproductive success. We also assessed the direct relationship between distance to partners and reproductive success. This was done simultaneously on males and females, using the `piecewiseSEM` package in R [48]. We then performed a multigroup analysis using local estimation of the parameters, by first providing statistics for sex \times distance interaction using type III ANOVA. This allowed us to test whether the direct or indirect effects of distance to partners on reproductive success were significantly different between sexes. Testing the effect of sex \times mating success interaction on reproductive success provided an additional test of a difference in the Bateman gradient between sexes. In a second step, the analysis provides correlation estimates and significant sex \times variable interactions are free to vary between males and females. These results were compared to results of the linear models described above. Finally, we used the same path analysis approach by additionally testing for indirect and direct effects of individual biomass on reproductive success. Because biomass was used to estimate female reproductive success, this last analysis was performed only on males.

3. Results

Paternity analysis, performed by genotyping 1495 cystocarps from 50 females, revealed that 92% of the fertilization events (1371 cystocarps) occurred with males located in the population and only 8% (124 cystocarps) with males from outside. Of the 71 reproductive males in the population, we did not detect any sired cystocarps for five of them (electronic supplementary material, tables S1 and S2) and these five were thus assigned a null reproductive and mating success.

(a) Bateman's metrics

Reproductive success, i.e. the total number of offspring, ranged from 0 to 48 112 for males and from 1215 to 66 495 for females (figure 3a–d; electronic supplementary material, tables S1 and S3). Mating success (i.e. the number of sexual partners) ranged from 0 to 27 for males and from 4 to 18 for females (figure 3b–e; electronic supplementary material, tables S1 and S3). Both the opportunity for selection I and the opportunity for sexual selection I_s were stronger for males than for females (I : 1.18 versus 0.66; I_s : 0.74 versus 0.05), although this difference was significant only for mating success (Levene's test: I : $F_{1,119} = 0.47$, $p = 0.49$; I_s : $F_{1,119} = 28.75$, $p < 0.001$). These results were not qualitatively affected when these analyses were performed on a subsample of 50 males to obtain equal sample sizes for males and females. Bateman gradients investigated for each sex separately provided different results in males and females: no significant relationship was found between relative mating and reproductive success in females (slope \pm s.e.: 0.46 ± 0.53 , $p = 0.39$), whereas it was significantly positive in males (slope \pm s.e.: 1.17 ± 0.05 , $p < 0.001$) (figure 3c–f). This result still held when the Bateman gradient was analysed on a subsample of 50 males to have the same sample size as in the

female dataset. However, when relative reproductive success of males and females were analysed conjointly, mating success had no effect (slope \pm s.e.: 0.46 ± 0.39 , $p = 0.25$) and the interaction between mating success and sex was non-significant but with a p-value of 0.08 (slope \pm s.e.: 0.71 ± 0.40 , $p = 0.08$). When using the path analysis approach, we detected a significant effect of sex \times mating success interaction on reproductive success, with mating success positively affecting reproductive success in males only (electronic supplementary material, figure S2).

One potential weakness of our approach is that we set a maximum value of female mating success (i.e. the number of genotyped offspring per female), which could artificially decrease the estimated female mating success and flatten the Bateman gradient in females. This is an unavoidable limit of such an approach, when exhaustive genotyping is not an option, as already underlined in similar studies [19,49]. However, in our case, the observed shared paternity among offspring of the same female (see electronic supplementary material, table S1) suggests that estimated female mating success would not necessarily strongly increase if we had genotyped a higher number of offspring for each female.

(b) Distance to partners and biomass explained part of the variance in mating success in males

The mean distance to potential mating partners ranged from 0.88 m to 2.18 m for females, and from 0.78 m to 2.59 m for males (electronic supplementary material, tables S1 and S3). In males, mating success significantly decreased when their distance to potential female partners increased (slope \pm s.e.: -0.93 ± 0.21 , $p < 0.001$) (figure 4a). The same result was observed for reproductive success (slope \pm s.e.: -1.01 ± 0.28 , $p < 0.001$) (electronic supplementary material, figure S1). However, when the distance to potential partners and mating success were simultaneously included in a linear regression of reproductive success, only mating success was found to have a significant effect (slope \pm s.e.: 1.21 ± 0.07 , $p < 0.001$) and the distance effect was no longer significant ($p = 0.40$). This result suggests that the effect of distance to potential partners on male reproductive success was mediated through an effect on male mating success. In contrast, distance to potential male partners had no effect on either female mating success ($p = 0.48$) (figure 4b) or reproductive success ($p = 0.23$) (electronic supplementary material, figure S1). The path analysis approach provided very consistent results, with an indirect effect of the distance to potential partners on reproductive success, mediated through the interaction between mating and reproductive success, in males but not in females (electronic supplementary material, figure S2).

Finally, when focusing on males only, we found that individual biomass positively affected mating success, thus having an indirect positive effect on reproductive success. Adding the biomass in the model did not qualitatively modify the effects of distance to potential female partners described above (electronic supplementary material, figure S3).

4. Discussion

In this first-ever test of Bateman's principles in an oogamous red alga, we found evidence in support of two of Bateman's three principles, suggesting a greater potential for sexual

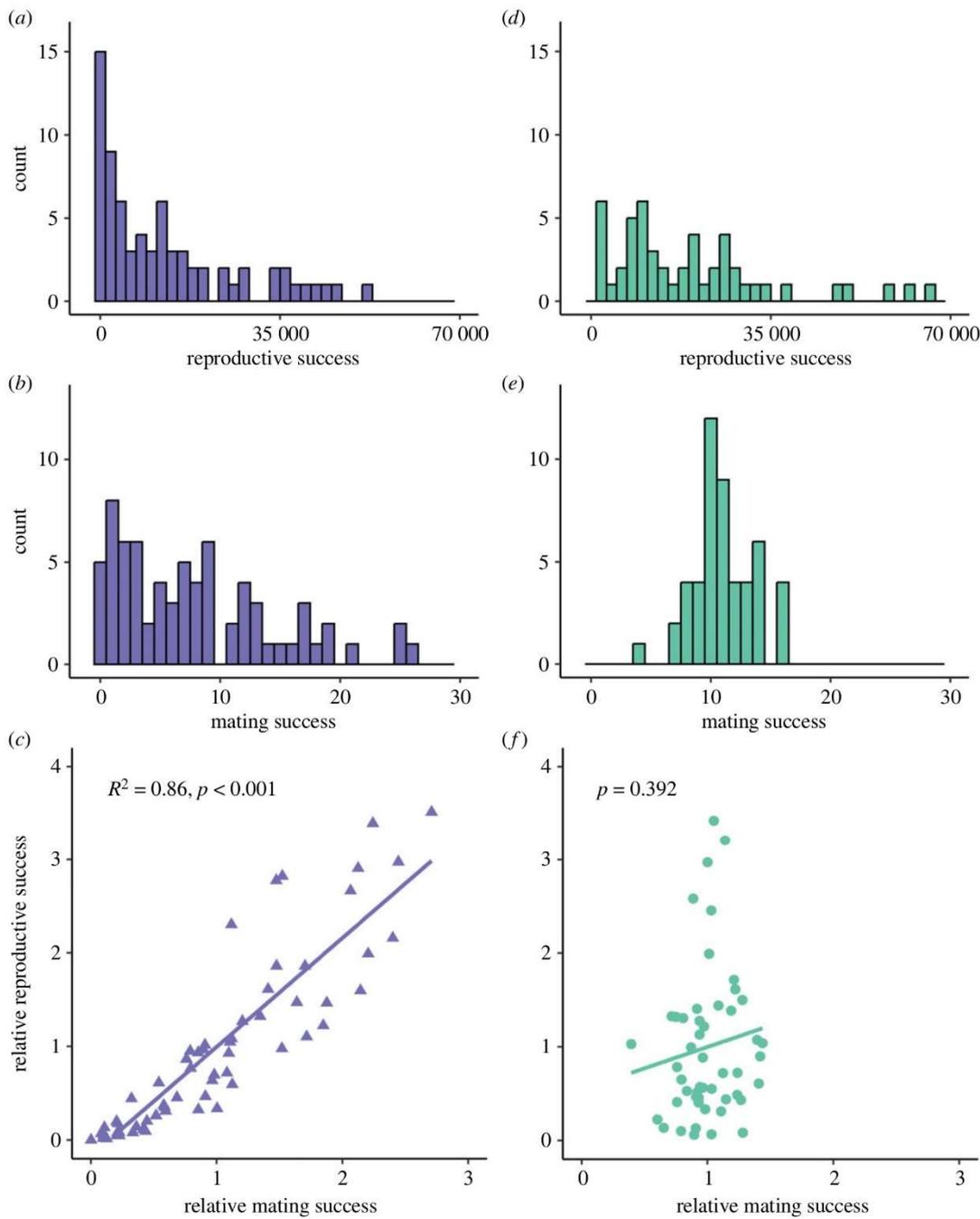


Figure 3. Relationship between reproductive and mating success and their distribution in males (dark blue) and females (green). Distribution of reproductive success (a,d), mating success (b,e) and the Bateman gradient (c,f) for males and females, respectively. The significance of the Bateman gradient, estimated by the slope of the linear regression, is indicated on the graph (c,f).

selection in males than in females in *Gracilaria gracilis*. We also detected an effect of individual location relative to potential mating partners on male mating success, which indirectly affects their reproductive success. Below, we discuss these different results in the light of red algal reproduction biology and their possible implications for processes of sexual selection in this species.

The first result of our study was that the variance in mating success was significantly higher in males than in females, thereby validating Bateman’s second principle. This result is consistent with the Darwinian sex-role hypothesis linked to anisogamy, which predicts that sexual selection is often strongest in the sex that produces the smallest and most abundant gametes (i.e. males by definition) [5]. This

expected consequence of anisogamy [3,50], even if not observed in all studies (see [8]), has been detected in a large number of animal species [1,8], but also in some angiosperms [12,13,51], mosses [20], fungi [52,53] and a red alga [31,32].

Second, our results also validate Bateman’s third principle because the Bateman gradient showed a significant positive relationship between reproductive and mating success in males, but not in females. The stronger dependence of reproductive success on mating success in males compared with females has been widely documented in animals (see for review [8]), but has only recently been reported in three species of angiosperms [17–19] and one aquatic species of peat moss [20], while it had never been tested in seaweeds

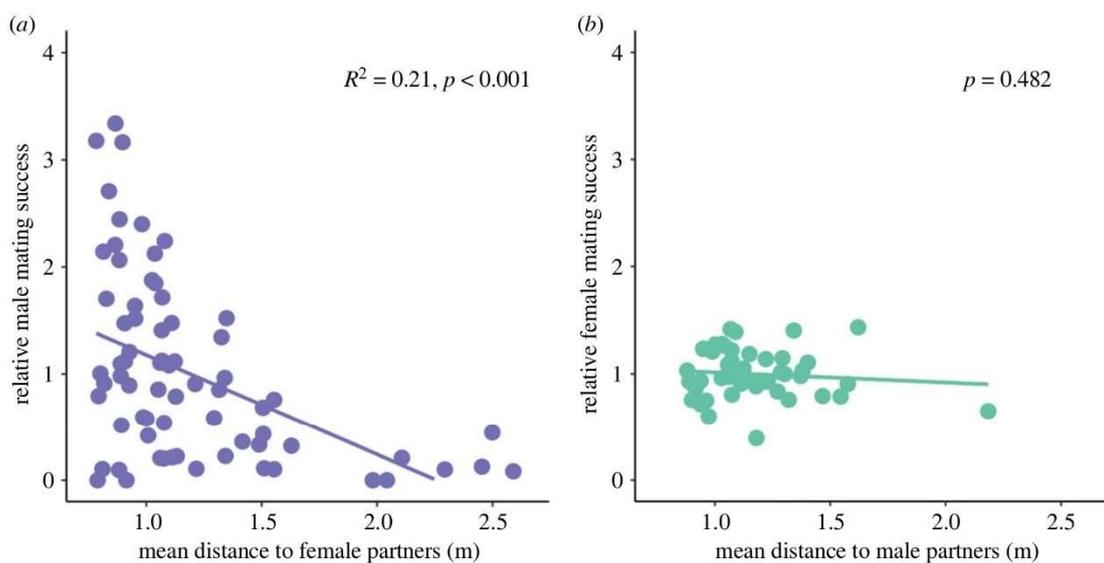


Figure 4. Relationship between mating success and mean distance to partners (a) in males and (b) in females. The significance of the relationship, estimated by the slope of the linear regression, is shown on each graph.

before. Bateman's third principle has generally been interpreted as the existence of strong competition between males for access to females, whereas the reproductive success of females is not strongly tied to their ability to access mates. The transferability of methods used for investigating the Bateman gradient and how to interpret it in animals to angiosperms was recently discussed in Tonnabel *et al.* [17] and Barbot *et al.* [19]. In particular, as frequently reported in angiosperms (see for review [54]) but rare in motile animals, it may bias the estimation of sexual selection. Multiple mating partners should result in high values of mating success, but the fact that genetic mating success is typically estimated on a subsample of offspring may lead to an underestimation of the mating success at least in some individuals, and ultimately to an underestimation of the variance in mating success. Such bias has been discussed in a few papers based on meta-analyses of studies focused in animals and simulated data sets, suggesting that the Bateman gradient may be overestimated in such a case [49,55]. In red algae, gametophytes are haploid and produce gametes by mitosis, and—given that male gametophytes thus produce genetically identical gametes—fertilization of multiple females by individual males can be readily detected. To date, the few paternity analyses published in red algae (i.e. *G. gracilis* [31] and *Chondrus crispus* [56]) have confirmed high levels of polyandry in natural populations, which suggests that in our study the Bateman gradient, as in other plants, may be overestimated in males.

Nevertheless, in the handful of investigated plant species, the positive Bateman gradient found in males, but not in females, has been interpreted as the direct result of female reproductive success not being limited by pollen supply, at least in the experimental conditions in which these studies were conducted [17,19]. Pollen limitation is another common feature in angiosperms [11,57] that should, when it occurs, decrease the difference in magnitude of sexual selection between females and males because in pollen-limiting situations, female reproductive success becomes limited by access to male gametes. Although this relationship has not been directly tested yet, in situations of low plant and/or

pollinator densities, despite the much higher production of male gametes compared with female gametes at the population level, female Bateman gradients are expected to become significant [3,19]. In sessile marine organisms, female fertility has been assumed to be limited due to short sperm lifespans and their dilution in turbulent flow [58,59], but several mechanisms such as synchronous release of motile gametes and chemotaxis have evolved in a range of invertebrates and brown seaweed, to ensure fertilization rates of up to 80–100% (for reviews, see [60,61]). In red algae, it has long been hypothesized that fertilization success should be particularly low due to the characteristics of their life cycle [62,63]. Male gametes are not flagellated, have a short lifespan and fertilization takes place on a remote female organ. The absence of any documented mechanism of synchronous gamete release or chemotaxis has raised questions on the efficiency of gamete encounters in rhodophytes [63]. Searles [62] even hypothesized that the evolution of cystocarps in which the female nurtures, amplifies and protects the zygote is probably a response to low rates of fertilization. Rare gamete encounters should lead to a positive Bateman gradient in female *G. gracilis*, a result that was not found in the current study. Therefore, in the studied population, dispersal appears to be efficient enough to ensure the sufficient access of female gametophytes to reproduction and thus the production of cystocarps. This argument is further supported by our evidence that all measured females had multiple fertilization partners. Although data on natural fertilization success are still sparse in red algae, Engel *et al.* [31] and Maggs *et al.* [64] reported that male gametes did not appear to be limiting because the majority of fertilization takes place during low tide when the spermatium concentration is high [65]. In addition, isopod-mediated transport of male gametes, a phenomenon similar to pollination, recently demonstrated in a red alga [29] may compensate for the lack of flagella, increasing fertilization rates and thus explaining any absence of gamete limitation. Further work is needed to investigate whether the Bateman gradient can become significant for females under spermatium-limiting conditions (i.e. without 'pollinators' or in a more open environment).

Here, the variance in mating success was greater in males and strongly correlated with their reproductive success. This relationship seems to suggest that variance in reproductive success is higher in males than in females. However, even if the opportunity for selection (I) tended to be stronger in males, the difference between sexes was not significant, and therefore did not confirm Bateman's first principle. These results differ from what has been found in other animal and plant species [7,8]. One possible explanation for this discrepancy is that female reproductive success depends on other factors not related to their access to reproduction but, for example, to their ability to mobilize resources. Interestingly, a trade-off between sexual reproduction and growth has been demonstrated in females for two species of red algae (*G. chilensis* [66] and *G. domingensis* [67]).

Our results thus suggest that sexual selection may be stronger in males in *G. gracilis*. Consequently, any heritable trait increasing individual access to mating partners may be under sexual selection in males, leading to some sort of sexual dimorphism. In animals, numerous studies have focused on dimorphic traits that allow males to increase the number of partners, such as ornaments or armaments [4]. In angiosperms, some sexually dimorphic traits such as different metrics of flower size and phenology have been shown to be under stronger selection [68,69] or sexual selection [19] in males. In the current study, some constraints in our data collection prevented us from investigating the impact of biomass on female reproductive success. When focusing on males, we found that biomass increased mating success, suggesting that this trait may thus be under sexual selection, although nothing is currently known about its heritability in *G. gracilis*.

If the variance in male mating success largely depends on the geographical location of individuals, a typically non-heritable trait, a distance effect may explain why sexual selection seems stronger in males in a species in which no obvious sexual dimorphism seems to occur. A distance effect on reproductive success has been commonly reported in plants [22–26] and also in *G. gracilis* [30]. In the current study, our tests indeed revealed that only male (and not female) reproductive success depends on the distance to potential mates. This effect arises from the dependence of mating success on distance. However, distance explains only a small part of the variance in male mating success, and specific male traits, not yet identified, may nevertheless be involved in this variable access to mates.

Given that red algae are cryptogams (i.e. without visible sexual organs) and have a simple morphology (i.e. thallus), the identification of dimorphic sexual characters remains a real challenge. In *G. gracilis* there is no marked sexual dimorphism [33,34]. Nevertheless, some male traits may help increase access to females by improving gamete quality and/or efficiency, such as the phenology of gamete production, or the level of production of mucilage strands in spermatia that may aid dispersal and animal transport [29,70]. These traits may be subject to sexual selection in males, and offer exciting avenues for future research.

By investigating the Bateman gradient, the current study mainly focused on the equivalent of pre-copulation sexual selection mechanisms [8], i.e. those involved in the transport of gametes from male to female reproductive structures. However, other processes can occur after mating such as

the selection of some particular male gametes by female tissues, a mechanism often referred to as cryptic female choice in animals and which may also occur in plants [55]. It is thus possible that our estimate of the Bateman gradient in *G. gracilis* also captured the consequences of such cryptic choice. In red algae, female choice could occur within a female structure called the trichogyne [71]. Several spermatia may adhere to a trichogyne [72], but only one male nucleus goes on to fuse with the female gamete nucleus [73]. Due to the long and costly development of cystocarps, female choice may play an important role after fertilization in *G. gracilis*. Through this process, females can improve offspring quality by selectively aborting zygotes, on the basis of their paternity. This phenomenon has been widely described in plants where abortions are frequent [74–77] and also in fungi [78]. Post-mating abortions have also been described after controlled crosses in Gracilariaceae [79–81], including individuals of *G. gracilis* sampled from the same population as that studied here [32].

In conclusion, our study suggests that sexual selection occurs with a higher intensity in males than in females in *G. gracilis*, a species that shows no clear sexual dimorphism. Our results pave the way for future research to examine particular traits and their susceptibility to sex-specific sexual selection. Finally, our investigation on a non-obvious candidate species shed light on sexual selection being a possible evolutionary driver in a hitherto little-studied phylum of the tree of life.

Ethics. This work did not require ethical approval from a human subject or animal welfare committee.

Data accessibility. Genotypic data, complete script of bootstrapping procedure and path analyses were deposited and are available in Dryad [82]. All other data used in the analyses are available in the paper or the electronic supplementary material [83].

Declaration of AI use. We have not used AI-assisted technologies in creating this article.

Authors' contributions. E.L.: conceptualization, formal analysis, investigation, methodology, resources, visualization, writing—original draft, writing—review and editing; M.V.: conceptualization, funding acquisition, investigation, project administration, supervision, writing—original draft, writing—review and editing; S.M.: data curation, methodology, resources, writing—review and editing; M.L.G.: funding acquisition, writing—review and editing; C.D.: conceptualization, investigation, writing—original draft, writing—review and editing; M.D.: formal analysis, investigation, methodology, validation, writing—original draft, writing—review and editing.

All authors gave final approval for publication and agreed to be held accountable for the work performed therein.

Conflict of interest declaration. The authors declare that they have no competing interests.

Funding. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) PhD fellowship to E.L.; core funding was provided by the IRL 3614, Evolutionary Biology and Ecology of Algae, CNRS and Sorbonne Université and by the International Research Network (IRN), Diversity and Biotechnology of Marine Algae, CNRS, to M.V., S.M., C.D. and M.L.G. This work was also funded by ANID–Millennium Nucleus Marine Agronomy of Seaweed Holobionts (NCN2021_033) to M.L.G.

Acknowledgements. We want to thank the Genomer platform of the Station Biologique de Roscoff in particular Gwenn Tanguy, Biogenouest genomics and EMBRC France partner core facility for their technical support. The authors are deeply grateful to Colin Destombe, Antoine Faure and Stéphane Loisel for sampling and Carolyn Engel for comments on the last version of the manuscript. We thank the associated editor Maurine Neiman and two anonymous reviewers for comments that have improved this article.

1. Hosken DJ, House CM. 2011 Sexual selection. *Curr. Biol.* **21**, R62–R65. (doi:10.1016/j.cub.2010.11.053)
2. Darwin C. 1872 *The descent of man, and selection in relation to sex*. New York, NY: Appleton & Co.
3. Lehtonen J. 2022 Bateman gradients from first principles. *Nat. Commun.* **13**, 3591. (doi:10.1038/s41467-022-30534-x)
4. Dewsbury DA. 2005 The Darwin-Bateman paradigm in historical context. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 831–837. (doi:10.1093/icb/45.5.831)
5. Kokko H, Jennions MD. 2008 Parental investment, sexual selection and sex ratios. *J. Evol. Biol.* **21**, 919–948. (doi:10.1111/j.1420-9101.2008.01540.x)
6. Bateman AJ. 1948 Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* **2**, 349–368. (doi:10.1038/hdy.1948.21)
7. Jones AG. 2009 On the Opportunity for sexual selection, the Bateman gradient and the maximum Intensity of sexual selection. *Evolution* **63**, 1673–1684. (doi:10.1111/j.1558-5646.2009.00664.x)
8. Janicke T, Häderer IK, Lajeunesse MJ, Anthes N. 2016 Darwinian sex roles confirmed across the animal kingdom. *Sci. Adv.* **2**, e1500983. (doi:10.1126/sciadv.1500983)
9. Arnold SJ. 1994 Is there a unifying concept of sexual selection that applies to both plants and animals? *Am. Nat.* **144**, S1–S12. (doi:10.1086/285650)
10. Grant V. 1995 Sexual selection in plants: Pros and Cons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 1247–1250. (doi:10.1073/pnas.92.5.1247)
11. Burd M. 1994 Bateman's principle and plant reproduction: The role of pollen limitation in fruit and seed set. *Bot. Rev.* **60**, 83–139. (doi:10.1007/BF02856594)
12. Delph LF, Ashman T-L. 2006 Trait selection in flowering plants: How does sexual selection contribute? *Integr. Comp. Biol.* **46**, 465–472. (doi:10.1093/icb/ijc038)
13. Moore JC, Pannell JR. 2011 Sexual selection in plants. *Curr. Biol.* **21**, R176–R182. (doi:10.1016/j.cub.2010.12.035)
14. Hodgins KA, Barrett SCH. 2008 Natural selection on floral traits through male and female function in wild populations of the heterostylous daffodil *Narcissus triandrus*. *Evolution* **62**, 1751–1763. (doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00404.x)
15. Briscoe Runquist RD, Geber MA, Pickett-Leonard M, Moeller DA. 2017 Mating system evolution under strong pollen limitation: Evidence of disruptive selection through male and female fitness in *Clarkia xantiana*. *Am. Nat.* **189**, 549–563. (doi:10.1086/691192)
16. Paterno GB, Silveira CL, Kollmann J, Westoby M, Fonseca CR. 2020 The maleness of larger angiosperm flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 10 921–10 926. (doi:10.1073/pnas.1910631117)
17. Tonnabel J, David P, Pannell JR. 2019 Do metrics of sexual selection conform to Bateman's principles in a wind-pollinated plant? *Proc. R. Soc. B* **286**, 20190532. (doi:10.1098/rspb.2019.0532)
18. Kwok A, Dorken ME. 2022 Sexual selection on male but not female function in monoecious and dioecious populations of broadleaf arrowhead (*Sagittaria latifolia*). *Proc. R. Soc. B* **289**, 20220919. (doi:10.1098/rspb.2022.0919)
19. Barbot E, Dufaj M, De Cauwer I. 2023 Sex specific selection patterns in a dioecious insect-pollinated plant. *Evolution* **77**, 1578–1590. (doi:10.1093/evolut/qpad069)
20. Johnson MG, Shaw AJ. 2016 The effects of quantitative fecundity in the haploid stage on reproductive success and diploid fitness in the aquatic peat moss *Sphagnum macrophyllum*. *Heredity* **116**, 523–530. (doi:10.1038/hdy.2016.13)
21. Janicke T, Morrow EH. 2018 Operational sex ratio predicts the opportunity and direction of sexual selection across animals. *Ecol. Lett.* **21**, 384–391. (doi:10.1111/ele.12907)
22. Graff A. 1999 Population Sex structure and reproductive fitness in gynodioecious *Sidalcea malviflora* (malvaceae). *Evolution* **53**, 1714–1722. (doi:10.1111/j.1558-5646.1999.tb04556.x)
23. Oddou-Muratario S, Klein EK, Demesure-Musch B, Austerlitz F. 2006 Real-time patterns of pollen flow in the wild-service tree, *Sorbus torminalis* (Rosaceae). III. Mating patterns and the ecological maternal neighborhood. *Am. J. Bot.* **93**, 1650–1659. (doi:10.3732/ajb.93.11.1650)
24. Isagi Y, Saito D, Kawaguchi H, Tateno R, Watanabe S. 2007 Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* population. *J. Ecol.* **95**, 983–990. (doi:10.1111/j.1365-2745.2007.01272.x)
25. De Cauwer I, Dufaj M, Cuguen J, Arnaud JF. 2010 Effects of fine-scale genetic structure on male mating success in gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Mol. Ecol.* **19**, 1540–1558. (doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04586.x)
26. De Cauwer I, Arnaud J-F, Schmitt E, Dufaj M. 2010 Pollen limitation of female reproductive success at fine spatial scale in a gynodioecious and wind-pollinated species, *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *J. Evol. Biol.* **23**, 2636. (doi:10.1111/j.1420-9101.2010.02119.x)
27. Dixon PS. 1973 *Biology of the Rhodophyta*. *University reviews in botany*. Edinburgh: Oliver & Boyd.
28. Bishop JDD, Pemberton AJ. 2006 The third way: spermcast mating in sessile marine invertebrates. *Integr. Comp. Biol.* **46**, 398–406. (doi:10.1093/icb/ijc037)
29. Lavaut E, Guillemin M-L, Colin S, Faure A, Coudret J, Destombe C, Valero M. 2022 Pollinators of the sea: A discovery of animal-mediated fertilization in seaweed. *Science* **377**, 528–530. (doi:10.1126/science.abo6661)
30. Kamiya M, Kawai H. 2002 Dependence of the carposporophyte on the maternal gametophyte in three ceramian algae (Rhodophyta), with respect to carposporophyte development, spore production and germination success. *Phycologia* **41**, 107–115. (doi:10.2216/10031-8884-41-2-107.1)
31. Engel CR, Wattier R, Destombe C, Valero M. 1999 Performance of non-motile male gametes in the sea: Analysis of paternity and fertilization success in a natural population of a red seaweed, *Gracilaria gracilis*. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 1879–1886. (doi:10.1098/rspb.1999.0861)
32. Engel CR, Valero M, Lagadeuc Y, Destombe C. 2002 Non-random mating in controlled multiple-donor crosses in *Gracilaria gracilis* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* **37**, 179–190. (doi:10.1017/S096702620200358X)
33. Destombe C, Valero M, Vernet P, Couvet D. 1989 What controls haploid—diploid ratio in the red alga, *Gracilaria verrucosa*? *J. Evol. Biol.* **2**, 317–338. (doi:10.1046/j.1420-9101.1989.2050317.x)
34. Kain(Jones) JM, Destombe C. 1995 A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* **7**, 269–281. (doi:10.1007/BF00004001)
35. Engel CR, Åberg P, Gaggiotti OE, Destombe C, Valero M. 2001 Population dynamics and stage structure in a haploid-diploid red seaweed, *Gracilaria gracilis*. *J. Ecol.* **89**, 436–450. (doi:10.1046/j.1365-2745.2001.00567.x)
36. Destombe C, Godin J, Bodard M. 1988 The decay phase in the life history of *Gracilaria verrucosa*: the consequences in intensive cultivation. In *Algal biotechnology* (ed. T Stadler et al.), pp. 287–303. Oxford, UK: Elsevier.
37. Wattier R, Dallas JF, Destombe C, Saumitou-Laprade P, Valero M. 1997 Single locus microsatellites in Gracilariaceae (Rhodophyta): high level of genetic variability within *Gracilaria gracilis* and conservation in related species. *J. Phycol.* **33**, 868–880. (doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00868.x)
38. Luo H, Mörchen M, Engel CR, Destombe C, Epplen JT, Epplen C, Saumitou-Laprade P, Valero M. 1999 Characterization of microsatellite markers in the red alga *Gracilaria gracilis*. *Mol. Ecol.* **8**, 700–702. (doi:10.1046/j.1365-294x.1999.00879.x)
39. Mauger S, Baud A, Le Corquillé G, Tanguy G, Gegeay E, Creis E, Valero M, Destombe C, Potin P. In press. Genetic resources of macroalgae: development of an efficient method using microsatellite markers in non-model organisms. *Algal Res.* (doi:10.1016/j.algal.2023.103251)
40. Mauger S, Couceiro L, Valero M. 2012 A simple and cost-effective method to synthesize an internal size standard amenable to use with a 5-dye system. *Prime Res. Biotechnol.* **2**, 2315–2329.
41. Peakall R, Smouse PE. 2006 Genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* **6**, 288–295. (doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x)
42. Peakall R, Smouse PE. 2012 GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **28**, 2537–2539. (doi:10.1093/bioinformatics/bts460)

