

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Étude moléculaire des populations de *Rhodiola rosea* L.
du Nunavik (Québec, Canada)**

par

Mariannick Archambault

Département de sciences biologiques
Institut de recherche en biologie végétale

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Sciences biologiques

Juillet 2009

© Mariannick Archambault, 2009



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude moléculaire des populations de *Rhodiola rosea* L.
du Nunavik (Québec, Canada)**

Présenté par :
Mariannick Archambault

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Bernard Angers, président-rapporteur
Anne Bruneau, directrice de recherche
Alain Cuerrier, co-directeur de recherche
Denis Barabé, membre du jury

Résumé

Rhodiola rosea L. est une plante médicinale très prometteuse dont le rhizome est couramment utilisé en Eurasie pour ses propriétés adaptogène, anti-dépressive, cardioprotectrice et immunostimulante. Cette espèce amphi-atlantique se retrouve également sur la côte est américaine de la baie d'Ungava à la Caroline du Nord. La culture de *R. rosea* a débuté dans plusieurs pays scandinaves et de l'ex-URSS pour répondre à la demande et protéger les populations naturelles de la récolte intensive. Les populations russes ont fait l'objet de plusieurs études, cependant les populations nord-américaines ont fait l'objet de très peu d'études et sont très peu connues. Notre recherche se concentre davantage sur les populations situées le long de la baie d'Ungava (Nunavik, Qc). Les deux objectifs principaux de notre étude sont de confirmer que les populations du Nunavik font parti du même taxon que *R. rosea* d'Eurasie et d'évaluer les relations entre les populations du Nunavik et différentes populations de *R. rosea* à différentes échelles géographiques. Pour y parvenir, nous avons amplifié la région chloroplastique *trnL-F* ainsi que la région ribosomale nucléaire ITS à partir d'échantillons récoltés et de spécimens d'herbier. Nous avons également utilisé la technique d'empreinte génétique AFLP (amplified fragment-length polymorphism). Nos analyses de séquences suggèrent que les populations nord-américaines (Nunavik, Minganie, Maritimes) et eurasiennes (Scandinavie, Europe Central et Russie) font parties du même taxon même si elles ont quelques différences. La présence de deux longues duplications dans les séquences *trnL-F* nous révèle une relation plus étroite entre les populations de l'Amérique du Nord et de la Scandinavie qu'avec les populations alpines de l'Eurasie n'ayant pas ces duplications. L'utilisation de nos séquences comme code à barre génétique pourrait faciliter et valider l'identification de l'espèce récoltée ou cultivée. Ceci permettrait de réduire les possibles adultérations de phytomédicaments associés à l'introduction de matériel d'espèces proches de façon consciente ou inconsciente (mauvaise identification). Au cours de l'analyse de nos échantillons de *R. rosea* provenant de culture, nous avons repéré une mauvaise

identification. Il y avait eu confusion avec une espèce proche, *R. integrifolia*, alors que cette dernière n'a pas encore été investiguée pour ses propriétés médicinales contrairement à *R. rosea*. Les AFLP nous ont permis de trouver une corrélation positive et significative entre la distance génétique et géographique et d'établir certaines relations entre les populations de *R. rosea* à différentes échelles géographiques. Cela nous a permis d'élaborer trois hypothèses de dispersion en Amérique du Nord par le biais des événements de dispersion à longue distance. Puisque les populations du Nunavik s'avèrent être *R. rosea*, des essais de culture ont été démarrés près de la communauté de Kangirsualujjuaq, et dans d'autres régions du Québec, grâce aux semences ramassées lors du travail de terrain. Un suivi des populations est en cours et sera effectué à chaque année jusqu'à la maturité des plants pour la récolte des rhizomes. Ce projet, financé par l'organisation inuite Nunavik Biosciences Inc. (une filiale de la Société Makivik), pourra bénéficier aux populations locales pour les aider à démarrer un projet de culture de cette espèce médicinale pour la fabrication de phytomédicaments, et ce sans mettre en péril les populations naturelles.

Mots-clés : *Rhodiola rosea*, plante médicinale, amphi-atlantique, taxonomie, AFLP, *trnL-F*, ITS

Table des matières

Résumé.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des abréviations et symboles.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 Vue d'ensemble du projet.....	1
1.2 Qu'est-ce que <i>Rhodiola rosea</i> ?.....	2
1.3 Aperçu de la plante.....	3
1.4 Une plante médicinale prometteuse.....	8
1.5 Un intérêt commercial grandissant.....	11
1.6 Problématique des phytomédicaments.....	12
1.7 Problématique taxonomique.....	13
1.8 Phylogéographie.....	15
1.9 Objectifs du projet.....	17
1.9.1 Identité taxonomique.....	17
1.9.2 Phylogéographie.....	18
Chapitre 2 Molecular analyses of the Nunavik (Quebec) populations of <i>Rhodiola rosea</i> L.	20
2.1 Abstract.....	20
2.2 Introduction.....	21
2.3 Materials and methods.....	25
2.3.1 Sampling.....	25
2.3.2 DNA extraction.....	30
2.3.3 Sequences.....	30

2.3.4 Parsimony analyses	31
2.3.5 AFLP	32
2.3.6 AFLP analyses	36
2.4 Results	38
2.4.1 Sequence results	38
2.4.2 AFLP results.....	44
2.4.3 Experimental error test.....	48
2.5 Discussion	49
2.5.1 Taxonomic distinction and medicinal perspectives	49
2.5.2 Barcoding.....	51
2.5.3 Phylogeography, environment and population structure	53
2.5.4 Conclusions	56
Chapitre 3 Conclusion.....	57
3.1 Conclusions générales.....	57
3.2 Phylogéographie.....	58
3.3 Perspectives.....	61
Bibliographie.....	64
Annexe 1	I
Annexe 2	III

Liste des abréviations et symboles

- ABC : Association Botanique du Canada
ADN : Acide désoxyribonucléique
AFLP : Amplified fragment length polymorphism
AMOVA : Analyse of molecular variance
ANHAN : Alberta Natural Health Agricultural Network
ARRGO : Alberta *Rhodiola rosea* growers organization
bp : Base pair(s) (Paire de bases)
BP : Before present
c.a.d. : C'est-à-dire
CI : Consistency index
CO1 : Cytochrome *c* oxydase 1
CRSNG : Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada
CYPs : Cytochrome P
DNA : Acide désoxyribonucléique
Dr. : Docteur
et al. : *et alia*
Fig. : Figure
GPS : Global Positioning System (Système de positionnement mondial)
inc. : Incorporé
i.e. : id est
ITS : Internal transcribed spacer
IRBV : Institut de recherche en biologie végétale
L. : Linné
MT : Montréal
n : Jeu de chromosomes
NCBI : National Center for Biotechnology Information
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

p : probabilité (aléatoire \geq observé)
p. : Page
pers. comm. : Communication personnelle
Qc : Québec
R. : *Rhodiola*
Raf. : Raffinesque
rDNA : Acide désoxyribonucléique ribosomal
RI : Retention index
SHR-5 : Extrait standardisé de *Rhodiola rosea* de Swedish Herbal Institute
SNP : Single nucleotide polymorphism
ssp. : Sous-espèce
URSS : Union des républiques socialistes soviétiques
USA : United states of America
USDA : United States Department of Agriculture
UVIC : University of Victoria
v. : Version
var. : Variété

Termes relatifs à la méthodologie

ABI : Applied Biosystems
BSA : Albumine sérique bovine (bovine serum albumine)
CTAB : Cetyl trimethylammonium bromide
dNTP : Désoxyribonucléotides tri-phosphate
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EDTA : Ethylene-diamine-tetraacetic acid
ETOH : Éthanol
H₂O : Eau
ILD : Incongruence Length Difference test
MgCl₂ : Chlorure de magnésium

PAUP* : Phylogenetic Analysis Using Parsimony (software)

PCR : Polymerase chain reaction

PEG : Polyethylene glycol

pH : Potentiel hydrogène

RNAse A : Ribonuclease A

Taq : *Thermophilus aquaticus*

TBR : Tree bisection reconnection

TE_{0.1} : Tris-EDTA buffer

Tris-HCl : Tris-hydrochloride

Unités

% : Pourcentage

°C : Degré Celcius

cm : Centimètre

g : Gramme

L : Litre

mg : Milligramme

min : Minute

mm : Millimètre

mM : Millimolaire

mmol : Millimole

ng : Nanogramme

nm : Nanomètre

pmol : Picomole

rpm : Rotations par minute

s : Seconde

U : Unité

µL : Microlitre

µmol : Micromole

Liste des tableaux

- Tableau 1 *Rhodiola* samples sequenced for the ITS and *trnL-F* chloroplast regions. For each sample, locality, collector and voucher number are given. p.26-27
- Tableau 2 Adapters and primers used in AFLP analyses with the restriction enzymes *TaqI*. p.32
- Tableau 3 *Rhodiola rosea* samples used for AFLP analysis. For each population, number of samples, locality, collector, and voucher information (deposited at Marie-Victorin herbarium, MT) are given. p.33-34
- Tableau 4 Summary of the partition of variance (AMOVA) among and within different groups of *R. rosea*. p.47

Liste des figures

Figure 1	Floraison de <i>Rhodiola rosea</i> à Killiniq (Nunavik, Qc). Photo : M. Archambault (Août 2006)	p.1
Figure 2	Croquis d'un plant de <i>Rhodiola rosea</i> provenant du Mont Horrid, Rochester (Windsor Co., Vermont) A- Vue d'ensemble; B- Fleur vue de côté; C- Fleur vue aérienne; D- Pétales et deux étamines; E- Carpelles; F- Carpelle et nectaire; G- Nectaire; H- Bourgeon floral; I- Graine; J- Follicule.	p.3
Figure 3	Diversité des formes et marges de feuilles de <i>Rhodiola rosea</i> observées par Clausen (1975) sur des plants en nature (ligne 1 et 3) et après un an en culture (ligne 2 et 4).	p.4
Figure 4	Vue aérienne de la fin de floraison du plant mâle (à droite) et de la fructification femelle (à gauche) du <i>Rhodiola rosea</i> à Kanjirsualujjuaq (Nunavik, Qc).	p.5
Figure 5	Carte de répartition de <i>Rhodiola rosea</i> et de <i>R. integrifolia</i> en Amérique du Nord.	p.6
Figure 6a	Sampling of <i>Rhodiola rosea</i> in North America.	p.28
Figure 6b	Detailed sampling <i>Rhodiola rosea</i> along the shore of Ungava Bay, Nunavik, Quebec.	p.29
Figure 7	Maximum parsimony tree of the <i>trnL-F</i> chloroplast DNA region for <i>Rhodiola rosea</i> and outgroups (<i>R. integrifolia</i> , <i>R. seminowii</i> , <i>R. kirilowii</i>).	p.40
Figure 8	Nucleotide alignment of <i>trnL-F</i> chloroplast DNA showing the first 23 bp indel.	p.41
Figure 9	Nucleotide alignment of <i>trnL-F</i> chloroplast DNA showing the second 19 bp indel.	p.41

Liste des figures (suite)

- Figure 10 Strict consensus resulting from the maximum parsimony analysis of ITS rDNA region for *Rhodiola rosea* and outgroups (*R. integrifolia*, *R. seminowii*, *R. kirilowii*). p.42
- Figure 11 Strict consensus of the combined matrix (ITS and *trnL-F*) of *Rhodiola rosea* and outgroups (*R. integrifolia*, *R. seminowii*, *R. kirilowii*) analyzed by maximum parsimony. p.43
- Figure 12 Comparison of AFLP pattern for different *Rhodiola* species for the blue (left) and green (right) combinations. p.44
- Figure 13 A simplified dendrogram of *Rhodiola rosea* clustering using Ward's algorithm with AFLP data. p.46

*À une plante aux milles propriétés qui m'a
offert une expérience inestimable !*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma douce moitié qui a su m'accompagner, me supporter, m'aider et me faire rire dans cette longue démarche. Je remercie ta volonté, ta détermination et ton sourire contagieux qui à chaque étape m'a permis de me surprendre et de me dépasser.

Un gros merci à mon directeur Alain Cuerrier pour toutes ses discussions, débouchées et pour sa complicité. Cela fut un plaisir de travailler avec toi, King Alain. Un autre gros merci à ma directrice Anne Bruneau, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, cela a été un détour crucial de ma vie. Merci pour ton aide et ta patience pour corriger mes textes incohérents, pour tes encouragements et les tâches de labo qui permettent d'être plus débrouillard et autonome.

J'aimerais remercier les différents organismes subventionnaires qui m'ont permis de mener à terme ce projet : Nunavik Biosciences Inc. (terrain et mon financement), INAC (terrain), Fondation muséums nature de Montréal (projet), CRSNG de Anne Bruneau (laboratoire), la bourse de voyage John Macoun de l'ABC (congrès) et les bourses Jacques Rousseau (congrès et terrain).

Merci à Denis Barabé pour ses corrections sur la version finale. Un immense remerciement à Bernard Angers pour sa présence sur mes comités, ses interventions constructives lors du comité conseil et de la rédaction finale ainsi que pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci aux membres de son labo qui savent nous faire rire et qui m'ont super bien épaulé lors de mes manipulations. Un gros merci pour tout ça, cela m'a vraiment permis de décoller côté AFLP.

Et bien sûr, un gros merci à Vicky Fillion, la princesse du *Rhodiola rosea*, ma collègue de voyage et de projet. Merci pour le travail de terrain au Nunavik qui a vraiment

été inoubliable, ta complicité et ton travail. Merci à tous les gens que j'ai rencontré sur le terrain (Bob Semple, Glyn, Marc Allard, Guy Rochefort, Bill Doidge, Molly, Samantha, nos guides à Killiniq, Suzie Jararuse) qui ont rendu cette expérience inoubliable.

Un énorme MERCI à tous les gens du laboratoire 204 une gang de travailleurs fous et acharnés. Luc Brouillet pour son rire, ses critiques, ses prises de position, son paternalisme et pour sa qualité enseignante ! Merci d'avoir été sur mon comité conseil. Tu es le prof d'université que j'ai eu le plus souvent (4 fois) et tu es génial. Stuart Hay, pour me supporter dans l'herbier, malgré ma jasette infatigable, et pour son rire de grand-papa que j'adore. Simon Joly, le dieu du labo qui est toujours là même à l'autre bout de la planète, merci pour m'avoir initiée aux AFLPs. Tu es une bible sur deux pattes avec un énorme coeur prêt à partager. Marjorie Mercure, pour m'avoir aidée et supportée surtout durant ma première année, pour ta bonne cuisine diversifiée qui m'a ouvert de nouveaux horizons, pour ton scepticisme légendaire qui permet de revenir sur terre (mais pas pour certains trucs ☺). Merci pour tes conseils de labo, et les soupers et les sorties au Jean-Talon. Surtout, merci pour m'avoir supervisée dans mes analyses et m'avoir permise de ne plus avoir peur du logiciel R et du progiciel R. Carole Sinou pour ton écoute, ton aide, ton appui, ta patience de me supporter au travail et à la maison. Merci pour les soirées labo, les marches, le développement photo et ton épaulement pour mon travail de représentante étudiante. Vincent Manzanilla pour ton air bohème, tes conseils et tes questions philosophiques. Pour ta simplicité et pour m'avoir convaincue d'emménager à Montréal. Stacey Lee Thompson pour ton sourire, ton fou rire, tes nombreux conseils, ton anglais. Un gros gros merci pour tes recommandations. Merci encore de m'avoir aidée dans la démarche d'échantillonnage et d'analyse des AFLP. Jamil Vaezi pour faire si bien Fester Addams, j'ai adoré faire du labo avec toi :) Sugir Selliah merci pour les commandes, la bouffe sri lankaise, les discussions et les conseils de labo. Marie-Pierre Gauthier pour nos discussions, tes connaissances, ton sourire et tes conseils. Élyse-Ann Faubert pour ta bonne humeur et pour m'avoir suivie dans mes premiers pas au labo et en enseignement. Vincent Chao pour tes questions et nos

discussions AFLP pour récapituler toute la matière. Marie Fougère pour tes conseils lors de tes séjours.

Labo Rivoal (306). Merci à Jean Rivoal pour sa confiance, pour les charges d'auxiliaires d'enseignement et pour son cours de biotechnologie végétale qui m'ont permis d'être beaucoup plus à l'aise pour manipuler. Un gros merci aux membres de son labo (Sonia, Mimi et Marie-Claude) qui ont été d'un grand réconfort lors de mes temps d'attente, on savait où me trouver ...

Jonathan Soulard pour être ce qu'il fait de mieux : Être à la fois un petit diable et un être adorable, ainsi qu'un excellent support informatique.

Denis Lauzer, mon Sauveur. Qui a été là tout au long de mon baccalauréat et une bonne partie de ma maîtrise pour m'aider pour un tas de petits trucs, comme les clés ! Merci aussi pour ton aide pour la culture de *R. rosea* et tes services de psy :)

Nicole Vanier, horticultrice du Jardin alpin, qui m'a permis de m'amuser dans les serres ! Qui m'a aidé à chaque étape de la culture, surtout la première année de plantation et la deuxième saison pour partir en grande. Merci à Isabelle et Annie pour le coup de pouce pour le repiquage des semis. Votre présence était très appréciée.

Bien que je vous inscrive à la fin, vous connaissez tous votre contribution dans la réussite de ma maîtrise : mes colocataires du familial 4, ma meilleure amie Nancy, mes parents Yves et Martine, mes grands-parents Lucie et Gilles, ma soeur Rachel, ma tante Dominique et Isabelle. Je suis la personne que je suis grâce à vous. Chacun à votre façon, vous m'avez supporté dans plusieurs moments de ma vie, autant psychologiquement, spirituellement que financièrement. Vous êtes ma source principale de motivation. Je vous remercie du fond du coeur pour toutes vos attentions, pour votre aide.

Merci à mes colocataires de me supporter à chanter, faire la vaisselle, le ménage quand j'en ai besoin et d'être génial pour toutes ces soirées pour se changer les idées, d'autres plus mémorables que d'autres, mais bon ...

Merci à Nancy, la déesse du courriel pour son écoute et son support journalier tout au long de ma maîtrise. J'adore te lire et je t'adore ...

Merci à mes parents, grâce à vous je me suis rendu jusqu'ici. Je suis fière de moi ! Et vous m'avez transmis des valeurs géniales en plus d'une passion immortelle, la nature particulièrement les plantes. Merci à mes grands-parents pour leurs encouragements, ça fait tellement du bien. Merci aussi pour l'aide que vous m'avez fourni tout au long de mes études. Ça m'a vraiment aidé, autant l'hébergement, le logement, la Camry que les repas et votre amour. Merci :) Ma soeur Rachel, celle qui peut vous faire rire peu importe la situation. On ne peut pas être frustré contre elle bien longtemps, quoique les membres de mon labo en ont entendu parler. Bref merci pour ta fraîcheur, ton sourire ! Je t'aime fort et je suis fière de toi... Merci à ma tante Dominique, une icône pour moi depuis ma tendre enfance. Je t'ai toujours admirée et cela m'a permis de me rendre plus loin, de me dépasser moi-même. Tu m'a donné des ailes pour ne pas avoir peur d'entreprendre de longues études, le goût d'en savoir toujours plus, l'exemple de l'investissement personnel dans le bénévolat et le goût de me déplacer sur de plus longues distances.