43. R Core Team. 2020 *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
44. Wade MJ. 1979 Sexual selection and variance in reproductive success. *Am. Nat.* **114**, 742–747. (doi:10.1086/283520)
45. Wade MJ, Arnold SJ. 1980 The intensity of sexual selection in relation to male sexual behaviour, female choice, and sperm precedence. *Anim. Behav.* **28**, 446–461. (doi:10.1016/S0003-3472(80)80052-2)
46. Arnold SJ, Wade MJ. 1984 On the measurement of natural and sexual selection: theory. *Evolution* **38**, 709–719. (doi:10.2307/2408383)
47. Henshaw JM, Jennions MD, Kruuk LEB. 2018 How to quantify (the response to) sexual selection on traits. *Evolution* **72**, 1904–1917. (doi:10.1111/evo.13554)
48. Lefcheck JS. 2016 PiecewiseSEM: piecewise structural equation modelling in R for ecology, evolution and systematics. *Methods Ecol. Evol.* **7**, 573–579. (doi:10.1111/2041-210X.12512)
49. Anthes N, Häderer IK, Michiels NK, Janicke T. 2017 Measuring and interpreting sexual selection metrics: evaluation and guidelines. *Methods Ecol. Evol.* **8**, 918–931. (doi:10.1111/2041-210X.12707)
50. Schärer L, Rowe L, Arnqvist G. 2012 Anisogamy, chance and the evolution of sex roles. *Trends Ecol. Evol.* **27**, 260–264. (doi:10.1016/j.tree.2011.12.006)
51. Murphy CG. 1998 Interaction-Independent sexual selection and the mechanisms of sexual selection. *Evolution* **52**, 8–18. (doi:10.1111/j.1558-5646.1998.tb05133.x)
52. Nieuwenhuis BPS, Aanen DK. 2012 Sexual selection in fungi. *J. Evol. Biol.* **25**, 2397–2411. (doi:10.1111/jeb.12017)
53. Beekman M, Nieuwenhuis B, Ortiz-Barrientos D, Evans JP. 2016 Sexual selection in hermaphrodites, sperm and broadcast spawners, plants and fungi. *Phil. Trans. R. Soc. B* **371**, 20150541. (doi:10.1098/rstb.2015.0541)
54. Pannell JR, Labouche A-M. 2013 The incidence and selection of multiple mating in plants. *Phil. Trans. R. Soc. B* **368**, 20120051. (doi:10.1098/rstb.2012.0051)
55. Tonnabel J, David P, Janicke T, Lehner A, Mollet J-C, Pannell JR, Dufay M. 2021 The scope for postmating sexual selection in plants. *Trends Ecol. Evol.* **36**, 556–567. (doi:10.1016/j.tree.2021.02.013)
56. Krueger-Hadfield SA, Roze D, Correa JA, Destombe C, Valero M. 2015 O father where art thou? Paternity analyses in a natural population of the haploid–diploid seaweed *Chondrus crispus*. *Heredity* **114**, 185–194. (doi:10.1038/hdy.2014.82)
57. Knight TM *et al.* 2005 Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **36**, 467–497. (doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.102403.115320)
58. Levitan DR, Sewell MA. 1998 Fertilization success in free-spawning marine invertebrates: review of the evidence and fisheries implications. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* **125**, 159–164.
59. Yund PO. 2000 How severe is sperm limitation in natural populations of marine free-spawners? *Trends Ecol. Evol.* **15**, 10–13. (doi:10.1016/S0169-5347(99)01744-9)
60. Berndt M-L, Callow JA, Brawley SH. 2002 Gamete concentrations and timing and success of fertilization in a rocky shore seaweed. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **226**, 273–285. (doi:10.3354/meps226273)
61. Serrão EA, Havenhand J. 2009 Fertilization strategies. In *Marine hard bottom communities*, pp. 149–164.
62. Searles RB. 1980 The strategy of the red algal life history. *Am. Nat.* **115**, 113–120. (doi:10.1086/283548)
63. Santelices B. 2002 Recent advances in fertilization ecology of macroalgae. *J. Phycol.* **38**, 4–10. (doi:10.1046/j.1529-8817.2002.00193.x)
64. Maggs CA, Fletcher HL, Fewer D, Loade L, Mineur F, Johnson MP. 2011 Speciation in red algae: members of the Ceramiales as model organisms. *Integr. Comp. Biol.* **51**, 492–504. (doi:10.1093/icb/ict075)
65. Engel CR, Destombe C. 2002 Reproductive ecology of an intertidal red seaweed, *Gracilaria gracilis*: influence of high and low tides on fertilization success. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **82**, 189–192. (doi:10.1017/S0025315402005349)
66. Guillemin ML, Valenzuela P, Gaitán-Espitia JD, Destombe C. 2014 Evidence of reproductive cost in the triphasic life history of the red alga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* **26**, 569–575. (doi:10.1007/s10811-013-0072-x)
67. Guimarães M, Plastino EM, Oliveira EC. 1999 Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Botanica Marina* **42**, 481–486. (doi:10.1515/BOT.1999.055)
68. Campbell DR. 1989 Measurements of selection in a hermaphroditic plant: variation in male and female pollination success. *Evolution* **43**, 318–334. (doi:10.1111/j.1558-5646.1989.tb04230.x)
69. O'Connell LM, Johnston MO. 1998 Male and female pollination success in a deceptive orchid, a selection study. *Ecology* **79**, 1246. (doi:10.2307/176740)
70. Brawley SH, Johnson LE. 1992 Gametogenesis, gametes and zygotes: An ecological perspective on sexual reproduction in the algae. *Br. Phycol. J.* **27**, 233–252. (doi:10.1080/00071619200650241)
71. Pickett-Heaps JD, West J. 1998 Time-lapse video observations on sexual plasmogamy in the red alga *Bostrychia*. *Eur. J. Phycol.* **33**, 43–56. (doi:10.1080/09670269810001736523)
72. Hommersand MH, Fredericq S. 1990 *Sexual reproduction and cystocarp development*. Cambridge: Cambridge University Press.
73. Fredericq S, Hommersand MH. 1989 Proposal of the Gracilariales ord. Nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. *J. Phycol.* **25**, 213–227. (doi:10.1111/j.1529-8817.1989.tb00116.x)
74. Hossaert M, Valero M. 1988 Effect of ovule position in the pod on patterns of seed formation in two species of *Lathyrus* (Leguminosae: papilionoideae). *Am. J. Bot.* **75**, 1714–1731. (doi:10.1002/j.1537-2197.1988.tb11248.x)
75. Willson MF, Burley N. 1983 *Mate choice in plants: tactics, mechanisms, and consequences*. Princeton: Princeton University Press.
76. Rigney LP. 1995 Postfertilization causes of differential success of pollen donors in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae): nonrandom ovule abortion. *Am. J. Bot.* **82**, 578–584. (doi:10.1002/j.1537-2197.1995.tb11502.x)
77. Havens K, Delph LF. 1996 Differential seed maturation uncouples fertilization and siring success in *Oenothera organensis* (Onagraceae). *Heredity* **76**, 623–632. (doi:10.1038/hdy.1996.89)
78. Bruggeman J, Debets AJM, Hoekstra RF. 2004 Selection arena in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 181–188. (doi:10.1016/j.fgb.2003.10.007)
79. van der Meer JP. 1986 Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). Xi. Further characterization of a bisexual mutant. *J. Phycol.* **22**, 151–158. (doi:10.1111/j.1529-8817.1986.tb04158.x)
80. Richerd S, Destombe C, Cuguen J, Valero M. 1993 Variation of reproductive success in a haplo-diploid Red Alga, *Gracilaria verrucosa*: Effects of parental identities and crossing distance. *Am. J. Bot.* **80**, 1379–1391. (doi:10.1002/j.1537-2197.1993.tb15382.x)
81. Gurgel CFD, Fredericq S, Norris JN, Yoneshigue-Valentin Y. 2008 Two new flat species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Phycologia* **47**, 249–264. (doi:10.2216/PH06-59.1)
82. Lavaut E, Valero M, Mauger S, Guillemin ML, Destombe C, Dufay M. 2023 Data from: Sexual selection in seaweed? Testing Bateman's principles in the red alga *Gracilaria gracilis*. Dryad Digital Repository. (doi:10.5061/dryad.t4b8gtj6c)
83. Lavaut E, Valero M, Mauger S, Guillemin ML, Destombe C, Dufay M. 2023 Sexual selection in seaweed? Testing Bateman's principles in the red alga *Gracilaria gracilis*. Figshare. (doi:10.6084/m9.figshare.c.6824001)

Table S2. Female metrics. X and Y: geographical coordinates within the population; Biomass: volume (in cm³) used as a proxy; NbC/cm³: Number of cystocarps per volume of thallus; RS: Reproductive success, total number of offspring; MS: mating success, number of male partners; RelRS: relative reproductive success, reproductive success standardized by the mean; RelMS: relative mating success, mating success standardized by the mean; D: mean distance to all males located in the population.

ID	X(m)	Y(m)	Biomass (cm ³)	NbC/cm ³	RS	MS	Rel RS	Rel MS	D (m)
F4	4.07	0.70	63.78	316.90	20212.4	16.0	1.20	1.39	1.62
F6	4.04	0.75	18.57	136.87	2541.6	10.1	0.15	1.19	1.58
F11	3.91	1.10	4.73	275.87	1304.7	11.5	0.08	1.20	1.38
F18	3.86	1.34	34.38	343.77	11818.2	15.7	0.70	1.48	1.34
F20	3.87	1.52	15.63	415.08	6485.8	10.9	0.39	1.10	1.37
F23	3.78	1.80	20.21	299.21	6046.7	12.3	0.36	1.55	1.40
F26	3.67	1.80	32.43	245.74	7970.4	8.4	0.47	0.81	1.32
F29	3.56	1.63	81.94	244.46	20031.2	4.4	1.19	0.43	1.18
F30	3.50	1.93	163.10	353.96	57731.5	11.1	3.43	0.97	1.30
F31	3.46	1.78	34.23	292.85	10025.5	10.2	0.60	0.90	1.19
F32	3.45	1.72	32.14	346.32	11131.7	10.5	0.66	0.86	1.16
F36	3.37	1.65	59.82	348.87	20869.3	15.5	1.24	1.27	1.09
F37	3.32	1.77	189.22	351.41	66495.7	11.7	3.96	1.16	1.12
F40	3.45	1.46	56.66	308.00	17450.2	15.8	1.04	1.51	1.07
F41	3.32	2.03	90.53	427.81	38728.6	11.3	2.30	1.00	1.29
F43	3.34	1.99	30.45	338.68	10311.2	9.3	0.61	0.82	1.27
F50	3.08	2.02	30.93	254.65	7875.3	10.3	0.47	0.91	1.23
F55	3.00	1.92	55.95	481.28	26928.8	13.2	1.60	1.46	1.15
F57	2.88	1.97	124.69	402.34	50168.2	9.9	2.98	1.34	1.18
F60	3.03	1.79	85.47	366.69	31343.0	13.6	1.86	1.27	1.07
F67	3.39	1.44	49.71	346.32	17215.2	10.7	1.02	1.22	1.03
F69	3.30	1.47	51.32	567.86	29145.0	14.2	1.73	1.24	1.00
F78	3.30	1.41	89.56	371.93	33310.0	13.5	1.98	1.16	0.99
F83	3.20	1.39	26.33	360.47	9491.3	13.8	0.56	1.13	0.95
F88	3.01	1.41	58.15	332.95	19359.5	9.7	1.15	0.93	0.92
F100	3.29	1.14	14.03	313.22	4393.2	6.7	0.26	0.62	0.97
F101	3.20	1.20	65.40	336.14	21984.5	10.4	1.31	0.85	0.94
F103	3.07	1.14	4.44	273.96	1215.8	9.9	0.07	0.88	0.91
F106	3.39	0.97	140.96	198.63	27998.1	12.1	1.67	1.06	1.06
F108	3.34	0.86	104.06	244.04	25395.1	9.0	1.51	0.92	1.07
F122	3.05	0.68	56.99	415.08	23653.4	10.8	1.41	1.01	1.06
F127	2.91	0.66	18.17	463.23	8415.5	14.1	0.50	1.28	1.04
F128	2.83	0.66	3.53	460.67	1624.7	14.3	0.10	1.35	1.03
F141	2.77	1.14	40.41	264.83	10702.7	11.5	0.64	0.94	0.88
F145	2.67	1.06	36.68	243.19	8919.0	10.4	0.53	0.91	0.89
F162	2.50	1.13	32.69	466.01	15231.5	8.4	0.91	0.69	0.90
F163	2.46	1.09	88.63	308.12	27309.5	10.2	1.62	0.83	0.91
F166	2.45	1.35	64.07	402.34	25780.0	8.0	1.53	0.86	0.94
F167	2.39	1.38	85.36	300.48	25648.2	8.4	1.53	0.68	0.96
F173	2.34	1.27	48.38	290.30	14045.5	13.8	0.84	1.27	0.95
F178	2.94	0.44	88.61	280.11	24821.6	10.4	1.48	1.22	1.18
F189	2.01	0.88	49.56	282.66	14008.9	12.5	0.83	1.16	1.07
F208	1.94	0.89	46.22	236.82	10945.3	10.7	0.65	0.95	1.10
F216	1.65	0.72	22.75	376.88	8573.0	12.8	0.51	1.18	1.29
F221	1.42	0.65	47.79	264.83	12657.2	8.8	0.75	0.92	1.47
F232	2.00	1.09	154.83	308.12	47706.9	11.5	2.84	0.94	1.06
F234	1.90	0.98	59.66	152.79	9114.9	10.1	0.54	0.96	1.11
F235	1.71	1.00	139.87	445.63	62329.4	12.7	3.71	1.11	1.22
F242	1.32	0.63	6.85	285.21	1953.0	8.8	0.12	0.78	1.55
F249	0.53	0.76	8.73	303.67	2649.5	7.2	0.16	0.88	2.18

Table S3. Male metrics. X and Y: geographical coordinates within the population; RS: Reproductive success, total number of offspring sired; MS: mating success, number of female partners; RelRS: relative reproductive success, reproductive success standardized by the mean; RelMS: relative mating success, mating success standardized by the mean; D: mean distance to all females located in the population.

ID	X(m)	Y(m)	Biomass (cm ³)	RS	MS	Rel RS	Rel MS	D (m)
M8	3.92	0.82	4.0	3816.0	4.6	0.37	0.66	1.29
M9	4.11	0.88	2.0	1552.7	2.8	0.15	0.41	1.42
M12	3.72	1.11	9.6	6936.5	9.1	0.68	1.31	1.07
M13	3.77	0.99	0.3	889.0	1.8	0.09	0.26	1.13
M15	3.63	1.04	12.7	17076.9	15.2	1.67	2.20	1.03
M17	3.57	0.87	33.8	3911.5	7.2	0.38	1.04	1.05
M25	3.65	1.65	18.7	14467.0	14.8	1.41	2.14	1.04
M26	3.61	1.76	5.3	22271.8	11.5	2.17	1.65	1.06
M27	3.67	1.80	na	594.7	1.8	0.06	0.26	1.11
M28	3.56	1.78	3.3	34489.7	17.0	3.37	2.45	1.04
M29	3.56	1.63	na	26012.9	19.3	2.54	2.78	0.98
M31	3.46	1.78	na	3338.2	4.6	0.33	0.66	0.99
M35	3.37	1.67	4.6	12480.9	8.9	1.22	1.29	0.91
M38	3.26	1.74	2.3	31866.3	11.9	3.11	1.71	0.91
M42	3.32	2.00	27.0	19491.0	11.3	1.90	1.62	1.07
M46	3.28	2.03	20.5	40402.3	17.7	3.94	2.55	1.08
M47	3.19	2.04	na	13150.1	14.1	1.28	2.03	1.07
M54	2.90	2.10	33.1	11053.6	6.4	1.08	0.92	1.13
M61	2.99	1.74	49.4	36528.7	25.7	3.56	3.70	0.90
M65	3.48	1.38	18.8	3113.6	4.2	0.30	0.61	0.89
M69	3.30	1.47	na	21243.2	13.8	2.07	1.99	0.83
M71	3.58	1.27	16.9	11439.0	12.4	1.12	1.79	0.95
M72	3.54	1.13	29.6	16653.8	13.0	1.63	1.88	0.95
M73A	3.50	1.24	na	0.0	0.0	0.00	0.00	0.91
M73B	3.50	1.24	na	0.0	0.0	0.00	0.00	0.91
M80	3.30	1.30	na	18685.4	17.3	1.82	2.49	0.81
M85	3.11	1.42	4.5	0.0	0.0	0.00	0.00	0.79
M87	2.97	1.49	10.0	294.6	0.8	0.03	0.12	0.81
M89	3.07	1.38	40.6	42135.7	25.9	4.11	3.73	0.78
M97	3.19	1.23	19.7	9201.5	6.4	0.90	0.92	0.79
M101	3.20	1.20	na	3754.7	8.1	0.37	1.16	0.80
M107	3.28	1.02	37.0	48112.2	26.8	4.69	3.86	0.87
M110	2.97	1.04	8.5	5584.5	7.4	0.54	1.06	0.82
M116	3.13	0.89	14.3	259.3	0.8	0.03	0.12	0.88
M117	3.11	1.00	24.7	41785.9	21.8	4.08	3.14	0.84
M130	2.75	0.64	na	1435.7	3.5	0.14	0.51	1.01
M132	2.78	0.94	19.6	24263.2	17.8	2.37	2.57	0.87
M135	2.51	0.78	4.5	4420.2	4.7	0.43	0.68	1.00
M151	2.62	1.46	18.7	35132.2	19.8	3.43	2.86	0.88
M158	2.49	1.00	16.3	15802.6	9.6	1.54	1.38	0.93
M159	2.53	1.15	3.2	32846.8	16.8	3.21	2.42	0.88
M160	2.53	1.09	2.4	11591.9	9.1	1.13	1.31	0.89
M168	2.51	1.24	na	8537.4	8.2	0.83	1.18	0.89
M171	2.42	1.28	na	11579.8	7.3	1.13	1.05	0.93
M176	3.06	0.52	0.8	7296.0	4.5	0.71	0.65	1.08
M181	2.19	1.00	51.7	12958.7	9.3	1.26	1.33	1.06
M184	2.35	0.74	na	2363.8	1.7	0.23	0.25	1.08
M185	2.12	0.99	11.4	8652.7	9.1	0.84	1.31	1.10
M187	2.24	0.76	3.5	1980.2	1.7	0.19	0.24	1.11
M188	2.06	1.03	26.5	28398.8	10.1	2.77	1.46	1.12
M203	1.95	0.58	14.8	585.8	2.7	0.06	0.39	1.34
M204	1.69	0.55	19.6	5323.1	6.5	0.52	0.94	1.51
M205	1.85	0.76	na	15802.4	11.1	1.54	1.60	1.32
M206	1.87	0.72	1.8	11565.4	7.9	1.13	1.14	1.33
M210	1.68	0.57	9.2	1227.8	4.6	0.12	0.67	1.51
M213A	1.58	0.61	8.4	10806.1	7.0	1.05	1.01	1.55
M213B	1.58	0.61	na	706.8	0.9	0.07	0.13	1.55
M214	1.60	0.68	17.9	282.6	0.9	0.03	0.13	1.51
M215	1.62	0.70	1.2	996.9	3.7	0.10	0.54	1.49
M218	1.76	0.85	42.3	34461.3	13.3	3.36	1.92	1.35
M224	1.95	1.78	54.1	7407.5	8.9	0.72	1.28	1.34
M228	1.94	1.37	1.9	1660.9	0.9	0.16	0.14	1.22
M233	1.91	1.16	16.1	12570.0	7.5	1.23	1.07	1.21
M240	1.39	0.83	2.3	5481.1	2.7	0.53	0.40	1.63
M243	1.08	0.38	6.7	0.0	0.0	0.00	0.00	2.04
M244	1.12	0.44	10.5	0.0	0.0	0.00	0.00	1.98
M250	0.41	0.93	10.1	2316.6	3.6	0.23	0.52	2.50
M251	1.14	0.15	2.0	887.8	1.8	0.09	0.25	2.11
M252	0.33	0.86	0.1	836.5	0.7	0.08	0.10	2.59
M253	0.45	1.07	1.9	175.1	1.0	0.02	0.14	2.45
M254	0.63	0.93	3.3	303.0	0.9	0.03	0.12	2.29

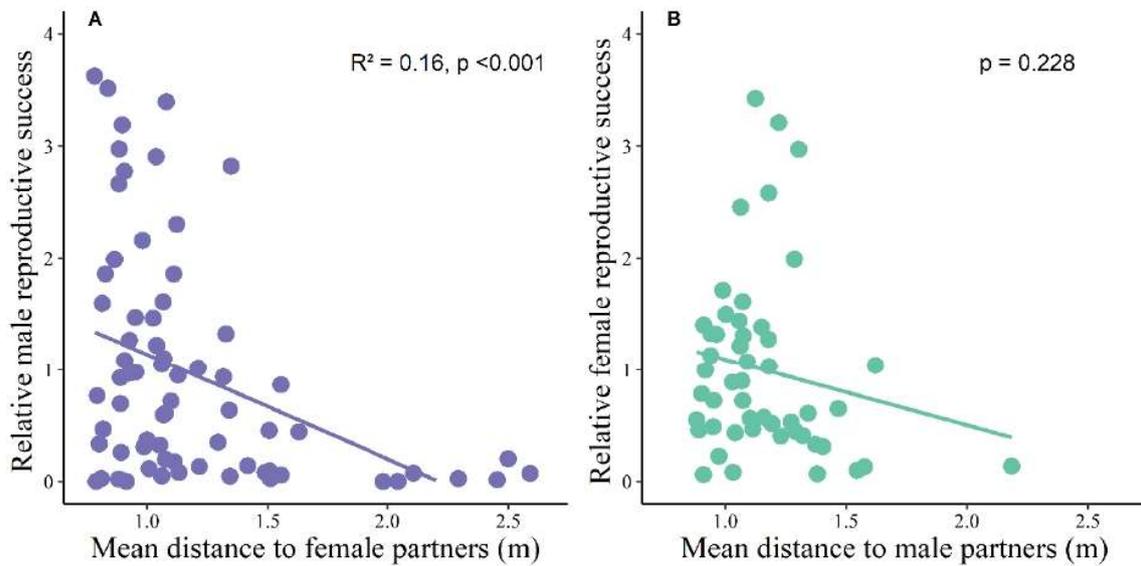


Figure S1. Relationship between reproductive success and mean distance to partners (A) in males and (B) in females. The significance of the relationship, estimated by the slope of the linear regression, is indicated on each graph.

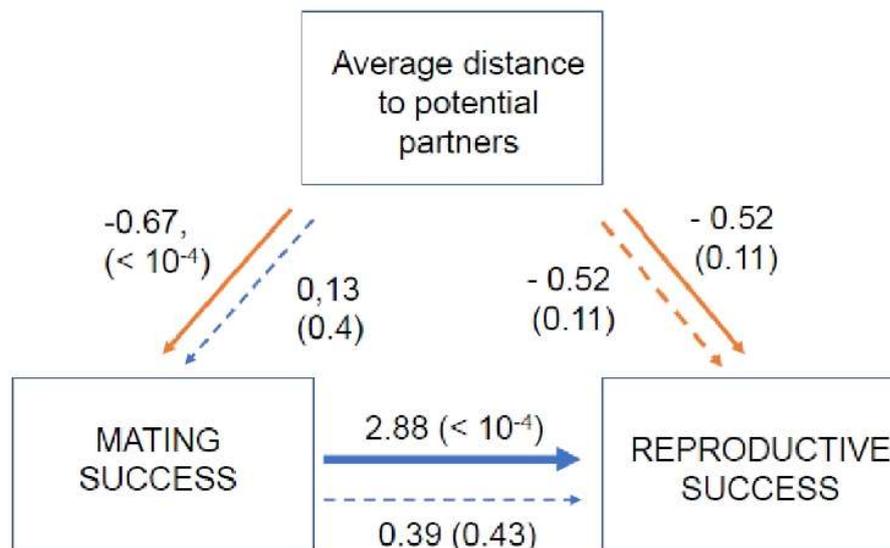


Figure S2. Results from the multigroup SEM analysis. Distance to potential partners can have a direct effect on the mating success and/or the reproductive success. It can also have an indirect effect on reproductive success, mediated by the relationship between mating and reproductive success (i.e. Bateman gradient). Estimates for each correlation are plotted with associated p -values within brackets, with blue arrows for positive effects and orange arrows for negative effects. In the SEM analysis, two correlations differed between males and females (i.e. significant sex \times variable interaction, $p < 10^{-4}$). Sex specific statistics are indicated, with dotted arrows referring to females and plain arrows to males. The same statistics appear for the correlation between distance and reproductive success as no significant interaction was found in this case.

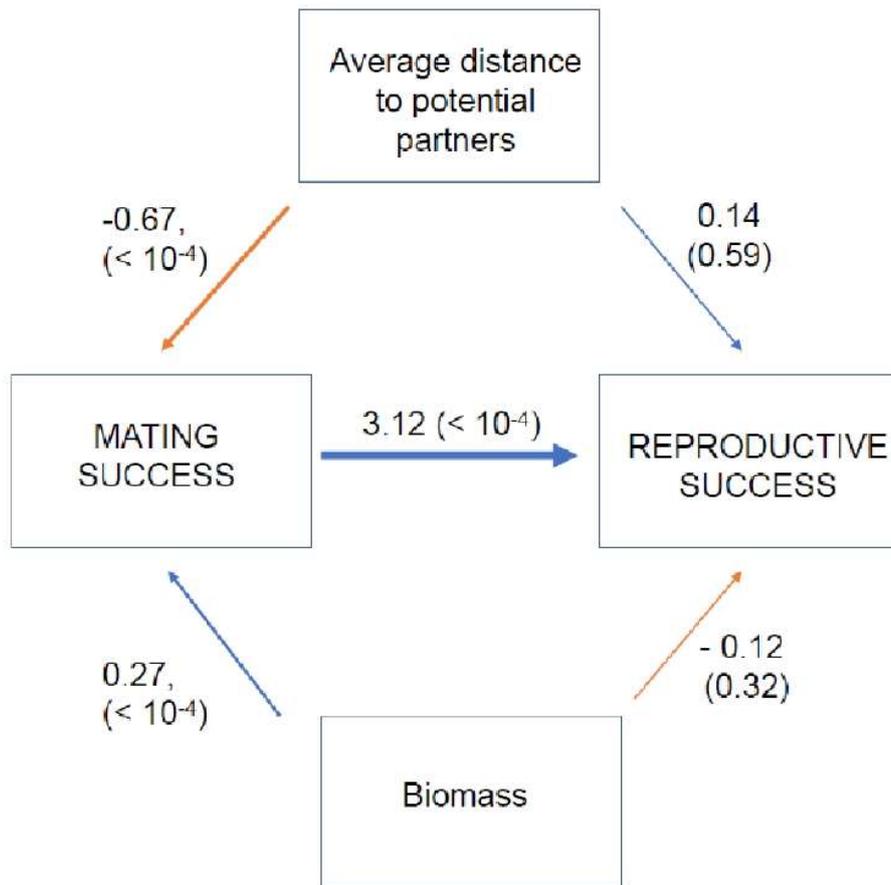


Figure S3. Results from the SEM analysis on males only. Both distance to potential partners and biomass can have a direct effect on the mating success and/or the reproductive success. They can also have an indirect effect on reproductive success, mediated by the relationship between mating and reproductive success (i.e. Bateman gradient). Estimates for each correlation are plotted with associated p -values within brackets, with blue arrows for positive effects and orange arrows for negative effects.

5.3 Etude des traits mâles candidats à la sélection sexuelle et de la variation du succès de fécondation des mâles

L'article précédent montre qu'il y a une possibilité de sélection sexuelle chez *G. gracilis*. Dans cette deuxième partie, nous nous sommes donc intéressés à plusieurs traits qui pourraient être sous sélection chez les mâles : la biomasse, la durée de fertilité des mâles, c'est-à-dire la période pendant laquelle ils réalisent des fécondations, et la capacité de leurs gamètes à être transportées par *I. balthica*.

Dans cet article, nous avons également montré que la distance aux partenaires avait un effet sur le succès reproducteur des mâles. Dans cette partie, nous avons ainsi comparé le succès des mâles entre les conditions naturelles et des conditions contrôlées en laboratoire afin de s'affranchir de l'effet de la distance.

La stabilité temporelle du succès de fécondation des mâles en population naturelle a de plus été testée grâce aux analyses réalisées en 1995 et 1997 (Engel et al., 1999 ; Engel, 2000).

Les analyses dans cette partie de la thèse ont été effectuées à partir des données issues des analyses de paternité réalisées : en 1995 et en 1997 par Carolyn Engel, en juin 2020 dans le cadre du stage de Master 1 de Coline Giraud co-encadrée avec Christophe Destombe, en août 2020 (données aussi utilisées dans l'article soumis 5.2), ainsi que celles réalisées dans le cadre de l'expérience menée avec les idotées (Lavaut et al., 2022, Chapitre 4).

5.3.1 Matériel et méthode

5.3.1.1 Analyse de paternité

5.3.1.1.1 En population naturelle

Les analyses de paternité ont été réalisées au mois de juin et au mois d'août 2020 dans la population GNH (**Tableau 5.1**) selon le protocole présenté dans le Chapitre 2 afin de répondre à plusieurs questions. Tout d'abord, les analyses réalisées au mois d'août ont été utilisées pour tester les trois principes de Bateman et ainsi étudier l'occurrence de la sélection sexuelle chez *G. gracilis* (voir article soumis 5.2). Les analyses du mois de juin (**Tableau 5.1**) ont été utilisées conjointement avec celles d'août pour étudier la phénologie de la reproduction chez les mâles de la population en 2020. Enfin, les analyses du mois d'août 2020 ont été utilisées comme point de comparaison temporelle avec les analyses de paternité réalisées en 1995 et 1997 (Engel et al., 1999) pour les individus ayant survécu plus de 20 ans dans la population de GNH (voir Chapitre 3). Ces dernières analyses ont été réalisées afin de tester la stabilité du succès reproducteur de ces individus sur le long terme.

Tableau 5.1. Nombre de cystocarpes et proportion de femelles utilisés dans les analyses de paternité en juin et en août 2020 dans la population naturelle de Gris Nez Haut.

	Juin 2020	Août 2020
Nombre de femelles total dans la population	47	70
Nombre de femelles avec cystocarpes prélevés	20	64
Pourcentage de femelles avec cystocarpes prélevés	43%	91%
Nombre moyen de cystocarpes prélevés pas femelle	22 (10 à 32)	32 (12 à 48)
Nombre total de cystocarpes analysés	437	2016

5.3.1.1.2 En croisements contrôlés

Des cystocarpes ont été prélevés et analysés suite à l'expérience de croisements avec ou sans idotées décrite dans Lavaut et al. (2022) (voir Chapitre 4). En plus des 4 conditions expérimentales (algues mâles et femelles en présence (C1) ou absence d'idotées (C2) ; algues femelles seules en présence d'idotées préalablement incubées avec des algues mâles (C3) ou témoin sans idotées (C4) présentées dans Lavaut et al. (2022), une cinquième condition a été mise en place : algues mâles et femelles avec bullage et sans idotées (C5) (**Tableau 5.2**). Dans ces expériences, les 10 individus mâles et les 6 individus femelles utilisés proviennent de la population GNH (l'identité des individus utilisés pour chaque croisement est donnée en **Tableau 5.2**). Dans chaque aquarium,

3 géotypes femelles et 10 géotypes mâles différents étaient présents. Les mêmes géotypes mâles ont été réutilisés entre les répliques, en revanche, les géotypes femelles étaient différents d'un réplique à l'autre (**Tableau 5.2**).

L'objectif des analyses de paternité était de comparer le succès de fécondation des mâles estimé sur le terrain avec celui estimé au laboratoire. La condition de laboratoire permet de s'affranchir de l'effet distance aux partenaires sur le terrain (c'est-à-dire déterminée par leur position géographique dans la flaque) (voir article soumis 5.2).

Tableau 5.2. Nombre de cystocarpes analysés dans chaque condition et dans chaque réplique après les croisements réalisés en conditions expérimentales. ng : cystocarpes non-génotypés.

	Réplica 3	Réplica 4	Total
Identité des femelles	163 – 249 – 32	125 – 86 – 30	
Identité des mâles	3 – 240 – 54 – 151 – 20 87 – 9 – 12 – 61 – 181		
Condition “C1” : Mâles et femelles avec idiotées	87	112	199
Condition “C2” : Mâles et femelles sans idiotées	<i>ng</i>	<i>ng</i>	<i>ng</i>
Condition “C3” : Femelles et idiotées pré-incubées avec des mâles	84	31	58
Condition “C4” : Femelles seules (i.e., biais du manipulateur)	2	0	2
Condition “C5” : Mâles et femelles avec bullage et sans idiotées	101	91	192
Total	217	234	451

5.3.1.2 Estimateurs des succès de fécondation et reproducteur

Grâce aux analyses de paternité et aux mesures réalisées sur le terrain, il est possible de mesurer plusieurs estimateurs chez les mâles et les femelles.

Pour les mâles, ces estimateurs sont :

- **Le succès de fécondation**, qui correspond à la proportion de cystocarpes engendrés par un mâle. Le succès de fécondation peut être estimé indépendamment pour chaque femelle ou sur l'ensemble des femelles.
- **Le succès reproducteur**, qui correspond au nombre total de cystocarpes engendrés par un mâle dans une saison de reproduction. Celui-ci est estimé par le produit du succès de fécondation mâle pour une femelle donnée et le succès reproducteur de cette femelle, sommé sur toutes les femelles.

- **Le nombre de partenaires**, qui correspond au nombre total de femelles différentes avec lequel un mâle a produit au moins un descendant.

Pour les femelles, ces estimateurs sont :

- **Le succès de fécondation**, qui correspond au nombre moyen de cystocarpes produits par centimètre de thalle
- **Le succès reproducteur**, qui correspond au nombre total de cystocarpes produit par une femelle dans une saison de reproduction. Celui-ci est estimé par le produit du succès de fécondation et de la biomasse totale de la femelle (c'est-à-dire volume total du thalle).
- **Le nombre de partenaires**, qui correspond au nombre total de mâles différents avec lesquels une femelle a produit au moins un descendant.

Le succès reproducteur et le nombre de partenaires ont été estimés sur 50 femelles pour lesquelles la biomasse et le nombre de cystocarpes par centimètre ont pu être mesurés. Le succès reproducteur et le nombre de partenaires des femelles et des mâles ont ensuite été standardisés en divisant la valeur obtenue pour chaque individu par la moyenne respective pour chaque sexe. Ces estimateurs ont été utilisés pour mesurer les 3 indices de Bateman (voir article section 5.2). Ces estimateurs ont été calculés seulement avec les résultats des analyses de paternité du mois d'août 2020 car c'était le jeu de données le plus complet.

Dans les analyses de la phénologie, le succès de fécondation pour chaque mâle a été calculé sur le terrain au début et en fin de saison de reproduction sur la totalité des descendants engendrés (cystocarpes) en juin et en août 2020.

Le succès de fécondation mâle a également été calculé au laboratoire dans les expériences de croisements contrôlés. La totalité des cystocarpes engendrés (c'est-à-dire, pour chacune des conditions C1, C2, C3, C4 et C5) par les 10 mâles utilisés dans l'expérimentation a été prise en compte pour le calcul de cet estimateur.

Le succès de fécondation obtenu sur le terrain pour les 24 mâles étant présents à la fois en 1995, 1997, et août 2020 a été estimé. Pour ces dates d'échantillonnage, des analyses de paternité étaient disponibles (Engel et al., 1999 ; Engel, 2000). A chaque date d'échantillonnage, l'estimation s'est faite en utilisant la totalité des cystocarpes engendrés uniquement par ces 24 mâles. Le reste des cystocarpes genotypés, fécondés par d'autres pères, n'a pas été pris en compte (contrairement aux analyses présentées dans l'article en section 5.2).

5.3.1.3 Traits mâles étudiés

5.3.1.3.1 Distance aux partenaires

La distance entre chaque individu et tous ses partenaires sexuels potentiels (i.e. tous les individus du sexe opposé) a été calculée à l'aide des coordonnées géographiques au sein de la population GNH. La moyenne de ces distances a été utilisée comme un indicateur de l'accès potentiel aux partenaires sexuels. Cet indice a été calculé pour les mâles et pour les femelles présents lors de l'échantillonnage du mois d'août 2020 (voir article section 5.2).

5.3.1.3.2 Phénologie de la reproduction des mâles

La période de fertilité des mâles a été estimée en utilisant les analyses de paternité réalisées sur les échantillonnages de juin et d'août 2020 (voir les résultats ci-dessous pour plus de détails). Cette analyse a été effectuée en prenant en compte les 88 mâles identifiés par leur génotype multilocus en juin et en août. Les analyses de paternité montrent qu'en juin certains cystocarpes sont issus de la fécondation de mâles qui n'ont pas été prélevés en juin (et réciproquement pour le mois d'août). Les 88 mâles ont donc été considérés comme présents dans la population en juin et en août, même s'ils n'ont pas tous été échantillonnés sur ces 2 mois, soit parce qu'ils étaient ensablés ou étaient sous forme dormante (dans ce cas seul le disque de fixation est présent) soit parce que les frondes étaient trop petites (voir Chapitre 3 pour plus de détails).

Trois catégories de mâles ont été discriminées : ceux ayant réalisé des fécondations uniquement en juin, ceux ayant réalisé des fécondations uniquement en août et ceux ayant réalisé des fécondations en juin et en août.

Ces 3 groupes de mâles ont été comparés afin de déterminer si une plus grande période de fertilité des mâles pouvait résulter en un plus grand succès de fécondation ou nombre de partenaires.

5.3.1.3.3 Biomasse

La biomasse des mâles en août 2020 a été estimée en utilisant la longueur (l) et le diamètre (d) mesurés sur le terrain pour calculer le volume cylindrique ($V = \pi \times l \times 0.25d^2$) (Cf Chapitre 2).

5.3.1.4 Analyses statistiques

5.3.1.4.1 Effet des traits mâles

Biomasse et distance aux partenaires : Des régressions linéaires simples ont été réalisées afin de tester si la biomasse avait un effet sur le succès reproducteur mâle ou le nombre de partenaires. Comme le nombre de partenaires et le succès reproducteur sont très corrélés chez les mâles (cf article 5.2), si un trait est corrélé avec l'un de ces estimateurs, il le sera probablement aussi avec le deuxième (comme c'est le cas de la distance aux partenaires, voir 5.2). Or, pour déterminer si un trait peut être sous-sélection sexuelle il est important de déterminer si ce trait influence principalement le nombre de partenaires ou le succès reproducteur. Pour cela, des modèles de régressions linéaires multiples ont été construits pour tester si un potentiel effet de la biomasse sur le succès reproducteur n'était pas uniquement la conséquence de l'effet de la biomasse sur le nombre de partenaires. De la même manière, des modèles de régressions linéaires multiples ont été utilisés pour tester si les effets potentiels de la biomasse et de la distance combinés sur le succès reproducteur n'étaient pas uniquement la conséquence de leur effet sur le nombre de partenaires. Les régressions linéaires ont été réalisées à l'aide de la fonction `lm()` sur R Core Team 2020 (v 4.0.3).

Période de fertilité : Le test de rang non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les succès de fécondation et le nombre de partenaires entre les 3 groupes de mâles de fertilité différentes (c'est-à-dire mâles ayant réalisé des fécondations seulement en juin 2020, ceux ayant réalisé des fécondations seulement en août 2020 et ceux ayant réalisé des fécondations en juin et en août 2020). Les tests ont été réalisés à l'aide de la fonction `cor.test()` sur R Core Team 2020 (v 4.0.3).

5.3.1.4.2 Variation du succès de fécondation des mâles

Des tests de corrélation de Spearman ont été réalisés pour comparer les succès de fécondations des mâles entre 1995, 1997 et 2020 (août), ainsi qu'entre les différentes conditions expérimentales et la population naturelle (août 2020). Les tests ont été réalisés à l'aide de la fonction `wilcox.test()` sur R Core Team 2020 (v 4.0.3).

5.3.2 Résultats

5.3.2.1 Analyses de paternités

5.3.2.1.1 Gris-Nez Haut juin 2020

En juin 2020, à partir de l'analyse des 437 cystocarpes, le génotype paternel a pu être reconstitué pour 198 cystocarpes, dont 76% d'entre eux ont pu être attribués à des mâles de la population, soit 150 cystocarpes, et 24% à des mâles extérieurs à la flaqué non cartographiés, soit 48 cystocarpes (**Tableau 5.3**). Les cystocarpes restant (55%) ne présentaient pas suffisamment de locus amplifiés pour être attribués à un père ou tous les locus amplifiés étaient identiques au génotype de la mère (**Tableau 5.3**). Ce dernier résultat est sans doute dû à des problèmes techniques d'amplification dus à l'échantillonnage au début de la saison de reproduction. En effet, les cystocarpes sont à un stade de développement précoce, et l'ADN paternel est probablement en trop faible quantité pour être détecté par rapport à l'ADN maternel du thalle et du péricarpe (enveloppe du cystocarpe).

Sur les 61 mâles échantillonnés au mois de juin, 23 n'ont engendré aucun cystocarpe. A l'inverse, dix cystocarpes de juin présentent des génotypes paternels de mâles prélevés seulement en août (voir matrice de fécondation **Annexe 1**).

Tableau 5.3. Identification de la paternité dans les analyses réalisées en juin et août 2020, ainsi que dans l'expérience de croisements contrôlés en laboratoire. N_C : nombre de cystocarpes ; P_C : Proportion de cystocarpes.

	Juin 2020		Août 2020		Expérience	
	N _C	P _C	N _C	P _C	N _C	P _C
Paternité identifiée	198	45%	1952	97%	328	73%
Mâles de la population	150	76%	1795	92%	-	-
Mâles extérieurs	48	24%	157	8%	-	-
Paternité non-identifiée	239	55%	64	3%	104	23%
Loci amplifiés insuffisants	118	49%	33	51%	80	77%
Identique au génotype maternel	121	51%	21	33%	24	23%
Présente 3 allèles pour au moins 1 locus	0	0%	10	16%	0	0%
Maternité non identifiée	-	-	-	-	19	4%
Total	437		2016		451	

5.3.2.1.2 Gris-Nez Haut août 2020

En août 2020, seuls 3% des cystocarpes génotypés ont été écartés des analyses de paternité, parmi lesquels 51 ne présentaient pas suffisamment de locus amplifiés pour être attribués à un père ou tous les locus amplifiés étaient identiques au génotype de la mère et 10 avaient un génotype triploïde pour certains des loci utilisés (**Tableau 5.3**). La proportion de cystocarpes ayant été engendrés par des mâles extérieurs était de 8% (**Tableau 5.3**). Sur les 71 mâles prélevés au mois d'août, seuls 3 n'ont réalisé aucune fécondation (voir matrice de fécondation, **Annexe 2**). Une partie des cystocarpes génotypés en août (N=87; **Annexe 2**) ont été engendrés par 8 mâles qui ont été échantillonnés seulement en juin (sans doute parce qu'ils ne restaient plus de fronde en août, ceci correspondrait à des individus présents sous forme dormante; voir Chapitre 3 pour plus de détails).

5.3.2.1.3 Gris-Nez Haut 1995 et 1997

Les données d'analyses de paternité étaient disponibles au laboratoire, suite à la thèse de Carolyn Engel (2000) pour l'année 1995 (Engel et al., 1999) et pour l'année 1997 (Engel, 2000, Article 6, tome II). Les 24 mâles ont engendré 179 cystocarpes en 1995 (soit 78% des fécondations), 174 cystocarpes en 1997 (soit 65% des fécondations) et 878 cystocarpes en 2020 (soit 49% des fécondations) (**Tableau 5.4**). Ces mâles ont donc engendré une grande proportion des cystocarpes dans la population, même en 2020 où ils ne représentent pourtant que 30% des mâles (**Tableau 5.4**).

Tableau 5.4. Nombre et proportion de cystocarpes engendrés par les 24 mâles présents en 1995, 1997 et 2020.

	1995	1997	2020
Nombre de mâles total	40	54	88
Proportion de mâles que représente les 24 mâles	0.60	0.44	0.27
Nombre de cystocarpes total	229	268	1795
Nombre de cystocarpes engendrés par les 24 mâles	179	174	878
Proportion de cystocarpes engendrés par les 24 mâles	0.78	0.65	0.49

Il est à noter que ces analyses de paternité ayant été réalisées avec des loci différents de celles de 2020 (voir Chapitre 2) la puissance de détection des pères uniques était légèrement différente entre les sets de loci. Grâce au nombre plus important de locus utilisés pour le génotypage en 2020, aucun mâle ne partageait le même de génotype multilocus au sein de la population, ce qui fait

qu'un père unique a pu être identifié pour les descendants en 2020, contrairement aux analyses précédentes où certains mâles partageaient des génotypes, dont 8 mâles sur 48 en 1995 et 2 mâles sur 56 en 1997 (Engel, 2000). Cependant, cela n'a aucune incidence pour nos analyses les mâles avec des génotypes partagés ne font pas partie des mâles analysés.

5.3.2.1.4 Croisements en laboratoire

Un fragment de thalle de chacune des six femelles utilisées a été génotypé avant le début de l'expérimentation. Cependant, comme les fragments de thalle provenant des 3 femelles utilisées conjointement dans chaque aquarium n'étaient pas marqués individuellement, le génotype de la mère a également dû être attribué à chacun des descendants (contrairement aux analyses de paternité en population naturelle où la mère est toujours connue). Pour 4% des cystocarpes analysés (i.e. 19 cystocarpes) la maternité n'a pas pu être attribuée, car le nombre de loci amplifiés n'étaient pas suffisants (**Tableau 5.3**). Sur les 432 cystocarpes de mère connue, 23% n'ont pas pu être attribués à un père unique puisque le nombre de loci amplifiés n'étaient pas suffisants (problème rencontré pour 80 cystocarpes) ou le cystocarpe avait le même génotype que la mère (problème rencontré pour 24 cystocarpes) (**Tableau 5.3**). La paternité n'a pas pu être attribuée pour les deux cystocarpes obtenus dans la condition C4.

Au total, la maternité et paternité a pu être attribuée sans équivoque pour 328 cystocarpes (sur les 451 génotypés). Une des 6 femelles (la femelle 249) n'a produit que 3 cystocarpes toutes conditions expérimentales confondues (**Tableau 5.5**). Cette femelle n'était donc pas mature au moment de l'expérimentation et elle ne sera pas prise en compte pour la suite des analyses.

Tableau 5.5. Nombre de descendants partagés (cystocarpes) entre les femelles et les mâles dans chaque condition. C5 : mâles et femelles avec bullage, C1 : mâles et femelles avec idotées, C3 : femelles avec idotées pré-incubées avec les mâles.

Identité mâle	Condition	Identité femelle						Total
		F30	F125	F86	F163	F32	F249	
M9	C5	8	18	11	17	16		70
	C1	7	17	26	4	4		58
	C3	1	5	3		7		16
	Total	16	40	40	21	27	0	144
M12	C5		1		9	6		16
	C1				11	6		17
	C3			1		2		3
	Total	0	1	1	20	14	0	36
M54	C5	1	1	1		2		5
	C1	1	1			1		3
	C3					2		2
	Total	2	2	1	0	5	0	10
M61	C5	1		1	3		1	6
	C1		3	2	4	7		16
	C3			1		4		5
	Total	1	3	4	7	11	1	27
M89	C5	2	8	1	2	4	2	19
	C1		4	1	1	3		9
	C3		2					2
	Total	2	14	2	3	7	2	30
M151	C5		7	3	6	3		19
	C1				3	1		4
	C3					2		2
	Total	0	7	3	9	6	0	25
M181	C5	5	9	3	3	1		21
	C1	7	3	5	2	1		18
	C3							0
	Total	12	12	8	5	2	0	39
M240	C5		1		1	2		4
	C1				1			1
	C3					1		1
	Total	0	1	0	2	3	0	6
M254	C5				2	3		5
	C1		1	2	2	1		6
	C3							0
	Total	0	1	2	4	4	0	11
M87	Total	0	0	0	0	0	0	0
Total	C5	17	45	20	43	37	3	165
	C1	15	29	36	28	24	0	132
	C3	1	7	5	0	18	0	31
	Total	33	81	61	71	79	3	328

5.3.2.2 Traits mâles candidats à la sélection sexuelle

5.3.2.2.1 La biomasse

La biomasse des mâles en août 2020 est comprise entre 0.2 et 162.3 cm³. Le nombre de partenaires des mâles augmente significativement avec leur biomasse (pente \pm se : 0.79 ± 0.01 , $p < 0.01$) (**Figure 5.1A**). Le même résultat est observé avec le succès reproducteur (pente \pm se : 0.79 ± 0.01 , $p < 0.05$) (**Figure 5.1B**). Cependant, lorsque les effets de la biomasse et du nombre de partenaires sont testés simultanément sur le succès reproducteur, seul le nombre de partenaires a toujours un effet significatif sur le succès reproducteur (pente \pm se : 1.24 ± 0.07 , $p < 0.001$), tandis que la biomasse n'a plus d'effet ($p = 0.35$). L'effet de la biomasse est donc similaire à celui de la distance (voir article, section 5.4), c'est-à-dire que la biomasse, comme la distance, ont d'abord un effet sur le nombre de partenaires.

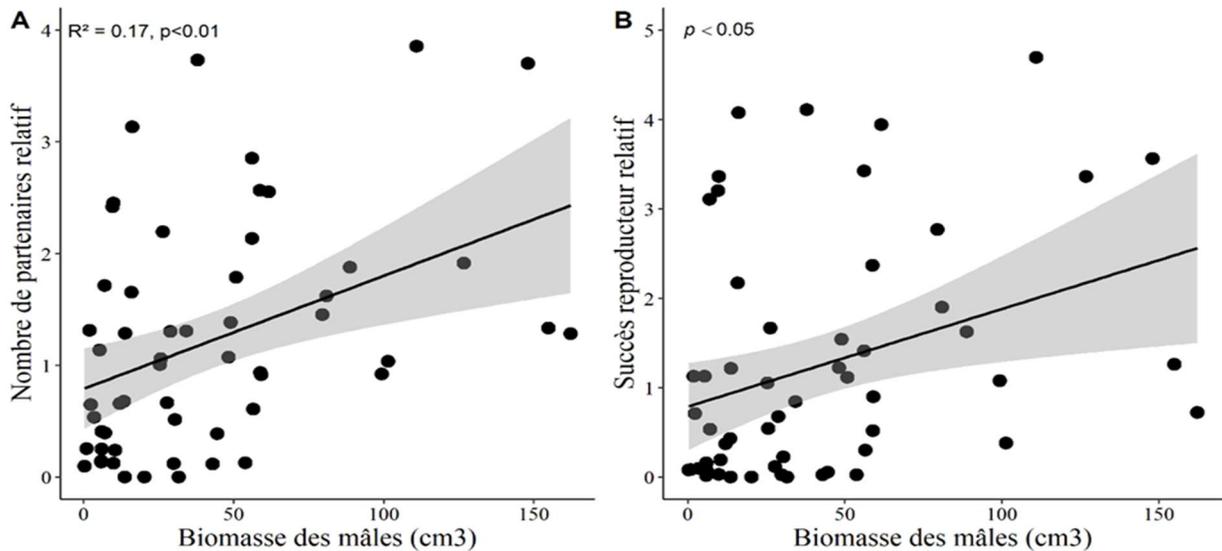


Figure 5.1. Relation entre la biomasse et (A) le nombre de partenaires, (B) le succès reproducteur chez les mâles. La significativité, estimée par la pente de la régression linéaire, est indiquée sur chaque graphique.

Lorsque l'on teste l'effet de la biomasse, de la distance au partenaire et du succès reproducteur simultanément sur le nombre de partenaires, les effets de la biomasse et de la distance au partenaire sont proches du seuil de significativité (respectivement, $p = 0.061$ et $p = 0.052$). Il faut noter que la corrélation entre la biomasse et la distance aux partenaires est proche du seuil de significativité ($p = 0.068$) (**Figure 5.2**). Cela suggère une fois de plus que la biomasse et la distance aux partenaires ont un effet direct sur le nombre de partenaires, et seulement un effet indirect sur le succès reproducteur.

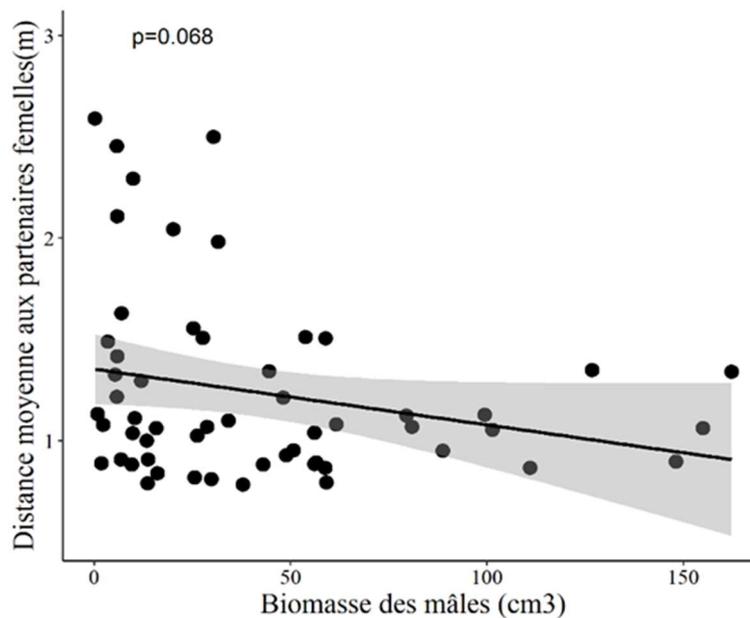


Figure 5.2. Relation entre la biomasse des mâles et la distance moyenne à leurs partenaires femelles potentiels. La significativité, estimée par la pente de la régression linéaire, est indiquée sur le graphique.

5.3.2.2.2 La phénologie de la reproduction

Au total sur les 88 mâles dénombrés en Juin et en août 2020, seuls 8 mâles ont réalisé des fécondations uniquement au mois de juin (soit 9%), 41 uniquement au mois d'août (soit 47%), 36 sur les deux mois (soit 41%) alors que 3 n'ont réalisé aucune fécondation (soit 3%) (**Tableau 5.6**). Les mâles ayant réalisé des fécondations durant toute la période de reproduction ont un nombre de partenaires significativement plus important que ceux ayant réalisés des fécondations exclusivement en début (juin) ou en fin (août) de période de reproduction (**Figure 5.3A**), avec en moyenne 14.86 ± 1.69 partenaire pour toute la saison contre 1.50 ± 0.29 et 7.51 ± 1.03 partenaire, respectivement, en juin et en août (**Tableau 5.6**).

Tableau 5.6. Nombre de partenaires et succès de fécondation moyens par période de fertilité des mâles en 2020. N : nombre de mâles.

Période	N	Nombre moyen de partenaires	Moyenne des succès de fécondation
Juin	8	1.50 ± 0.29	0.0010 ± 0.0003
Août	41	7.51 ± 1.03	0.0083 ± 0.0015
Juin et Août	36	14.86 ± 1.69	0.0181 ± 0.0026
Aucune fécondation	3	0	0
Total	88	9.72 ± 0.97	0.0114 ± 0.0014

Le même résultat est observé pour le succès de fécondation, i.e. la proportion de cystocarpes engendrés par rapport au nombre total de cystocarpes (**Figure 5.3B, Tableau 5.6**). En ce qui concerne les mâles ayant réalisé des fécondations durant toute la période de reproduction, les analyses réalisées en juin ont permis d'identifier seulement 1 ou 2 partenaires supplémentaires différents de ceux du mois d'août. Le plus grand nombre de partenaires sur la saison de reproduction ne s'explique donc pas par le fait qu'ils auraient fécondé des pools de femelles différents en début et en fin de saison. La distribution des mâles n'étant efficace qu'en août ou sur toute la saison est homogène dans la population, tandis que les 8 mâles n'ayant réalisé des fécondations qu'en juin se trouvent plutôt localisés en bordure de la cuvette rocheuse (**Figure 5.4**).