Merci à Isabelle, le mentor de ma jeunesse, toi qui m'as initiée à l'identification des plantes, au jardinage et à la nature, grâce à toi, mon coeur est ouvert ! Merci pour tes acquis qui resteront à tout jamais ...

Chapitre 1

Introduction

1.1 Vue d'ensemble du projet

Le projet *Rhodiola rosea* est né d'une initiative de Nunavik Bioscience Inc., une filiale de Makivik, société ayant, entre autres, pour but de promouvoir la croissance économique des Inuits du Nunavik en aidant la création d'entreprises locales. Le projet porte sur *Rhodiola rosea* Linné (figure 1), une espèce médicinale prometteuse répandue le long de la côte est de la baie d'Ungava (Nunavik). Ce projet couvre différents volets liés à l'identification, l'utilisation et à la mise en marché de ce phytomédicament. L'étude touche à différentes problématiques reliées aux populations de *Rhodiola rosea* au Nunavik (Québec) afin de vérifier l'authenticité de l'espèce à l'étude, d'étudier la variabilité des populations du Québec, quantifier les composés phytochimiques actifs de la plante ainsi qu'évaluer la possible mise en culture au Nunavik. Les retombées de ce projet pourraient permettre d'implanter ce phytomédicament sur le marché québécois tout en aidant le peuple inuit à développer une nouvelle culture très prometteuse qui respecterait les normes établies par Santé Canada sur les « bonnes pratiques de fabrication » des produits de santé naturels.

Dans ce mémoire, les volets d'authentification taxonomique et de variabilité génétique seront principalement abordés. Le volet d'évaluation phytochimique du projet est pris en charge par Mme Vicky Fillion, une étudiante à la maîtrise de l'équipe du Dr. J.T. Arnason de l'Université d'Ottawa (2008).



Figure 1 : Floraison de *Rhodiola rosea* à Killiniq (Nunavik, Qc). Photo : M. Archambault (Août 2006)

1.2 Qu'est-ce que *Rhodiola rosea* ?

Rhodiola rosea Linné est une espèce végétale au sein de la famille des Crassulaceae. Le genre *Rhodiola* Linné est constitué de 58 espèces (Ohba 2002) réparties dans l'hémisphère nord, principalement en Eurasie. Le centre de diversité du genre se situe en Asie (Amano et al. 1995). Seulement trois espèces se retrouvent sur le continent Américain : *R. rhodantha* (A. Gray) H. Jacobsen qui est endémique dans le sud-ouest des États-Unis, *R. integrifolia* Raf. qui comprend quatre sous-espèces quasi exclusivement réparties dans l'ouest du continent et *R. rosea* dont la répartition est à l'est du continent (Rousseau 1974; Clausen 1975; Hulten et Fries 1986; Ohba 2002). *Rhodiola rosea* est l'espèce type du genre en plus d'être l'espèce dont l'aire est la plus étendue (Gontcharova 1999).

Rhodiola rosea est connu sous différents noms vernaculaires français : orpin rose, rhodiole ; en anglais, «roseroot», «golden root», «arctic root», «new ginseng» (Small et Catling 2000) ; en norvégien, «rosenrot» ; en finnois, «Ruusujuuri» ; en allemand, «rosenwurz» ; en islandais, «burnirót», «svaefla» ; en danois, «rosenrod» (Anderberg 1999). Une compilation très complète des appellations norvégiennes et des peuples Sami est disponible dans l'article de Alm (2004).

L'histoire taxonomique de *R. rosea* est relativement compliquée, d'autant plus que le statut du genre *Rhodiola* a été maintes fois modifié. Le genre a été nommé pour la première fois par Linné, mais il a été placé par la suite comme sous-genre du genre *Sedum* (Fröderström 1936; Clausen 1975). Depuis peu, le genre *Rhodiola* est reconnu comme distinct du genre *Sedum* grâce à plusieurs caractéristiques morphologiques : rhizome charnu, feuille en forme d'écaille, fleur unisexuée (Ohba 2002), et ceci est appuyé par les études moléculaires de Mayuzumi et Ohba (2004). *Rhodiola rosea* a reçu maintes dénominations latines : plus de vingt noms scientifiques lui ont été attribués, et plusieurs variétés s'y sont greffées selon les flores à l'étude. Jusqu'à récemment, l'espèce incluait *R.*

integrifolia et ses sous-espèces. La taxonomie du genre *Rhodiola* a été mise à jour par Ohba (2002) et c'est sur cette dernière que nous nous basons. Cependant, certains auteurs distinguent différentes sous-espèces de *R. rosea* soit *Rhodiola rosea* ssp. *rosea* L., le plus répandu et les sous-espèces localisées : *Rhodiola rosea* ssp. *arctica* (Borrisova) A. Löve en Norvège (Alm 2004; Galambosi 2005) et deux de l'extrême est de la Russie, *R. rosea* ssp. *krivochzinii* (Sipl.) S. Gontch. et *R. rosea* ssp. *sachalinensis* (Boriss.) S. Gontch. (Gontcharova 1999).

1.3 Aperçu de la plante

Rhodiola rosea est une espèce vivace, herbacée, caractérisée par un rhizome charnu, cylindrique ou oblong, au léger parfum de rose (figure 2). C'est d'ailleurs l'arôme de son rhizome qui lui a valu plusieurs de ses noms et non la couleur de sa floraison. La hauteur des tiges varie de 2 à 50 cm avec des feuilles vert pâle, glabres, alternes, en formes d'écailles et ayant une marge entière ou légèrement dentée. La forme et la marge des feuilles sessiles sont assez variables comme le démontre la figure 3.

L'espèce est considérée comme diploïde ($2n = 22$) (Amano et al. 1995) et dioïque. Les organes

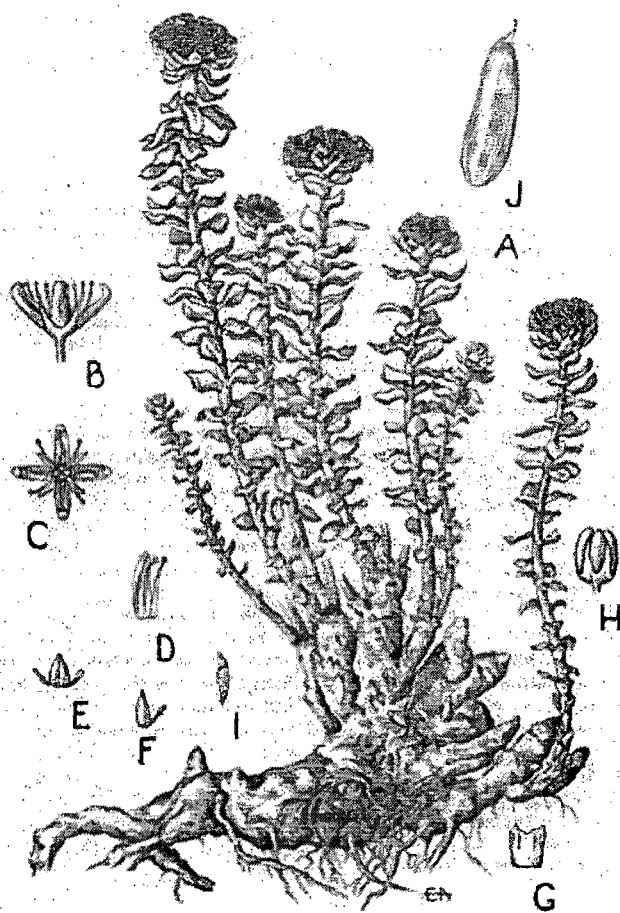


Figure 2 : Croquis d'un plant de *Rhodiola rosea* provenant du Mont Horrid, Rochester (Windsor Co., Vermont) A- Vue d'ensemble; B- Fleur vue de côté; C- Fleur vue aérienne; D- Pétales et deux étamines; E- Carpelles; F- Carpelle et nectaire; G- Nectaire; H- Bourgeon floral; I- Graine; J- Follicule. Figure 151 reprinted from Robert T. Clausen, *Sedum of North America North of the Mexican Plateau*. Copyright © 1975 by Cornell University. Used by permission of the publisher, Cornell University Press.

mâles et femelles sont sur des plants séparés (voir figure 4) bien que parfois certaines fleurs sont hermaphrodites avec un androcée ou un gynécée réduit ou immature (Small et Catling 2000). Les fleurs que nous avons observées étaient pratiquement toutes hermaphrodites. Cependant l'espèce serait fonctionnellement dioïque, car après la floraison nous observions des plants soit couverts de fruits ou des plants dont les extrémités florales étaient fanées, jamais un mélange de ces deux états (figure 4). Les fleurs sont généralement tétramères, mais parfois pentamères ou trimères. La longueur des fleurs staminées varie entre 5 à 8 mm, et les fleurs pistillées entre 3 à 6 mm (Clausen 1975) . Les tiges florales restent attachées au plant l'hiver. L'inflorescence terminale est en forme de corymbe et contient de 25 à 50 bourgeons floraux jaune à rosé ou rouge. Les pétales deviennent jaunes à la floraison et ont parfois l'extrémité rouge. La floraison varie de juillet à août selon l'altitude, la latitude et les conditions climatiques. Les fruits (follicules) sont bruns et érigés, et contiennent de petites graines ailées orange brun en forme de poire. L'espèce se propage grâce aux graines (sexuée) et au rhizome (asexuée) qui peut se détacher et reformer un nouveau plant.

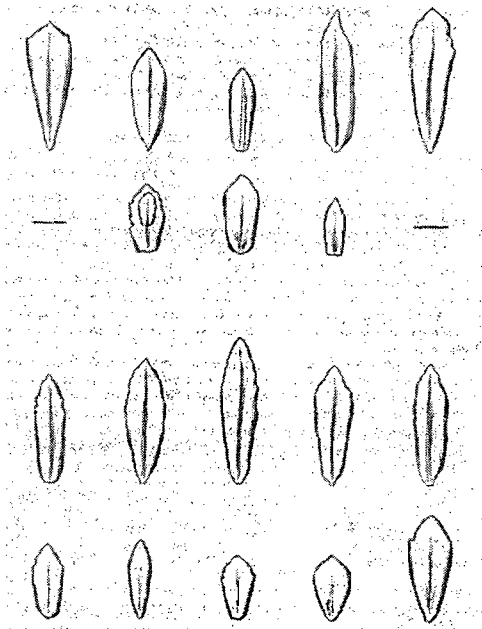


Figure 3 : Diversité des formes et marges de feuilles de *Rhodiola rosea* observées par Clausen (1975) sur des plants en nature (ligne 1 et 3) et après un an en culture (ligne 2 et 4). Figure 152 reprinted from Robert T. Clausen, *Sedum of North America North of the Mexican Plateau*. Copyright © 1975 by Cornell University. Used by permission of the publisher. Cornell University Press.



Figure 4 : Vue aérienne de la fin de floraison du plant mâle (à droite) et de la fructification femelle (à gauche) de *Rhodiola rosea* à Kangirsualujjuaq (Nunavik, Qc). Photo : M. Archambault (Août 2006)

Rhodiola rosea a une répartition amphi-atlantique dans les régions froides et subarctiques, ainsi qu'en altitude plus au sud. On peut qualifier cette espèce d'arctique-alpine ou subarctique-alpine. L'aire de répartition en Amérique du Nord de *R. rosea* avec l'ancienne nomenclature est présentée conjointement avec *R. integrifolia* à la figure 5 (Clausen 1975). On retrouve l'espèce en Asie (Russie, Chine, Japon), en Europe (Royaume-Uni, Scandinavie, montagnes de l'Europe centrale), Islande, Groenland, et en Amérique du Nord (Polunin 1969; Vladimir Leont'evic Komarov 1971; Clausen 1975; Hulten et Fries 1986; Ohba 2002; Galambosi 2006). En Amérique du Nord, *R. rosea* s'étend

principalement le long de la côte est de la baie d'Ungava jusqu'aux environs de Kuujuaq (Nunavik, Qc), sur les côtes du Labrador jusqu'à la Côte-Nord (Qc) et à Terre-Neuve. On la retrouve également sur certaines côtes au Nouveau-Brunswick, en Nouvelle-Écosse, au Maine et à quelques endroits isolés plus à l'intérieur des terres sur la côte est américaine (Vermont, New York, Connecticut et Pennsylvanie). Il existe aussi quelques mentions isolées avec spécimens au Nunavut et en Caroline du Nord (Polunin, 1940; Clausen, 1975; Roland, 1998; USDA, 1999; Hinds, 2000; (Moran In press)). Ces populations plus au sud peuvent être des reliques post-glaciaires ayant survécu aux changements climatiques dans des régions isolées principalement côtières ou alpines, là où la compétition végétale est la plus faible.

Selon Rousseau (1974), la zone limite de croissance optimale (zone de rusticité) de *R. rosea* est la zone 2 (héli-arctique). Cette espèce se retrouve dans la toundra ainsi que sur les falaises côtières et les flancs de montagnes, souvent dans des crevasses rocheuses et des endroits humides mal drainés, seule ou en association avec des mousses ou d'autres types de végétations locales, sur un substrat organique variable en sable et en matière organique (Aiken et al. 2003). Dans les régions nordiques de l'Amérique du Nord, les populations de *R. rosea* sont côtières, habituellement sur les falaises et les rives rocheuses, souvent près de sources d'azote comme les sites de nidification d'oiseaux ou des sites ayant subis des perturbations humaines, tels que des campements. Plus au sud, on la retrouve surtout dans des habitats côtiers jusqu'en Pennsylvanie.

Selon les conditions environnementales, on observe des variations morphologiques et phytochimiques. Dans les populations des régions plus arctiques, la croissance est limitée, les fleurs sont moins nombreuses et la floraison s'observe plus tard que chez les populations plus au sud ou cultivées (Small et Catling 2000; Galambosi 2006). Des observations personnelles abondent dans le sens de Clausen (1975) à l'effet que les plantes poussant le plus au sud (souvent cultivées) sont davantage étiolées et moins vigoureuses. Les températures chaudes, la sécheresse et les canicules semblent particulièrement les affecter.

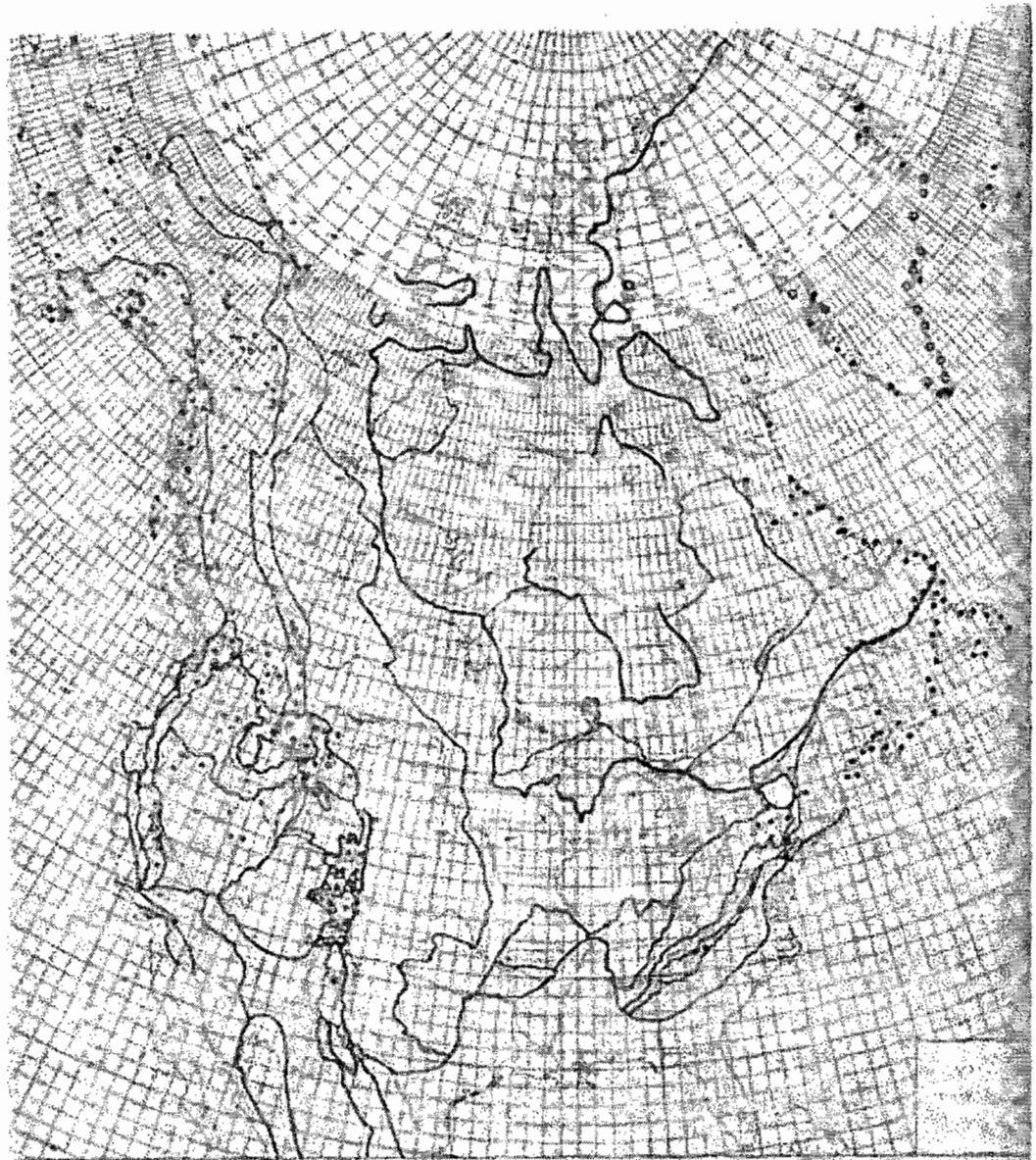


Fig. 142. Recent distribution of *Sedum integrifolium* ssp. *integrifolium* (○), ssp. *tridactyl* (△), ssp. *prostratum* (△), and ssp. *neomexicanum* (□) and *S. rosea* (●) and (□) for literature records.

Figure 5 : Carte de répartition de *Rhodiola rosea* et de *R. integrifolia* en Amérique du Nord. Figure 142 reprinted from Robert T. Clausen, *Sedum of North America North of the Mexican Plateau*. Copyright © 1975 by Cornell University. Used by permission of the publisher, Cornell University Press.