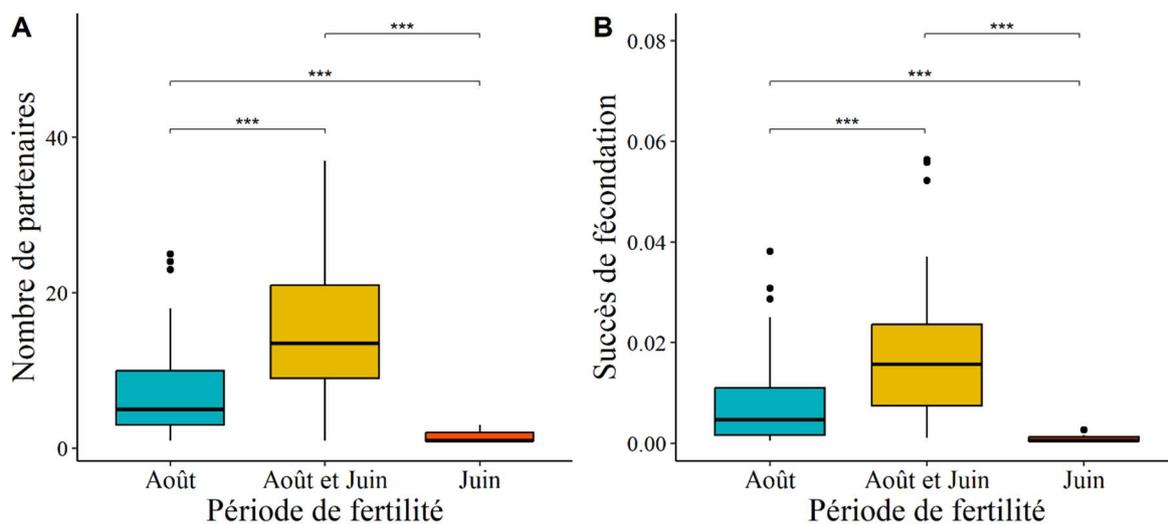


Figure 5.3. Distributions du nombre de partenaires et succès de fécondation en fonction des périodes de fertilité des mâles. *** $p < 0.001$ (Test non-paramétrique de rang Wilcoxon).

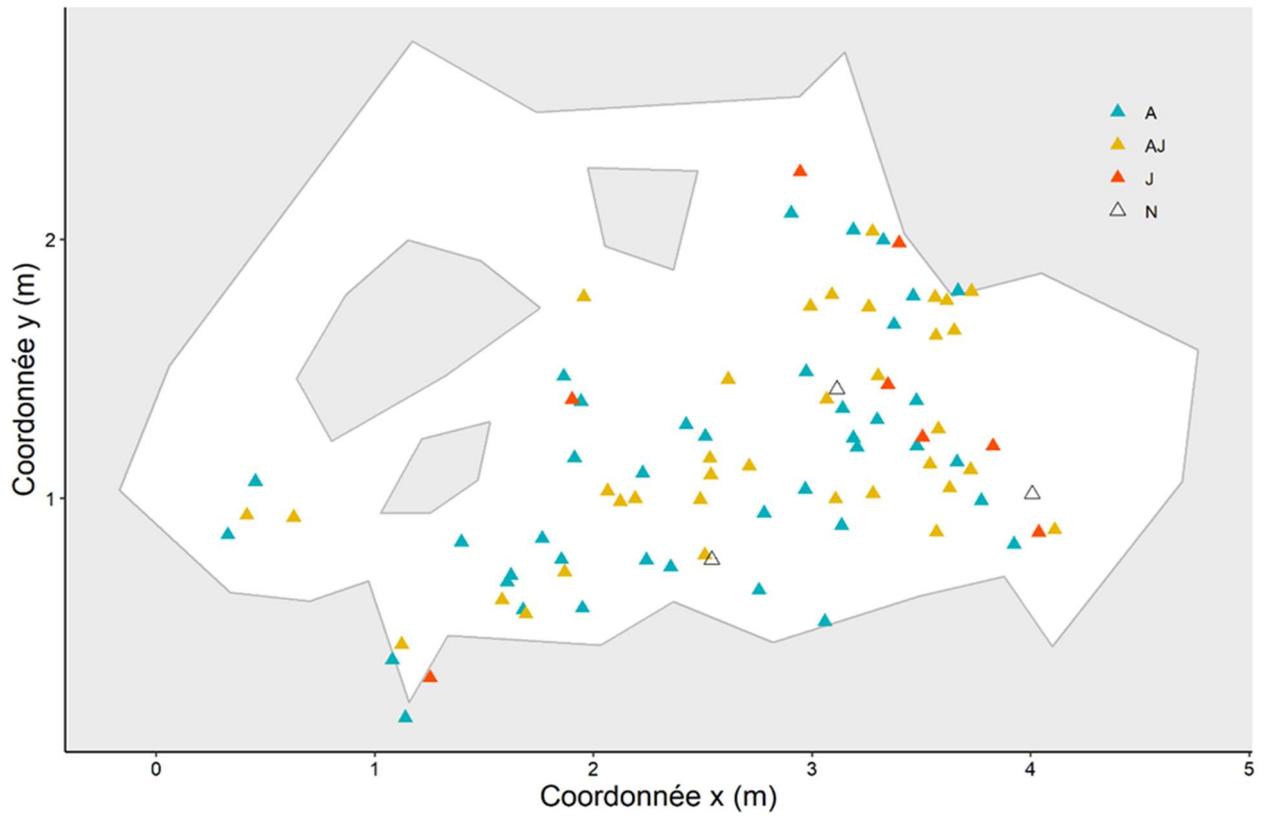


Figure 5.4. Position des mâles dans la population ayant engendré des descendants uniquement en juin (J), uniquement en août (A), durant les deux mois (AJ) ou n'ayant jamais engendré de descendants (N) en 2020. La limite de la cuvette rocheuse dans laquelle se trouve la population est indiquée en gris, les formes géométriques (en gris) indiquent la présence de roches au milieu de la cuvette.

5.3.2.2.3 Interaction avec les idiotées

Le succès de fécondation pour chacun des 10 mâles utilisés dans l'expérience de croisements avec ou sans idiotées (voir Chapitre 4) a été calculé dans 3 des 5 conditions expérimentales : la condition avec des mâles et des femelles en présence de bullage (C5), la condition avec des mâles et des femelles en présence d'idotées (C1), la condition avec des femelles en présence d'idotées préalablement incubées avec des mâles (C3) (**Figure 5.5**).

Tout d'abord, les résultats montrent une forte variation entre mâles, le mâle M9 ayant engendré près de 40% des cystocarpes dans les 3 conditions expérimentales alors que le mâle M87 n'a engendré aucun cystocarpe (**Figure 5.5**).

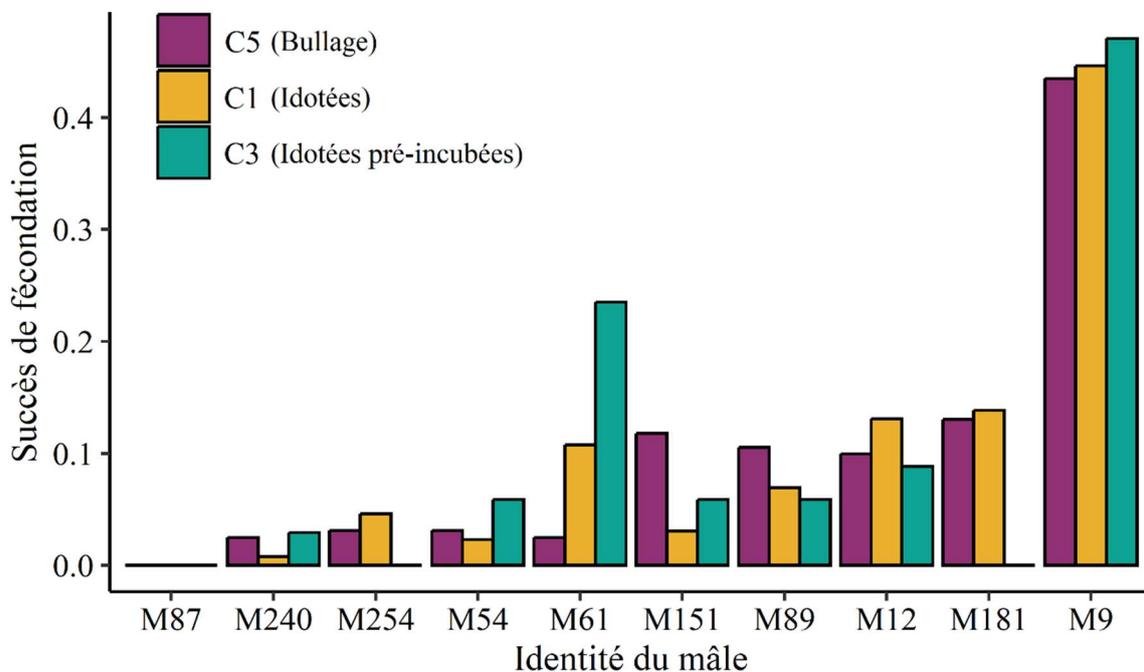


Figure 5.5. Succès de fécondation pour chacun des 10 mâles dans les 3 conditions expérimentales : la condition avec des mâles et des femelles en présence d'idotées (C1), la condition avec des femelles en présence d'idotées précédemment incubées avec des mâles (C3), la condition avec des mâles et des femelles en présence de bullage (C5).

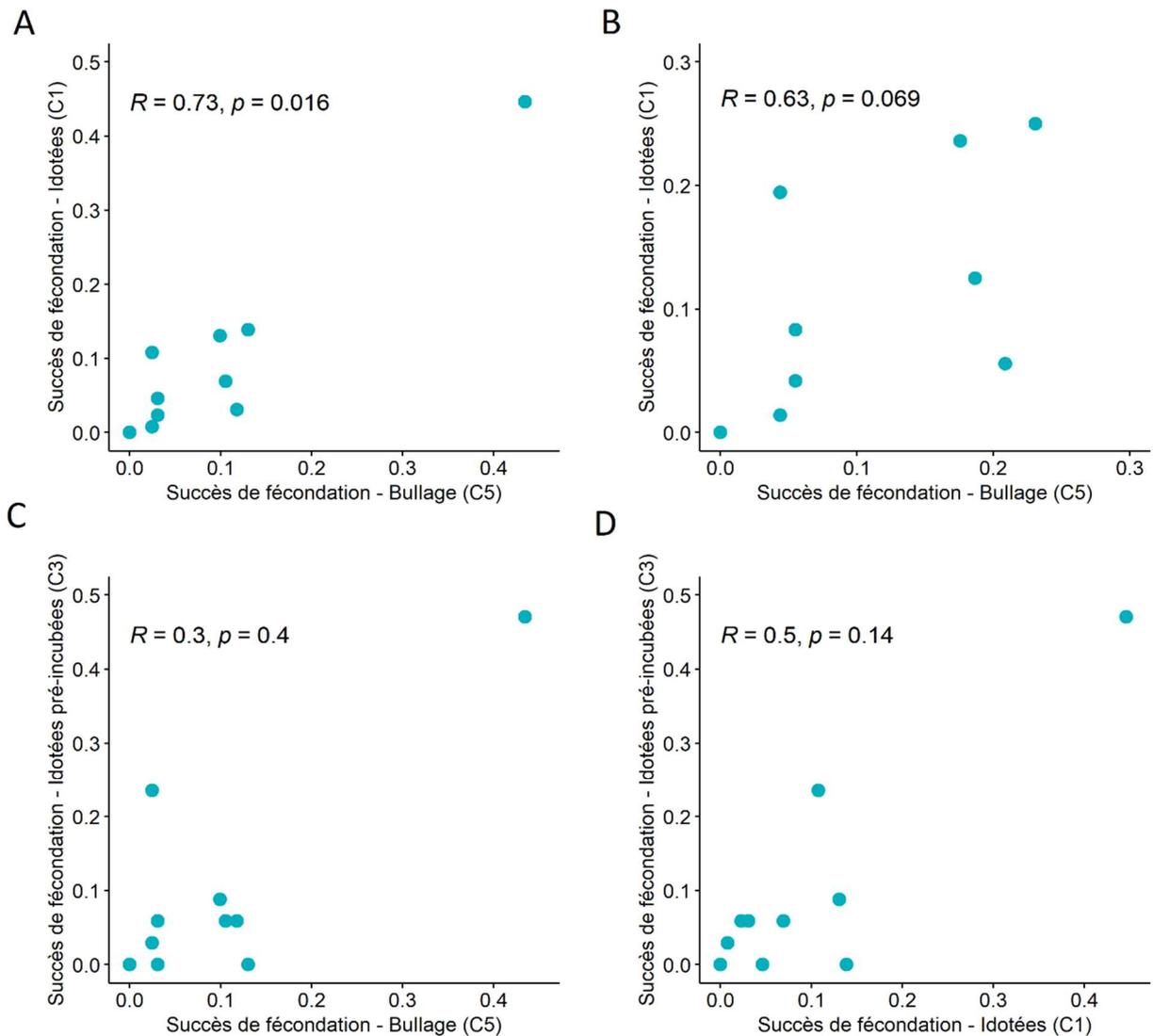


Figure 5.6. Corrélation de Spearman entre les succès de fécondation des mâles dans les différentes conditions expérimentales : (A) entre les conditions avec des mâles et des femelles en présence de bullage (C5) et en présence d'idotées (C1) ; (B) idem que (A) mais sans le mâle M9 ; (C) entre les conditions avec des mâles et des femelles en présence de bullage (C5) et avec des femelles en présence d'idotées préalablement incubées avec des mâles (C3) ; (D) entre les conditions avec des mâles et des femelles en présence d'idotées (C1) et avec des femelles en présence d'idotées préalablement incubées avec des mâles (C3). Le coefficient de corrélation et la significativité sont indiqués sur chaque graphique.

Les analyses montrent une corrélation significative entre les succès de fécondation des mâles dans les conditions avec bullage (C5) et avec idotées (C1) (**Figure 5.6A**), cette corrélation reste partiellement significative ($p=0.069$) même lorsque qu'on refait cette analyse sans le mâle M9 qui a une très forte valeur (**Figure 5.6B**). Cependant, il n'y a aucune corrélation du succès reproducteur des mâles entre les conditions avec bullage (C5) ou avec idotées (C1) et la condition avec idotées pré-incubées (C3) (**Figure 5.6,C,D**). Cela semble montrer que le succès des mâles en laboratoire est distribué très différemment lorsqu'ils sont (C5 et C1) ou pas (C3) dans l'aquarium avec les femelles. Cela est particulièrement visible pour 2 mâles. Le mâle M181 conserve un succès de fécondation similaire dans les conditions C5 et C1 où il est présent, mais ne réalise aucune fécondation dans la condition C3, lorsque le transport de ces spermaties jusqu'aux femelles dépend uniquement des spermaties qui auraient pu adhérer aux idotées (**Figure 5.5**). Le succès de fécondation du mâle M61 est impacté positivement par la présence des idotées, puisque dans la condition C5 (sans idotées) il a un succès de fécondation qui est très faible (0.02), puis qui augmente dans la condition C1 en présence des idotées (0.11), pour atteindre un maximum dans la condition C3 (0.24). En effet, ce mâle, engendre 24% des fécondations (deuxième meilleur mâle) dans la condition où le transport de ces spermaties jusqu'aux femelles dépend exclusivement des spermaties qui adhèrent aux idotées.

5.3.2.3 Variation du succès de fécondation

5.3.2.3.1 Stabilité temporelle

Engel et collaborateurs (1999) ont montré que la majorité des fécondations se réalisaient à une distance moyenne entre les partenaires (distance observée) plus courte que celle attendue, calculée d'après leur position dans la population (distance observée d'environ $0.49 \pm 0.01\text{m}$, contre une valeur attendue de $0.91 \pm 0.01\text{m}$). Les résultats d'août 2020 sont similaires avec une distance moyenne entre les couples qui ont engendré des descendants de $0.43 \pm 0.01\text{m}$, contre une distance attendue de $1.17 \pm 0.01\text{m}$ (i.e. la distance moyenne de tous les couples possibles au sein de la population). La distribution des fréquences de ces distances (**Figure 5.7**) montre que 50% des partenaires des couples potentiels se situent à une distance de moins de 0.83 cm l'un de l'autre, tandis que 50% des partenaires des couples réels se situent à moins de 0.34 cm l'un de l'autre. Ces distances sont comparables à celles mesurées en 1995, respectivement de 0.86 m et 0.33 m (Engel et al., 1999).

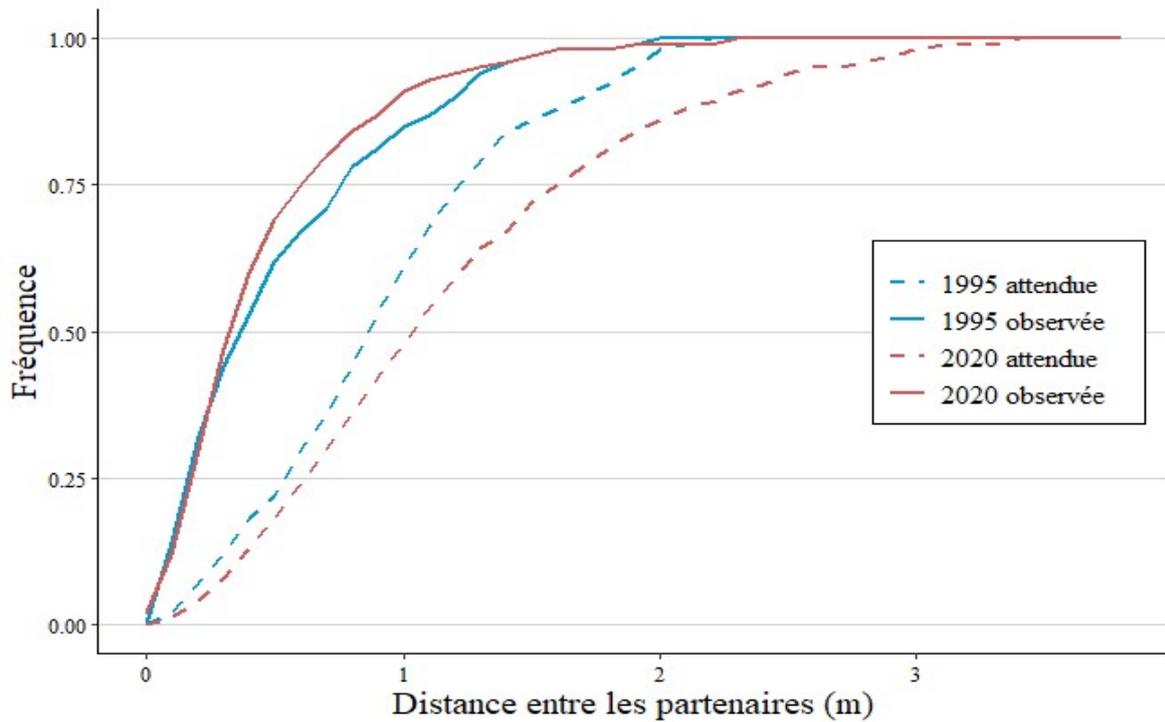


Figure 5.7. Fréquence des couples attendus et observés en fonction des distances entre les partenaires.

La comparaison des succès de fécondation des 24 mâles présents en 1995, en 1997 et en 2020 montre une corrélation significativement positive entre 1995 et 1997 (**Figure 5.8A**) et entre 1995 et 2020 (**Figure 5.9B**). La corrélation est partiellement significative ($p = 0.071$) entre 1997 et 2020 (**Figure 5.8C**). Cela démontre que la variance du succès de fécondation est stable au cours du temps avec certains mâles ayant toujours un fort succès de fécondation et d'autres ayant toujours un succès de fécondation faible, voire nul.

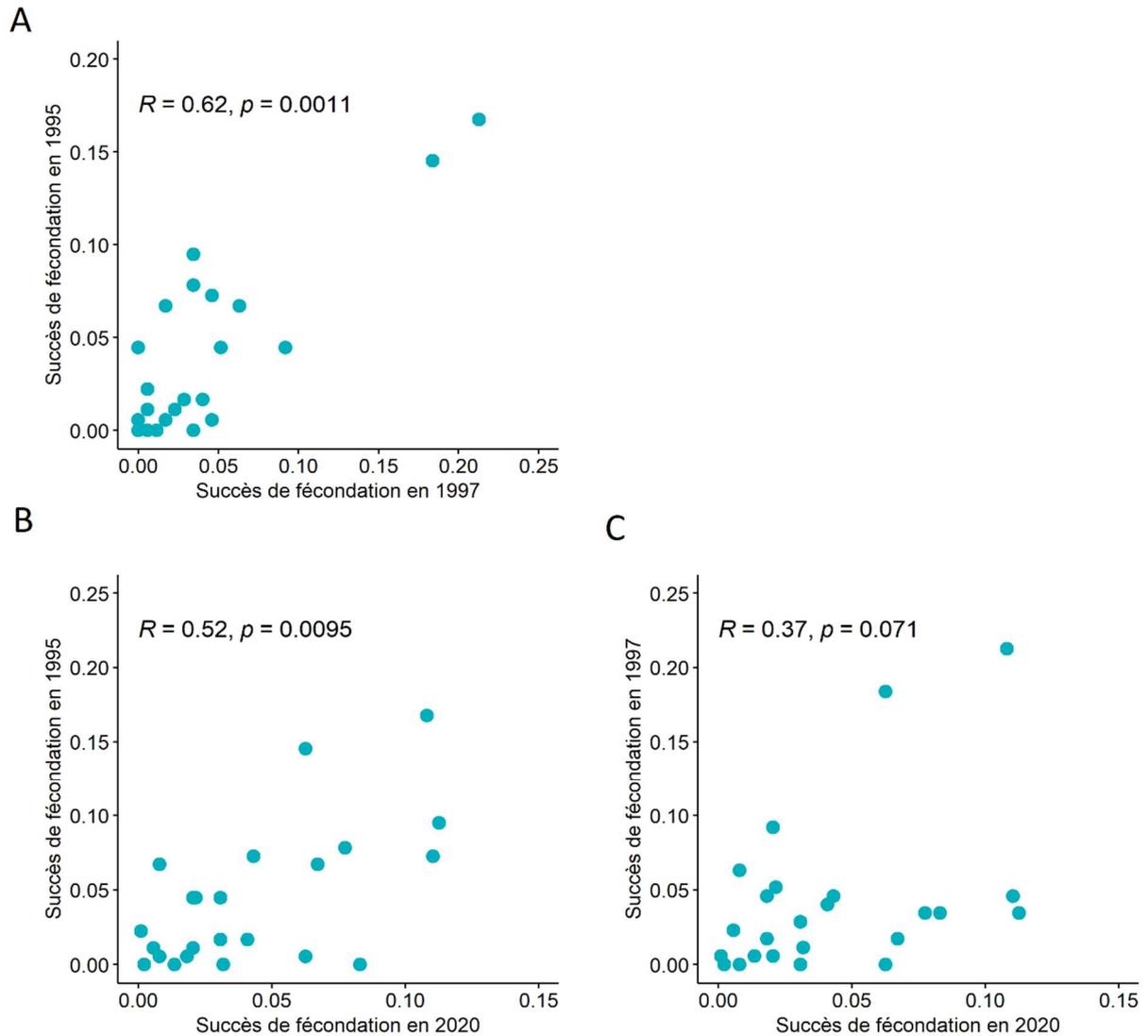


Figure 5.8. Corrélation de Spearman entre les succès de fécondation des mâles en (A) 1995 et 1997, (B) 1995 et 2020, (C) 1997 et 2020. Le coefficient de corrélation et la significativité sont indiqués sur chaque graphique.

5.3.2.3.2 Variabilité entre conditions naturelles et contrôlées

La stabilité dans le temps, montrée dans le paragraphe précédent, pourrait être dépendante de l'identité mâle et/ou de la position des individus dans la flaque. Dans la première partie de ce chapitre (voir article 5.2) nous avons montré que la distance moyenne des mâles à leurs partenaires potentiels avait un impact sur leur succès reproducteur (i.e. le nombre total de descendants produit sur une saison de reproduction) et leur nombre de partenaires. En comparant, la variabilité du succès de fécondation entre conditions naturelles et contrôlées, l'objectif est de séparer l'effet de

l'identité mâle à celui de la position dans la flaqué. En effet, en laboratoire les mâles étaient tous situés à une distance égale des femelles, soit 15 cm (Lavaut et al. 2022, Chapitre 4).

Nous avons comparé le succès de fécondation des 10 mâles utilisés dans l'expérience des idotées avec le succès de fécondation de ces mêmes mâles sur le terrain en août 2020. Il n'y a pas de corrélation entre les succès de fécondation des mâles en population naturelle et en laboratoire (**Figure 5.9A**) et cela reste vrai même lorsque le mâle M9 est enlevé des analyses (**Figure 5.9B**). Les mâles M240, M254, et M87 ont un faible succès reproducteur en laboratoire et sur le terrain (**Figure 5.10**).

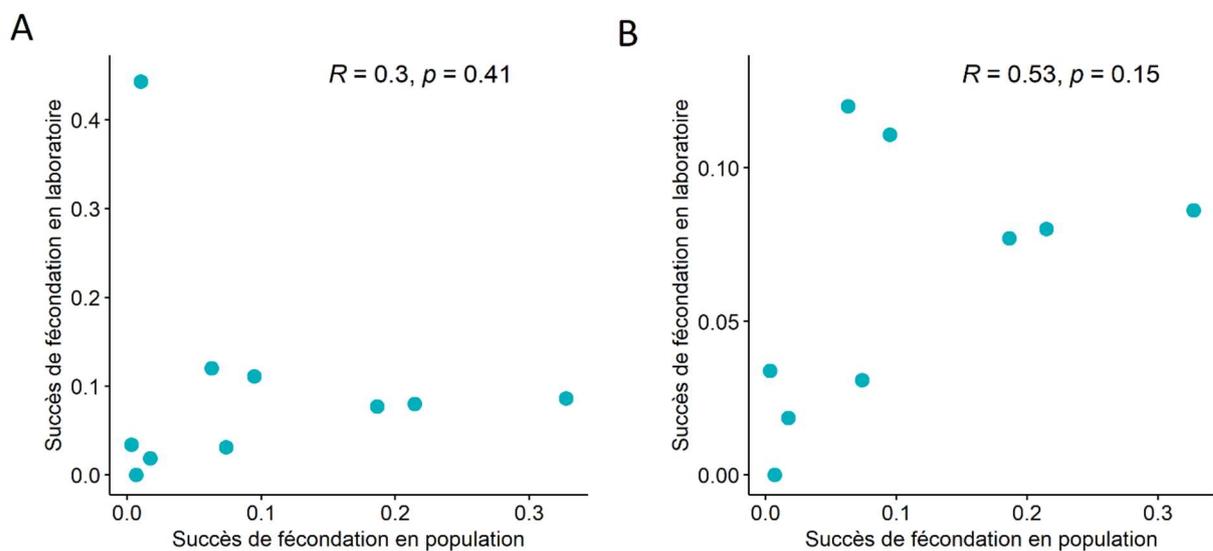


Figure 5.9. Corrélation de Spearman entre les succès de fécondation des mâles dans la population et en laboratoire : (A) avec tous les mâles, (B) sans le mâle M9. Le coefficient de corrélation et la significativité sont indiqués sur chaque graphique.

Les mâles M89, M151, M61, M12 ont des succès reproducteurs parmi les plus élevés sur le terrain, mais ils ne montrent pas les meilleurs succès reproducteurs en laboratoire (**Figure 5.10**). Enfin, le mâle M9 a un succès de fécondation considérablement plus élevé en laboratoire que sur le terrain (**Figure 5.10**). Le mâle M9 est situé en bordure de population (**Figure 5.11**) et pourrait donc être limité dans son accès aux partenaires en population naturelle avec une distance moyenne à ces partenaires de 1.42 m, ce qui pourrait expliquer son plus fort succès reproducteur en laboratoire. Cependant, les mâles M240 et M254 sont également en bordure de population (avec des distances moyennes aux partenaires de 1.63 m et 2.29 m respectivement) et leur succès reproducteur reste faible en condition expérimentale. Enfin, l'individu M87, pourtant situé au milieu de la population, avec un accès privilégié aux partenaires ($d = 0.81$ m) reste

particulièrement médiocre, car il n'a réalisé aucune fécondation dans les expériences et est le père de seulement 2 cystocarpes dans des conditions naturelles (**Annexe 2**).