1.4 Une plante médicinale prometteuse

Rhodiola rosea, perçu comme le «nouveau ginseng», est considéré parmi les plantes adaptogènes telles que le *Panax ginseng* (Araliaceae) ou l'*Eleutherococcus senticosus* (Araliaceae) («Siberian ginseng»). L'origine du terme adaptogène provient du Dr. Nicolai Lazarev, un scientifique russe, qui l'utilisa en 1947. Une substance est dite adaptogène lorsqu'elle augmente de façon non spécifique la résistance d'un organisme peu importe le type de stress (physique ou émotionnel), et ce, sans perturber les fonctions biologiques normales. Brekhman et Dardymov (1969) ont défini ce qualificatif par trois critères : 1) La production d'une réponse non spécifique de l'organisme, i.e. une augmentation de la résistance contre les multiples sources de stress (physique, chimique, agent biologique); 2) Une tendance à normaliser la réponse physiologique peu importe la direction du changement à effectuer pour rétablir l'équilibre après un stress; 3) Une incapacité à influencer les fonctions biologiques normales de l'organisme au-delà de la réponse non spécifique de résistance. Pour Winston et Maimes (2007), les plantes adaptogènes sont celles qui affectent l'axe de l'hypothalamus, l'hypophyse et des glandes surrénales.

Sa renommée médicinale n'est pas récente, *R. rosea* est une plante médicinale qui a traversé les âges. La première mention de l'utilisation de cette plante a été faite par Dioscorides à l'époque des Grecs dans *De Materia Medica* (Brown et al. 2002). Elle fut utilisée comme nourriture ou remède par beaucoup de peuples au cours du temps, ce partout dans son aire de distribution en Europe de l'Est, en Scandinavie et en Asie (Russie, Mongolie, Chine) (Kelly 2001; Brown et al. 2002; Alm 2004). On l'utilisait notamment comme un tonique dans la médecine tibétaine et russe (Furmanowa et al. 1995). De nos jours, elle est encore employée dans la médecine traditionnelle en Russie, en Norvège, en Chine et en Mongolie (Germano et Ramazanov 1999; Galambosi 2005) ainsi que pour certaines applications dans la médecine moderne (Kelly 2001; Brown et al. 2002).

Les recherches concernant les propriétés médicinales des rhizomes de *R. rosea* se sont intensifiées vu l'accroissement de la demande pour les plantes adaptogènes. Une grande part des premières recherches (années 70-80) sur cette plante s'est effectuée en Russie. *Rhodiola rosea* est une espèce très prometteuse et de nombreuses études sont en cours pour vérifier et clarifier ses multiples propriétés. Comme toutes plantes médicinales, il faut cependant vérifier précautionneusement les sources et les protocoles de recherche ayant permis d'établir les propriétés (nombres d'essais, dose utilisée, groupe de référence témoin).

Maintes propriétés ont été énoncées par les études : diminution du temps de récupération après un effort prolongé (Furmanowa et al. 1999), cardioprotecteur (Kelly 2001), potentiel anti-dépresseur (Darbinyan et al. 2007; Sarris 2007), augmentation de la mémoire à long terme et de la concentration (Furmanowa et al. 1999), anti-stress, anti-hypoxique, augmentation du système immunitaire, prévention du mal des montagnes et amélioration des dysfonctions sexuelles (Brown et al. 2002). *Rhodiola rosea* pourrait également être bénéfique en thérapie pour les conditions asthéniques (fatigue, affaiblissement de l'organisme) liés à des efforts intellectuels et physiques chroniques ou intenses (Kelly 2001). Le potentiel anti-dépresseur de l'extrait de *R. rosea* standardisé SHR-5 a été cliniquement vérifié dans le traitement des dépressions légères à modérées (Darbinyan et al. 2007). La prise de *R. rosea* en concomitance avec des agents anti-tumorales pharmaceutiques augmenteraient l'efficacité de ces derniers en plus de prévenir certains de leurs effets secondaires (Kelly 2001). Plusieurs autres études répertorient les effets de *R. rosea*; pour en savoir davantage voir Brown et al. (2004).

Les propriétés médicinales de cette espèce proviennent des composés phytochimiques présents au niveau du rhizome. À travers le temps, plusieurs composés ont été ciblés, notamment le p-tyrosol et le salidroside (Kelly 2001). Le salidroside s'est avéré être un composé non spécifique au *R. rosea* : on le retrouve en effet dans plusieurs autres familles de plantes et parfois en plus forte concentration. *Rhodiola rosea* contient plusieurs

autres composés phytochimiques, certains d'entre eux étant spécifiques à cette espèce. Ainsi, on a identifié trois phénylpropanoïdes regroupés sous le terme rosavines : rosavine, rosine et rosarine (Brown et al. 2002). Les rosavines sont maintenant considérées comme les composés actifs et servent donc de marqueurs pour la normalisation des produits à base de *R. rosea*. La normalisation actuelle est située à un ratio de 3:1 entre les rosavines et le salidroside (Brown et al. 2002). Plusieurs autres composés spécifiques semblent également être responsables des propriétés médicinales. Filion et al. (2008) décrivent davantage les composés phytochimiques.

En général, la dose thérapeutique quotidienne varie entre 100 à 170 mg et aucun effet secondaire n'a été rapporté (Kelly 2001). Des effets secondaires ont été rapportés pour des doses oscillant entre 1.5 et 2.0 g, c'est-à-dire dix à vingt fois plus élevé que la dose quotidienne recommandée. Même si la toxicité semble faible, des intervalles périodiques d'abstinence sont recommandés lors d'usage régulier. Les femmes enceintes devraient éviter d'en consommer tant que des études ne sont pas disponibles sur le sujet (Kelly 2001).

Malgré la très faible toxicité de *R. rosea*, celui-ci semble avoir un potentiel d'interactions avec l'absorption de certains médicaments. Les cytochromes P450s (CYPs) sont des isozymes qui ont différents rôles métaboliques avec des substrats spécifiques (Scott et al. 2006). Chacun a un effet distinct sur le taux d'absorption et de biodisponibilité des médicaments dans le corps. Les extraits de *R. rosea* dans l'éthanol ont une inhibition significative de l'activité des cytochromes CYP3A4 et CYP19 (Scott et al. 2006). Il y a une relation positive entre la concentration de rosarine et le niveau d'inhibition des CYPs. Cette étude suggère donc que la prise d'extrait de *R. rosea* en concomitance avec d'autres médicaments pourrait altérer ou réduire l'effet de ces derniers.

1.5 Un intérêt commercial grandissant

Avec toutes ces propriétés, l'intérêt commercial pour *R. rosea* a rapidement augmenté. On trouve une grande variété de produits (teinture, capsule, racine séchée) sur le marché. Ces produits médicaux sont principalement utilisés en Eurasie, mais ils commencent à faire tranquillement leurs apparitions sur nos tablettes. Le marché par Internet pour les produits à base de *R. rosea* est florissant et facile d'accès pour tous. Cette demande croissante amène une problématique majeure : fournir la matière première pour satisfaire la demande industrielle (Galambosi 2006). Les populations naturelles ont et sont encore utilisées comme source primaire, ce qui a mené inévitablement au déclin de la taille des populations. Cette espèce arctique alpine croît lentement : le rhizome arrive à maturité phytochimiquement après quatre à cinq années de croissance, et la récolte intensive du rhizome altère sérieusement les populations naturelles dans certaines régions (Galambosi 2006). L'exportation des rhizomes séchés de *R. rosea* est estimée à 20-30 tonnes par année pour la Russie, où les plus grandes populations sont situées dans la région de l'Altaï. Les populations en Europe ont été moins récoltées du fait des coûts élevés associés à la récolte dans les régions montagneuses. La collecte abusive de *R. rosea* a mené l'espèce à un statut précaire dans plusieurs pays comme la Russie, particulièrement la région de l'Altaï, la Slovaquie, la Bosnie-Herzégovine et la République Tchèque (Galambosi 2006). Aux États-Unis, dans les états de New York, de la Caroline du nord, de la Pennsylvanie et du Vermont, on considère l'espèce comme ayant un statut de plante menacée (United States Department of Agriculture 1999), probablement lié à sa petite aire de répartition. Au Canada, *R. rosea* n'est pas répertorié comme espèce en péril, mais fait tout de même partie des plantes ciblées par le programme de conservation des ressources phytogénétiques du Canada (St-Pierre 2006).

La méthode la plus prometteuse pour produire une quantité suffisante de rhizome pour satisfaire la demande est la culture. Cette méthode a un haut coût de production entre autres parce que la plante a un temps de croissance de 4 à 5 ans avant d'obtenir une récolte

suffisante tant en terme de poids qu'en terme de composés actifs (Galambosi 2006). Bien que la croissance soit plus rapide qu'en milieux naturels (Galambosi 2006), la récolte nécessite l'extraction complète du rhizome, donc chaque année on doit planter en prévision d'une récolte ultérieure. La culture de *R. rosea* a débuté dans les années 90 en Russie, dans certains pays de l'ex-URSS, en Pologne, en Suède, en Finlande et au Canada. Les techniques de culture sont maintenant bien établies pour l'espèce. Le sud de la Finlande produit entre 1.5 et 3 tonnes de racines séchées par hectare (Galambosi 2006).

Au Canada, plusieurs publications mentionnent l'intérêt et le potentiel commercial de cette plante médicinale (Small et Catling 2000). La culture de *R. rosea* a d'ailleurs débuté en Alberta par l'entremise de recherches entreprises chez ANHAN («Alberta Natural Health Agricultural Network») qui chapeaute plusieurs projets en lien avec des plantes médicinales. Il existe maintenant un regroupement de producteurs de *R. rosea* en Alberta (ARRGO) qui ont débuté la culture et la commercialisation de ce produit (ARRGO 2008).

1.6 Problématique des phytomédicaments

L'intensification de la cueillette de plantes médicinales en milieu naturel est un enjeu important pour la biodiversité à petite et grande échelle. Non réglementées, ces pratiques peuvent conduire à l'extinction d'espèces menacées et à la destruction d'habitats et de ressources naturelles (Bagozzi 2004). Heureusement, la culture tente de remplacer la récolte de plantes en milieu sauvage pour certains phytomédicaments essentiels en médecine moderne (Bagozzi 2004). L'organisation Mondiale de la Santé (OMS) a identifié les lignes directrices pour la culture et la récolte des plantes médicinales, afin de garantir une production de phytomédicaments durable, sûre, de bonne qualité et sans danger pour la population ou l'environnement (Organisation Mondiale de la Santé 2002).

L'OMS rapporte également que l'on observe des cas plus nombreux d'effets indésirables chez les patients utilisant des phytomédicaments. L'une des principales causes

de ces événements indésirables tient à la mauvaise qualité des produits, notamment au choix de la matière première utilisée pour la fabrication, ainsi qu'à des erreurs de détermination de l'espèce. La culture, la récolte et la classification des plantes revêtent donc une importance capitale pour la qualité et l'innocuité des phytomédicaments (Bagozzi 2004).

Au Canada, plusieurs lignes directrices ont été tracées par Santé Canada (2006) sur les bonnes pratiques pour la fabrication des produits de santé naturels. À l'intérieur de ce document, plusieurs articles réfèrent directement à l'identification des matières premières, à la vérification de l'identité botanique, à la composition et la pureté des produits finis. Tous ces points vont dans le sens d'une identification taxonomique reconnue pour s'assurer que le produit final contienne la bonne espèce et surtout les composés chimiques clés. Ces règlements s'appliquent à tous les produits que l'on trouve sur nos tablettes. La certification taxonomique est un enjeu clé pour lequel on doit développer des outils technologiques efficaces.

Notre projet va, en ce sens, en développant des outils moléculaires permettant de confirmer l'identité taxonomique de l'espèce récoltée ou cultivée par la comparaison de séquences d'ADN. Cet outil objectif, le code à barre génétique, permet de s'assurer que les espèces utilisées dans la fabrication des phytomédicaments ne sont pas des espèces proches parentes ayant été mal identifiées de façon inconsciente ou consciente.

1.7 Problématique taxonomique

Autrefois, *R. rosea* et *R. integrifolia* étaient considérés comme une seule et même espèce sous le nom de *Sedum rosea* (L.) Scop., mais divisés en deux variétés, soit *S. rosea* var. *rosea* et *S. rosea* var. *integrifolia* (Rafinesque) Jepson ; la sous-espèce *S. rosea* var. *integrifolia* comprenant quatre différentes sous-variétés. *Rhodiola* a ensuite repris son statut de genre distinct du genre *Sedum* (Ohba 2002). L'espèce *R. rosea* comprenait encore les

deux sous-espèces, mais au cours de l'évolution les différences entre les sous-espèces se sont accumulées et elles ont été taxonomiquement séparées. Jusqu'à présent, *R. integrifolia* a fait l'objet de quelques études (Olfelt et al. 1998; Olfelt et al. 2001; Guest et Allen 2008), mais très peu évaluent ces propriétés médicinales (Anderson 1939; Kuhajek et al. 2003).

Les deux espèces se différencient sur la base de quelques caractères, mais la plupart s'observent difficilement ou uniquement lors de la floraison. *Rhodiola integrifolia*, espèce amphi-béringienne, possède une inflorescence rouge à rose foncée, les pétales des fleurs staminées sont plus grands (1,3-1,7 mm) et la plante présente un nombre chromosomique de $2n = 36$, comparativement au *R. rosea*, espèce amphi-atlantique qui produit une inflorescence jaune avec des pétales plus courts sur les fleurs staminées (0,7-1,1 mm), et un nombre chromosomique de $2n=22$ (Clausen 1975; Amano et al. 1995; Moran 2000).

Les personnes non familières avec ces espèces peuvent donc avoir de la difficulté à les distinguer, surtout lorsque la plante n'est pas en floraison. De plus, l'ancienne nomenclature est encore utilisée dans certaines flores récentes et plusieurs confusions subsistent dans les nouveaux ouvrages (Polunin 1940; Scoggan 1978; Hulten et Fries 1986; Gleason et Cronquist 1991; Roland et Zinck 1998; Cody 2000; Aiken et al. 2003; Dodson et Dunmire 2007). On décrit souvent l'espèce en mentionnant qu'il existe une différence entre l'est et l'ouest du continent nord-américain. Toutes ces confusions taxonomiques peuvent mener à l'adultération inconsciente de certains phytomédicaments commerciaux par l'utilisation de la mauvaise espèce. Il faut donc redoubler de vigilance au niveau de l'identité taxonomique des espèces médicinales mises en culture.

L'utilisation de *R. integrifolia* dans nos analyses, à titre d'extra-groupe, a pour but de démontrer que cette espèce est bien distincte de *R. rosea*. L'approche moléculaire tente de résoudre cette épineuse problématique qui mène à une confusion trop fréquente de *R. rosea* avec cette espèce parente dans la fabrication de phytomédicaments.

1.8 Phylogéographie

Le genre *Rhodiola*, dont l'aire de distribution est exclusive à l'hémisphère nord, a pour centre de diversité l'Asie de l'est (Mayuzumi et Ohba 2004) et a probablement une origine dans les montagnes de l'est asiatique (Galambosi 2005; Gontcharova et al. 2006).

Rhodiola rosea est la seule espèce du genre à être amphi-atlantique, i.e. avoir un patron de distribution des deux côtés de l'océan Atlantique (Hulten 1958; Rousseau 1974). Selon Hulten (1958), la définition stricte d'une espèce amphi-atlantique est une «espèce qui se trouve sur les deux côtés de l'océan Atlantique, mais qui est absente du côté de l'océan Pacifique». Cette définition permet de faire la distinction entre les espèces amphi-atlantique et circumpolaire/circumboréale, qui ont une aire de distribution continue sans disjonction importante. Malgré quelques mentions de populations de chaque côté de l'océan Pacifique (Hulten 1958; Amano et al. 1995), il existe une importante disjonction dans l'ouest et le centre de l'Amérique du Nord. Nous considérons donc *R. rosea* comme une espèce amphi-atlantique.

Depuis longtemps, différents auteurs ont remarqué des similarités au sein des espèces arctiques-alpines établies de chaque côté de l'océan Atlantique et tentent de l'expliquer (Dahl 1963; Löve 1963). Hulten (1937) croyait que les espèces amphi-atlantiques avaient été circumpolaires au début du Quaternaire. Lors des dernières glaciations, ces espèces auraient survécu dans différentes régions non-glacées comme l'est américain, le long des côtes de l'océan Atlantique. Suite au retrait des glaciers du Wisconsinien, les populations ont recolonisé l'est de l'Amérique du Nord et n'ont pas retrouvé leur entière distribution d'origine. Selon Hulten, bien que pas exclue, la dispersion longue-distance n'expliquerait pas adéquatement la répartition de la majorité des espèces. Selon Dahl (1963), les espèces auraient migré à la fin du Tertiaire par la passerelle de l'Atlantique Nord, et auraient survécu de leur côtés respectifs de l'océan durant le Quaternaire. Il considérait l'océan comme une grande barrière pour la dispersion des

plantes. Nordal (1987) considérait que des dispersions sur de longue distance de la Scandinavie à l'Amérique du Nord après la dernière glaciation étaient possible via des vecteurs de dispersion tels que la glace qui dérive, les icebergs et les oiseaux migrateurs. De nos jours, plusieurs auteurs suggèrent que les similarités de part et d'autre de l'océan sont attribuables à des dispersions longue distance sur la glace (Gabrielsen et al. 1997; Bauert et al. 1998; Abbott et Brochmann 2003; Reisch 2008). Les outils moléculaires fournissent des preuves pour appuyer de récentes migrations trans-océanique et les dispersions longue-distances (Abbott et Brochmann 2003). Cependant, les patrons de répartition des espèces amphi-atlantiques ne sont jamais identiques et chaque espèce a sa propre histoire de dispersion (Abbott et Brochmann 2003).

Rhodiola rosea est probablement arrivé en Amérique du Nord par des événements de dispersion longue-distance. Les graines de *R. rosea* ont pu migrer sur les glaces portées par le vent puisqu'elles sont minuscules et ailés aux deux extrémités (Clausen 1975). Malgré que les vents dominants soufflent de l'ouest sur l'océan Atlantique Nord, occasionnellement des vents en provenance de l'est sont possibles occasionnellement sur de courtes périodes (Löve 1963); ces derniers peuvent avoir facilité à la dispersion dans cette direction. La couverture de neige est souvent faible dans les régions arctiques, ce qui pourrait permettre aux tiges les plus grandes portant les follicules axillaires de *R. rosea* de dépasser la couverture de neige. A. Cuerrier (pers. comm.) a d'ailleurs pu l'observer dans la région de Kangirsualujjuaq. Pielou (1994) fait mention de cette avantage pour la dispersion des graines et des fruits sur les champs de neige dans l'Arctique. La dispersion par le vent de parties souterraines (rhizomes ou racines) de *R. rosea* est aussi envisageable pour cette espèce qui peut se propager facilement de façon asexuée (clonale) (Clausen 1975). La dispersion longue-distance ayant été possible pour *R. rosea*, nous désirons vérifier à l'aide d'outils moléculaires si les populations d'Europe et d'Amérique du Nord sont génétiquement semblables.