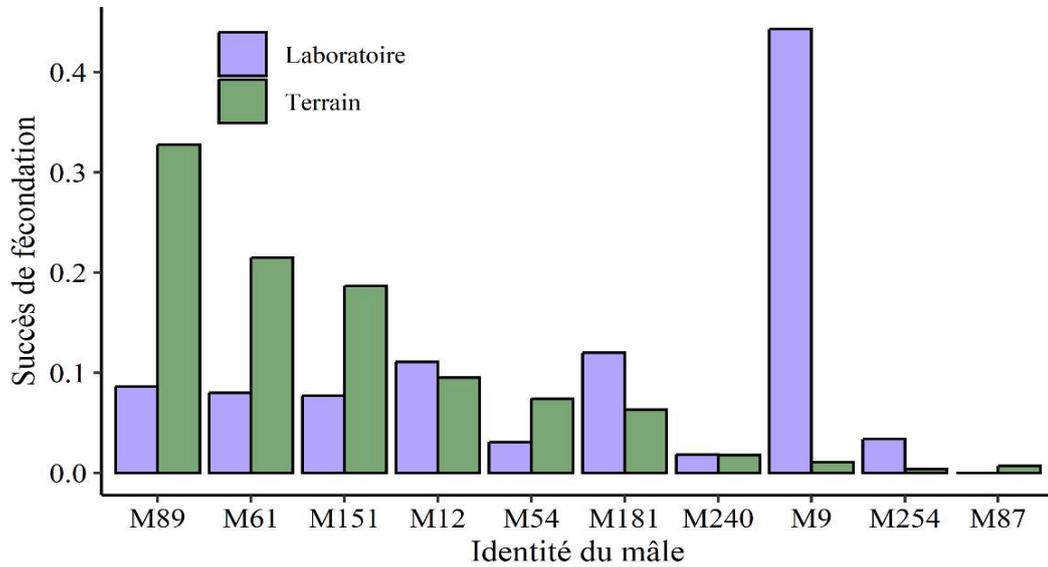


Figure 5.10. Succès de fécondation pour chacun des 10 mâles en laboratoire (violet) ou en population naturelle (vert).

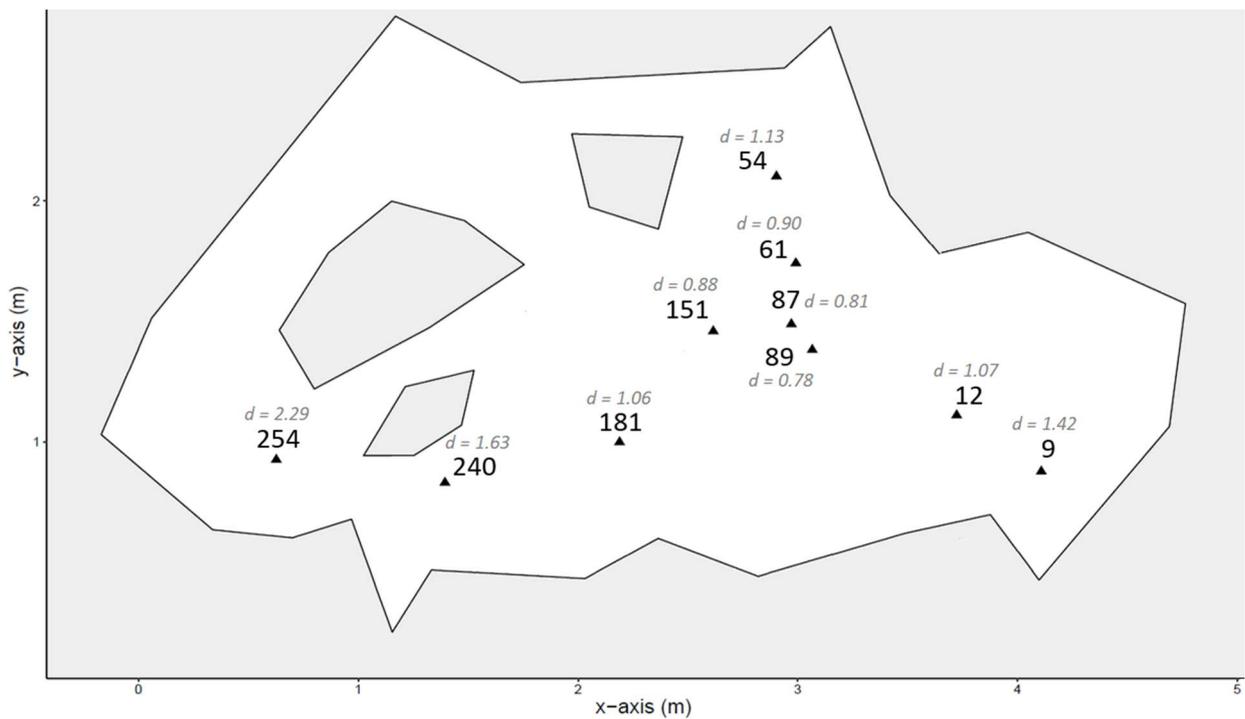


Figure 5.11. Position géographique au sein de la population des mâles utilisés dans l'expérience. La distance moyenne d'accès aux partenaires (d , en mètres) est indiquée en gris à côté de chaque mâle.

5.4 Discussion

La mesure du gradient de Bateman, effectuée pour la première fois chez une algue rouge, a permis de mettre en évidence une opportunité pour la sélection sexuelle chez *G. gracilis*. Notre étude, conjointement à celle de Johnson et Shaw (2016) qui ont mis en évidence l'existence d'un gradient de Bateman chez une mousse aquatique (*Sphagnum macrophyllum*), montrent que la sélection sexuelle peut être une force évolutive importante chez des espèces haploïde-diploïdes anisogames ne présentant pas de dimorphisme sexuel. Il existe un biais historique (Darwin, 1871) dans les études de sélection sexuelle, surtout en ce qui concerne le test des principes de Bateman. En effet, quasi toutes les études qui testent les principes de Bateman ont été réalisées sur des animaux (voir pour revue Janicke et al., 2016 qui recense 76 études effectuées sur 66 espèces d'animaux), alors que seulement trois espèces d'angiospermes (Tonnabel et al., 2019 ; Kwok and Dorken, 2022 ; Barbot et al., 2023), une espèce de mousse (Johnson et Shaw, 2016) et une espèce d'algue rouge ont été étudiées. Ces études réalisées dans des phylums encore très peu étudiés renforcent ces hypothèses, permettant ainsi de généraliser certains processus évolutifs affectant les espèces anisogames. Dans le cas de *G. gracilis*, bien que nous ayons montré l'existence possible d'une sélection sexuelle plus intense chez les mâles, les traits mâles sous sélection restent encore à étudier. Les analyses de paternité effectuées plusieurs années de suite sur le terrain et comparées à celles obtenues au laboratoire nous permettent d'avancer des pistes sur ces traits mâles potentiellement sous sélection sexuelle, comme la période de reproduction ou certaines caractéristiques des gamètes permettant un transport plus efficace par les animaux, qui pourraient être de bons candidats.

Confirmant ce qui avait déjà été démontré chez de nombreuses espèces sessiles (mousses : Van der Velde et al., 2001 ; plantes à fleur : Devlin et al., 1992 ; Wright et Meagher, 2004 ; De Cauwer et al., 2010; balanes: Kelly et al., 2012; Ascidies: Grosberg, 1991; Yund et McCartney, 1994), notre étude montre qu'il existe un effet significatif de la distance aux femelles sur le nombre de partenaires (i.e. le « mating success ») des mâles. L'effet de la distance sur la reproduction de *G. gracilis* avait déjà été mis en évidence sur le terrain dans la même population de GNH en 1995 par Engel et collaborateurs (1999). Les résultats d'août 2020 dans GNH appuient très bien ces premiers résultats et confirment que plus de la moitié des fécondations se font au sein de la population entre des individus distant de moins de 40 cm l'un de l'autre. Bien qu'il ait été proposé que certains traits ayant une influence sur la distance aux partenaires, comme la variation des stratégies de recrutement (solitaire/grégaire), pourraient présenter une base génétique et donc être

sous sélection (Kelly et al., 2012) ; il est généralement admis que la distance aux partenaires est un trait non héréditaire. Certains mâles pourraient ainsi présenter un plus fort succès reproducteur, quels que soient leurs génotypes, tout simplement car ils sont situés plus près de nombreuses femelles par rapport à d'autres mâles moins chanceux. Ceci est le cas, par exemple, de la balane *Tetraclita rubescens*, une espèce marine pour laquelle la fécondation se fait au plus à quelques centimètres de distance via un long pénis extensible (Kelly et al., 2012). Chez cette espèce, le succès reproducteur est très peu variable entre mâles et seule la distance aux femelles semble expliquer ces faibles variations, d'autres traits morphologiques comme la taille des gonades et du pénis n'ayant pas d'effet significatif. Notre étude montre toutefois que bien qu'il existe un effet de la distance, ce facteur n'explique qu'une partie de la variance dans le nombre de partenaires. De fait, la comparaison des succès de fécondation des mêmes 10 mâles sur le terrain et le laboratoire, où la distance aux femelles était la même pour tous, montre que d'autres caractéristiques phénotypiques des mâles pourraient être aussi des facteurs d'importance. En effet, même en s'affranchissant de l'effet distance, certains mâles, comme le mâle M254 établi en bordure de la population GNH, restent médiocres au laboratoire. Le mâle M87, proche de beaucoup de femelles sur le terrain car en position très centrale dans la flaque, a engendré un très faible nombre de descendants tant sur le terrain qu'au laboratoire. Ces résultats, conjointement avec ceux déjà publiés sur *G. gracilis* à partir de croisements contrôlés en laboratoire de différents génotypes mâles et femelles (Engel et al. 2002), montrent que le succès reproducteur mâle dépend non seulement de la distance entre partenaires mais également des génotypes des gamétophytes mâles et femelles. D'autres études, comme celle de Johnson et Shaw (2016) chez la mousse *S. macrophyllum*, ont également montré que le succès reproducteur mâle dépendait en partie des génotypes des gamétophytes mâles et femelles et que ceux-ci avaient également un impact sur le fitness des sporophytes engendrés lors de la reproduction. Chez *G. gracilis* (Engel et al., 2002) et *S. macrophyllum* (Johnson et Shaw 2016), il a été proposé qu'il existait une compétition entre les gamètes mâles pour l'accès aux gamètes femelles et que les femelles pourraient exercer un choix permettant de maximiser la probabilité de fécondation par des partenaires de haute qualité/génétiquement plus compatibles. De nombreux mécanismes pouvant permettre un choix des gamètes mâles par les femelles ont été proposés chez d'autres organismes sessiles comme les plantes (Delph et Ashman, 2006 ; Moore et Pannell, 2011) ou les invertébrés marins (Evans et al., 2012 ; Evans et Sherman, 2013).

Dans notre étude nous avons montré que la biomasse avait également un effet sur le nombre de partenaires. Chez les plantes, la taille a été mise en relation avec le succès de fécondation mâle,

car elle peut influencer la production de pollen et sa distance de dispersion (Younginger et al., 2017). En effet, les plantes de grande taille peuvent par exemple présenter un plus grand nombre de fleurs et attirer plus de pollinisateurs ou permettre une meilleure pollinisation par le vent car les fleurs sont positionnées plus en hauteur (de Jong et Klinkhamer, 1994 ; Barrett et Hough, 2013 ; Snow et Lewis, 1993). Une plus grande taille pourrait aussi simplement permettre de réduire la distance aux femelles, par exemple pour les espèces rampantes tapissant le sol (Van der Velde et al., 2001). Pourtant, chez les algues comme chez les plantes, la biomasse (et la taille en général) est directement en relation avec la surface dédiée à l'accès aux nutriments et à la lumière du soleil, et l'on pourrait donc s'attendre à ce que celle-ci soit fortement soumise à la sélection naturelle chez ces organismes, sans être nécessairement un avantage en termes de sélection naturelle. Chez les animaux la biomasse (un trait potentiellement attractif pour les femelles) peut être soumise à la sélection sexuelle mais représenter un trait contre-sélectionné par la sélection naturelle si la survie des plus gros mâles est plus faible. Il est en effet possible que ces mâles nécessitent plus de ressources ce qui peut engendrer des comportements plus risqués pour les acquérir ou qu'une grande taille soit liée à une moindre mobilité et donc capacité d'échapper aux prédateurs (Clutton-Brock, 1988). Bien qu'il a effectivement été montré que le nombre de partenaires peut être lié à la taille du mâle chez les animaux (Jones et al., 2002), une grande taille semble en général ne pas diminuer de manière significative la survie chez de nombreuses espèces (Jennions et al., 2001 ; Toïgo et al., 2007). Il a été proposé chez les organismes pérennes que les individus qui possèdent plus de ressources pourraient présenter un plus fort succès reproducteur (plus de ressource allouée à la production des gamètes et autres structures impliquées dans la reproduction) mais aussi avoir une meilleure survie (Toïgo et al., 2007 ; Younginger et al., 2017). Si nos résultats démontrent bien un effet direct de la biomasse sur le nombre de partenaires, celle-ci a par contre seulement un effet indirect sur le succès reproducteur. Il est possible que chez *G. gracilis*, une plus grande biomasse influence la capacité d'un mâle à exporter ses gamètes de manière plus efficace. Une forte biomasse pourrait par exemple être plus attractive pour les idotées comme abri et source de nourriture. Cependant, comme le montre le suivi temporel de la population de GNH présenté dans le Chapitre 3, la variation de la biomasse est également dépendante de l'environnement puisqu'elle subit parfois des variations annuelles, et ce quel que soit le type d'individus. Chez *G. gracilis*, comme chez de nombreuses plantes (Younginger et al., 2017), d'autres variables, par exemple la qualité du microhabitat ou l'âge, pourraient générer des variations de taille et de biomasse entre individus d'une même population. Comme recommandé par Younginger et collaborateurs (2017), il faut donc être très prudent dans l'analyse de ce trait qui pourrait être la résultante de deux composantes, l'une héritable et l'autre non (c'est-à-dire environnementale).

Un autre trait mâle qui pourrait être sous sélection sexuelle est la phénologie. Chez les plantes, la durée et la date de début de floraison sont des paramètres très étudiés (Forrest, 2015). En effet, pour un individu une floraison précoce peut être avantageuse puisque cela peut : permettre d'éviter la compétition pour accéder aux pollinisateurs, augmenter le nombre de fécondation, permettre plus de temps de maturation pour les graines, ou générer des graines qui pourront germer plus tôt (voir pour revues Kudo, 2006 ; Elzinga et al., 2007). De nombreuses études montrent que les interactions biotiques influencent la phénologie de la floraison, face aux pollinisateurs, les floraisons précoces ou synchrones sont avantagées, tandis que face aux prédateurs, les individus avec une floraison tardive ou une durée de floraison plus étalée sont avantagés (voir pour revue Elzinga et al., 2007). Le fait que pour de très nombreuses plantes les fleurs mâles (ou les parties mâles des fleurs chez les hermaphrodites ; Preston, 1991) fleurissent plus tôt et/ou plus longtemps que les femelles a été mis en relation avec l'effet de la sélection sexuelle (Barrett et Hough, 2013; Forrest, 2015). Un mâle plus précoce pourrait avoir accès à des fleurs femelles qui n'ont pas encore reçu de pollen ou avoir accès à des fleurs femelles de plus haute qualité (si par exemple les femelles investissent moins de ressource dans les graines formées en fin de saison de reproduction). Par exemple, chez le frêne commun, les premiers gamètes mâles arrivant sur le stigma ont beaucoup plus de chance de féconder le gamète femelle que ceux arrivés plus tard (Bochenek et Eriksen, 2011). Chez *G. gracilis*, une plus grande durée de fertilité, équivalente à la durée de floraison chez les plantes, est associée à un accès à un plus grand nombre de partenaires et se traduit par un plus grand nombre de descendants (cystocarpes). De plus, ce plus grand nombre de partenaires ne s'explique pas par le fait que les mâles auraient fécondé des pools de femelles différents en début et en fin de saison. En étant efficace sur une plus grande période, il est possible que cela augmente leurs probabilités d'être présent au moment de la maturité d'un grand nombre de femelles. La phénologie des mâles constitue donc un bon candidat soumis à la sélection sexuelle, de même que la durée de floraison l'est chez les plantes (Barbot et al., 2023). Toutefois, comme pour la biomasse, la phénologie de floraison est influencée par les conditions environnementales locales auxquelles les plantes sont soumises (Davies et Ashton, 1999). Dans le cas de *G. gracilis*, il est intéressant de constater que beaucoup des mâles fertiles uniquement en juin sont situés en bordure de population. Ces mâles pourraient être plus soumis aux variations saisonnières de l'environnement, comme les phénomènes d'ensablement, ce qui pourrait limiter la durée de leur période de reproduction.

D'autres traits qu'il serait intéressant de mesurer sont les traits liés aux caractéristiques des gamètes, tels que leur quantité, leur durée de vie et d'efficacité, et la production d'une substance

adhérente : le mucilage (Bouzon, 2000). Cependant, les différentes expériences réalisées durant cette thèse ont montré qu'il est difficile de prévoir si et quand les spermatises seront libérées par les mâles. En effet, d'une part la production de spermatises diminue chez les mâles après plusieurs jours en laboratoire (Veyret, 2003, observations personnelles). D'autre part, on supposait jusqu'à aujourd'hui que l'observation à la loupe binoculaire de structures mâles (cryptes contenant les spermatocystes; Chapitre 4 **Figure 4.4**) à la surface du thalle était nécessairement accompagnée d'une production de gamètes (Richerd et al., 1993b). Or, ce n'est pas toujours le cas, particulièrement en fin de période de reproduction (obs. personnelles). Les récentes observations en microscopie confocale montrent que la libération des spermatises se fait par un pore (ostiole) à la surface de la crypte qui se forme dans la cuticule (Chapitre 4 **Figure 4.4**) et on peut se demander quels sont les facteurs qui régissent l'ouverture de ces ostioles. Le cycle de libération des gamètes peut sans doute être influencé par de nombreux éléments tels que les marées ou les cycles lunaires, les mouvements d'eau et les interactions biotiques. En effet, comme la majorité des fécondations en population se réalisent à marée basse, ce facteur joue peut-être un rôle déclencheur dans la libération des gamètes (Engel and Destombe, 2002). Chez les algues brunes et vertes, comme chez d'autres organismes sessiles comme les coraux (Zoccola and Tambutté, 2015) et les holothuries (Mercier et al., 2007), les gamètes peuvent être libérés selon un cycle lunaire ou semi-lunaire (pour revue voir Häfker et al., 2023 ; Brawley et Johnson, 1992 ; Brawley et al., 1999). Cependant, chez de nombreuses algues brunes, la libération des gamètes semble être plutôt liée à la hauteur de la marée (par exemple, marées de vives eaux) qu'à une phase lunaire stricte (Brawley et Johnson, 1992). Des rythmes endogènes ont été démontrés pour certaines algues ayant des cycles semi-lunaires ou lunaires comme l'algue brune *Dictyota*, (Sweeney, 1987). Enfin, la libération des gamètes chez les algues brunes se produit également souvent à la suite d'un changement d'irradiation (lumière après une période d'obscurité ou vice versa), de qualité de la lumière (Pearson et al., 2004) ou de changement de salinité (Brawley, 1991). En revanche, peu de données existent sur la libération des spermatises chez les algues rouges. Comme la durée de vie et la dispersion efficace des spermatises sont relativement courtes et que la distance influe sur le succès de la fécondation, Santelices (2002), malgré l'absence de preuves empiriques provenant de populations naturelles, suppose que certains facteurs environnementaux agissent pour synchroniser la maturation des carpogones et la libération des spermatises. Fetter et Neushul (1981) observent que la libération des spermatises chez l'algue *Tiffaniella snyderae* se produit par la déchirure de la cuticule recouvrant l'organe mâle en partie sous l'effet de l'hydrodynamisme. Par ailleurs, de nombreux auteurs ont observé l'apparition de brins mucilagineux lors de la libération des spermatises (pour revue voir Fetter et Neushul, 1981). Ces auteurs suggèrent que ce mucilage

pourrait faciliter la dispersion et le transport des spermaties ainsi que leur capture par les trichogynes. De tels brins de mucilage ont été observés chez *G. gracilis* (Chapitre 4) et il serait intéressant d'étudier les modalités de libération des spermaties et la production de mucilage en fonction des conditions hydrodynamiques et la présence des isopodes impliquées dans les relations mutualistes. La durée de vie et la durée d'efficacité des gamètes mâles (période pendant laquelle ils peuvent féconder un gamète femelle) semblent également être de bons candidats de trait mâles sous sélection. Chez les animaux, il a été démontré que la longévité et la viabilité des spermatozoïdes sont des traits qui influencent fortement le succès reproducteur des mâles (Snook, 2005). Chez les animaux marins, comme les oursins, la durée de vie des gamètes peut être très courte (2h maximum, Levitan, 2000). Chez *G. gracilis*, des expérimentations en laboratoire ont montré que la durée d'efficacité des gamètes mâles est d'environ 6h (Destombe et al., 1990). Les données préliminaires obtenues durant la thèse sur la durée de vie des gamètes montrent une nette diminution du nombre de spermaties entre 4h et 6h après le début de l'expérience, confirmant les résultats précédents (Annexe 3). Des échantillons de gamètes laissés à "vieillir" en eaux de mer durant des temps croissants ont été obtenus pour des mâles de *G. gracilis* dont le succès reproducteur a été estimé sur le terrain, afin de tester la relation entre durée de vie des gamètes, succès reproducteur et succès de fécondation. Des mesures par qPCR sont prévues une fois le développement de la technique terminé.

Dans le Chapitre 4 nous avons montré que la présence d'idotées semblait favoriser la libération des gamètes mâles et dans ce chapitre, nous avons montré que le succès de fécondation de certains mâles en laboratoire semblait être favorisé par la présence des idotées (en particulier le mâle M61, voir résultats ci-dessus). Il est donc possible que les spermaties de certains mâles, par exemple ceux émettant plus de mucilage, adhèrent mieux aux idotées et leur confèrent un avantage dans le transport de leurs gamètes jusqu'aux femelles. Si c'est le cas, ce trait pourrait être sous-sélection sexuelle, puisqu'il pourrait impacter directement le succès de fécondation des mâles. Il existe, chez certaines espèces d'angiosperme, différentes substances qui paraissent participer à l'adhésion du grain de pollen au corps du pollinisateur comme les polysaccharides (Schnetzler et al., 2017), les huiles (Possobom et Machado, 2017) ou encore certaines résines (Gonçalves-Souza et al., 2018). Par exemple, chez l'Araceae *Philodendron adamantinum*, il a été montré que la résine libérée par la fleur recouvre toute la surface du corps du coléoptère pollinisateur *Erioscelis emarginata*. En raison de la surface lisse du corps du coléoptère et de l'absence de poils auxquels les grains de pollen pourraient adhérer, la résine libérée semble être nécessaire pour que les coléoptères soient des porteurs de pollen efficaces (Pereira et al., 2014). De plus, la

synchronisation observée entre la déhiscence des anthères et l'exsudation de la résine de *P. adamantinum* renforce l'idée de l'existence d'un rôle central de cette sécrétion dans le processus de pollinisation (Gonçalves-Souza et al., 2018).

En conclusion, bien que la quantification de traits mâles soit très complexe, travailler sur cette population reste très intéressant pour étudier les traits potentiellement sous-sélection sexuelle chez *G. gracilis*. En effet, le succès reproducteur est très stable dans le temps et avec les données de génotypage et de cartographie, il est très facile de retrouver les individus dans cette population. Si à l'avenir de nouvelles techniques permettaient de quantifier les traits mâles, il serait intéressant de les comparer entre les mâles ayant un fort ou faible succès reproducteur. Il serait particulièrement pertinent d'approfondir le lien entre la phénologie de la reproduction, la production de mucilage et les interactions biotiques.

Chapitre 6

Conclusion générale et perspectives.

Pérennité des individus et maintien du cycle de vie

Les analyses des données démographiques obtenues lors du suivi d'une population de *G. gracilis* sur plus de 25 ans confirment les projections du modèle démographique construit par Engel et al. (2001) à partir de 3 ans d'observations. Ces résultats démontrent la robustesse de ce type de modèle à long terme et confirment que *G. gracilis* est une espèce pérenne à longue durée de vie avec des individus pouvant survivre pendant au moins 25 ans. Les estimations des taux de survie et de recrutement sont variables à de courtes échelles de temps (3 ans) mais sans que cela n'affecte la croissance de la population sur des échelles de temps plus longues (de l'ordre de la décennie). Ces fluctuations restent pour l'instant inexplicables et il serait intéressant de confronter ces résultats aux variations des paramètres environnementaux abiotiques (modifications climatiques, pollution) ou biotiques (espèces introduites, modification de l'aire de distribution des espèces et en particulier des "pollinisateurs") de ces dernières années dans cette région soumise à de fortes pressions anthropiques (Dauvin et Lozacheur, 2006).

Comparativement au rôle des banques de graines chez les angiospermes ou celui des gamétophytes microscopiques des laminaires (algues brunes), l'observation d'individus dormants chez les algues rouges a été jusqu'alors peu discutée (Hoffmann et Santelices, 1991 ; Carney et Edwards, 2006). Cette "dormance" pourrait être une forme de résistance permettant aux individus de survivre sous forme de disque à différentes pressions environnementales afin de se reproduire lorsque les conditions redeviennent favorables. Cette dormance contribue sans doute aussi à la très longue durée de vie des individus sur le terrain. L'avantage d'un suivi à long terme permet de mieux estimer les temps de "dormance" et la fréquence des individus exprimant une telle stratégie. Enfin, de nouveaux modèles matriciels basés sur ces données pourront être réalisés afin de tester la pertinence du choix des paramètres démographiques les plus à même d'expliquer la croissance de la population.

D'autre part, nous montrons une stabilité des sexe- et ploïdie -ratios. Le cycle de vie haploïde-diploïde ne semble donc pas évoluer rapidement vers la réduction d'une des phases. Cependant, comme ces processus évolutifs sont longs, il serait intéressant de regarder si la structure génétique de cette population a changé, puisque nous disposons des informations génétiques des individus pour chaque année de relevé.

Enfin, cette étude démographique a permis de retrouver au sein de la population étudiée un certain nombre d'individus présentant des phénotypes incongruents par rapport au cycle

haplodiplobiontique classiquement décrit (Destombe et al., 1989). Leurs fréquences restent relativement stables dans le temps, cependant il est difficile d'estimer leur impact au sein de la population. Afin d'explorer les mécanismes de leur apparition et de leur maintien dans la population, des expériences de croisements contrôlés impliquant ces différents types de variants pourraient être réalisées. Le suivi de croisements entre des hermaphrodites diploïdes avec des individus haploïdes pourrait permettre de vérifier si des descendants polyploïdes viables et fertiles peuvent être émis. D'autre part, nous pourrions tester si les variants hermaphrodites diploïdes et haploïdes, ainsi que pour les tétrasporophytes avec des gamétophytes en épiphytes, sont capables de réaliser des autofécondations. La viabilité des spores issue des croisements (entre des variants et des femelles, ou issue d'autofécondation) pourra être étudiée pour comprendre si cela peut être un facteur limitant leur établissement dans les populations. Enfin, des marqueurs du sexe (étude en cours) pourront être utilisés sur ces variants afin de mieux caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression de leur phénotype.

Fécondation facilitée par l'isopode *Idotea balthica*

Dans le Chapitre 4, nous montrons pour la première fois, que la rencontre des gamètes chez l'algue rouge *G. gracilis* est facilitée par l'isopode *I. balthica*. En effet, notre expérience a permis de mettre en évidence que le nombre de fécondations était 20 fois plus important en présence de l'isopode et que les spermaties étaient transportées directement en adhérant à la cuticule de l'isopode. Les recensements sur le terrain permettent également de montrer que l'isopode *I. balthica* est plus fréquemment retrouvé sur *G. gracilis* que sur d'autres algues et que *G. gracilis* semble être un habitat préférentiel pour les isopodes juvéniles, de plus petites tailles. Enfin, des expériences préliminaires semblent indiquer que l'isopode pourrait faciliter la libération des spermaties par les mâles.

Tous ces éléments, suggèrent que la relation entre *G. gracilis* et *I. balthica* est de type mutualiste à bénéfices réciproques. Dans ce système, les isopodes trouveraient une source de nourriture, en broutant les épiphytes (Mancinelli et Rossi, 2001), et un habitat contre les prédateurs auprès de l'algue. D'un autre côté, les isopodes procureraient des bénéfices à *G. gracilis* en facilitant la libération, la diffusion et le transport de ses spermaties, et favoriserait également sa croissance en broutant les épiphytes en surface de ses thalles. La découverte d'une telle relation dans le milieu marin remet en question l'histoire évolutive des relations animaux-végétaux pour faciliter la reproduction de ces derniers. Jusque-là l'hypothèse est que ce type de relation,

dont la plus connue est la pollinisation, serait apparue après la colonisation du milieu terrestre par les plantes. Et bien que des observations de transport de gamètes en milieu aquatique avaient déjà été observées, elles concernaient toutes des plantes terrestres, comme les mousses (Cronberg et al., 2006 ; Shortlidge et al., 2021). L'origine des algues rouges étant plus ancienne que la colonisation du milieu terrestre par les plantes, notre étude propose que l'évolution de ces relations animaux-végétaux pour faciliter la reproduction des végétaux, ait pu se produire dans le milieu marin bien avant la colonisation du milieu terrestre. Elle aurait également pu se produire en parallèle dans les deux environnements, marin et terrestre.

Afin d'explorer toutes les facettes de cette relation plusieurs études pourraient être mises en place. Tout d'abord, le caractère mutualiste de cette relation pourrait être étudié pour définir les avantages respectifs pour les deux protagonistes. D'une part, des observations sur le terrain pourront être réalisées afin de déterminer si les isopodes sont trouvés préférentiellement sur les gracilaires pendant la période de reproduction. D'autre part, des expériences en laboratoire nous permettront de tester si la gracilaire est un habitat refuge préférentiel pour les isopodes, notamment face aux prédateurs. Ensuite, tester la spécificité de cette relation pourrait nous permettre d'en apprendre plus sur son évolution. Pour cela, des expériences similaires à celles menées entre *G. gracilis* et *I. balthica* pourraient être réalisées avec des espèces appartenant à d'autres ordres d'algues rouges. Enfin, afin d'explorer le degré de coévolution de ce système nous pourrions déterminer s'il existe des mécanismes spécifiques à cette interaction, de la même manière que pour les pollinisateurs. Pour cela, nous pourrions réaliser des expériences pour savoir s'il existe des signaux chimiques entre les deux partenaires ou si des traits ont été spécifiquement sélectionnés chez *G. gracilis* pour faciliter le transport de ces spermatis, tel que la production de mucilage par les gamètes.

La sélection sexuelle chez *G. gracilis*

Dans le chapitre 5, la mesure du gradient de Bateman a permis de mettre en évidence une opportunité pour la sélection sexuelle chez *G. gracilis*. Nous avons également montré que différents traits des individus pouvaient jouer sur la variance du nombre de partenaires. Un de ces traits n'était pas un trait héritable puisqu'il s'agit de la distance aux partenaires (dépendant donc de la position géographique des individus dans la population). Un autre trait qui influence le nombre de partenaires est la biomasse, dont le caractère héritable reste encore à définir puisque nous avons montré dans le Chapitre 3 que ce paramètre était également soumis aux conditions environnementales. Enfin, la phénologie de floraison des individus pourrait être un

trait héritable et donc potentiellement sous sélection sexuelle, puisque nous avons montré que les individus avec une durée de floraison plus longue permettaient un accès à un plus grand nombre de partenaires.

Ces résultats sont innovants puisqu'ils montrent que la sélection sexuelle peut être une force évolutive importante chez des espèces haploïdes-diploïdes anisogames ne présentant pas de dimorphisme sexuel. Les études restent peu nombreuses dans ce cas. En effet, elles ont principalement été menées chez des animaux, à fort dimorphisme sexuel, puisqu'il est supposé que le dimorphisme sexuel soit l'une des principales conséquences de la sélection sexuelle. Or, notre étude, ainsi que celle menée chez les mousses (Johnson et Shaw, 2016), montrent que l'occurrence de la sélection sexuelle n'implique pas systématiquement l'évolution d'un dimorphisme sexuel.

Afin de confirmer l'existence d'un ou plusieurs traits mâles sous-sélection sexuelle, des expériences complémentaires sont nécessaires. En effet, bien que la distance semble expliquer une partie de la variance du succès reproducteur et du nombre de partenaires chez les mâles, les expériences de croisement réalisées en laboratoire, avec une distance égale entre les mâles et les femelles, montrent une variation du nombre de descendants engendrés par les mâles, celle-ci pourrait être liée à l'influence d'autres facteurs. D'autres croisements contrôlés pourront être menés pour confirmer ou infirmer l'impact d'autres caractéristiques mâles comme le nombre de gamètes produits, leur durée de vie ou la quantité de mucilage produit.

En effet, l'étude des caractéristiques des gamètes mâles semble être une piste à explorer. La durée de vie des gamètes a été estimée à 6h (Destombe et al., 1990), et il serait intéressant de déterminer si cette durée de vie peut varier entre les mâles, et influencer leur succès reproducteur. La variation interindividuelle du nombre de spermaties produites pourrait être également mesurée. La principale contrainte pour réaliser ces expériences est de maîtriser la libération des spermaties et de mettre au point une méthode rapide de quantification. Durant cette thèse, l'optimisation des protocoles déjà existant de comptage en ainsi que le développement d'une méthode de quantification en qPCR ont été initiés. Il serait donc intéressant, afin de quantifier la production de gamètes et leur durée de vie, de reprendre le développement de ces méthodes.

Enfin, une autre caractéristique des gamètes mâles qu'il semble essentiel d'étudier de manière plus approfondie, est la production de mucilage par les spermaties. En effet, dans le chapitre 4 nous avons montré que les spermaties étaient transportées par les isopodes en adhérant à leur

cuticule grâce au mucilage. Et dans le chapitre 5, nous montrons que le succès de fécondation des mâles est différent lorsqu'il dépend uniquement de la capacité de leur gamète à être transporté par les idotées. Il serait donc nécessaire de développer des outils permettant de mesurer et de suivre la production de mucilage par les mâles.

En conclusion, cette thèse a permis de révéler la complexité des mécanismes impliqués dans la reproduction de l'algue rouge *G. gracilis*. Cette étude constitue une première étape dans l'exploration de ces mécanismes chez cette espèce et une base pour les étudier chez d'autres espèces d'algues rouges.

Références bibliographiques

- Abbott, J.K., Nordén, A.K., Hansson, B., 2017. Sex chromosome evolution: historical insights and future perspectives. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **284**, 2016–2806. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2806>
- Aberg, P., 1992. A Demographic Study of Two Populations of the Seaweed *Ascophyllum Nodosum*. *Ecology*. **73**, 1473–1487. <https://doi.org/10.2307/1940691>
- Åberg, P., 1990. Measuring size and choosing category size for a transition matrix study of the seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **63**, 281–287. <https://doi.org/10.3354/meps063281>
- Aguilera, M.A., 2011. The functional roles of herbivores in the rocky intertidal systems in Chile: A review of food preferences and consumptive effects. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **84**, 241–261. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2011000200009>
- Ahmed, S., Cock, J.M., Pessia, E., Luthringer, R., Cormier, A., Robuchon, M., Sterck, L., Peters, A.F., Dittami, S.M., Corre, E., Valero, M., Aury, J.-M., Roze, D., Van de Peer, Y., Bothwell, J., Marais, G.A.B., Coelho, S.M., 2014. A Haploid System of Sex Determination in the Brown Alga *Ectocarpus sp.* *Curr. Biol.* **24**, 1945–1957. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.042>
- Allen, C.E., 1945. The genetics of bryophytes. II. *Bot. Rev.* **11**, 260–287. <https://doi.org/10.1007/BF02861195>
- Althoff, D.M., Segraves, K.A., Smith, C.I., Leebens-Mack, J., Pellmyr, O., 2012. Geographic isolation trumps coevolution as a driver of yucca and yucca moth diversification. *Mol. Phylogenet. Evol.* **62**, 898–906. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.11.024>
- Alvarez-Buylla, E.R., Chaos, A., Pinero, D., Garay, A.A., 1996. Demographic Genetics of a Pioneer Tropical Tree Species: Patch Dynamics, Seed Dispersal, and Seed Banks. *Evolution*. **50**, 1155–1166. <https://doi.org/10.2307/2410656>
- Ang, P., De Wreede, R., 1993. Simulation and analysis of the dynamics of a *Fucus distichus* (Phaeophyceae, Fucales) population. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **93**, 253–265. <https://doi.org/10.3354/meps093253>
- Ang, P., De Wreede, R., Dyck, L., 1990. A simulation model for an *Iridaea splendens* (Gigartinales, Rhodophyta) population in Vancouver, Canada. *Hydrobiologia*. **204/205**, 191–196. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2049-1_27
- Araújo, R.M., Serrão, E.A., Sousa-Pinto, I., Åberg, P., 2014. Spatial and Temporal Dynamics of Fucoid Populations (*Ascophyllum nodosum* and *Fucus serratus*): A Comparison between Central and Range Edge Populations. *Plos One*. **9**, e92177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092177>
- Armisen, R., 1995. World-wide use and importance of Gracilaria. *J. Appl. Phycol.* **7**, 231. <https://doi.org/10.1007/BF00003998>
- Arnold, S.J., 1994. Is there a Unifying Concept of Sexual Selection that Applies to Both Plants and Animals? *Am. Nat.* **144**, S1–S12. <https://doi.org/10.1086/285650>

- Bao, T., Wang, B., Li, J., Dilcher, D., 2019. Pollination of Cretaceous flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 24707–24711. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916186116>
- Barbot, E., Dufay, M., DE Cauwer, I., 2023. Sex specific selection patterns in a dioecious insect-pollinated plant. *Evolution*. <https://doi.org/10.1093/evolut/qpad069>
- Barrett, S.C.H., Hough, J., 2013. Sexual dimorphism in flowering plants. *J. Exp. Bot.* **64**, 67–82. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers308>
- Barton, N.H., Charlesworth, B., 1998. Why Sex and Recombination? *Science*. **281**, 1986–1990. <https://doi.org/10.1126/science.281.5385.1986>
- Bateman, A.J., 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*. **2**, 349–368. <https://doi.org/10.1038/hdy.1948.21>
- Bell, G., 1978. The evolution of anisogamy. *J. Theor. Biol.* **73**, 247–270. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(78\)90189-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(78)90189-3)
- Bellorin, A.M., Oliveira, M.C., Oliveira, E.C., 2004. *Gracilaria vermiculophylla*: A western Pacific species of Gracilariaceae (Rhodophyta) first recorded from the eastern Pacific. *Phycol. Res.* **52**, 69–79. <https://doi.org/10.1111/j.1440-183.2004.00330.x>
- Benton, T.G., Plaistow, S.J., Coulson, T.N., 2006. Complex population dynamics and complex causation: devils, details and demography. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **273**, 1173–1181. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3495>
- Bernstein, H., Bernstein, C., 2013. Evolutionary Origin and Adaptive Function of Meiosis, *Meiosis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/56557>
- Bernstein, H., Bernstein, C., 2010. Evolutionary Origin of Recombination during Meiosis. *BioScience*. **60**, 498–505. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.7.5>
- Bernstein, H., Bernstein, C., Michod, 2011. Meiosis as an Evolutionary Adaptation for DNA Repair. *DNA Repair*. IntechOpen <https://doi.org/10.5772/25117>
- Berrenger, H., 2022. (Stage fin d'étude) Interactions entre *Gracilaria gracilis* et *Idotea balthica*. InTechMer.
- Berthelsen, A., Taylor, R., 2014. Arthropod mesograzers reduce epiphytic overgrowth of subtidal coralline turf. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **515**, 123–132. <https://doi.org/10.3354/meps11025>
- Bhattacharya, D., Qiu, H., Lee, J., Su Yoon, H., Weber, A.P.M., Price, D.C., 2018. When Less is More: Red Algae as Models for Studying Gene Loss and Genome Evolution in Eukaryotes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **37**, 81–99. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1482364>
- Billiard, S., López-Villavicencio, M., Devier, B., Hood, M.E., Fairhead, C., Giraud, T., 2011. Having sex, yes, but with whom? Inferences from fungi on the evolution of anisogamy and mating types. *Biol. Rev.* **86**, 421–442. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00153.x>

- Bird, C.J., Edelstein, T., McLachlan, J., 1977. Studies on *Gracilaria*. Occurrence in Atlantic Canada, with particular reference to Pomquet Harbour, Nova Scotia. *Naturaliste Can.* **104**: 257-266.
- Bochenek, G.M., Eriksen, B., 2011. First Come, First Served: Delayed Fertilization Does Not Enhance Pollen Competition in a Wind-Pollinated Tree, *Fraxinus excelsior* L. (Oleaceae). *Int. J. Plant Sci.* **172**, 60–69. <https://doi.org/10.1086/657298>
- Bondarenko, V., Cosson, J., 2019. Structure and beating behavior of the sperm motility apparatus in aquatic animals. *Theriogenology.* **135**, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.005>
- Bouzon, L., 2000. Male gametogenesis in the red algae *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta, Gracilariales). *Cryptogam. Algal.* **21**, 33–47. [https://doi.org/10.1016/S0181-1568\(00\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0181-1568(00)00103-3)
- Brawley, S.H., 1991. The fast block against polyspermy in fucoid algae is an electrical block. *Dev. Biol.* **144**, 94–106. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90482-i](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90482-i)
- Brawley, S.H., Johnson, L.E., 1992. Gametogenesis, gametes and zygotes: An ecological perspective on sexual reproduction in the algae. *Br. Phycol. J.* **27**, 233–252. <https://doi.org/10.1080/00071619200650241>
- Brawley, S.H., Johnson, L.E., Pearson, G.A., Speransky, V., Li, R., Serrão, E., 1999. Gamete Release at Low Tide in Fucoid Algae: Maladaptive or Advantageous ? *Am. Zool.* **39**, 218–229. <https://doi.org/10.1093/icb/39.2.218>
- Briscoe Runquist, R.D., Geber, M.A., Pickett-Leonard, M., Moeller, D.A., 2017. Mating System Evolution under Strong Pollen Limitation: Evidence of Disruptive Selection through Male and Female Fitness in *Clarkia xantiana*. *Am. Nat.* **189**, 549–563. <https://doi.org/10.1086/691192>
- Broadwater, S.T., Scott, J., 1982. Ultrastructure of early development in the female reproductive system of polysiphonia *Harveyi bailey* (Ceramiales, Rhodophyta). *J. Phycol.* **18**, 427–441. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1982.tb03206.x>
- Buchmann, S., 1983. Buzz Pollination in Angiosperms. *Flor. Cues Anim. Behav.* **266**, 73–113. https://digitalcommons.usu.edu/bee_lab_bo/266
- Buchmann, S.L., Hurley, J.P., 1978. A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. *J. Theor. Biol.* **72**, 639–657. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(78\)90277-1](https://doi.org/10.1016/0022-5193(78)90277-1)
- Budd, G.E., Jensen, S., 2000. A critical reappraisal of the fossil record of the bilaterian phyla. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **75**, 253–295. <https://doi.org/10.1017/s000632310000548x>
- Bullock, S.H., Beach, J.H., Bawa, K.S., 1983. Episodic Flowering and Sexual Dimorphism in *Guarea rhopalocarpa* in a Costa Rican Rain Forest. *Ecology.* **64**, 851–861. <https://doi.org/10.2307/1937208>

- Buschmann, A.H., Bravo, A., 1990. Intertidal Amphipods as Potential Dispersal Agents of Carpospores of *Iridaea Laminarioides* (gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* **26**, 417–420. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00417.x>
- Buschmann, A.H., Correa, J.A., Westermeier, R., Hernández-González, M. del C., Norambuena, R., 2001. Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture.* **194**, 203–220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00518-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00518-4)
- Buschmann, A.H., Vergara, P.A., 1993. Effect of Rocky Intertidal Amphipods on Algal Recruitment: A Field Study. *J. Phycol.* **29**, 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00154.x>
- Cabioch, J., 1972. A new case of anomaly in the cycle of Gigartinales (Algae Florideae) *C.R. Acad. SC. Paris.* **275**, 1979-1981.
- Campbell, D.H. 1921. The gametophyte and embryo of *Botrychium obliquum*, Mühl. *Ann. Bot. London.* **36**, 441-455.
- Capdevila Lanzaco, P., 2017. Life history, population dynamics and conservation of underwater Mediterranean forests: insights from the long-lived alga *Cystoseira zosteroides*. Thèse. Université de Barcelone <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13192.47360>
- Capdevila, P., Hereu, B., Riera, J.L., Linares, C., 2016. Unravelling the natural dynamics and resilience patterns of underwater Mediterranean forests: insights from the demography of the brown alga *Cystoseira zosteroides*. *J. Ecol.* **104**, 1799–1808. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12625>
- Capel, B., 2017. Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 675–689. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.60>
- Carney, L.T., Edwards, M.S., 2006. Cryptic processes in the sea: a review of delayed development in the microscopic life stages of marine macroalgae. *Algae.* **21**, 161–168. <https://doi.org/10.4490/algae.2006.21.2.161>
- Caswell, H., 1989. Matrix Population Models. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Chapman, A.R.O., 1993. “Hard” data for matrix modelling of *Laminaria digitata* (Laminariales, Phaeophyta) populations. *Hydrobiologia.* **260**, 263–267. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1998-6_31
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1979. The evolution and breakdown of S-allele systems. *Heredity.* **43**, 41–55. <https://doi.org/10.1038/hdy.1979.58>
- Cheung, K.W., Lee, K.Y., Hodgkiss, I.J., 1984. The Occurrence of Tetrasporangia and Cystocarps on the Same Thalli in *Polysiphonia harlandii* (Rhodophyta: Ceramiales). *Bot. Mar.* **27**, 571–572. <https://doi.org/10.1515/botm.1984.27.12.571>
- Clutton-Brock, T.H., 1988. Reproductive Success: Studies of Individual Variation in Contrasting Breeding Systems. University of Chicago Press. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1990.3050478.x>

- Coelho, S.M., Gueno, J., Lipinska, A.P., Cock, J.M., Umen, J.G., 2018. UV Chromosomes and Haploid Sexual Systems. *Trends Plant Sci.* **23**, 794–807. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.06.005>
- Coelho, S.M., Peters, A.F., Charrier, B., Roze, D., Destombe, C., Valero, M., Cock, J.M., 2007. Complex life cycles of multicellular eukaryotes: New approaches based on the use of model organisms. *Gene.* **406**, 152–170. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.07.025>
- Cohan, F.M., Aracena, S., 2012. Prokaryotic Sex: Eukaryote-like Qualities of Recombination in an Archaeal Lineage. *Curr. Biol.* **22**, 601–602. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.052>
- Cohen, P.A., Knoll, A.H., Kodner, R.B., 2009. Large spinose microfossils in Ediacaran rocks as resting stages of early animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 6519–6524. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902322106>
- Couceiro, L., Le Gac, M., Hunsperger, H.M., Mauger, S., Destombe, C., Cock, J.M., Ahmed, S., Coelho, S.M., Valero, M., Peters, A.F., 2015. Evolution and maintenance of haploid-diploid life cycles in natural populations: The case of the marine brown alga *Ectocarpus*. *Evolution.* **69**, 1808–1822. <https://doi.org/10.1111/evo.12702>
- Cox, P.A., Sethian, J.A., 1985. Gamete Motion, Search, and the Evolution of Anisogamy, Oogamy, and Chemotaxis. *Am. Nat.* **125**, 74–101. <https://doi.org/10.1086/284329>
- Cronberg, N., Natcheva, R., Hedlund, K., 2006. Microarthropods Mediate Sperm Transfer in Mosses. *Science.* **313**, 1255–1255. <https://doi.org/10.1126/science.1128707>
- Culley, T.M., Weller, S.G., Sakai, A.K., 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends Ecol. Evol.* **17**, 361–369. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02540-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02540-5)
- Da Silva Vieira, V.M.N. de C., Pimenta Santos, R.O., 2010. Demographic Mechanisms Determining the Dynamics of the Relative Abundance of Phases in Biphasic Life Cycles. *J. Phycol.* **46**, 1128–1137. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00924.x>
- Daly, M., 1978. The Cost of Mating. *Am. Nat.* **112**, 771–774. <https://doi.org/10.1086/283319>
- D'Antonio, C., 1985. Epiphytes on the rocky intertidal red alga *Rhodomela Larix* (Turner) C. Agardh: Negative effects on the host and food for herbivores? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **86**, 197–218. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(85\)90103-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(85)90103-0)
- Darwin, C., 1871. The descent of man, and selection in relation to sex. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.70891>
- Dauvin, J.-C., Lozachmeur, O., 2006. Mer côtière à forte pression anthropique propice au développement d'une gestion intégrée : exemple du bassin oriental de la Manche (Atlantique Nord-Est). *VertigO - Revue Électronique En Science.* <https://doi.org/10.4000/vertigo.1914>
- Davies, S.J., Ashton, P.S., 1999. Phenology and fecundity in 11 sympatric pioneer species of *Macaranga* (Euphorbiaceae) in Borneo. *Am. J. Bot.* **86**, 1786–1795. <https://doi.org/10.2307/2656675>

- De Cauwer, I., Arnaud, J.-F., Schmitt, E., Dufay, M., 2010. Pollen limitation of female reproductive success at fine spatial scale in a gynodioecious and wind-pollinated species, *Beta vulgaris ssp. maritima*. *J. Evol. Biol.* **23**, 2636–2647. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02119.x>
- De Cauwer, Isabelle, Dufay, M., Cuguen, J., Arnaud, J.-F., 2010. Effects of fine-scale genetic structure on male mating success in gynodioecious *Beta vulgaris ssp. maritima*. *Mol. Ecol.* **19**, 1540–1558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04586.x>
- De Jong, T.J., Klinkhamer, P.G.L., 1994. Plant Size and Reproductive Success through Female and Male Function. *J. Ecol.* **82**, 399–402. <https://doi.org/10.2307/2261307>
- De Luca, P.A., Bussière, L.F., Souto-Vilaros, D., Goulson, D., Mason, A.C., Vallejo-Marín, M., 2013. Variability in bumblebee pollination buzzes affects the quantity of pollen released from flowers. *Oecologia*. **172**, 805–816. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2535-1>
- De Wreede, R.E., 1986. Demographic characteristics of *Pterygophora californica* (Laminariales, Phaeophyta). *Phycologia*. **25**, 11–17. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-25-1-11.1>
- De Wreede, R., Klinger, T., 1988. *Reproductive strategies in algae*. Oxford University Press, New York.
- Delph, L.F., Ashman, T.-L., 2006. Trait selection in flowering plants: how does sexual selection contribute? *Integr. Comp. Biol.* **46**, 465–472. <https://doi.org/10.1093/icb/icj038>
- Destombe, C., 1987. Biologie des populations de l'algue rouge *Gracilaria verrucosa* Hudson (Papenfuss) (Gigartinales), intérêt et implication en aquaculture. Thèse, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, Lille, France.
- Destombe, C., Godin, J., Bodard, M., 1988. The decay phase in the life history of *Gracilaria verrucosa*: the consequences in intensive cultivation. *Algal Biotechnol.* Ed. T Stadler.
- Destombe, C., Valero, M., Vernet, P., Couvet, D., 1989. What controls haploid—diploid ratio in the red alga, *Gracilaria verrucosa* ? *J. Evol. Biol.* **2**, 317–338. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1989.2050317.x>
- Destombe, C., Godin, J., Remy, J.-M., 1990. Viability and dissemination of spermatia of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*. **204/205**, 219–223. <https://doi.org/10.1007/BF00040237>
- Destombe, C., Godin, J., Lefebvre, C., Dehorter, O., Vernet, P., 1992. Differences in Dispersal Abilities of Haploid and Diploid Spores of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* **35**, 93–98. <https://doi.org/10.1515/botm.1992.35.2.93>
- Destombe, C., Godin, J., Nocher, M., Richerd, S., Valero, M., 1993. Differences in response between haploid and diploid isomorphic phases of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta: Gigartinales)

- exposed to artificial environmental conditions. *Hydrobiologia*. **260**, 131–137.
<https://doi.org/10.1007/BF00049011>
- Devlin, B., Clegg, J., Ellstrand, N.C., 1992. The effect of flower production on male reproductive success in wild radish populations. *Evolution*. **46**, 1030–1042.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1992.tb00617.x>
- Dewsbury, D.A., 2005. The Darwin-Bateman Paradigm in Historical Context. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 831–837. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.831>
- Dixon, P. S., 1960. Studies on marine algae of the British Isles: The genus *Ceramium*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **39**(2), 331–374. <https://doi.org/10.1017/S0025315400013369>
- Dixon, P.S., 1973. Biology of the Rhodophyta, University reviews in botany. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- Drew, K.M., 1934. Contributions to the cytology of Spennon (hamnion Turnen (Mert.) Aresch. I. The diploid generation. *Ann. Bot.* **48**, 549–573.
- During, H.J., 1979. Life Strategies of Bryophytes: A Preliminary Review. *Lindbergia*. **5**, 2–18.
<https://www.jstor.org/stable/20149317>
- Dusenbery, D.B., 2006. Selection for high gamete encounter rates explains the evolution of anisogamy using plausible assumptions about size relationships of swimming speed and duration. *J. Theor. Biol.* **241**, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.11.006>
- Eberhard, W.G., 1980. Evolutionary consequences of intracellular organelle competition. *Q. Rev. Biol.* **55**, 231–249. <https://doi.org/10.1086/411855>
- Edelstein, T., Chen, L.C.-M., McLachlan, J., 1978. Studies on *Gracilaria* (gigartinales, Rhodophyta): Reproductive Structures. *J. Phycol.* **14**, 92–100.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1978.tb00638.x>
- Ehrlén, J., Lehtilä, K., 2002. How perennial are perennial plants? *Oikos*. **98**, 308–322.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.980212.x>
- Elzinga, J.A., Atlan, A., Biere, A., Gigord, L., Weis, A.E., Bernasconi, G., 2007. Time after time: flowering phenology and biotic interactions. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 432–439.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.05.006>
- Engel, C.R., Åberg, P., Gaggiotti, O.E., Destombe, C., Valero, M., 2001. Population dynamics and stage structure in a haploid-diploid red seaweed, *Gracilaria gracilis*. *J. Ecol.* **89**, 436–450.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2001.00567.x>
- Engel, C.R., 2000. Fonctionnement des populations d'une espèce d'algue rouge marine haplo-diploïde : structures et dynamiques démographique et génétique chez *Gracilaria gracilis* - Tome I & II. Thèse. Université de Paris-Sud ORSAY. France.