1.9 Objectifs du projet

Le *R. rosea* provenant de l'Eurasie principalement de la Russie est récolté et utilisé depuis de nombreuses années pour ses propriétés médicinales. Il a fait l'objet de plusieurs études en Europe et en Asie, mais les populations nord-Américaines ont été peu couvertes (Olfelt et al. 2001; Filion 2008; Filion et al. 2008; Guest et Allen 2008; Avula et al. *in press*). La majorité des recherches sur cette espèce concernent les composants phytochimiques et ses diverses propriétés; peu d'études se sont intéressées aux questions taxonomiques et phylogéographique. Notre étude couvre ces deux aspects avec un échantillonnage principalement nord-américain, où nous nous sommes particulièrement intéressés aux populations de *R. rosea* du Nunavik (Nord du Québec). D'ailleurs une partie de notre échantillonnage est commune à celles des études de Filion (2008), Filion et al. (2008) et de Avula et al. (*in press*), afin que nous puissions comparer les résultats des analyses phytochimiques aux validations taxonomiques.

1.9.1 Identité taxonomique

Le premier volet a pour but de vérifier l'identité taxonomique des populations de *R. rosea* du Nunavik.. Nous tenons à valider que les populations du Nunavik font parties du même taxon que celles d'Europe et d'Asie avant une possible commercialisation de phytomédicaments à base de *R. rosea* du Nunavik. Vu les confusions taxonomiques existantes entre *R. rosea* et *R. interifolia*, nous désirons également identifier des marqueurs moléculaires pour séparer ces deux espèces.

Pour répondre à ce premier volet, nous avons comparé des séquences d'ADN de *R. rosea* provenant de différents sites dans plusieurs régions entre elles, ainsi qu'avec des séquences d'autres espèces de *Rhodiola*, dont *R. integrifolia*. Ceci nous permettra de vérifier si le *R. rosea* est distinct ou pas des espèces proches parentes. Nous avons sélectionné sur NCBI deux régions d'ADN disponibles au préalable pour l'espèce : la

région chloroplastique *trnL-F* comprenant une partie de l'exon *trnL* 5', l'intron *trnL*, l'exon *trnL* 3', l'espaceur entre *trnL* et *trnF* et une partie de l'exon *trnF* (Taberlet et al. 1991) et la région nucléaire ribosomale du 18S au 26S de l'ITS, «internal transcribed spacer» (Douzery et al. 1999). Ces séquences ont, dans plusieurs groupes taxonomiques, un taux de variation de nucléotides suffisant pour permettre de résoudre les relations au niveau infra-générique (Taberlet et al. 1991; Muschner et al. 2003). Pour répondre à ce volet, nous avons également comparé et analysé les profils d'empreinte génétique obtenus par AFLP («amplified fragment length polymorphism»), technique développée par Vos et al. (1995). Souvent plus variables que les séquences d'ADN, ces marqueurs peuvent venir appuyer les résultats provenant des séquences tout en apportant des données complémentaires provenant du génome dans son ensemble, principalement des régions non codantes (Meudt et Clarke 2007). Cette technique est relativement facile, rapide, répliquable et utile pour l'analyse de la variabilité génétique au niveau des espèces ou des populations (Mueller et Wolfenbarger 1999; Bonin et al. 2007; Meudt et Clarke 2007).

1.9.2 Phylogéographie

Le deuxième volet s'intéresse davantage à la phylogéographie de l'espèce. Nous supposons que les différentes régions de l'aire de distribution de *R. rosea* ont évolué indépendamment. Nous désirons répondre aux questions suivantes : Le *R. rosea* est-il différent selon les régions? Est-ce que certaines régions sont génétiquement plus semblables? Observe-t-on une différenciation au niveau des populations malgré le faible temps de recolonisation depuis les dernières glaciations? La distance génétique est-elle corrélée à la distance géographique? Est-il possible d'établir des hypothèses de dispersion en Amérique du Nord?

Afin de déterminer le niveau de différenciation, nous avons utilisé l'information provenant des séquences d'ADN des régions du *trnL-F* et de l'ITS, ainsi que des empreintes génétique AFLP sur plusieurs populations de différentes régions : Amérique du Nord (Nord du Québec, Mingan, Maritimes), Eurasie et Scandinavie (Norvège et Finlande).

Des tests de Mantel ont été effectués sur les données AFLP pour évaluer la corrélation entre les distances génétique et géographique, nous avons effectué. Nous avons aussi fait des analyses de variance moléculaire (AMOVA) pour déterminer si la variabilité génétique se retrouve davantage entre les populations ou régions ou au sein de celles-ci. Des analyses de distance ont permis d'évaluer les relations existantes entre les populations et les régions.

Chapitre 2

Molecular analyses of the Nunavik (Quebec) populations of *Rhodiola rosea* L.

2.1 Abstract

Rhodiola rosea L. is an amphi-Atlantic species found along the East coast of North America. This promising medicinal plant is currently used in Eurasia for its adaptogen, anti-depressive, cardioprotective and immunomodulating properties. The cultivation of this species is underway in some countries to supply the medicinal demand in rhizomes and to protect endangered populations. The Russian populations of *R. rosea* have been the subject of many studies. Although distributed in northern North America, this species is poorly known in this region. Our objectives are to confirm the taxonomic identity of the species in northern Quebec and to evaluate the relationships of the Quebec populations with those in Russia, Norway and elsewhere. Our research has focused on populations located along the shore of the Ungava Bay (Nunavik, Quebec). DNA sequences from the chloroplast *trnL-F* and nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS) obtained from herbarium specimens and field samples were analyzed to establish the taxonomic identification. Our analyses suggest that the Canadian and the Eurasian populations belong to the same taxon even if they show some differences. The presence of two duplications found in the *trnL-F* suggest a closer relationship between North American and North Scandinavian populations than with Alpine Eurasian populations, which lack the duplications. Taxonomic identification through genetic barcoding of cultivated medicinal plant material could help prevent the adulteration, which is often associated with the marketing of phytomedications. In a few cultures of *R. rosea*, misidentifications with the closely related *R. integrifolia* were

found; even though this latter species has not been investigated for its medicinal properties. AFLPs were also used for identification and to establish relationships among populations at different geographical scales. We found a positive and significant correlation between geographic and genetic distances. We are proposing three long-distance dispersal hypotheses for *R. rosea* in North America. Despite some geographic structure, there is no resolution at the population level in the Ward's dendrogram. This is probably the result of a recent dispersal following the retreat of the Wisconsinan ice-sheet and uninterrupted gene flow. This project, supported by an Inuit organization, will benefit Nunavimmiut in helping to start plant propagation projects and in promoting the economic development of a quality product without decimating natural populations.

Keywords: *Rhodiola rosea*, amphi-Atlantic, medicinal plant, AFLP, *trnL-F*, ITS

2.2 Introduction

The medicinal plant *Rhodiola rosea* L., known as roseroot, golden root or Arctic root, has been used in many countries in Eastern Europe, Scandinavia and Asia (Russia, Mongolia, China) for centuries (Kelly 2001; Brown et al. 2002; Alm 2004). It was used as a tonic in Russian and Tibetan medicine (Furmanowa et al. 1995) and it is used for different medicinal applications in modern medicine (Kelly 2001; Brown et al. 2002). Russian researchers have identified *R. rosea* as an adaptogen: a substance that nonspecifically increases the resistance of an organism and does not disturb normal biological parameters (Kelly 2001; Brown et al. 2002). *Panax ginseng* (Korean Ginseng), *Eleutherococcus senticosus* (Siberian Ginseng) and many other well known medicinal plants are considered adaptogens (Kelly 2001). For Winston and Maimes (2007) adaptogen plants are those that affect the hypothalamus-pituitary-adrenal axis.

Because of the growing importance of adaptogen plants in daily life, researchers have investigated the properties of *R. rosea* roots and rhizomes. Studies have revealed

numerous promising effects (Brown et al. 2004; György 2006), such as antifatigue, shortened recovery time after prolonged workouts (Furmanowa et al. 1999), cardioprotective (Kelly 2001) and antidepressant activities (Darbinyan et al. 2007; Sarris 2007), increased long-term memorization and concentration ability (Furmanowa et al. 1999), antistress, antihypoxic, enhancement of the immune system, prevention of high altitude sickness and benefits in sexual disturbances (Brown et al. 2002).

Over time, the medicinal properties of *R. rosea* have been attributed to different compounds such as p-tyrosol and salidroside (Kelly 2001). *Rhodiola rosea* contains many chemical compounds, of which three cinnamyl alcohol-vicianosides (phenylpropanoids) are specific to this species: rosavin, rosin and rosarin, grouped under the term rosavins (Brown et al. 2002). Rosavins are the marker compounds for the standardization of *R. rosea* products, with an optimal ratio of rosavins/salidroside of 3:1 (Brown et al. 2002). In general, the daily therapeutic dose varies between 100-170 mg, and no side effects have been reported for this dosage (Kelly 2001).

With all these properties, the commercial interest for *R. rosea* has quickly increased leading to a major difficulty in meeting the increasing industrial demand (Galambosi 2006). Natural populations are and have been used as the main source and this has resulted in an important decline in the size of populations. The plants grow slowly, and mature rhizomes are normally collected when the plant reaches 4-5 years, so overharvesting has seriously altered natural populations in some regions (Galambosi 2006). The exportation from Russia, where the Altai area has the largest population stock, of dry *R. rosea* roots is estimated at 20-30 tons/year (Galambosi 2006). Due to the high labour costs associated with harvest of *R. rosea* principally in high mountain areas, this taxon in European countries has been less collected. The overharvesting has resulted in *R. rosea* being considered an endangered species in some countries such as Russia, Slovakia, Bosnia-Herzegovina and Czech Republic (Galambosi 2006).

Rhodiola rosea is an amphi-Atlantic species found in Asia (from Russia to Japan), Europe (Scandinavia, United Kingdom, most of the mountains of Central Europe, including the Pyrenees to those found in south Bulgaria), Iceland, Greenland, and in North America (Polunin 1969; Vladimir Leont'evic Komarov 1971; Hulten and Fries 1986; Ohba 2002; Galambosi 2006). In North America, *R. rosea* occurs in a few locations in Nunavut, but mostly along the east coast of Nunavik, Labrador to Côte-Nord (Qc), Newfoundland, New Brunswick and Nova Scotia, Maine and in some isolated populations south to Pennsylvania (Polunin 1940; Clausen 1975; Roland and Zinck 1998; United States Department of Agriculture 1999; Hinds 2000; Moran In press). North American populations of *R. rosea* have been the subject of little research, even if the species has been highlighted as a promising Canadian medicinal crop (Small and Catling 2000). Our project focuses on the genetic diversity of *R. rosea* populations in Nunavik (low arctic region of Northern Quebec, Canada).

Rhodiola rosea is a diploid ($2n = 22$) (Amano et al. 1995), perennial herbaceous plant with a characteristic oblong or cylindrical, thick, fleshy, fragrant rhizome. The flowering stems are persistent with terminal corymb inflorescences, the flower buds are yellow to red and the petals turn yellow before anthesis. The species has been reported to be generally dioecious but hermaphroditic flowers are also known (Small and Catling 2000).

Rhodiola rosea is considered as an arctic-alpine species even though its distribution includes some southern localities. The species occurs in tundra, slopes, cliffs imperfectly drained moist areas, often in rock crevices isolated or in association with moss and other local vegetation, with low organic substratum, but sometimes richer ones (Aiken et al. 2003). Morphological variation occurs depending on the environmental conditions. Arctic *R. rosea* has a lower growth form, fewer flowers, and blooms later than southern and cultivated plants (Small and Catling 2000; Galambosi 2006).

Formerly, *R. rosea* and *R. integrifolia* Raf., two of the three *Rhodiola* species in North America, were considered a single species under *Sedum rosea* (L.) Scop. and divided into subspecies, *S. rosea* ssp. *rosea* and *S. rosea* ssp. *integrifolia*. In some instances, this nomenclature still prevails and in regional floras some confusion remains (Polunin 1940; Scoggan 1978; Hulten and Fries 1986; Gleason and Cronquist 1991; Roland and Zinck 1998; Cody 2000; Aiken et al. 2003; Dodson and Dunmire 2007). But the two taxa can be differentiated based on several characters. *Rhodiola integrifolia*, an amphi-beringian species, has purple to reddish flowers, wider petals in staminate flowers (1.3-1.7 mm), and $2n=36$, whereas *R. rosea* has yellow flowers with shorter petals in staminate flowers (0.7-1.1 mm), and a chromosome number of $2n=22$ (Clausen 1975; Amano et al. 1995; Moran 2000). During the vegetative phase, the two taxa are difficult to differentiate. In addition, seed coat morphology and specimen origin were considered not useful for discriminating among some subspecies of *R. rosea* (Gontcharova et al. 2009). This taxonomic confusion can lead to unconscious adulteration of commercialized products based upon the wrong species. This is problematic because, to date, no medicinal properties have been reported for *R. integrifolia*. Furthermore, over its wide distribution, *R. rosea* has been named differently more than twenty times; in this study, we refer to the taxonomy proposed by Ohba (2002).

The vast majority of studies on *R. rosea* concern the phytochemistry, the medicinal properties and the cultivation of the species. In addition, the North American *R. rosea* have not been studied as extensively as European populations (Olfelt et al. 2001; Filion 2008; Filion et al. 2008; Avula et al. *in press*). Numerous populations of *R. rosea* occur in Nunavik (Quebec) where the cultivation of this species could be interesting for the Inuit communities. Our objective is to verify the taxonomic identity of the Nunavik populations relative to the known and studied European populations and to provide molecular tools that define the species. To assess this objective, we compare nucleotide sequence variation among *R. rosea* samples from diverse regions. We sequenced the chloroplast *trnL-F* region and the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS), which are known for their high

rate of nucleotide substitution and their usefulness in resolving infrageneric relationships in other plant taxa (Taberlet et al. 1991; Muschner et al. 2003).

In addition, we evaluate the regional genetic variation to examine phylogeographic relationships among regions. We were particularly interested by differences among regions along the Ungava Bay in Quebec. We also verified whether the North American populations had differentiated in the short laps of time since the last glaciations and whether geographic and genetic distances were correlated. This information will help to better understand the relationship between Nunavik *R. rosea* populations and populations elsewhere and allow us to elaborate dispersal hypotheses. To achieve this, we used the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique elaborated by Vos and *al.* (1995). This technique is relatively easy, fast, reliable and useful in genetic variation analyses below the species level (Mueller and Wolfenbarger 1999; Bonin et al. 2007; Meudt and Clarke 2007).

2.3 Materials and methods

2.3.1 Sampling

The sampled taxa included *Rhodiola rosea* and three other species used as outgroups, *R. integrifolia*, *R. kirilowii* and *R. seminowii* (Table 1). Fieldwork was undertaken principally around the shore of Ungava Bay in Nunavik, Quebec. Each of the sites collected were considered as a distinct populations. The populations were always coastal, mostly found on the East shore of Ungava Bay, except for the three populations found at Quaqtac. We collected leaves in silica gel from a total of 32 populations, with either 10 or 20 samples per population; for more sampling details in Nunavik, see Appendix 1. Three populations from New Brunswick and two from Nova Scotia were also collected. Figure 6 shows an overview of the sampling in North America. Samples from

TABLE 1 : *Rhodiola* samples sequenced for the nuclear ribosomal ITS and *trnL-F* chloroplast regions. The number in parentheses corresponds to the sample DNA extraction number. For each sample, locality, collector and voucher information are given. Specimens are deposited at Marie-Victorin herbarium (MT), except one specimen of *R. integrifolia* from Colorado, which is at UVIC. Genbank accession number are given. Samples from Galambosi were cultivated by Bertalan Galambosi, Agrifood Research Finland.

Species	Voucher information	Origin location, country	Latitude, Longitude or Origin specifications		GenBank for ITS	Genbank for <i>trnL-F</i>
<i>R. rosea</i> (440)	Archambault and Filion (RR2006-MM)	Quaqtaq (Cape hope Advance), Canada	N 61 07 816	W 069 55 179	GQ374182	GQ374209
<i>R. rosea</i> (42)	Archambault, Cuerrier and Filion (RR2005-C)	Kangirsualujjuaq, Canada	N 58 30 969	W 065 57 962	GQ374184	GQ374211
<i>R. rosea</i> (240)	Archambault and Filion (RR2006-CC)	Killiniq, Canada	N 60 42 201	W 064 83 934	GQ374181	GQ374208
<i>R. rosea</i> (140)	Archambault and Filion (RR2005-M)	Kuujuuaq, Canada	N 58 06 697	W 068 19 541	GQ374185	GQ374212
<i>R. rosea</i> (196)	Charest et al. (96-578)	Swale Island, Newfoundland, Canada	N 48 61 534	W 053 69 197	GQ374183	GQ374210
<i>R. rosea</i> (670)	Archambault (RR2006-NB-cap)	Cap Enragé, New Brunswick, Canada	N 45 35 43	W 064 46 40	GQ374189	GQ374216
<i>R. rosea</i> (197)	Charest et al. (NDC99-391)	Limit Quebec-Labrador, Canada	N 51 41 743	W 057 10 510	GQ374186	GQ374213
<i>R. rosea</i> (182)	Park Canada (RR2005-S)	Mingan Archipelago (Grande Île), Canada	N 50.241	W 63.914	GQ374188	GQ374215
<i>R. rosea</i> (189)	Sunniva Aagaard (RR-2005-Nw)	Bakliffjellet, Selbu, Norway	N 63 26 44	E 10 19 52	GQ374191	GQ374218
<i>R. rosea</i> (787)	Galambosi (RR2008-G17)	Altai , Russia	Seedlings from Tomsk Boanical Garden		GQ374201	GQ374228
<i>R. rosea</i> (706)	Galambosi (RR2008-G1)	Kilpisjärvi, Jeähkäjärvi, Finland	From natural populations		GQ374192	GQ374219
<i>R. rosea</i> (704)	Galambosi (RR2008-G18)	Hirvas, Finland	Plants from Kaloti nursery		GQ374193	GQ374220
<i>R. rosea</i> (779)	Galambosi (RR2008-G15)	Adanello, Italy	Seedlings from seeds from Torento		GQ374195	GQ374222
<i>R. rosea</i> (780)	Galambosi (RR2008-G16)	Bondelo, Italy	Seedlings from seeds from Torento		GQ374196	GQ374223
<i>R. rosea</i> (781)	Galambosi (RR2008-G13)	Alps, Austria	Plants from nature from Obertauern		GQ374197	GQ374224
<i>R. rosea</i> (782)	Galambosi (RR2008-G12)	Germany	Seed from Kiel botanical garden		GQ374198	GQ374225
<i>R. rosea</i> (783)	Galambosi (RR2008-G11)	Sweden	Commercial seed from the swedish company Impecta		GQ374199	GQ374226
<i>R. rosea</i> (807)	Galambosi (in cultivation)	Norway	Plants from Särkä nursery		GQ374190	GQ374217
<i>R. rosea</i> (784)	Galambosi (in cultivation)	Mattark, Switzerland	Seedlings from RAC		GQ374200	GQ374227
<i>R. rosea</i> (792)	Thompson (SLT#2007-003)	Peggy's Cove, Nova Scotia, Canada	N 44 29 31	W 063 55 5	GQ374187	GQ374214
<i>R. rosea</i> (701)	Thompson (SLT#2007-001)	Tatzanski Park Narodowy, Poland	N 49 15 04	E 19 54 04	GQ374194	GQ374221
<i>R. rosea</i> (808)	Kwesi (in cultivation)	Russia	Cultivated plants in Alberta (Kwesi)		GQ374181	GQ374229

TABLE 1 (suite) : *Rhodiola* samples sequenced for the nuclear ribosomal ITS and *trnL-F* chloroplast regions. The number in parentheses corresponds to the sample DNA extraction number. For each sample, locality, collector and voucher information are given. Specimens are deposited at Marie-Victorin herbarium (MT), except one specimen of *R. integrifolia* from Colorado, which is at UVIC. Genbank accession number are given. Samples from Galambosi were cultivated by Bertalan Galambosi, Agrifood Research Finland.