- Engel, C.R., Destombe, C., 2002. Reproductive ecology of an intertidal red seaweed, *Gracilaria gracilis*: influence of high and low tides on fertilization success. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **82**, 189–192. <https://doi.org/10.1017/S0025315402005349>
- Engel, C.R., Destombe, C., Valero, M., 2004. Mating system and gene flow in the red seaweed *Gracilaria gracilis*: effect of haploid–diploid life history and intertidal rocky shore landscape on fine-scale genetic structure. *Heredity*. **92**, 289–298. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800407>
- Engel, C.R., Valero, M., Lagadeuc, Y., Destombe, C., 2002. Non-random mating in controlled multiple-donor crosses in *Gracilaria gracilis* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* **37**, 179–190. <https://doi.org/10.1017/S096702620200358X>
- Engel, C.R., Wattierf, R., Destombe, C., Valero, M., 1999. Performance of non–motile male gametes in the sea: analysis of paternity and fertilization success in a natural population of a red seaweed, *Gracilaria gracilis*. *Proc. R. Soc. B.* **266**, 1879–1886. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0861>
- Erwin, D.H., Laflamme, M., Tweedt, S.M., Sperling, E.A., Pisani, D., Peterson, K.J., 2011. The Cambrian Conundrum: Early Divergence and Later Ecological Success in the Early History of Animals. *Science*. **334**, 1091–1097. <https://doi.org/10.1126/science.1206375>
- Evans, J.P., Garcia-Gonzalez, F., Almbro, M., Robinson, O., Fitzpatrick, J.L., 2012. Assessing the potential for egg chemoattractants to mediate sexual selection in a broadcast spawning marine invertebrate. *Proc. R. Soc. B.* **279**, 2855–2861. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0181>
- Evans, J.P., Sherman, C.D.H., 2013. Sexual Selection and the Evolution of Egg-Sperm Interactions in Broadcast-Spawning Invertebrates. *Biol. Bull.* **224**, 166–183. <https://doi.org/10.1086/BBLv224n3p166>
- Faure, A., 2021. Les butineurs de la mer : Etude de l'interaction biotique entre l'algue rouge *Gracilaria gracilis* et les isopodes du genre *Idotea* (Master II). Sorbonne Université. Roscoff. France
- Fedonkin, M.A., 2003. The origin of the Metazoa in the light of the Proterozoic fossil record. *Paleontol. Res.* **7**, 9–41. <https://doi.org/10.2517/prpsj.7.9>
- Fetter, R., Neushul, M., 1981. Studies on Developing and Released Spermatia in the Red Alga, *Tiffaniella Snyderae* (rhodophyta). *J. Phycol.* **17**, 141–159. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1981.tb00833.x>
- Fisher, R.A., 1930. The genetical theory of natural selection. Oxford: Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/genetics/154.4.1419>
- Forrest, J.R.K., 2015. Plant–pollinator interactions and phenological change: what can we learn about climate impacts from experiments and observations ? *Oikos*. **124**, 4–13. <https://doi.org/10.1111/oik.01386>
- Fredericq, S., Hommersand, M.H., 1989. Proposal of the Gracilariales ord. Nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. *J. Phycol.* **25**, 213–227. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1989.tb00116.x>

- Frenkel, J., Vyverman, W., Pohnert, G., 2014. Pheromone signaling during sexual reproduction in algae. *Plant J.* **79**, 632–644. <https://doi.org/10.1111/tpj.12496>
- Gioele, C., Marilena, S., Valbona, A., Nunziacarla, S., Andrea, S., Antonio, M., 2017. *Gracilaria gracilis*, Source of Agar: A Short Review. *Curr. Org. Chem.* **21**, 380–386. <https://doi.org/10.2174/1385272820666161017164605>
- Gonçalves-Souza, P., Schlindwein, C., Paiva, E.A.S., 2018. Floral resins of *Philodendron adamantinum* (Araceae): secretion, release and synchrony with pollinators. *Acta Bot. Bras.* **32**, 392–401. <https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0115>
- Gong, Y.-B., Yang, M., Vamosi, J.C., Yang, H.-M., Mu, W.-X., Li, J.-K., Wan, T., 2015. Wind or insect pollination? Ambophily in a subtropical gymnosperm *Gnetum parvifolium* (Gnetales). *Plant Species Biol.* **31**, 272–279. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12112>
- Gotelli, N.J., 1991. Demographic Models for *Leptogorgia Virgulata*, A Shallow-Water Gorgonian. *Ecology.* **72**, 457–467. <https://doi.org/10.2307/2937187>
- Gouyon, P.-H., Gliddon, C.J., Couvet, D., 1988. The evolution reproductive systems : a hierarchy of causes. *Plant Popul. Ecol.* In J. Davy, M. J. Hutchings, A. R. Watkinson eds. p 23-33.
- Grant, V., 1995. Sexual Selection in Plants: Pros and Cons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1247–1250. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1247>
- Grosberg, R.K., 1991. Sperm-Mediated Gene Flow and the Genetic Structure of a Population of the Colonial Ascidian *Botryllus schlosseri*. *Evolution.* **45**, 130–142. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1991.tb05272.x>
- Gross, L., 2006. Sexual Selection Comes at a Cost. *PLoS Biol.* **4**, e394. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040394>
- Guillemin, M-L., Akki, S.A., Givernaud, T., Mouradi, A., Valero, M., Destombe, C., 2008. Molecular characterisation and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquat. Bot.* **89**, 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.03.008>
- Guillemin, M-L., Faugeron, S., Destombe, C., Viard, F., Correa, J.A., Valero, M., 2008. Genetic Variation in Wild and Cultivated Populations of the Haploid–Diploid Red Alga *Gracilaria Chilensis*: How Farming Practices Favor Asexual Reproduction and Heterozygosity. *Evolution.* **62**, 1500–1519. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00373.x>
- Guillemin, M-L., Huanel, O.R., Martínez, E.A., 2012. Characterization of genetic markers linked to sex determination in the haploid-diploid red alga *Gracilaria chilensis*. *J. Phycol.* **48**, 365–372. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01116.x>
- Guillemin, M.-L., Sepúlveda, R.D., Correa, J.A., Destombe, C., 2013. Differential ecological responses to environmental stress in the life history phases of the isomorphic red alga *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* **25**, 215–224. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9855-8>

- Guimarães, M., Plastino, E.M., Destombe, C., 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Eur. J. Phycol.* **38**, 165–169. <https://doi.org/10.1080/0967026031000085878>
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2023. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>.
- Häfker, N.S., Andreatta, G., Manzotti, A., Falciatore, A., Raible, F., Tessmar-Raible, K., 2023. Rhythms and Clocks in Marine Organisms. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **15**, 509–538. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-030422-113038>
- Hamilton, W.D., 1980. Sex versus Non-Sex versus Parasite. *Oikos*. **35**, 282–290. <https://doi.org/10.2307/3544435>
- Han, J.W., Klochkova, T.A., Shim, J.B., Yoon, K., Kim, G.H., 2012. Isolation and Characterization of a Sex-Specific Lectin in a Marine Red Alga, *Aglaothamnion oosumiense* Itono. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7283–7289. <https://doi.org/10.1128/AEM.00415-12>
- Hargeby, A., Johansson, J., Ahnesjö, J., 2004. Habitat-specific pigmentation in a freshwater isopod: adaptive evolution over a small spatiotemporal scale. *Evolution*. **58**, 81–94. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01575.x>
- Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., Hedges, S.B., 2001. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*. **293**, 1129–1133. <https://doi.org/10.1126/science.1061457>
- Henking, H. 1891. Über Spermatogenese und deren Beziehung zur Entwicklung bei *Pyrrhocoris apterus* L. *Z. Wissenschaftliche Zool.* **51**, 685–736. <https://doi.org/10.1007/BF00407470>
- Henshaw, J.M., Bittlingmaier, M., Schärer, L., 2023. Hermaphroditic origins of anisogamy. *Philos. Trans. R. Soc. B.* **378**, 20220283. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0283>
- Hobbs, R.J., Yates, S., Mooney, H.A., 2007. Long-Term Data Reveal Complex Dynamics in Grassland in Relation to Climate and Disturbance. *Ecol. Monogr.* **77**, 545–568. <https://doi.org/10.1890/06-1530.1>
- Hodgins, K.A., Barrett, S.C.H., 2008. Natural Selection on Floral Traits Through Male and Female Function in Wild Populations of the *Heterostylous Daffodil Narcissus Triandrus*. *Evolution*. **62**, 1751–1763. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00404.x>
- Hoekstra, R.F., 1982. On the asymmetry of sex: Evolution of mating types in isogamous populations. *J. Theor. Biol.* **98**, 427–451. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(82\)90129-1](https://doi.org/10.1016/0022-5193(82)90129-1)
- Hoffmann, A.J., Santelices, B., 1991. Banks of Algal Microscopic Forms: Hypotheses on Their Functioning and Comparisons with Seed Banks. *Marine Ecology Progress Series*. **79**, 185–194. <https://doi.org/10.3354/meps079185>

- Hosken, D.J., House, C.M., 2011. Sexual selection. *Curr. Biol.* **21**, R62–R65. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.11.053>
- Hughes, J.S., Otto, S.P., 1999. Ecology and the Evolution of Biphase Life Cycles. *Am. Nat.* **154**, 306–320. <https://doi.org/10.1086/303241>
- Hurst, L.D., Hamilton, W.D., 1992. Cytoplasmic fusion and the nature of sexes. *Proc. R. Soc. B.* **247**, 189–194. <https://doi.org/10.1098/rspb.1992.0027>
- Isagi, Y., Saito, D., Kawaguchi, H., Tateno, R., Watanabe, S., 2007. Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* population. *J. Ecol.* **95**, 983–990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2007.01272.x>
- Janicke, T., Häderer, I.K., Lajeunesse, M.J., Anthes, N., 2016. Darwinian sex roles confirmed across the animal kingdom. *Sci. Adv.* **2**, e1500983. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500983>
- Jennions, M.D., Moller, A.P., Petrie, M., 2001. Sexually Selected Traits and Adult Survival: A Meta-Analysis. *Q. Rev. Biol.* **76**, 3–36. <https://doi.org/10.1086/393743>
- Johnson, M.G., Shaw, A.J., 2016. The effects of quantitative fecundity in the haploid stage on reproductive success and diploid fitness in the aquatic peat moss *Sphagnum macrophyllum*. *Heredity.* **116**, 523–530. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.13>
- Johnson, S.D., Steiner, K.E., 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends Ecol. Evol.* **15**, 140–143. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01811-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01811-X)
- Jones, A.G., Arguello, J.R., Arnold, S.J., 2002. Validation of Bateman’s principles: a genetic study of sexual selection and mating patterns in the rough-skinned newt. *Proc. R. Soc. B.* **269**, 2533–2539. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2177>
- Jormalainen, V., Merilaita, S., Tuomi, J., 1995. Differential predation on sexes affects colour polymorphism of the isopod *Idotea baltica* (Pallas). *Biol. J. Linn. Soc.* **55**, 45–68. [https://doi.org/10.1016/0024-4066\(95\)90028-4](https://doi.org/10.1016/0024-4066(95)90028-4)
- Kafkas, S., Ma, X., Zhang, Xingtian, Topçu, H., Navajas-Pérez, R., Wai, C.M., Tang, H., Xu, X., Khodaeiaminjan, M., Güney, M., Paizila, A., Karcı, H., Zhang, Xiaodan, Lin, J., Lin, H., Herrán, R. de la, Rejón, C.R., García-Zea, J.A., Robles, F., Muñoz, C. del V., Hotz-Wagenblatt, A., Min, X.J., Özkan, H., Motalebipour, E.Z., Gozel, H., Çoban, N., Kafkas, N.E., Kilian, A., Huang, H., Lv, X., Liu, K., Hu, Q., Jacygrad, E., Palmer, W., Michelmore, R., Ming, R., 2023. Pistachio genomes provide insights into nut tree domestication and ZW sex chromosome evolution. *Plant Commun.* **4**, 100497. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100497>
- Kain(Jones), J.M., Destombe, C., 1995. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* **7**, 269–281. <https://doi.org/10.1007/BF00004001>
- Kelly, M.W., Grosberg, R.K., Sanford, E., 2012. Love the one you’re with: proximity determines paternity success in the barnacle *Tetraclita rubescens*. *Mol. Ecol.* **21**, 5088–5097. <https://doi.org/10.1111/mec.12009>

- Kim, G.H., Fritz, L., 1993. Gamete recognition during fertilization in a red alga, *Antithamnion nipponicum*. *Protoplasma*. **174**, 69–73. <https://doi.org/10.1007/BF01404044>
- Kim, G.H., Kim, S.H., 1999. The Role of F-Actin During Fertilization in the Red Alga *Aglaothamnion oosumiense* (rhodophyta). *J. Phycol.* **35**, 806–814. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3540806.x>
- Kling, R., Bodard, M., 1987. Morphogenesis of the frond of *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss: the differentiation of vegetative and sexual areas. *Proceedings of the International Seaweed Symposium*, **12**, 205–206.
- Klinkhamer, P.G.L., de Jong, T.J., Metz, H., 1997. Sex and size in cosexual plants. *Trends Ecol. Evol.* **12**, 260–265. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01078-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01078-1)
- Krueger-Hadfield, S., 2018. Everywhere you look, everywhere you go, there's an estuary invaded by the red seaweed *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss, 1967. *BioInvasions Rec.* **7**, 343–355. <https://doi.org/10.3391/bir.2018.7.4.01>
- Krueger-Hadfield, S.A., Blakeslee, A.M.H., Fowler, A.E., 2019. Incorporating Ploidy Diversity into Ecological and Community Genetics. *J. Phycol.* **55**, 1198–1207. <https://doi.org/10.1111/jpy.12906>
- Krueger-Hadfield, S.A., Collén, J., Daguin-Thiébaud, C., Valero, M., 2011. Genetic Population Structure and Mating System in *Chondrus Crispus* (rhodophyta). *J. Phycol.* **47**, 440–450. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00995.x>
- Krueger-Hadfield, S.A., Flanagan, B.A., Godfroy, O., Hill-Spanik, K.M., Nice, C.C., Murren, C.J., Strand, A.E., Sotka, E.E., 2021. Using RAD-seq to develop sex-linked markers in a haplodiplontic alga. *J. Phycol.* **57**, 279–294. <https://doi.org/10.1111/jpy.13088>
- Krueger-Hadfield, S.A., Hoban, S.M., 2016. The importance of effective sampling for exploring the population dynamics of haploid–diploid seaweeds. *J. Phycol.* **52**, 1–9. <https://doi.org/10.1111/jpy.12366>
- Krueger-Hadfield, S.A., Kollars, N.M., Strand, A.E., Byers, J.E., Shainker, S.J., Terada, R., Greig, T.W., Hammann, M., Murray, D.C., Weinberger, F., Sotka, E.E., 2017. Genetic identification of source and likely vector of a widespread marine invader. *Ecol. Evol.* **7**, 4432–4447. <https://doi.org/10.1002/ece3.3001>
- Krueger-Hadfield, S.A., Roze, D., Correa, J.A., Destombe, C., Valero, M., 2015. O father where art thou? Paternity analyses in a natural population of the haploid–diploid seaweed *Chondrus crispus*. *Heredity*. **114**, 185–194. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.82>
- Kudo, G., 2006. Flowering phenologies of animal-pollinated plants: Reproductive strategies and agents of selection. In *"Ecology and Evolution of Flowers"*, Ed. by Harder, L.D. ; Barrett, C.H., pp 139-158.

- Kwok, A., Dorken, M.E., 2022. Sexual selection on male but not female function in monoecious and dioecious populations of broadleaf arrowhead (*Sagittaria latifolia*). *Proc. Biol. Sci.* **289**, 20220919. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.0919>
- Landry, C., Geyer, L.B., Arakaki, Y., Uehara, T., Palumbi, S.R., 2003. Recent speciation in the Indo–West Pacific: rapid evolution of gamete recognition and sperm morphology in cryptic species of sea urchin. *Proc. R. Soc. B.* **270**, 1839–1847. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2395>
- Lavaut, E., Guillemain, M.-L., Colin, S., Faure, A., Coudret, J., Destombe, C., Valero, M., 2022. Pollinators of the sea: A discovery of animal-mediated fertilization in seaweed. *Science.* **377**, 528–530. <https://doi.org/10.1126/science.abo6661>
- Lawson, R.P., Russell, G., 1967. Simultaneous occurrence of carposporophytes and tetrasporangia in *Polysiphonia urceolata*. *Br. Phycol. Bull.* **3**, 249–250. <https://doi.org/10.1080/00071616700650111>
- Lebel-Hardenack, S., Hauser, E., Law, T.F., Schmid, J., Grant, S.R., 2002. Mapping of Sex Determination Loci on the White Campion (*Silene latifolia*) Y Chromosome Using Amplified Fragment Length Polymorphism. *Genetics.* **160**, 717–725. <https://doi.org/10.1093/genetics/160.2.717>
- Lee, J., Cho, C.H., Park, S.I., Choi, J.W., Song, H.S., West, J.A., Bhattacharya, D., Yoon, H.S., 2016. Parallel evolution of highly conserved plastid genome architecture in red seaweeds and seed plants. *BMC Biol.* **14**, 75. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0299-5>
- Lees, H.R., 2001. The demography and interactions of *Ecklonia radiata* in southern New Zealand. Thèse. University of Canterbury. New Zealand. <https://doi.org/10.26021/6593>
- Lefebvre, C., Destombe C., Godin, J., 1987. Le fonctionnement du carposporophyte de *Gracilaria verrucosa* et ses répercussions sur la stratégie de reproduction. *Cryptog. Algol.* **8**(2), 113-126 <https://biostor.org/reference/261752>
- Lehtonen, J., Parker, G.A., 2014. Gamete competition, gamete limitation, and the evolution of the two sexes. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 1161–1168. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau068>
- Lenormand, T., Otto, S.P., 2000. The evolution of recombination in a heterogeneous environment. *Genetics.* **156**, 423–438. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.1.423>
- Lesica, P., Ahlenslager, K., 1996. Demography and life history of three sympatric species of *Botrychium* subg. *Botrychium* in Waterton Lakes National Park, Alberta. *Canadian Journal of Botany*, **74**(4), 538-543. <https://doi.org/10.1139/b96-068>
- Lessels, C.M., Snook, R.R., Hosken, D.J., 2009. The evolutionary origin and maintenance of sperm: selection for a small, motile gamete mating type, in: *Sperm Biology, An Evolutionary Perspective*. pp. 43–67. Academic Press.
- Levin, T.C., King, N., 2013. Evidence for Sex and Recombination in the Choanoflagellate *Salpingoeca rosetta*. *Curr. Biol.* **23**, 2176–2180. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.061>

- Levitan, D. R. 1991 Influence of body size and population density on fertilization success and reproductive output in a free-spawning invertebrate. *Biol. Bull.* **181**, 261-268. <https://doi.org/10.2307/1542097>
- Levitan, D.R., 1993. The Importance of Sperm Limitation to the Evolution of Egg Size in Marine Invertebrates. *Am. Nat.* **141**, 517–536. <https://doi.org/10.1086/285489>
- Levitan, D.R., 1996. Effects of gamete traits on fertilization in the sea and the evolution of sexual dimorphism. *Nature.* **382**, 153–155. <https://doi.org/10.1038/382153a0>
- Levitan, D. R. 1998. Sperm limitation, gamete competition, and sexual selection in external fertilizers. In: *Sperm Competition and Sexual Selection*. Ed. by T. R. Academic Press.
- Levitan, D.R., 2000. Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Proc. R. Soc. B.* **267**, 531–534. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1032>
- Lewis, I. F. 1909. The life history of *Griffithsia Bornetiana*. *Ann. Bot.* **23**: 639-690. Magallon S. et K.W. Hilu. 2009. Land plants (Embryophyta). Pp133-137 in *The Timetree of Life*, S.B. Hedges and S. Kumar, Eds. (Oxford University Press)
- Lewis, W.M., 1987. The cost of sex, in: Stearns, S.C. (Ed.), *The Evolution of Sex and Its Consequences*, *Experientia Supplementum*. Birkhäuser, Basel, pp. 33–57. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6273-8_2
- Littler, M.M., Littler, D.S., Taylor, P.R., 1995. Selective Herbivore Increases Biomass of Its Prey: A Chiton-Coralline Reef-Building Association. *Ecology.* **76**, 1666–1681. <https://doi.org/10.2307/1938167>
- Liu, Y., Pei, J., Grishin, N., Snell, W.J., 2015. The cytoplasmic domain of the gamete membrane fusion protein HAP2 targets the protein to the fusion site in *Chlamydomonas* and regulates the fusion reaction. *Dev. Camb. Engl.* **142**, 962–971. <https://doi.org/10.1242/dev.118844>
- Luo, H., Mörchen, M., Engel, C.R., Destombe, C., Epplen, J.T., Epplen, C., Saumitou-Laprade, P., Valero, M., 1999. Characterization of microsatellite markers in the red alga *Gracilaria gracilis*. *Mol. Ecol.* **8**, 700–702. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00879.x>
- Lynn, A., Piotter, E., Harrison, E., Galen, C., 2020. Sexual and natural selection on pollen morphology in *Taraxacum*. *Am. J. Bot.* **107**, 364–374. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1428>
- Lyra, G. de M., Iha, C., Grassa, C.J., Cai, L., Zhang, H., Lane, C., Blouin, N., Oliveira, M.C., Nunes, J.M. de C., Davis, C.C., 2021. Phylogenomics, divergence time estimation and trait evolution provide a new look into the Gracilariales (Rhodophyta). *Mol. Phylogenet. Evol.* **165**, 107294. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107294>
- Mable, B.K., Otto, S.P., 1998. The evolution of life cycles with haploid and diploid phases. *BioEssays.* **20**, 453–462. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199806\)20:6<453::AID-BIES3>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199806)20:6<453::AID-BIES3>3.0.CO;2-N)

- Maggs, C. A., 1988. Intraspecific life history variability in the Florideophycidae (Rhodophyta). *Bot. mar.* **31**, 465–490. <https://doi.org/10.1515/botm.1988.31.6.465>
- Magruder, W.H., 1984. Specialized Appendages on Spermatia from the Red Alga *Aglaothamnion Neglectum* (ceramiales, Ceramiaceae) Specifically Bind with Trichogynes. *J. Phycol.* **20**, 436–440. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1984.00436.x>
- Malm, T., 1999. Distribution patterns and ecology of *Fucus serratus* L. and *Fucus vesiculosus* L. in the Baltic Sea. Thèse. Stockholm University. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:su:diva-64047>
- Mancinelli, G., Rossi, L., 2001. Indirect, size-dependent effects of crustacean mesograzers on the Rhodophyta *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss: evidence from a short-term study in the *Lesina Lagoon* (Italy). *Mar. Biol.* **138**, 1163–1173. <https://doi.org/10.1007/s002270100545>
- Mantri, V.A., Kambey, C.S.B., Cottier-Cook, E.J., Usandizaga, S., Buschmann, A.H., Chung, I.K., Liu, T., Sondak, C.F.A., Qi, Z., Lim, P.E., Van Nguyen, N., 2023. Overview of global *Gracilaria* production, the role of biosecurity policies and regulations in the sustainable development of this industry. *Rev. Aquac.* **15**, 801–819. <https://doi.org/10.1111/raq.12761>
- Marchi, F., Plastino, E.M., 2020. Codominant inheritance of polymorphic color mutant and characterization of a bisexual mutant of *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* **32**, 4385–4398. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02199-w>
- Martinez, E.A., Destombe, C., Quillet, M.C., Valero, M., 1999. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers highly linked to sex determination in the red alga *Gracilaria gracilis*. *Mol. Ecol.* **8**, 1533–1538. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00721.x>
- Mauger, S., Baud, A., Le Corguillé, G., Tanguy, G., Legeay, E., Creis, E., Valero, M., Destombe, C., Potin, P. Genetic resources of macroalgae: development of an efficient method using microsatellite markers in non-model organisms. *Algal Res.* *submitted*
- Mauger, S., Couceiro, L., Valero, M., 2012. A simple and cost-effective method to synthesize an internal size standard amenable to use with a 5-dye system. *Prime Res. Biotechnol.* **2**, 2315–5299.
- Maynard Smith, J., 1971. What use is sex? *J. Theor. Biol.* **30**, 319–335. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(71\)90058-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(71)90058-0)
- Maynard Smith, J., 1978. *The Evolution of Sex*. Cambridge: Cambridge University Press.
- McQuaid, C.D., Froneman, P.W., 1993. Mutualism between the Territorial Intertidal Limpet *Patella longicosta* and the Crustose Alga *Ralfsia verrucosa*. *Oecologia.* **96**, 128–133. <https://doi.org/10.1007/BF00318040>

- Mercier, A., Ycaza, R., Hamel, J., 2007. Long-term study of gamete release in a broadcast-spawning holothurian: predictable lunar and diel periodicities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **329**, 179–189. <https://doi.org/10.3354/meps329179>
- Michod, R.E., Bernstein, H., Nedelcu, A.M., 2008. Adaptive value of sex in microbial pathogens. *Infect. Genet. Evol.* **8**, 267–285. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.01.002>
- Michod, R.E., Levin, B.R., 1988. *The Evolution of Sex*. Eds Sinauer Sunderland.
- Mittwoch, U., 1996. Sex-determining mechanisms in animals. *Trends Ecol. Evol.* **11**, 63–67. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)81044-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)81044-5)
- Moi, D., Nishio, S., Li, X., Valansi, C., Langleib, M., Brukman, N.G., Flyak, K., Dessimoz, C., de Sanctis, D., Tunyasuvunakool, K., Jumper, J., Graña, M., Romero, H., Aguilar, P.S., Jovine, L., Podbilewicz, B., 2022. Discovery of archaeal fusexins homologous to eukaryotic HAP2/GCS1 gamete fusion proteins. *Nat. Commun.* **13**, 3880. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31564-1>
- Moore, J.C., Pannell, J.R., 2011. Sexual selection in plants. *Curr. Biol.* **21**, R176–R182. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.12.035>
- Morgan, T.H., 1913. *Heredity and sex*. New York: Columbia University Press.
- Morrow, E.H., 2004. How the sperm lost its tail: the evolution of aflagellate sperm. *Biol. Rev.* **79**, 795–814. <https://doi.org/10.1017/S1464793104006451>
- Mott, A.W., Krueger-Hadfield, S.A., Blakeslee, A.M.H., Fowler, A.E., 2022. Native tube-building polychaete prefers to anchor non-native alga over other macrophytes. *Oecologia* **198**, 967–980. <https://doi.org/10.1007/s00442-022-05164-1>
- Muller, H. J., 1932. Some genetic aspects of sex. *Am. Nat.* **66**, 118–138. <https://doi.org/10.1086/280418>
- Muller, S., 1993. Population dynamics in *Botrychium matricariifolium* in Bitcherland (Northern Vosges Mountains, France). *Belg. J. Bot.* **126**, 13-19. <https://www.jstor.org/stable/20794287>
- Needham, A.E., 1974. *The Significance of Zoochromes*. Springer, Berlin Heidelberg New York. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-80766-4>
- Narra, H.P., Ochman, H., 2006. Of What Use Is Sex to Bacteria? *Curr. Biol.* **16**, 705–710. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.024>
- Neiman, M., Lively, C.M., Meirmans, S., 2017. Why Sex ? A Pluralist Approach Revisited. *Trends Ecol. Evol.* **32**, 589–600. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.05.004>
- Ning, J., Otto, T.D., Pfander, C., Schwach, F., Brochet, M., Bushell, E., Goulding, D., Sanders, M., Lefebvre, P.A., Pei, J., Grishin, N.V., Vanderlaan, G., Billker, O., Snell, W.J., 2013. Comparative genomics in *Chlamydomonas* and *Plasmodium* identifies an ancient nuclear

- envelope protein family essential for sexual reproduction in protists, fungi, plants, and vertebrates. *Genes Dev.* **27**, 1198–1215. <https://doi.org/10.1101/gad.212746.112>
- Nyberg, C.D., Thomsen, M.S., Wallentinus, I., 2009. Flora and fauna associated with the introduced red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *Eur. J. Phycol.* **44**, 395–403. <https://doi.org/10.1080/09670260802592808>
- Nyman, M.A., Brown, M.T., Neushul, M., Keogh, J.A., 1990. *Macrocystis pyrifera* in New Zealand: testing two mathematical models for whole plant growth. *J. Appl. Phycol.* **2**, 249–257. <https://doi.org/10.1007/BF02179782>
- Oddou-Muratorio, S., Klein, E.K., Demesure-Musch, B., Austerlitz, F., 2006. Real-time patterns of pollen flow in the wild-service tree, *Sorbus torminalis* (Rosaceae). III. Mating patterns and the ecological maternal neighborhood. *Am. J. Bot.* **93**, 1650–1659. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.11.1650>
- Oliveira, E.C., Plastino, E.M., 1984. The life history of some species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Brazil. *Jap. J. Phycol.* **32**, 203–208. <https://doi.org/10.1515/BOT.1999.055>
- Oliveira, E.C., 1968. Recherches sur le développement et les organes reproducteurs de *Gracilaria* en Manche. Thèse. Faculté des Science de Paris. France.
- Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos.* **120**, 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Otto, S.P., 2009. The Evolutionary Enigma of Sex. *Am. Nat.* **174**, S1–S14. <https://doi.org/10.1086/599084>
- Pacini, E., Franchi, G.G., 2020. Pollen biodiversity – why are pollen grains different despite having the same function? A review. *Bot. J. Linn. Soc.* **193**, 141–164. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa014>
- Pannell, J.R., 2017. Plant Sex Determination. *Curr. Biol.* **27**, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.052>
- Paolillo, D.J., 1981. The Swimming Sperms of Land Plants. *BioScience*; **31**, 367–373. <https://doi.org/10.2307/1308401>
- Parfrey, L.W., Lahr, D.J.G., 2013. Multicellularity arose several times in the evolution of eukaryotes (response to DOI 10.1002/bies.201100187). *BioEssays.* **35**, 339–347. <https://doi.org/10.1002/bies.201200143>
- Parker, G.A., 1970. Sperm Competition and Its Evolutionary Consequences in the Insects. *Biol. Rev.* **45**, 525–567. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1970.tb01176.x>
- Parker, G.A., Baker, R.R., Smith, V.G., 1972. The origin and evolution of gamete dimorphism and the male-female phenomenon. *J. Theor. Biol.* **36**, 529–553. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(72\)90007-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(72)90007-0)

- Paterno, G.B., Silveira, C.L., Kollmann, J., Westoby, M., Fonseca, C.R., 2020. The maleness of larger angiosperm flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 10921–10926. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910631117>
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics.* **28**, 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol.* **6**, 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Pearson, G.A., Serrão, E.A., Dring, M., Schmid, R., 2004. Blue- and green-light signals for gamete release in the brown alga, *Silvetia compressa*. *Oecologia.* **138**, 193–201. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1424-z>
- Pélissié, B., Jarne, P., David, P., 2012. Sexual selection without sexual dimorphism: Bateman gradients in a simultaneous hermaphrodite: sexual selection in a hermaphrodite. *Evolution.* **66**, 66–81. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01442.x>
- Peñuelas, J., Munné-Bosch, S., 2010. Potentially immortal ? *New Phytol.* **187**, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03360.x>
- Pereira, J., Schlindwein, C., Antonini, Y., Maia, A.C.D., Dötterl, S., Martins, C., Navarro, D.M. do A.F., Oliveira, R., 2014. *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles. *Biol. J. Linn. Soc.* **111**, 679–691. <https://doi.org/10.1111/bij.12232>
- Pfister, C.A., Wang, M., 2005. Beyond Size: Matrix Projection Models for Populations Where Size Is an Incomplete Descriptor. *Ecology.* **86**, 2673–2683. <https://doi.org/10.1890/04-1952>
- Pickett-Heaps, J., West, J., Wilson, S., McBride, D., 2001. Time-lapse videomicroscopy of cell (spore) movement in red algae. *Eur. J. Phycol.* **36**, 9–22. <https://doi.org/10.1080/09670260110001735148>
- Pickett-Heaps, J.D., West, J., 1998. Time-lapse video observations on sexual plasmogamy in the red alga *Bostrychia*. *Eur. J. Phycol.* **33**, 43–56. <https://doi.org/10.1080/09670269810001736523>
- Pickup, M., Barrett, S.C.H., 2011. Reversal of height dimorphism promotes pollen and seed dispersal in a wind-pollinated dioecious plant. *Biol. Lett.* **8**, 245–248. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0950>
- Pierre, G., 2015. Le changement climatique : des impacts regionaux aux pistes d’adaptation, du Nord-Pas de Calais à l’Eurorégion : L’influence des paramètres hydroclimatiques et météo-marins sur le recul des côtes à falaises.