Species	Voucher information	Origin, location, country	Latitude, Longitude or Origin specifications	GenBank for ITS	Genbank for <i>trnL-F</i>
<i>R. integrifolia</i>	Cody and Ginns (34697)	Reindeer Mountain, Yukon, Canada	N 63 37 W 139 22	GQ374205	GQ374232
<i>R. integrifolia</i>	Guest, Heidi (046085) (UVIC)	La Plata Canyon, Colorado, USA	N 37 25 938 W 108 02 124	GQ374204	GQ374231
<i>R. integrifolia</i>	Jorgenson (RI2007-001)	Mt. Chiginagak, Alaska, USA	N 57 10 707 W 157 06 786	GQ374203	GQ374230
<i>R. kirilowii</i>	Archambault (MA-2008-01)	Montreal Botanical Garden (371-2007)	Seeds from cultivated materials of Botanischer Garden des Landes Karnten, Klagenfurt, Austria	GQ374206	GQ374233
<i>R. semenovii</i>	Archambault (MA-2008-02)	Montreal Botanical Garden (372-2007)	Seeds from cultivated materials of Botanischer Garden des Landes Karnten, Klagenfurt, Austria	GQ374207	GQ374234

Finland, Germany, Iceland, Italy, Norway, Poland, Russia and Sweden were obtained with the help of collaborators for a wide representation of *R. rosea*. The sampling for the sequence analyses included 27 individuals, 22 of which were from different populations of *R. rosea* and five individuals representing the three others species used as outgroups (Table 1).

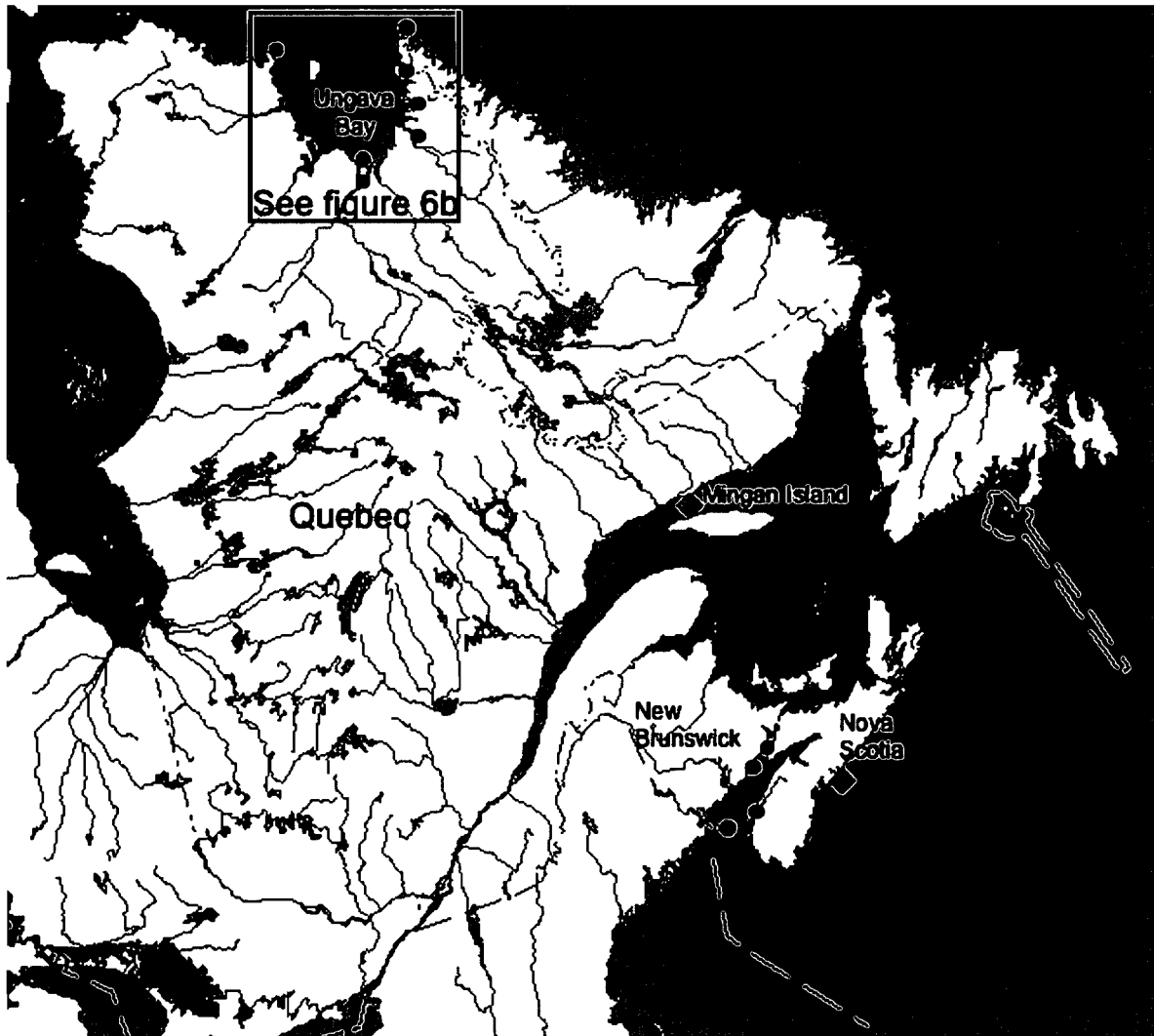


Figure 6a: Sampling of *Rhodiola rosea* in North America. Circles represent populations that we collected and lozanges show populations collected by collaborators. For detailed sampling of the Ungava Bay coast, see figure 6b.

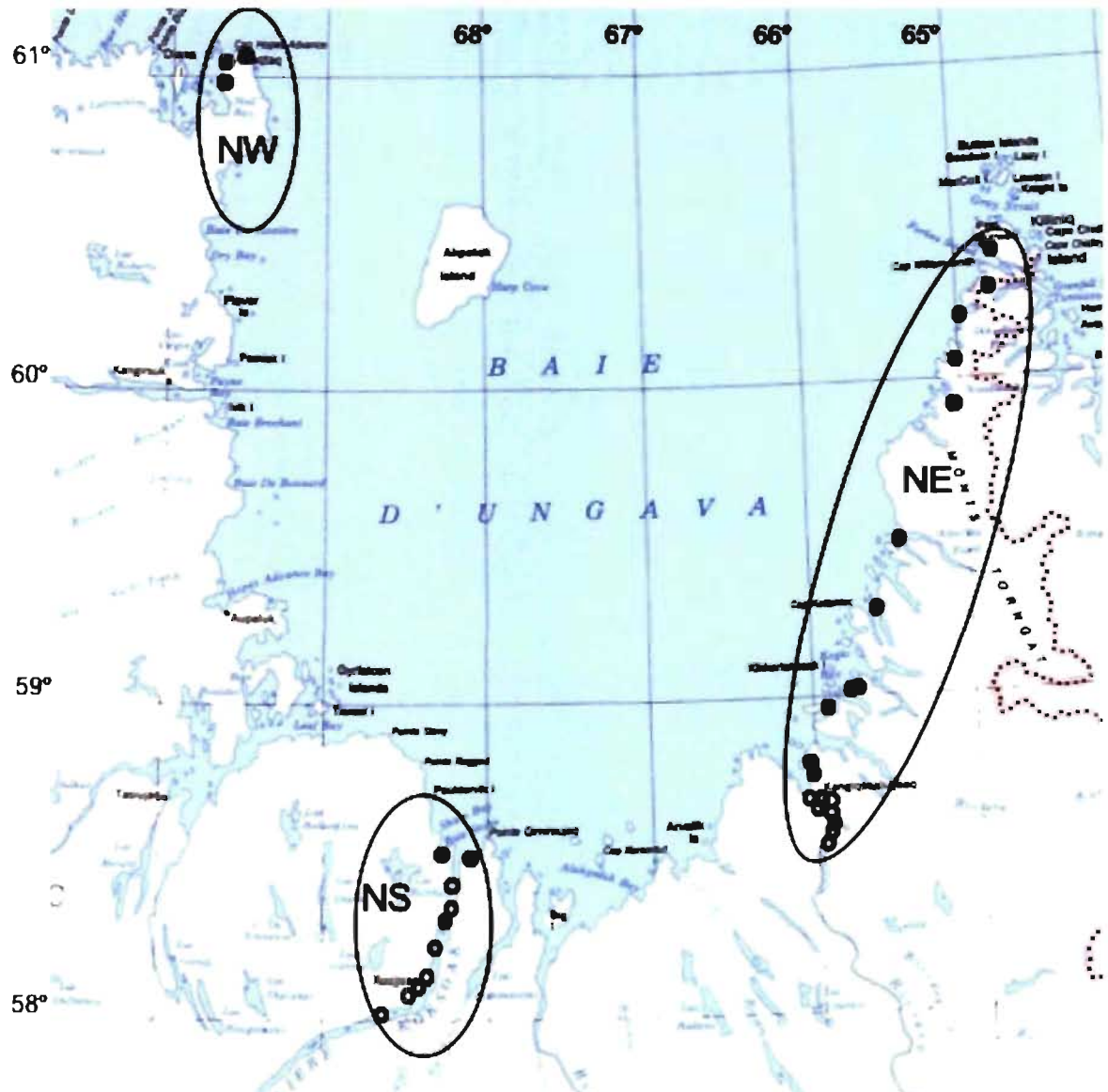


Figure 6b: Detailed sampling of *Rhodiola rosea* along the shore of Ungava Bay, Nunavik, Quebec. Empty circles represent populations that were collected in 2005 and full circles are populations collected in 2006. Three regions are defined relative to their proximity: NW for West Nunavik, NE for East Nunavik and NS for South Nunavik. This map is modified from the regional map of Quebec MCR 42 of Energy, Mines and Resources Canada

2.3.2 DNA extraction

DNA extractions were performed on leaves dried in silica gel. We modified the protocol used by Xia et al. (2005) on a *Rhodiola* species and the CTAB protocol of Doyle and Doyle (1987). We added 1% polyvinylpyrrolidone (PVP) and 40 µg of RNase A to the extraction buffer. The chloroform-isoamyl alcohol extraction was performed twice and the precipitation was followed by a 20 min centrifugation at 14 000 rpm at 4°C. The pellets were washed using 500 µL of 70% ETOH or wash buffer (76% ETOH, 10 mM ammonium acetate) twice, dried and resuspended in 100 µL TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA disodium, pH 7.4), and then incubated at 65°C for at least 10 min to redissolve the DNA.

2.3.3 Sequences

We sequenced two regions: the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region of the 18S-26S and the chloroplast *trnL*-F region (containing the *trnL* intron, *trnL* 3' exon and *trnL*-*trnF* intergenic spacer).

The polymerase chain reaction was performed in a Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler (Applied Biosystems (ABI), Foster City, USA) or a 2720 Thermal Cycler (ABI). Amplification of the ITS region was done in a total volume of 25 µL containing 1X PCR buffer (Roche Diagnostics, Laval, Canada) (with a total 1.5 mmol/L MgCl₂ concentration), 200 µmol/L of each dNTP (MBI Fermentas, Burlington, Canada), 0.1 µg/µL bovine serum albumin (BSA) (New England Biolabs, Pickering, Canada), 6% of DMSO, 0.06% of Tween20, 0.4 µmol/L of each primer and two units of *Taq* polymerase with 1 µL of total DNA, using the primers AB101 and AB102 (Douzery et al. 1999). The PCR protocol consisted of an initial denaturation step (3 min at 94°C) followed by 40 cycles of denaturation (30 s at 94°C), annealing (30 s at 50°C) and elongation (1 min at 72°C), with a final extension (7 min at 72°C) step.

PCR for the *trnL-F* region was done in a total volume of 25 μ L containing 1X PCR buffer, a total 2 mmol/L $MgCl_2$ concentration, 200 μ mol/L of each dNTP (MBI Fermentas), 0.4 μ mol/L of each primer and two units of *Taq* polymerase with 1 μ L of total DNA, using the primers *trnL-c* and *trnL-f* (Taberlet et al. 1991). The PCR conditions followed the ITS protocol except the annealing temperature which was set to 48°C and only 35 cycles were used.

The PCR products were purified using the polyethylene glycol (PEG) purification procedure as described by Joly et al. (2006) with the following modifications for centrifugation time. For the first precipitation, centrifugation was for 20 min rather than 15 min and the centrifugation for the two washes was increased to 7 min.

Sequencing reactions using the same primers as above were performed with BigDye terminator (v1.1; ABI) following the manufacturer's protocols. Sequences were run on a 3100-*avant* automated sequencer (ABI). Sequencher (version 4.7, GeneCodes, Ann Arbor, Michigan, USA) was used to visualize and edit the sequences. Sequence alignment was performed manually with BioEdit v.1.6.0 (Hall 1999). Indels were coded by Seqstate v.1.32 software (Müller 2006) using the simple indel coding model (Simmons and Ochoterena 2000).

2.3.4 Parsimony analyses

We used the parsimony criterion for the analysis, but maximum likelihood yielded similar results in preliminary analyses. The analyses were performed on the ITS and *trnL-F* matrices individually and on the combined matrix (which included only individuals for which both sequences were available). A total of 27 sequences, include the five sequences for the outgroups, were analyzed with PAUP* (v.4.0; (Swofford 2002)) using a heuristic search strategy with 1000 random addition replicates, with tree-bisection-reconnection (TBR) branch-swapping and one tree held at each step during stepwise addition with a

maximum of 10 000 trees in memory. A second analysis was performed using all trees in memory as starting trees with TBR branch swapping. Nodal support was estimated using 1000 bootstrap replicates using a heuristic search with TBR branch swapping. Strict consensus trees were obtained and trees were rooted with the outgroup species. Before combining the data, separate analyses were conducted on each matrix to test for congruence. The two datasets were also tested for incongruence with the ILD test implemented in PAUP*.

2.3.5 AFLP

Initial AFLP reactions were conducted with the restriction enzymes *EcoRI* and *MseI* but because these lacked variation, we used the restriction enzymes *MseI* and *TaqI*, which are both four base cutters and thus more frequent base cutters (Table 2). The reactions were done using a Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (ABI). Primers were commanded at Alpha DNA (Montréal). AFLP analyses were guided by the protocol described by Soltis and Gitzendanner (1999). The following modifications were applied.

Table 2: Adapters and primers used in AFLP analyses with the restriction enzymes *TaqI*

Adapters <i>TaqI</i>	Top strand	5'- GACGATGAGTCCTGAG
	Bottom strand	5'- CGCTCAGGACTCAT
Primers <i>TaqI</i>	Taq+I	5'- GACGATGAGTCCTGAGCGA C
	Taq+CAG*Hex	5'- GATGAGTCCTGAGCGA CAG
	Taq+CTC*Fam	5'- GATGAGTCCTGAGCGA CTC
	Taq+CGC*	5'- GATGAGTCCTGAGCGA CGC

TABLE 3 : *Rhodiola rosea* samples used for AFLP analysis. For each population, number of samples, locality, collector, and voucher specimen deposited at Marie-Victorin herbarium (MT) are given. The localities where we estimated the latitude and longitude are in *italic*. Pop: population code, No: number of samples used for AFLP analysis, H: number of haplotypes per populations, L: number of polymorphic loci on a possibility of 88, Rg: geographic region (NE: Ungava Bay-East, NS: Ungava Bay-South, NW: Ungava Bay-West, Mg: Mingan Islands, Ma: Maritimes, Sc: Scandinavia, Eur: Eurasia), H-Rg: number of haplotypes per region, L-Rg: number of polymorphic loci per region

Rg	Pop	No	H	L	H-Rg	L-Rg	Locality	Latitude, Longitude	Voucher information
NE	a	10	10	48	258	74	Canada, Quebec, Ungava Bay, Kangirsualujjuaq (around)	58.69258 65.95013	Archambault et al. (RR2005-A)
	b	9	9	47			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kangirsualujjuaq (around)	58.67742 66.01660	Archambault et al. (RR2005-B)
	c	8	8	32			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kangirsualujjuaq (around)	58.51160 65.96603	Archambault et al. (RR2005-C)
	d	8	8	41			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kangirsualujjuaq (around)	58.55162 65.93748	Archambault et al. (RR2005-D)
	e	7	7	45			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kangirsualujjuaq (around)	58.59725 65.89087	Archambault et al. (RR2005-E)
	f	10	10	37			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kangirsualujjuaq (around)	58.67680 66.00843	Archambault et al. (RR2005-F)
	g	6	6	32			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kangirsualujjuaq (around)	58.69422 65.94262	Archambault et al. (RR2005-G)
	aa	19	19	43			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kangirsualujjuaq (around)	58.74270 66.02954	Archambault and Filion (RR2006-AA)
	bb	17	17	51			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kangirsualujjuaq (around)	58.75073 66.03168	Archambault and Filion (RR2006-BB)
	cc	15	15	47			Canada, Quebec, Ungava Bay, Killiniq	60.42201 64.83934	Archambault and Filion (RR2006-CC)
	dd	16	16	50			Canada, Quebec, Ungava Bay, shore between Kangirsualujjuaq and Killiniq	60.35905 64.85030	Archambault and Filion (RR2006-DD)
	ee	18	18	52			Canada, Quebec, Ungava Bay, shore between Kangirsualujjuaq and Killiniq	60.22697 64.96510	Archambault and Filion (RR2006-EE)
	ff	18	18	48			Canada, Quebec, Ungava Bay, shore between Kangirsualujjuaq and Killiniq	60.09253 65.07035	Archambault and Filion (RR2006-FF)
	gg	17	17	52			Canada, Quebec, Ungava Bay, shore between Kangirsualujjuaq and Killiniq	59.92101 65.02571	Archambault and Filion (RR2006-GG)
	hh	16	16	36			Canada, Quebec, Ungava Bay, shore between Kangirsualujjuaq and Killiniq	59.30652 65.66747	Archambault and Filion (RR2006-HH)
	ii	15	15	48			Canada, Quebec, Ungava Bay, shore between Kangirsualujjuaq and Killiniq	59.49055 65.51294	Archambault and Filion (RR2006-II)
	jj	18	18	49			Canada, Quebec, Ungava Bay, shore between Kangirsualujjuaq and Killiniq	59.05420 65.74654	Archambault and Filion (RR2006-JJ)
kk	18	18	49	Canada, Quebec, Ungava Bay, shore between Kangirsualujjuaq and Killiniq	58.93758 65.97757	Archambault and Filion (RR2006-KK)			
ll	17	17	49	Canada, Quebec, Ungava Bay, shore between Kangirsualujjuaq and Killiniq	59.06207 65.72964	Archambault and Filion (RR2006-LL)			
NS	h	7	7	32	96	65	Canada, Quebec, Ungava Bay, Kuujjuaq (along Koksoak river)	58.02645 68.44675	Archambault and al. (RR2005-H)
	i	9	9	34			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kuujjuaq (along Koksoak river)	58.14810 68.33710	Archambault and Filion (RR2005-I)
	j	10	10	43			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kuujjuaq (along Koksoak river)	58.35753 68.19277	Archambault and Filion (RR2005-J)
	k	10	10	34			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kuujjuaq (along Koksoak river)	58.44615 68.19597	Archambault and Filion (RR2005-K)
	l	9	9	28			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kuujjuaq (along Koksoak river)	58.27043 68.28210	Archambault and Filion (RR2005-L)
	m	8	8	32			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kuujjuaq (along Koksoak river)	58.11162 68.32568	Archambault and Filion (RR2005-M)
	n	6	6	31			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kuujjuaq (along Koksoak river)	58.10328 68.10328	Archambault and Filion (RR2005-N)
	pp	17	17	44			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kuujjuaq (along Koksoak river)	58.53354 68.12910	Archambault and Filion (RR2006-PP)
	qq	14	14	44			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kuujjuaq (along Koksoak river)	58.55163 68.18744	Archambault and Filion (RR2006-QQ)
	rr	6	6	36			Canada, Quebec, Ungava Bay, Kuujjuaq (along Koksoak river)	58.32655 68.25588	Archambault and Filion (RR2006-RR)

RG	Pop	No	H	L	H-RG	L-RG	Locality	Latitude	Longitude	Voucher information			
NW	mm	15	15	35	46	58	Canada, Quebec, Ungava Bay, Quaqtac	61.07816	69.55179	Archambault and Filion (RR2006-MM)			
	nn	17	17	49			Canada, Quebec, Ungava Bay, Quaqtac	61.04693	69.63371	Archambault and Filion (RR2006-NN)			
	oo	14	14	46			Canada, Quebec, Ungava Bay, Quaqtac	61.07090	69.60801	Archambault and Filion (RR2006-OO)			
N	All				400	77							
Mg	p	4	4	31	40	64	Canada, Quebec, Mingan Archipelago, Île Nue de Mingan	50.211	64.117	Park Canada (RR2005-P)			
	q	4	4	34			Canada, Quebec, Mingan Archipelago, Petite île au Marteau	50.216	63.563	Park Canada (RR2005-Q)			
	r	3	3	39			Canada, Quebec, Mingan Archipelago, Île du Havre	50.213	63.608	Park Canada (RR2005-R)			
	s	7	7	36			Canada, Quebec, Mingan Archipelago, Grande île	50.241	63.914	Park Canada (RR2005-S)			
	ss	9	9	36			Canada, Quebec, Mingan Archipelago, Île du Havre (2)	50.20803	63.6047	Park Canada (RR2006-SS)			
	tt	5	5	34			Canada, Quebec, Mingan Archipelago, Île du Havre (1)	50.20767	63.60477	Park Canada (RR2006-TT)			
	uu	4	4	28			Canada, Quebec, Mingan Archipelago, Petite île au Marteau	50.20945	63.55788	Park Canada (RR2006-UU)			
	vv	4	4	27			Canada, Quebec, Mingan Archipelago, Île du Fantôme	50.22098	63.68042	Park Canada (RR2006-VV)			
	Ma	GM	4	4			18	37	66	Canada, New Brunswick, Grand Manan Island	44.76417	66.73465	Archambault (RR2006-NB-GM)
WQ		6	6	31	Canada, New Brunswick, West Quaco	45.31513	65.55387			Archambault (RR2006-NB-WQ)			
SC		8	8	28	Canada, Nova Scotia, Sandy Cove	44.49767	66.10502			Archambault (RR2006-NS-SC)			
CE		10	10	53	Canada, New Brunswick, Cap Enragé	45.59390	64.77993			Archambault (RR2006-NB-cap)			
NE		9	9	32	Canada, Nova Scotia, Peggy's cove	44.49674	63.91913			Thompson (SLT#2007-003)			
Sc	FK1	5	5	33	71	65	Finland, Kilpisjärvi (Jeähkäjärvi)	69.04647	20.79530	Galambosi (RR2008-G1)			
	FK2	8	8	37			Finland, Kilpisjärvi (Saana)	69.04647	20.79530	Galambosi (RR2008-G2)			
	FK3	5	5	38			Finland, Kilpisjärvi (Saananmaja)	69.04647	20.79530	Galambosi (RR2008-G3)			
	FK4	7	7	29			Finland, Kilpisjärvi (Tsahkaljärvi South)	69.04647	20.79530	Galambosi (RR2008-G4)			
	FK5	7	7	34			Finland, Kilpisjärvi (Tsahkaljärvi North)	69.04647	20.79530	Galambosi (RR2008-G5)			
	FK6	7	7	36			Finland, Kilpisjärvi (Marjajärvi)	69.04647	20.79530	Galambosi (RR2008-G6)			
	FH1	5	5	23			Finland, Halti (Jogasjärvi)	69.30733	21.26964	Galambosi (RR2008-G7)			
	FH2	5	5	36			Finland, Halti (Valtijoki)	69.30733	21.26964	Galambosi (RR2008-G8)			
	FH3	6	6	40			Finland, Halti (Somaslompolo)	69.30733	21.26964	Galambosi (RR2008-G9)			
	FU	5	5	30			Finland, Utsjoki (Goahppelasjoki)	68.90486	27.02605	Galambosi (RR2008-G10)			
	Norw	10	11	41			Norway, Trondelag	63.44568	10.33111	Sunniva Aagaard (RR2006-Nw)			
	Norw	1					Norway (nursery)	60.47203	8.46895	Galambosi (in culture)			
	Eur	Eur	1	6			51	6	51	Austria, Alps	47.55483	14.74436	Galambosi (RR2008-G13)
		Eur	1							Germany (Botanical Garden)	54.32268	10.12775	Galambosi (RR2008-G12)
Eur		1	Italy, Valle d'Aperta		46.60396	11.45397				Galambosi (RR2008-G14)			
Eur		1	Italy, Bondolo		46.13926	8.33197				Galambosi (RR2008-G16)			
Eur		1	Poland, Tatranski Park Narodowy		49.25111	19.90111				Thompson (SLT#2007-001)			
Eur		1	Russia, Altai		50.83239	86.95778				Galambosi (RR2008-G17)			

Sampling of AFLP – We amplified more than 700 samples and discarded those which did not work in one or both primer combinations in the final combined matrix (Table 3). Some individuals (24) were arbitrarily chosen as replicates and were analyzed twice for calculation of the error rate.

Restriction - The first step was the digestion with the restriction enzyme *MseI* (New England Biolabs). Total DNA was quantified by optical density at 260 nm. The digestion mix, in a volume of 7 μL , contained 0.7 μL buffer 2 (New England Biolabs), 0.7 μL of BSA (1 mg/mL) and 5 U *MseI* for 300 ng of total DNA. The reaction was performed for at least 3 hours at 37°C. The second step was the digestion with the restriction enzyme *Taq α I* (New England Biolabs). A volume of 3 μL , containing 4 U of *Taq α I*, 0.5 μL buffer 3 (New England Biolabs), was added to the first digestion tube. The digestion was performed at least 3 hours at 65°C.

Ligation - Ligation mix, in a volume of 5 μL , containing 2 μL of T4 DNA ligase buffer (New England Biolabs), 1 μL of *MseI* and *Taq α I* adapters (50 $\mu\text{mol/L}$), 0.25 U of T4 DNA ligase (New England Biolabs). A total of 5 μL of the digestion was added to the ligation mix and placed for at least 3 hours or overnight at room temperature.

Pre-selective amplification - The first amplification was performed using the protocol described by Soltis and Gitzendanner (1999). The PCR master mix was modified by using a total 3 mmol/L MgCl_2 concentration and 1.6 U of *Taq* polymerase in a total volume of 20 μL . An electrophoresis of 10 μL of the PCR product followed the PCR + 1. Samples where we visualized a smear were subsequently diluted with 100 μL H_2O .

Selective amplification - Two combinations were chosen because they were the most variable: *Taq α I*+CAG (green chromophore 5'-HEX) and *MseI*+CAC, *Taq α I*+CTC (blue chromophore 5'-FAM) and *Taq α I*+CGC. The PCR+3 mix containing 1X PCR buffer for a total 3 mmol/L MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol/L}$ of each dNTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 100 pmol/L of selective primer and 0.8 U of *Taq* polymerase with 1.5 μL of PCR+1, in a total volume of 10 μL . The condition for selective amplification was modified only by decreasing the number of cycles to 20 in the second step of the amplification.

Following the selective amplification, samples were diluted with 10 μL of water, 0.5 μL of each combination (green and blue chromophore) were pooled together with 12 μL Hi-Di Formamide (ABI) and 0.2 μL GeneScan-500 ROX size standard (ABI) and denatured at 95°C for 5 minutes. Samples were run on an ABI 3100-*avant* automatic sequencer. Because of time and cost constraints, we used only two combinations of primers, but the most variable were chosen.

2.3.6 AFLP analyses

Data from the automatic sequencer were imported and aligned using the software Genographer v. 1.6 (Benham 2001). AFLP bands were scored using the same software for fragments between 50 and 500bp. AFLP fragments were scored as present or absent, only for the unambiguous ones and were verified manually.

The binary matrix of presence/absence from Genographer was transferred to Excel. Only the individuals present in both combinations were retained in the final matrix. The data matrix were analyzed using Jaccard's distance (Jaccard 1900) that considers shared presence but not shared absence to maximize the homology (Joly and Bruneau 2007). The conversion of the presence/absence matrix into a distance matrix was done for the Mantel test with the software R Package version 4.0 (Casgrain and Legendre 1999) and with the statistic software R (The R Foundation for Statistical Computing 2005) for the redundancy analysis and the clustering.

The distance matrix was computed using the "binary" method, which is equivalent to Jaccard's distance in the statistic software R. A cluster analysis was implemented with R using Ward's cluster algorithm in the "agnes" function of the "cluster" package. Ward's (1963) algorithm was chosen because it is useful for large scale ($n > 100$) and it forms hierarchical groups that are mutually exclusive.

To test the correlation between genetic and geographic distances we performed a Mantel test (Mantel 1967) with the R Package version 4.0. Significance was based on 1000 permutations. Geographic coordinates were mostly obtained directly in the field, but some were estimated with Google Earth (<http://earth.google.com/>, 2008) (Table 3). Different tests were performed using different geographical scales of sampling: all samples, North American samples (without estimated coordinates for the European samples) and Nunavik samples.

In order to study allelic variation among populations and regions, we defined different geographical groups. The definition was based on the proximity of populations: we divided the Nunavik samples into three groups depending on which side of the Ungava Bay shore they were collected (figure 6b), we grouped all populations from Mingan Island together, and the samples from New-Brunswick and Nova Scotia were labeled as Maritime populations. Although all these populations are from Canada, we refer to them collectively as the North American populations. All the samples from Eurasian countries were divided into two main groups: Norway and Finland were grouped as Scandinavia samples and the rest were considered as the Eurasian samples. To evaluate the allelic variation, an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed using the Arlequin software (Excoffier et al. 2005) with 10 000 permutations to test for significance. All samples were considered as a different haplotype. The analyses were designed to test for variation at the geographic level. First, we evaluated whether to evaluate if our Nunavik subdivision was suitable or not. We also wanted to test the variation between our defined regions to see if these would stand as groups or not. Finally, we evaluated the variation within and among the different populations.

We also evaluated the experimental effect of the laboratory through two different analyses. First, we defined laboratory groups based upon the running AFLP plate in the sequencer because we observed some alignment differences between plates. We then did an AMOVA on these groups to see how variation was distributed among or within the groups.

We also used the function "rda" and "varpart" in the "vegan" package in R to estimate the impact of different variables (AFLP plates, geographical region, populations), which could explain data variability.

2.4 Results

2.4.1 Sequence results

For each locality, only a single sample was retained in the analysis because no sequence variation was detected within a locality. Each matrix contained 27 sequences, including five as outgroups. The *trnL*-F matrix contained 883 bp plus 11 indels and the ITS matrix contained 805 bp plus nine indels for a total of 1708 bp with the insertion of 20 indels for the combined matrix. We found 5% and 14.6% parsimony informative characters for *trnL*-F and ITS, respectively, for a total of 9.5% in the combined matrix including outgroups. In the combined matrix we had a total of 1.6% missing data. The three matrices (*trnL*-F, ITS and *trnL*-F+ITS) showed concordant results, but with different levels of resolution. In all these analyses, the outgroup species are clearly supported as separate from the *R. rosea* clade, even though the placement of *R. integrifolia* samples from different regions differs among analyses.

Although there were fewer parsimony informative characters in the *trnL*-F matrix there was more resolution in the clade of interest. Maximum parsimony analysis of the *trnL*-F matrix retrieved only one tree of 47 steps with a consistency index (CI) of 1.00 and a retention index (RI) of 1.00 (figure 7). The *Rhodiola rosea* clade is strongly supported and separated into three main groups: a non-resolved mix composed of Eurasian samples, a subclade with Poland and Russian samples, and a larger subclade supported by a bootstrap value of 95%. This larger subclade contains all the samples from North America, including the Nunavik populations, and samples from Norway and Finland (North Scandinavia).

They all share two important duplications of 23 bp (figure 8) and 19 bp (figure 9). The sample from Sweden (Scandinavia) does not have these duplications. However, the seeds of this cultivated sample were obtained from a Swedish nursery, but are not necessarily of Swedish origin.

The analysis of the ITS matrix generated 186 trees of 138 steps with a CI of 0.96 and a RI of 0.97. The strict consensus tree is shown in figure 10, with bootstrap values are indicated along the branches. The *R. rosea* clade forms a polytomy with no distinction between the different geographic regions, but it is clearly distinct from the outgroups and is supported with a bootstrap value of 100%.

The *trnL-F* and ITS matrices were combined in a single analysis because the ILD test did not detect any significant incongruence ($p= 0.001$) between the two data sets. Maximum parsimony analysis of the combined matrix found 190 trees of 189 steps with a CI of 0.96 and a RI of 0.98. The strict consensus tree is shown (figure 11) with bootstrap values noted on branches. This analysis shows approximately the same pattern as that from the *trnL-F* matrix but the *R. rosea* clade is better supported with a bootstrap of 100%. The *R. rosea* subclade, which comprises North American and Scandinavian samples, is also well supported (95%). The subclade of Poland-Russia is less well supported than in the *trnL-F* matrix analysis.

Preliminary analyses (not shown) of our sequences, in combination with sequences from NCBI, also distinguish a *R. rosea* clade, but with lower support, because the NCBI sequences are shorter, thus adding missing data to our matrix.

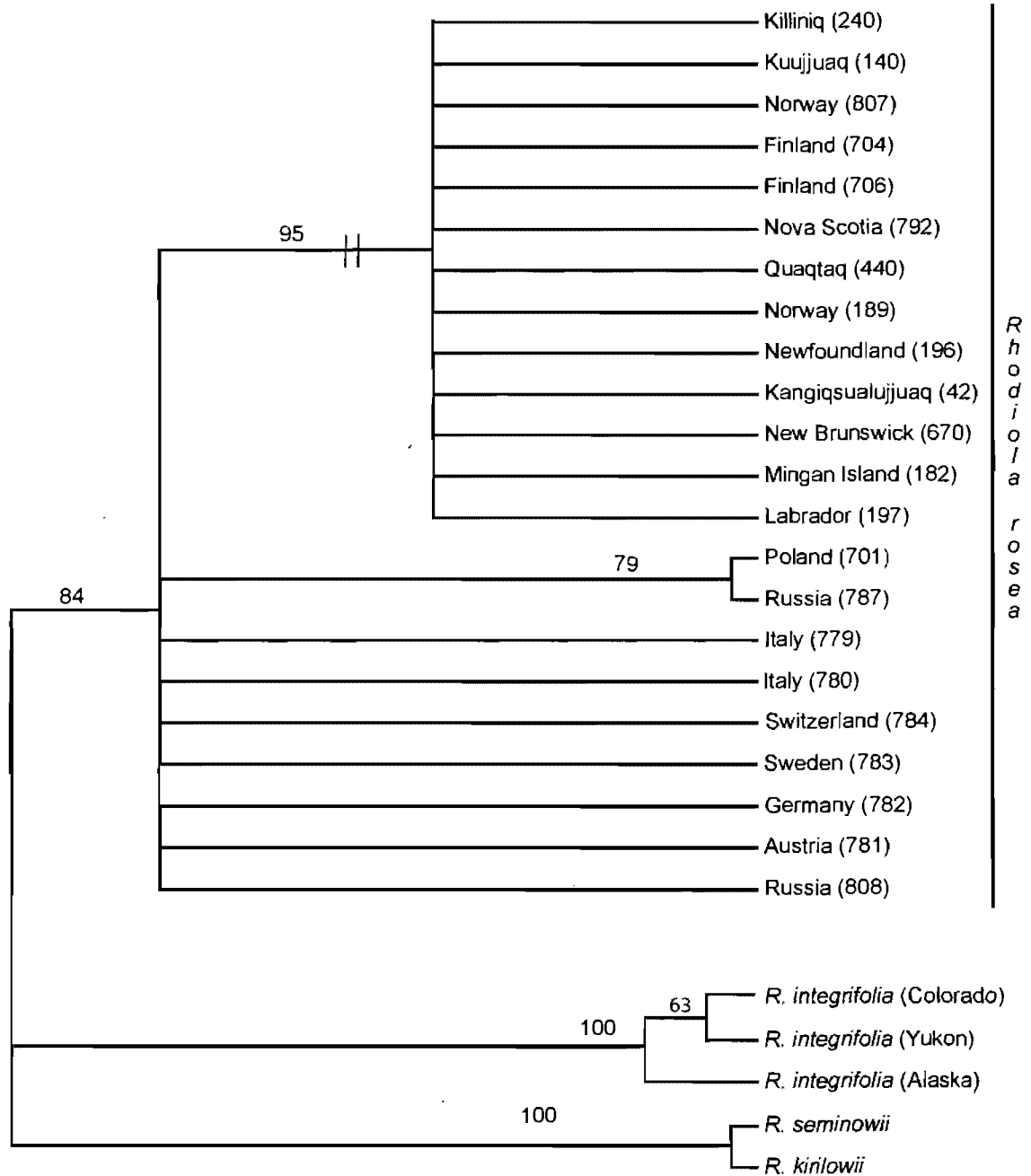


Figure 7: Single maximum parsimony tree obtained from the analysis of the *trnL-F* chloroplast DNA region for *Rhodiola rosea* and outgroups (*R. integrifolia*, *R. seminowii*, *R. kirilowii*). Bootstrap support and indels (represented by vertical marks) are added on the branches.