- Pitnick, S., Hosken, D.J., Birkhead, T.R., 2009. Sperm morphological diversity, in: *Sperm Biology, An Evolutionary Perspective*. pp. 69–149. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372568-4.00003-3>
- Plastino, E.M., Guimarães, M., Matioli, S.R., Oliveira, E.C., 1999. Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Genet. Mol. Biol.* **22**, 105–108. <https://doi.org/10.1590/S1415-47571999000100020>
- Plastino, E.M., Ursi, S., Fujii, M.T., 2004. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycol. Res.* **52**, 45–52. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2003.00324.x>
- Poore, G.C.B., 2001. *Isopoda valvifera*: Diagnoses and Relationships of the Families. *J. Crustac. Biol.* **21**, 205–230. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990118>
- Possobom, C.C.F., Machado, S.R., 2017. Elaiophores: their taxonomic distribution, morphology and functions. *Acta Bot. Bras.* **31**, 503–524. <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0088>
- Preston, R.E., 1991. The Intrafloral Phenology of *Streptanthus Tortuosus* (brassicaceae). *Am. J. Bot.* **78**, 1044–1053. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1991.tb14512.x>
- R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Randerson, J.P., Hurst, L.D., 2001. The uncertain evolution of the sexes. *Trends Ecol. Evol.* **16**, 571–579. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02270-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02270-4)
- Reed, D.C., Laur, D.R., Ebeling, A.W., 1988. Variation in Algal Dispersal and Recruitment: The Importance of Episodic Events. *Ecol. Monogr.* **58**, 321–335. <https://doi.org/10.2307/1942543>
- Rescan, M., Lenormand, T., Roze, D., 2016. Interactions between Genetic and Ecological Effects on the Evolution of Life Cycles. *Am. Nat.* **187**, 19–34. <https://doi.org/10.1086/684167>
- Richerd, S., Couvet, D., Valero, M., 1993a. Evolution of the alternation of haploid and diploid phases in life cycles. II. Maintenance of the haplo-diplontic cycle. *J. Evol. Biol.* **6**, 263–280. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1993.6020263.x>
- Richerd, S., Destombe, C., Cuguen, J., Valero, M., 1993b. Variation of reproductive success in a haplo-diploid Red Alga, *Gracilaria Verrucosa*: effects of parental identities and crossing distance. *Am. J. Bot.* **80**, 1379–1391. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1993.tb15382.x>
- Roberts, T.M., Stewart, M., 2000. Acting like Actin: The Dynamics of the Nematode Major Sperm Protein (Msp) Cytoskeleton Indicate a Push-Pull Mechanism for Amoeboid Cell Motility. *J. Cell Biol.* **149**, 7–12. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.1.7>
- Rønsted, N., Weiblen, G.D., Cook, J.M., Salamin, N., Machado, C.A., Savolainen, V., 2005. 60 million years of co-divergence in the fig–wasp symbiosis. *Proc. R. Soc. B.* **272**, 2593–2599. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3249>

- Rosenshine, I., Tchelet, R., Mevarech, M., 1989. The Mechanism of DNA Transfer in the Mating System of an Archaeobacterium. *Science*. **245**, 1387–1389. <https://doi.org/10.1126/science.2818746>
- Roze, D., 2012. Disentangling the Benefits of Sex. *PLoS Biol.* **10**, e1001321. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001321>
- Rueness, J., 2005. Life history and molecular sequences of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta), a new introduction to European waters. *Phycologia*. **44**, 120–128. [https://doi.org/10.2216/0031-8884\(2005\)44\[120:LHAMSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2216/0031-8884(2005)44[120:LHAMSO]2.0.CO;2)
- Salguero-Gómez, R., Jones, O.R., Archer, C.R., Bein, C., de Buhr, H., Farack, C., Gottschalk, F., Hartmann, A., Henning, A., Hoppe, G., Römer, G., Ruoff, T., Sommer, V., Wille, J., Voigt, J., Zeh, S., Vieregg, D., Buckley, Y.M., Che-Castaldo, J., Hodgson, D., Scheuerlein, A., Caswell, H., Vaupel, J.W., 2016. COMADRE: a global data base of animal demography. *J. Anim. Ecol.* **85**, 371–384. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12482>
- Salguero-Gómez, R., Jones, O.R., Archer, C.R., Buckley, Y.M., Che-Castaldo, J., Caswell, H., Hodgson, D., Scheuerlein, A., Conde, D.A., Brinks, E., de Buhr, H., Farack, C., Gottschalk, F., Hartmann, A., Henning, A., Hoppe, G., Römer, G., Runge, J., Ruoff, T., Wille, J., Zeh, S., Davison, R., Vieregg, D., Baudisch, A., Altwegg, R., Colchero, F., Dong, M., de Kroon, H., Lebreton, J.-D., Metcalf, C.J.E., Neel, M.M., Parker, I.M., Takada, T., Valverde, T., Vélez-Espino, L.A., Wardle, G.M., Franco, M., Vaupel, J.W., 2015. The compadre Plant Matrix Database: an open online repository for plant demography. *J. Ecol.* **103**, 202–218. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12334>
- Santelices, B., 2002. Recent Advances in Fertilization Ecology of Macroalgae. *J. Phycol.* **38**, 4–10. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.00193.x>
- Santelices, B., 1990. Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **28**, 177–276.
- Santos, R., 1993. Plucking or cutting *Gelidium sesquipedale* ? A demographic simulation of harvest impact using a population projection matrix model. *Hydrobiologia*. **260**, 269–276. <https://doi.org/10.1007/BF00049028>
- Santos, R., Nyman, M., 1998. Population modelling of *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta, Gelidiales). *J. Appl. Phycol.* **10**, 261–272. <https://doi.org/10.1023/A:1008083926349>
- Schaffelke, B., Evers, D., Walhorn, A., 1995. Selective grazing of the isopod *Idotea baltica* between *Fucus evanescens* and *F. vesiculosus* from Kiel Fjord (western Baltic). *Mar. Biol.* **124**, 215–218. <https://doi.org/10.1007/BF00347125>
- Schnetzler, B.N., Teixeira, S.P., Marinho, and C.R., 2017. Trichomes that secrete substances of a mixed nature in the vegetative and reproductive organs of some species of Moraceae. *Acta Bot. Bras.* **31**, 392–402. <https://doi.org/10.1590/0102-33062016abb0293>

- Schoen, D.J., Stewart, S.C., 1986. Variation in Male Reproductive Investment and Male Reproductive Success in White Spruce. *Evolution*. **40**, 1109–1120. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1986.tb05737.x>
- Scott, M.F., Rescan, M., 2017. Evolution of haploid–diploid life cycles when haploid and diploid fitnesses are not equal. *Evolution*. **71**, 215–226. <https://doi.org/10.1111/evo.13125>
- Searles, R.B., 1980. The Strategy of the Red Algal Life History. *Am. Nat.* **115**, 113–120. <https://doi.org/10.1086/283548>
- Shim, E., Shim, J., Klochkova, T.A., Han, J.W., Kim, G.H., 2012. Purification of a sex-specific lectin involved in gamete binding of *Aglaothamnion callophyllidicola* (Rhodophyta): lectin involved in gamete binding. *J. Phycol.* **48**, 916–924. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01155.x>
- Shortlidge, E.E., Carey, S.B., Payton, A.C., McDaniel, S.F., Rosenstiel, T.N., Eppley, S.M., 2021. Microarthropod contributions to fitness variation in the common moss *Ceratodon purpureus*. *Proc. R. Soc. B.* **288**, 20210119. <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.0119>
- Silvertown, J., Franco, M., Pisanty, I., Mendoza, A., 1993. Comparative Plant Demography--Relative Importance of Life-Cycle Components to the Finite Rate of Increase in Woody and Herbaceous Perennials. *J. Ecol.* **81**, 465–476. <https://doi.org/10.2307/2261525>
- Snook, R.R., 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends Ecol. Evol.* **20**, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.10.011>
- Snow, A.A., Lewis, P.O., 1993. Reproductive Traits and Male Fertility in Plants: Empirical Approaches. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **24**, 331–351. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.001555>
- Speijer, D., 2016. What can we infer about the origin of sex in early eukaryotes? *Philos. Trans. R. Soc. B.* **371**, 20150530. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0530>
- Speijer, D., Lukeš, J., Eliáš, M., 2015. Sex is a ubiquitous, ancient, and inherent attribute of eukaryotic life. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 8827–8834. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501725112>
- Stebbins, G.L., Hill, G.J.C., 1980. Did Multicellular Plants Invade the Land? *Am. Nat.* **115**, 342–353. <https://doi.org/10.1086/283565>
- Stoeckel, S., Arnaud-Haond, S., Krueger-Hadfield, S.A., 2021. The Combined Effect of Haplodiplonty and Partial Clonality on Genotypic and Genetic Diversity in a Finite Mutating Population. *J. Hered.* **112**, 78–91. <https://doi.org/10.1093/jhered/esaa062>
- Suneson, S., 1947. Colour change and chromatophore activators in *Idothea*. *K. Fysiogr. Sällsk. Lund Handl.* **58**, 2–34.
- Sweeney, B. M., 1987. Rhythmic Phenomena in Plants. Academic Press, Inc., New York.

- Thomas, C.M., Nielsen, K.M., 2005. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- Thornber, C.S., 2006. Functional properties of the isomorphic biphasic algal life cycle. *Integr. Comp. Biol.* **46**, 605–614. <https://doi.org/10.1093/icb/icl018>
- Thornber, C.S., Gaines, S.D., 2004. Population Demographics in Species with Biphasic Life Cycles. *Ecology.* **85**, 1661–1674. <https://doi.org/10.1890/02-4101>
- Togashi, T., Cox, P.A., 2011. The Evolution of Anisogamy: A Fundamental Phenomenon Underlying Sexual Selection. Cambridge University Press.
- Toïgo, C., Gaillard, J.-M., Festa-Bianchet, M., Largo, E., Michallet, J., Maillard, D., 2007. Sex- and age-specific survival of the highly dimorphic *Alpine ibex*: evidence for a conservative life-history tactic. *J. Anim. Ecol.* **76**, 679–686. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2007.01254.x>
- Tonnabel, J., David, P., Pannell, J.R., 2019. Do metrics of sexual selection conform to Bateman's principles in a wind-pollinated plant ? *Proc. R. Soc. B.* **286**, 20190532. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0532>
- Toon, A., Terry, L.I., Tang, W., Walter, G.H., Cook, L.G., 2020. Insect pollination of cycads: Insect pollination of cycads. *Austral Ecol.* **45**(8), 1033–1058. <https://doi.org/10.1111/aec.12925>
- Totland, O., Sottocornola, M., 2001. Pollen limitation of reproductive success in two sympatric alpine willows (Salicaceae) with contrasting pollination strategies. *Am. J. Bot.* **88**, 1011–1015. <https://doi.org/10.2307/2657082>
- Trivers, R. L., 1972. Parental Investment and Sexual Selection. In B. Campbell (Ed.), *Sexual Selection and the Descent of Man*, 1871-1971. pp. 136-179
- Trøjelsgaard, K., Báez, M., Espadaler, X., Nogales, M., Oromí, P., Roche, F.L., Olesen, J.M., 2013. Island biogeography of mutualistic interaction networks. *J. Biogeogr.* **40**, 2020–2031. <https://doi.org/10.1111/jbi.12165>
- Umen, J., Heitman, J., 2013. Evolution of Sex: Mating Rituals of a Pre-Metazoan. *Curr. Biol.* **23**, 1006–1008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.009>
- Uyenoyama, Marcy K., 1988. On the Evolution of Genetic Incompatibility Systems. II. Initial Increase of Strong Gametophytic Self-Incompatibility Under Partial Selfing and Half-Sib Mating. *Am. Nat.* **131**, 700–722. <https://doi.org/10.1086/284814>
- Uyenoyama, M. K., 1988. On the evolution of genetic incompatibility systems. III. Introduction of weak gametophytic self-incompatibility under partial inbreeding. *Theor. Popul. Biol.* **34**, 47–91. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(88\)90035-4](https://doi.org/10.1016/0040-5809(88)90035-4)
- Valero, M., Guillemín, M.-L., Destombe, C., Jacquemin, B., Gachon, C.M.M., Badis, Y., Buschmann, A.H., Camus, C., Faugeron, S., 2017. Perspectives on domestication research for sustainable seaweed aquaculture. *Perspect. Phycol.* **4**, 33–46. <https://doi.org/10.1127/pip/2017/0066>

- Valero, M., Richerd, S., Perrot, V., Destombe, C., 1992. Evolution of alternation of haploid and diploid phases in life cycles. *Trends Ecol. Evol.* **7**, 25–29. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(92\)90195-H](https://doi.org/10.1016/0169-5347(92)90195-H)
- Williams, G.C., Mitton, J.B., 1973. Why reproduce sexually ? *J. Theor. Biol.* **39**, 545–554. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90067-2)
- Van der Kooi, C.J., Ollerton, J., 2020. The origins of flowering plants and pollinators. *Science*. **368**, 1306–1308. <https://doi.org/10.1126/science.aay3662>
- Van der Meer, J.P., Todd, P.A., 1977. Genetics of *Gracilaria sp.* (Rhodophyceae, Gigartinales). Iv. Mitotic recombination and its relationship to mixed phases in the life history. *Can. J. Bot.* **55**, 2810–2817.
- Van der Meer, J.P., Patwary, M.U., Bird, C.J., 1984. Genetics of *Gracilaria Tikvahiae* (rhodophyceae). X. Studies on a Bisexual Clone. *J. Phycol.* **20**, 42–46. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1984.00042.x>
- Van der Meer, J.P., 1986. Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (rhodophyceae). Xi. Further Characterization of a Bisexual Mutant. *J. Phycol.* **22**, 151–158. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1986.tb04158.x>
- Van der Meer, J.P., Zhang, X., 1988. Similar unstable mutations in three species of *Gracilaria* (Rhodophyta). *J. Phycol.* **24**, 198–202. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1988.tb04234.x>
- Van der Meer, J.P., 1990. Genetics. In *Biology of the red algae* (K. Cole & R. Sheath, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p.103-122.
- Van der Velde, M., During, H.J., Van de Zande, L., Bijlsma, R., 2001. The reproductive biology of *Polytrichum formosum*: clonal structure and paternity revealed by microsatellites. *Mol. Ecol.* **10**, 2423–2434. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01385.x>
- Van Tussenbroek, B.I., Monroy-Velazquez, L., Solis-Weiss, V., 2012. Meso-fauna foraging on seagrass pollen may serve in marine zoophilous pollination. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **469**, 1–6. <https://doi.org/10.3354/meps10072>
- Van Tussenbroek, B.I., Villamil, N., Márquez-Guzmán, J., Wong, R., Monroy-Velázquez, L.V., Solis-Weiss, V., 2016. Experimental evidence of pollination in marine flowers by invertebrate fauna. *Nat. Commun.* **7**, 12980. <https://doi.org/10.1038/ncomms12980>
- Veyret, M., 2003. Ecologie de la reproduction chez *Gracilaria gracilis* (Gracilariaceae, Rhodophyta) : analyse du succès reproducteur mâle (Rapport de Master). Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. France.
- Vienne, D.M. de, Giraud, T., Gouyon, P.-H., 2013. Lineage Selection and the Maintenance of Sex. *Plos One*. **8**, e66906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066906>

- Vranken, S., Robuchon, M., Dekeyzer, S., Bárbara, I., Bartsch, I., Blanfuné, A., Boudouresque, C. F., Decock, W., Destombe, C., De Reviere, B., Díaz-Tapia, P., Herbst, A., Julliard, R., Karez, R., Kersen, P., Krueger-Hadfield, S. A., Kuhlenkamp, R., Peters, A. F., Peña, V., Piñeiro-Corbeira, C., Rindi, F., Rousseau, F., Rueness, J., Schubert, H., Sjøtun, K., Sansón, M., Smale, D., Thibaut, T., Valero, M., Vandepitte, L., Vanhoorne, B., Vergés, A., Verlaque, M., Vieira, C., Le Gall, L., Leliaert, F., De Clerck, O., 2022. AlgaeTraits: a trait database for (European) seaweeds. *Earth Syst. Sci. Data*. 2023: in press. <https://doi.org/10.14284/574>
- Wang, D.Y., Kumar, S., Hedges, S.B., 1999. Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc. R. Soc. B*. **266**, 163–171. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0617>
- Wang, R., Dobritsa, A.A., 2018. Exine and Aperture Patterns on the Pollen Surface: Their Formation and Roles in Plant Reproduction, in: Roberts, J.A. (Ed.), *Annual Plant Reviews*. **1**(2), 589–628. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0625>
- Wang, S., Wang, G., Weinberger, F., Bian, D., Nakaoka, M., Lenz, M., 2017. Anti-epiphyte defences in the red seaweed *Gracilaria vermiculophylla*: non-native algae are better defended than their native conspecifics. *J. Ecol.* **105**, 445–457. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12694>
- Ward, S., Carrel, J.S., 1979. Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **73**, 304–321. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(79\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(79)90069-1)
- Wattier, R., Dallas, J.F., Destombe, C., Saumitou-Laprade, P., Valero, M., 1997. Single Locus Microsatellites in Gracilariales (rhodophyta): High Level of Genetic Variability Within *Gracilaria Gracilis* and Conservation in Related Species. *J. Phycol.* **33**, 868–880. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00868.x>
- Weber, C., Capel, B., 2021. Sex determination without sex chromosomes. *Philos. Trans. R. Soc. B*. **376**, 20200109. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0109>
- Weismann, A., 1889. The significance of sexual reproduction in the theory of natural selection. In: Poulton EB, Schönland S, Shipley AE, eds. *Essays upon heredity and kindred biological problems*. Oxford: Clarendon. pp 251–332.
- Werner, M., Simmons, L.W., 2008. Insect Sperm Motility. *Biol. Rev.* **83**, 191–208. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00039.x>
- Willson, M.F., 1981. On the Evolution of Complex Life Cycles in Plants: A Review and an Ecological Perspective. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **68**, 275–300. <https://doi.org/10.2307/2398799>
- Wong, J.L., Johnson, M.A., 2010. Is HAP2-GCS1 an ancestral gamete fusogen? *Trends Cell. Biol.* **20**, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.12.007>
- Wright, J.W., Meagher, T.R., 2004. Selection on floral characters in natural Spanish populations of *Silene latifolia*. *J. Evol. Biol.* **17**, 382–395. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00671.x>

- Xu, D., Zhu, J., He, Y., Cheng, X., Zhang, W., Zhang, X., 2008. Structure of reproductive apparatus of *Gracilaria/Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Sci. China C Life Sci.* **51**, 1137–1143. <https://doi.org/10.1007/s11427-008-0147-0>
- Yamanouchi, S., 1906. The Life History of *Polysiphonia violacea*. *Bot. Gaz.* **41**, 425–433. <https://doi.org/10.1086/328872>
- Yang, E.C., Boo, S.M., Bhattacharya, D., Saunders, G.W., Knoll, A.H., Fredericq, S., Graf, L., Yoon, H.S., 2016. Divergence time estimates and the evolution of major lineages in the florideophyte red algae. *Sci. Rep.* **6**, 21361. <https://doi.org/10.1038/srep21361>
- Younginger, B.S., Sirová, D., Cruzan, M.B., Ballhorn, D.J., 2017. Is biomass a reliable estimate of plant fitness ? *Appl. Plant Sci.* **5**, 1600094. <https://doi.org/10.3732/apps.1600094>
- Yund, P.O., McCartney, M.A., 1994. Male Reproductive Success in Sessile Invertebrates: Competition for Fertilizations. *Ecology.* **75**, 2151–2167. <https://doi.org/10.2307/1940874>
- Zoccola, D., Tambutté, S., 2015. Sex under the moon. *eLife.* **4**, e12936. <https://doi.org/10.7554/eLife.12936>

Annexes

Annexe 1. Matrice de fécondation du mois de juin 2020

	F18	F26	F28	F42	F53	F55	F66	F68	F80	F81	F98	F103	F104	F123	F130	F132	F141	F217	F220	F224	Total	
Mj5																				1	1	
Mj10																						
Mj11					1					1	1											3
Mj12																						
Mj19			4		1					2	1			1								9
Mj20			1						1		1											3
Mj21	2									1												3
Mj25					1				1	1					1		1					5
Mj27																						
Mj32												1										1
Mj33	1								3		1											5
Mj35																		1				1
Mj39					1									2		2						5
Mj40																			2			2
Mj41										2		2	1									5
Mj42									1	1												2
Mj43																						
Mj45																						
Mj51																						
Mj54	2									1												3
Mj57			2		2						1			3					2			10
Mj70															1							1
Mj77																						
Mj83																						
Mj91					1																	1
Mj93					1												1					2
Mj94																						
Mj95					2			1			7					1	1		1			13
Mj107																1						1
Mj108						1			1			1	1	1								5
Mj109																						
Mj111										1			2	1								4
Mj119														1				1	1			3
Mj120															1							1
Mj121	1								1										1			3
Mj124																						
Mj125					1						3							3				7
Mj129																	2					2
Mj131																	1					1
Mj137												1										1
Mj142														1				1				1
Mj145												1						1				2
Mj147								1		2				1	1				1			6
Mj149																						
Mj150																			1			1
Mj151																						
Mj152					1																	1
Mj157																						
Mj162																						
Mj177																						
Mj180																						
Mj182																			2			2
Mj184																						
Mj185																		2				2
Mj188														1								1
Mj189								1			1					3		1	1			7
Mj193																						
Mj199											1								1			2
Mj201					1																	1
Mj202																						
Mj205																			1			1
Mj207																						
Mj213														1					2			3
Mj214																						
Mj218																		1				1
Mj222																		1	2			3
Mj225																						
M185																			1			1
M205						1																1
M28										1			1									2
M29b	1								1		2	1	1									6
M69b								1														1
M73a					1																	1
M73b						1																1
ext	1	1	1		4	1			6	5	1	3	8	2			3	8	4		48	
na	6	29	22	14	14	12	10	8	17	15	6	10	5	12	7	15	17	7	4	9	239	
Total	14	30	30	14	32	16	10	11	27	32	32	18	14	32	13	26	33	32	11	10	437	

Annexe 3. Expérience sur la durée de vie des gamètes

La durée de vie des gamètes mâles chez *Gracilaria gracilis*, est estimée à environ 6h (Destombe et al., 1990). Cependant, cette mesure n'a jamais été comparée au succès reproducteur des mêmes mâles en population naturelle.

Une expérience a donc été mise en place pour mesurer la durée de vie des gamètes de 10 mâles, provenant de la population GNH, dont le succès reproducteur sur le terrain était connu. L'objectif était de déterminer si les mâles avec un plus fort succès reproducteur produisaient des gamètes ayant une meilleure durée de vie. Dans cette expérience deux caractéristiques des gamètes mâles ont été mesurées : (1) la durée pour laquelle les gamètes sont encore capables de réaliser une fécondation (i.e. la durée de vie mesurée par Destombe et al., 1990), désignée ci-après comme « durée d'efficacité », et (2) la durée pour laquelle les gamètes peuvent encore être observées dans l'eau de mer, désignée ci-après comme « durée de viabilité ».

Pour cela, 10 mâles ont été incubés dans des contenants indépendants de 480mL d'eau de mer durant 20 min. Pour chaque mâle, l'eau d'incubation a été récupérée et fragmentée en volumes égaux pour les différents temps de l'expérience (t0, t2h, t4h, t6h, t8h, t24h), soit 6 fois 80mL. Au t0, le premier volume de 80mL a été utilisé. 50mL pour chaque mâle ont été filtrés afin de concentrer les gamètes et pouvoir les dénombrer après l'expérience. Les 30mL restant pour chaque mâle ont été mélangés afin d'obtenir un volume de 300mL, contenant les gamètes des 10 mâles mélangés. Puis 10 fragments de femelles vierges cultivées en laboratoire (voir Lavaut et al., 2022, Chapitre 4) ont été incubés dans 250mL de ce mélange de gamètes mâles. Après 1h, les fragments femelles ont été retirés et conservés en culture jusqu'au développement des cystocarpes. Les 50 mL restant du mélange de gamètes mâles ont été filtrés, et un comptage en microscopie à fluorescence a été réalisé immédiatement, grâce au marquage des gamètes à la ConA-AF488 (voir protocole de coloration dans Supplementary Material, Lavaut et al., 2022, Chapitre 4). Cette opération a été répétée pour chaque temps de l'expérience, soit 2h, 4h, 6h, 8h et 24h après le début de l'expérience.

La durée d'efficacité des gamètes mâles n'a pas pu être mesurée puisqu'aucun cystocarpe ne s'est formé après l'expérience. Il n'était pas possible de mesurer la durée de viabilité des gamètes pour les 10 mâles, à chaque temps de l'expérience, avec la méthode classique de comptage en microscopie. Pour cela, une méthode de quantification en qPCR a été initiée, afin d'estimer la quantité de gamètes, pour chaque mâle et à chaque temps de l'expérience, à partir des filtres qui sont actuellement conservés à -20°C.

Bien qu'aucune fécondation n'ait été réalisée, le comptage réalisé en microscopie à chaque temps (sur le mélange des gamètes des 10 mâles) a montré que les mâles ont pourtant produit des gamètes durant cette expérience (Figure 1). Cette mesure montre que la quantité de gamètes chute entre 4h et 6h, et confirme les résultats précédents (Destombe et al., 1990). Cependant, cela montre également que des gamètes sont encore présents (intègres) après 6h, et même après 24h. Il serait donc intéressant de réaliser à nouveau cette expérience pour pouvoir comparer les durées de viabilité et d'efficacité des gamètes entre les différents mâles.

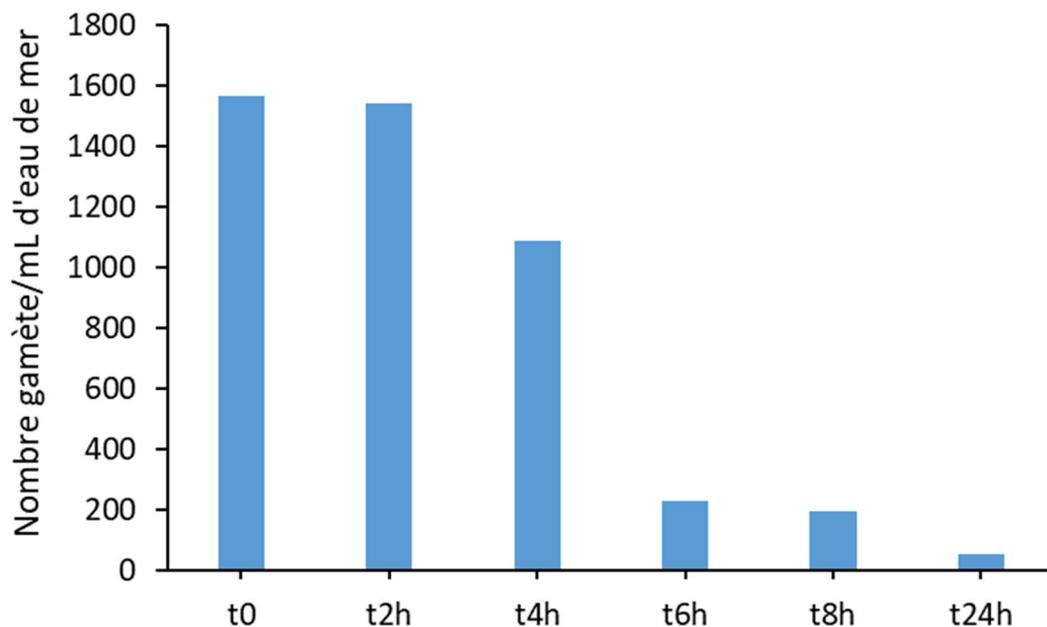


Figure 1. Durée de viabilité des gamètes. Nombre de gamètes par millilitres d'eau de mer en fonction du temps après leur émission, sur un mélange de 10 mâles.