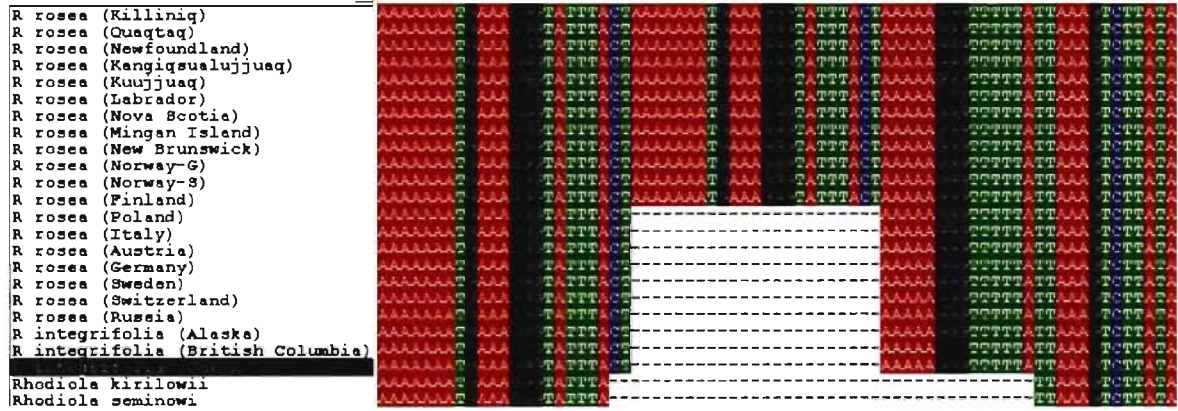


Figure 8: Nucleotide alignment of *trnL-F* chloroplast DNA showing the first 23 bp indel. This indel, which looks like a duplication, is present only in North American and Scandinavian populations. The absence can be seen in other *Rhodiola rosea* populations and in other species of the genus.

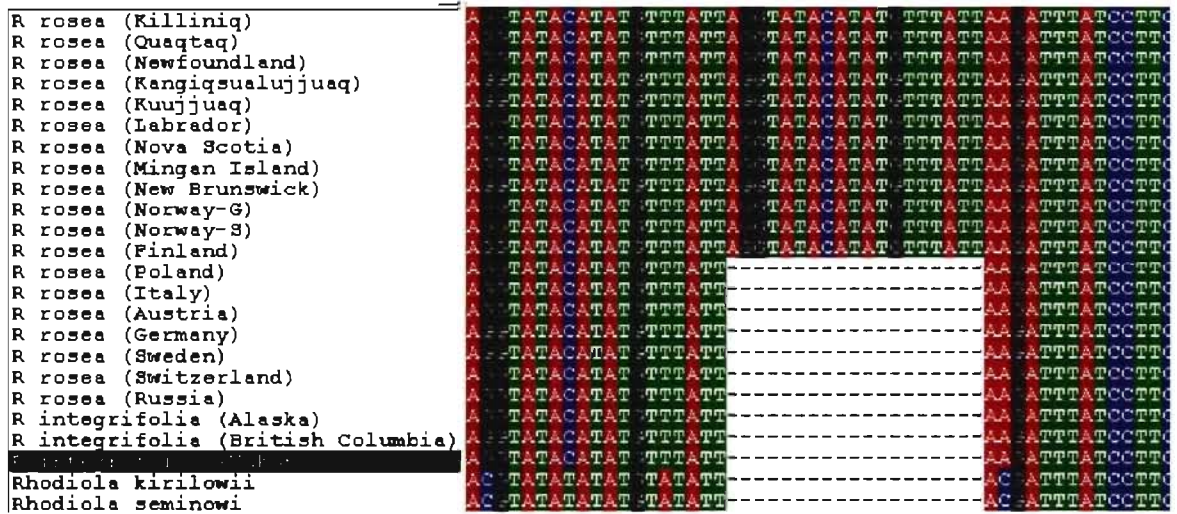


Figure 9: Nucleotide alignment of *trnL-F* chloroplast DNA showing the second 19 bp indel. This indel also looks like a duplication and is present only in North American and Scandinavian populations.

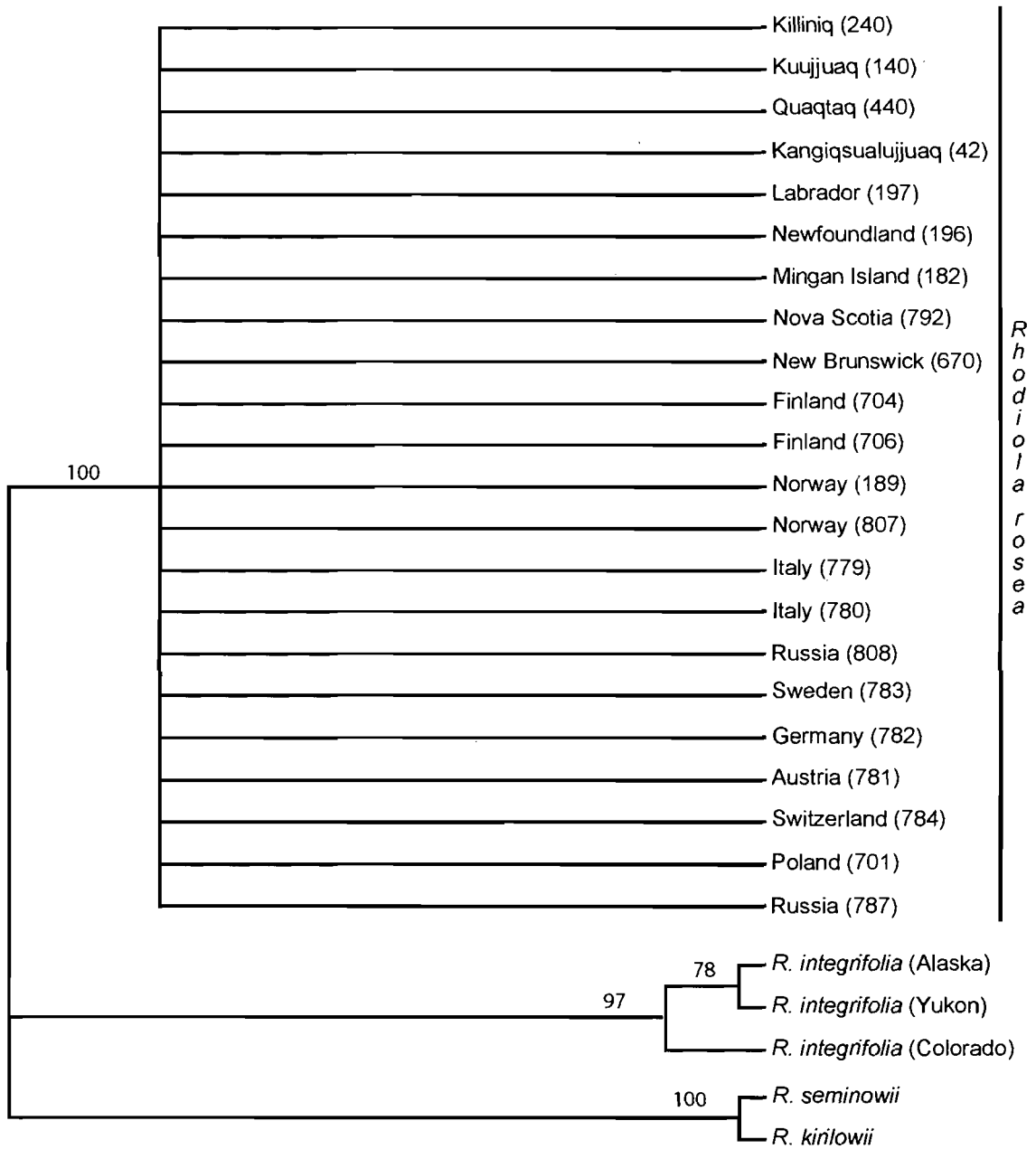


Figure 10: Strict consensus resulting from the maximum parsimony analysis of ITS rDNA region for *R. rosea* and outgroups (*R. integrifolia*, *R. seminowii*, *R. kirilowii*). Bootstrap support values are added above the branches.

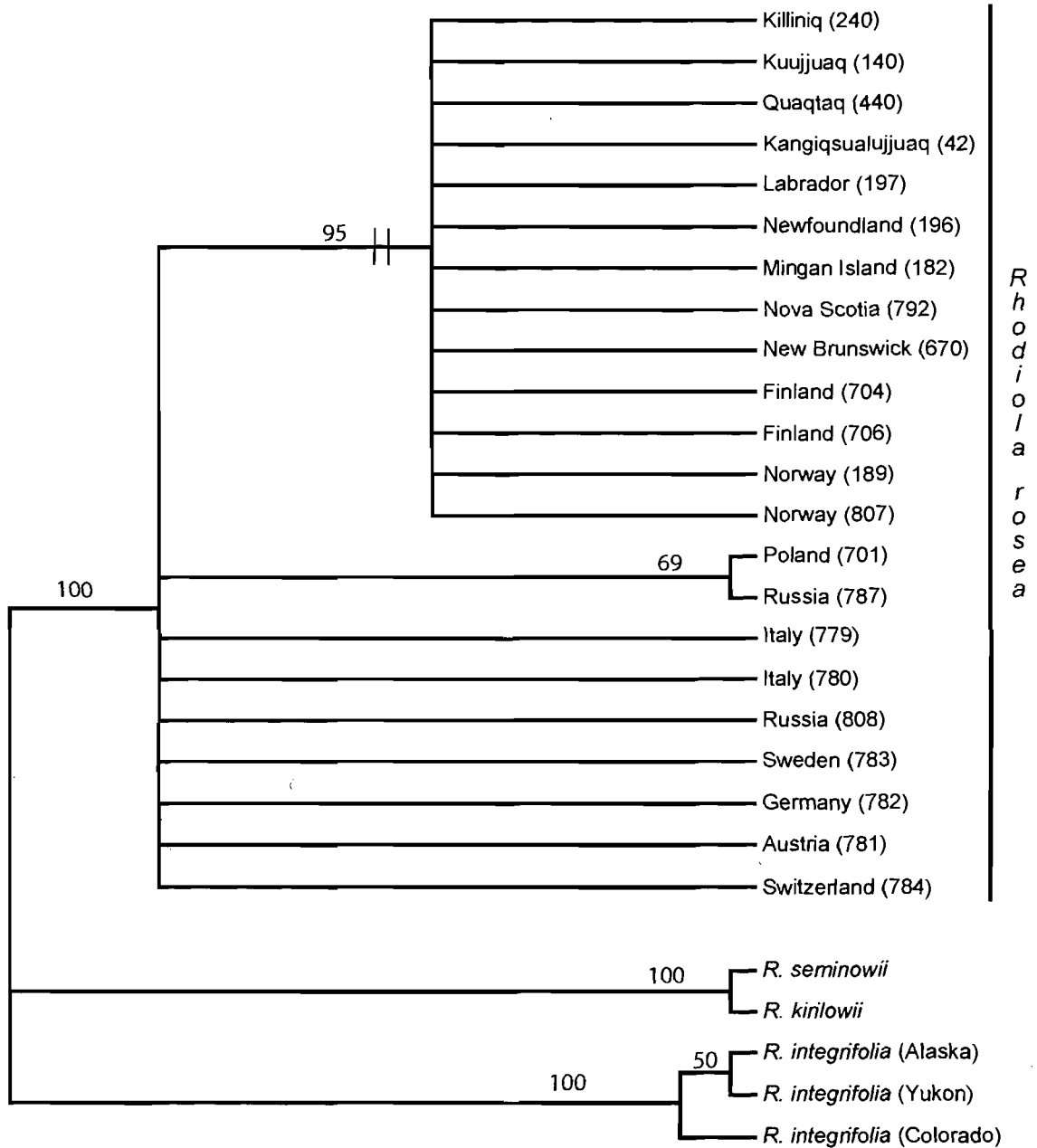


Figure 11: Strict consensus of the combined matrix (ITS and *trnL-F*) of *R. rosea* and outgroups (*R. integrifolia*, *R. seminowii*, *R. kirilowii*) analyzed by maximum parsimony. Bootstrap support values and indels (represented by vertical marks) are added on the branches.

2.4.2 AFLP results

Only unambiguous AFLP fragments were scored as presence/absence for 553 *R. rosea* samples. A total of 60 fragments were scored for the blue combination between 107 and 491 bp in length and 28 fragments for the green combination between 117 and 420 bp in length. All samples were exemplified by a different haplotype, as shown in Table 3 where the number of haplotypes and the number of polymorphic loci is given for each population and region. The overall patterns from the outgroup *Rhodiola* species were easy to distinguish from the *R. rosea* pattern (figure 12).

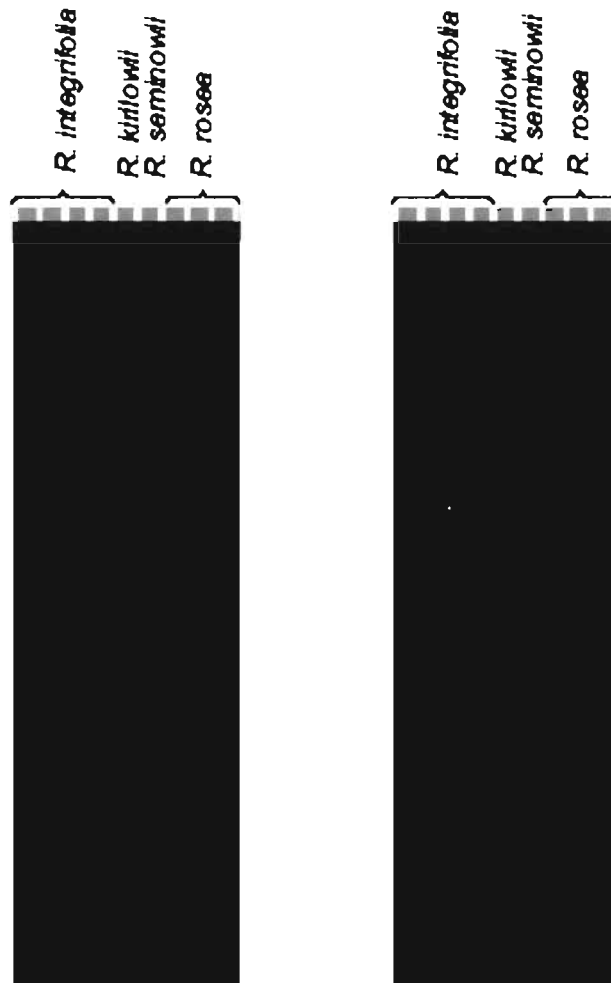


Figure 12: Comparison of AFLP pattern for different *Rhodiola* species for the blue (left) and green (right) combination.

All our tests confirm a geographical component in our data. The Mantel test, at the largest scale with all samples of *R. rosea*, reveals a positive correlation ($r_M=0.412$, $P=0.001$) between genetic and geographic distances. The Ward dendrogram shows geographic clustering of Scandinavian, Eurasian and Maritime samples, but none at the population level even in these well defined region groups. The tree was simplified in order to see the main clusters and the origin of the samples (figure 13; complete tree in Appendix 3). Three main clusters are defined and this is supported by a pcoA analysis with the same samples (data not shown), which also reveals the presence of these same three groups (1-2-3) on the first two principal coordinates.

The relationship between the differently defined regions found in the dendrogram identifies some unexpected groupings such as the distinction between groups 1 and 2 in the dendrogram. The two groups share some individuals from the same populations. Group 1 is only composed of samples from Nunavik and Mingan. Within group 2, Scandinavian samples cluster into three closely related groups. Two of them cluster together and the other clusters with a group formed by Mingan and Nunavik samples. These form a sister group to a cluster comprised of Mingan and Nunavik samples. Nunavik and Mingan samples can be found randomly in groups 1 and 2, suggesting a lack of resolution at a regional level for these two regions (see Appendix 2). There is no apparent differentiation between Nunavik and Mingan samples. Group 3, sister to the group 1 and 2 dichotomy, indicates a relationship between two groups of Maritime samples and the grouping of the six samples from Eurasia.

Other Mantel tests were performed on subsets of the samples and confirmed the similarity of geographic and genetic distances with the same threshold ($P=0.001$). The strongest positive correlation was found between geographic and genetic distances at the North American level ($r_M=0.642$, $P=0.001$). When we removed the Maritime samples, the correlation found in the Mantel tests was weaker ($r_M=0.339$, $P=0.001$). When samples from

both the Maritimes and Mingan were removed, with only Nunavik samples remaining, the correlation observed decreased ($r_M=0.267$, $P=0.001$).

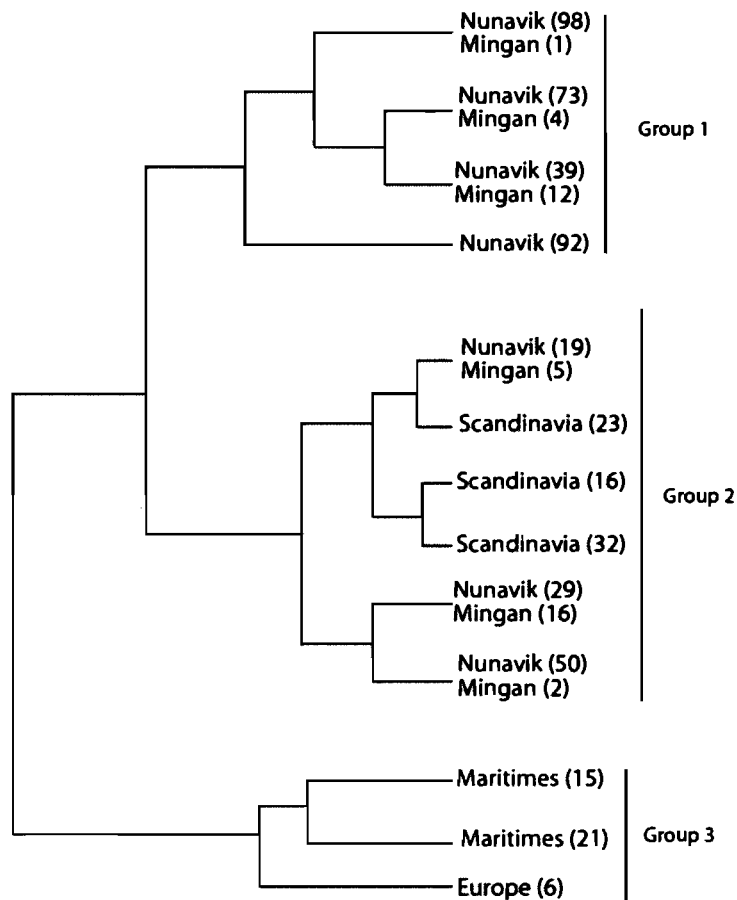


Figure 13: A simplified dendrogram of *Rhodiola rosea* clustering using Ward's algorithm with AFLP data. The main geographic regions are colored, followed by the number of samples for each in parentheses. The complete tree is presented in Appendix 3.

Table 4 : Summary of the partition of variance (AMOVA) among and within different groups of <i>R. rosea</i>					
N	Group and level of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
	Ungava Bay (Nunavik)				
3	3 subregions : (NE) (NW) (NS)				
	Among subregions	2	340.05	1.30	11.76
	Among populations within subregions	29	979.19	2.08	18.88
	Within populations	372	2851.59	7.67	69.35
	North America				
3	3 subregions : (N-Mg-Ma)				
	Among subregions	2	627.59	4.21	28.81
	Among populations within subregions	42	1582.89	2.79	19.06
	Within subregions	436	3323.79	7.62	52.13
	Geographic regions				
5	5 regions : (N-Mg-Ma-Sc-Eur)				
	Among regions	4	1027.16	3.67	26.27
	Among populations within regions	52	1759.16	2.63	18.84
	Within populations	501	3839.74	7.66	54.89
	Populations				
1	57 populations				
	Among populations	56	2786.32	4.32	36.04
	Within populations	501	3839.74	7.66	64.07
	Experimental plate division				
1	10 Sequencing plates				
	Among plates	9	1698.63	2.77	22.51
	Within plates	644	6140.12	9.53	77.49
All P-values ($P(\text{rand} \geq \text{obs})$) were <0.001					
Geographic region (NE: Ungava Bay-East, NS: Ungava Bay-South, NW: Ungava Bay-West, N: Ungava Bay (Nunavik), Mg: Mingan Islands, Ma: Maritime, Sc: Scandinavia,					
N: Number of groups in the analysis					
d.f.: Degrees of freedom					

Different partitions of variance for different groupings are represented in Table 4. The AMOVA reveals that more than a third of the allelic variation is distributed between populations, and that most of the variation is from the population itself. The lowest allelic variance (11.76 %) among subregions was found in the Nunavik region, between the three main regions around Ungava Bay (South, East and West), whereas the highest allelic variance 69.35% was found within these Nunavik populations. In each analysis, most of the allelic variance is found within populations or regions instead of among populations or

regions. However, because our goal was not a population level study, our sampling is not extensive enough within the different regions for this type of analysis. The irregular distribution of the samples among the populations and the regions probably influences our analyses and at least the number of degrees of freedom. A more extensive sampling, as suggested previously, will probably help to resolve a part of the non-resolved clustering analysis. Alternatively, the analysis of more fragments by using other sets of primers should increase the resolution at the population level.

2.4.3 Experimental error test

The AFLP replicates were not included in the analysis, but were used to evaluate technical error rates. The comparison of the data matrix of those replicates showed an error rate of 7.8%. This error rate for genotyping mistakes is slightly higher than the usual range between 2 to 5% (Bonin et al. 2007). The comparison of the scoring matrix for the same replicates gives us an error rate of 10%, which includes laboratory and scoring errors. According to Bonin et al. (2007), scoring errors contribute more to mistakes regarding the data. Here, experimental errors seem more important and they can be attributed to different variables such as DNA quality, human errors, and genotyping variations (observed with Genographer between the experimental plates that were analyzed at different times). The evaluations of bias from experimental laboratory manipulations were done with different tests. The partition of allelic variance among plates shows 22.5% compare to 77.5% of variation within plates. A part of this variance among plates is expected due to sampling differences among plate. Redundancy analysis on different explicative variables for our allelic variance reveals that running plates explains only 3.5% of the allelic variance if we remove the population contributions (populations were often analyzed on the same plate). We can compare this value to other variables that contribute more to the allelic variance: 21.6% from the population variable and 15.7% from the five geographic regions as delimited in the AMOVA analysis. All this shows that even if there are some differences in

the alignment in Genographer that reveals plate differentiation, those differences only slightly affected the analyses.

2.5 Discussion

2.5.1 Taxonomic distinction and medicinal perspectives

The aim of this research was to determine if and how the Nunavik populations are related to the Eurasian ones. We evaluated the genetic and taxonomic relationships between them, in order to assess Nunavik populations as possible medicinal candidates for future cultivation. In particular, we compared the Nunavik populations with those from Russia that have been considered and studied for their medicinal properties for several decades.

Our maximum parsimony analyses (figures 7-10-11) reveal a well-supported clade composed of *R. rosea* samples from Europe, Russia and eastern North America. This distinction between the *R. rosea* clade and the outgroup species, *R. integrifolia*, *R. kirilowii*, *R. seminowii*, suggests that samples from *R. rosea*, independently of their origin, are more closely related to each other than to other members of the genus. Our AFLP patterns (figure 12) also allow us to distinguish between *R. rosea* and other members of the genus. Clustering analysis with AFLP data including the outgroup species (data not shown) clearly separate them from all samples of *R. rosea* in the dendrogram. These analyses strongly suggest that the Nunavik populations are not, at the species level, taxonomically distinct from the Eurasian taxon.

Even though we consider all our *R. rosea* samples as the same taxon because of the strong support for the monophyly of this species with respect to the outgroup taxa, variation remain and results in the grouping of one subclade of *R. rosea* that includes North American and Scandinavian, but not Eurasian samples (figures 7 and 11). Samples in this subclade share two short duplications in the *trnL-F* marker that are absent in Eurasian

samples. The rest of the *R. rosea* samples from Central Europe and Russia forms a polytomy, but are grouped together in the AFLP clustering analysis (figure 13). The AFLP dendrogram also reveals clustering of some regions within *R. rosea* such as grouping of the Maritime and Scandinavia samples. We observed morphological differences between the Finland and Nunavik specimens, which have thicker and shorter leaves than specimens from Central Europe or Russia, where the leaves can be more lanceolate and dentate. Morphological differences between Finnish and Central Europe samples of *R. rosea* were also reported by Asdal et al. (2006).

Phytochemical analyses also identified some regional differences. The study by Filion et al. (2008) on four key phytochemical markers (salidroside, rosavin, rosarin, rosin) for a similar geographic sampling showed that Nunavik populations possess the key compounds, but in lesser amounts than the Siberian populations. The presence of these phytochemical markers, which are specific to this species, are considered to contribute to its medicinal properties (Brown et al. 2002). It thus confirms the close phytochemical relationship between Siberian and Nunavik populations of *R. rosea*. New compounds, that are yet to be identified, were also found in the Nunavik populations, but are absent in the Siberian ones (Filion et al. 2008). Avula et al. (*in press*) evaluated fourteen compounds, of which four were not detected in *R. rosea* from Nunavik but were present in Eurasian populations, and others were detected but under the limit of quantification. Those studies indicate differences between Nunavik and Russian populations of *R. rosea*, but also demonstrate the presence of similar key compounds.

In conclusion, our data emphasize that Nunavik populations belong to *R. rosea* despite the regional variation observed. The intraspecific variability observed among the regions (morphology, molecular or phytochemical) is likely the result of their independent evolution, and need not be recognized as a distinct taxonomic variety or subspecies. Variability within a species is dependant on different evolutionary processes such as mutation, gene flow, genetic drift and natural selection, which may differ among regions. Morphological and phytochemical variations may also be related to environmental

variables. For example, Avula et al. (*in press*) noted that the quantity of some phytochemical markers was variable depending on the samples analyzed. Similarly, the quantity of phytochemical compounds was reported to vary depending on the distribution and the age of the plants (Furmanowa et al. 1995). György (2006) also noted that the detection of compounds depends on the plant origin, the extraction and analysis method used. Fillion et al. (Fillion 2008) also found variations according to the plant gender (pistillate, staminate, hermaphroditic) and the age. Thus, despite infraspecific and regional variation, we consider Nunavik populations of *R. rosea* to be good candidates for future local cultivation and exploitation, following further phytochemical and pharmacological assays and investigations.

2.5.2 Barcoding

Over its wide distribution, *R. rosea* has been latinised differently more than twenty times (Ohba 2002), excluding the local common names. Despite the recent and thorough taxonomic account on the genus *Rhodiola* by Ohba (2002) many authors still use the old nomenclature. Formerly, *R. integrifolia* was included as a subspecies in *R. rosea*. Clausen (1975) refers to them as two species and studies of chromosome counts have revealed the difference between *R. integrifolia* and *R. rosea* (Uhl 1952; Amano et al. 1995). Nonetheless, confusion persists in the taxonomic determination of plant material. The nomenclature remains crucial for correct identification, but often depends on the regional flora used where subspecies and varieties sometimes are recognized.

Sequence information can be useful for plant identification. DNA barcoding is an idea that has spread in the scientific community. It aims to easily identify all types of recognized organisms (Hebert et al. 2003). To reach this goal, nucleotide sequences of specific markers from as many species as possible are needed and must be freely accessible. Different genomic regions have been proposed. The mitochondrial locus

cytochrome *c* oxydase 1 (CO1) has been adopted for animals as a single uniform DNA barcode (Erickson et al. 2008), but the low level of variability in mitochondrial DNA in plants makes this marker unsuitable. For plants, more than one marker will likely be needed to discriminate between species because there is no single marker variable enough to discriminate all plant species. Multiple markers will also help to account for hybridization and polyploidy events between plant species (Savolainen et al. 2005). To date, there is no consensus on the DNA markers that should be used for plants as a general barcode, partly due to the relatively low rates of nucleotide substitution observed in plastid markers (Erickson et al. 2008). A few markers have been proposed for plastid loci: *trnH-psbA* intergenic spacer (Kress et al. 2005), *rbcL* (Baxter 2004; Chase et al. 2005; Newmaster et al. 2006), *matK* (Stoeckle 2003; Lahaye et al. 2008) or the *trnL* (UAA) intron (Taberlet et al. 2007); for nuclear DNA, the internal transcribed spacer (ITS) (Stoeckle 2003; Chase et al. 2005; Kress et al. 2005) or some low-copy nuclear genes; or different combinations of these markers: *atpF-atpH*, *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* (Chase et al. 2007; Kim et al. 2007; Fazekas et al. 2008; Lahaye et al. 2008). The weakness of plant DNA barcoding is that a consensus is needed on which DNA region should be used. Otherwise, disparate information will accumulate for different species, where different markers have been used as barcodes, and this puzzling information will be difficult to use for identification and comparison.

Despite the lack of consensus, barcoding can have important applications for identification of medicinal plants, if a well-organized system is established. The misidentification of medicinal plants is a serious problem that causes adulteration of some medicinal products and may sometimes affect the health of users throughout the world (Brigham et al. 2004). It was the case for products containing *Actaea racemosa*, which was almost abandoned by the Canadian agency, NHPD. Health problems were caused by products having other *Actaea* spp., like the poisonous non-medicinal plant, *Actaea rubra*. For an even closer example, our sequence analysis revealed a misidentification of some Canadian *R. rosea* plants under cultivation. Some cultivated samples that originated from

wild populations from western North America were identified as *R. rosea*, but their origin as well as our analysis, suggest they are *R. integrifolia*. In Yukon, herbalists have used and sold what they thought were *R. rosea* (Cuerrier, pers. comm.). Health Canada has recently established standards for natural health products that regulate, among others, the quality of the product by controlling the botanical identity (Santé Canada 2006). Various Canadian associations together have produced recommendations for good practices associated with plant identification for the herbal industry (Brigham et al. 2004).

Charlie Chang Liu (DNA barcoding Chinese medicinal plants) (Chan et al. 2007) and the Smithsonian Institution have begun to develop a barcode library for medicinal plants, using different markers (Pennisi 2007). A consensus for the compilation of medicinal plant DNA sequences is expected, so that other groups may add sequences to this database. As such our sequences have been submitted in Genbank, so that ITS and *trnL-F* sequences generated for *R. rosea* can be used as an initial barcode to taxonomically validate samples of this medicinal plant. This type of information could be useful for future commercial exploitation of *R. rosea*, to prevent misidentification before market distribution. Furthermore, with the two informative duplications (figures 10-11) in the chloroplast *trnL-F* region, it is possible to distinguish if the plant are of of Eurasian or of Scandinavian-North American origin.

2.5.3 Phylogeography, environment and population structure

The chloroplast *trnL-F* region reveals two duplications (figures 8-9) in the *R. rosea* subclade comprising North American (Maritimes, Nunavik, Mingan) and Scandinavian (Norway and Finland) samples. This cluster is similar to one observed in *Arabis alpina* where only one haplotype of *trnL-F* was found for the samples from Canada, North Europe, Greenland, Iceland and Svalbard (Koch et al. 2006). In the case of *R. rosea*, the subclade is geographically and environmentally distinct. In contrast to the Eurasian samples (Russia

and Central Europe) that are from high altitude regions, such as the Alps and Altai Mountains, this North American-Scandinavian subclade comprises coastal samples on both sides of the Atlantic Ocean.

Different dispersal hypothesis are possible to explain the distribution of this species. Based on our plastid and AFLP results, we propose three possible dispersal hypotheses for *R. rosea* that imply long-distance events. The first hypothesis implies a long-distance dispersal from Scandinavia to North America and the colonization of the northern part following the ice-sheet retreat by the populations that survived south of the ice-sheet. The second hypothesis is a variant of the first which implies northern and southern refugia during the last glaciations. The third hypothesis invokes a first dispersal event from Europe to North America during early Quaternary or late Tertiary via the North Atlantic land bridge and a second event from North America to Scandinavia during or after the last glaciations. This hypothesis is similar to that proposed for the amphi-atlantic *Saxifraga paniculata* (Reisch 2008). Other regions could have played a role in the dispersal of *R. rosea*, but more extensive sampling is needed to confirm our hypothesis.

Our results (figure 13 and appendix 2) show more geographic structure among regions than population structure within regions. The Mantel test on North American individuals shows a strong correlation between geographic and genetic distances, higher than when we used the overall sampling. With this result, we expect some geographic differentiation in our North American sampling. This contrasts with the lack of resolution observed for Nunavik and Mingan samples in the dendrogram. The evaluation of the allelic variation from the three subregions of our North American sampling (Nunavik, Mingan, Maritimes) shows that only a third of the variation is between these subregions. A Mantel test on a more restrictive part of the sampling, excluding the Maritime samples that are strongly grouped in the cluster analysis, reduced considerably the correlation. For this reason, most of the support for the Mantel test comes from the Maritime group, which is the only differentiated group on the dendrogram for the North American continent. Of the areas sampled, the Maritimes is the first region that was deglaciated around 12,000 years

BP and was occupied by tundra (10,000 years B.P) (Delcourt and Delcourt 1993) compared to Nunavik (Ungava Bay), which was completely ice-free 7,000 years BP, except for some eastern parts of Ungava Bay that were ice-free around 10,000 years BP (Brouillet and Whetstone 1993). The earlier retreat of the ice-sheet from the Maritimes allows more time for regional differentiation after the colonization. Maritime samples are differentiated by the AFLP dendrogram but morphological variation was also observed mostly in the etiolation of the plant, the leaf color and their height. These variations can be due to acclimatizing to environmental conditions that are different from subarctic or high altitude regions. Our AFLP analyses (figure 13) also indicate a close relationship between the two groups of Maritime samples and the samples from Eurasia. These results contrast with those of the sequence analysis, where the Maritime samples group with the North America-Scandinavia clade. This pattern could be explained by the second and third dispersal hypothesis described above.

Our subdivision of the Nunavik populations on each side of the Ungava Bay was not confirmed by the partitioning of the allelic variance. Most of the variance is found within populations instead of among the subregions. The dendrogram also reveals a random distribution of the Nunavik samples. The Mantel test based only on Nunavik samples indicates the lower correlation between geographic and genetic distances. Nothing indicates that these populations are distinct (or differentiated) in different subgroups, so our Nunavik subdivision was not required. The colonization of northern regions, such as Nunavik and Mingan, is too recent to show regional differentiation by clustering together, but the genetic uniformity also could be the result of gene flow during postglacial colonization (Reisch 2008).

Considering all our sampling, even in the regional grouping, there is no population structure in the dendrogram. The allelic analysis of populations also reported that two thirds of the variation occurs within populations rather than among them. The lack of population differentiation is probably due to the short time since their colonization. Several temporal,

geographic and evolutionary variables have affected *R. rosea* populations, so in each case there are multiple possible hypotheses.

2.5.4 Conclusions

In conclusion, our data emphasize that Nunavik populations belong to *R. rosea* despite the regional variation observed. With further phytochemical trials, this offers a possibility to Nunavik Inuits to cultivate this resource as a Nunavik *R. rosea*. The sequences obtained could also be useful for barcoding to verify the identity of the species under cultivation or collected before processing for market utilization. Scandinavian and North American populations are genetically more similar, sharing two duplications in the chloroplast *trnL-F* sequences. The distribution of this amphi-Atlantic species and the observed phylogeographic pattern suggest a common dispersal history for populations on either side of the ocean. Geographic differences were observed in our analyses but no differentiation was found at the population level. In North America, only the Maritime samples form a clearly distinct geographic entity. Our analyses suggest that the Nunavik region is not genetically differentiated from the rest of the North American populations, perhaps due to the short time since the last glaciations.

Chapitre 3

Conclusion

3.1 Conclusions générales

Le résultat de nos recherches a permis de confirmer que les populations de *R. rosea* du Nunavik ne sont pas suffisamment différentes des populations retrouvées en Eurasie et en Scandinavie pour qu'il s'agisse d'une espèce différente. En effet, les analyses de séquences (*trnL-F*, ITS et ITS+*trnL-F*) présentées aux figures 7, 10 et 11 montrent clairement que les échantillons de *R. rosea* forment un groupe monophylétique bien supporté qui se distingue des autres membres du genre. Ils sont donc plus proches entre eux qu'avec d'autres espèces. Nous considérons que *R. rosea* du Nunavik fait partie du même taxon étudié depuis quelques dizaines d'années en Russie, malgré quelques variations intraspécifiques. C'est donc dire que les Inuits possèdent sur leur territoire une ressource potentiellement commercialisable. De plus, cette ressource offre un profil phytochimique et génétique assez distinct des individus provenant de la Russie pour en faire un produit typé Inuit ou Nunavik ayant ainsi un attrait intéressant pour la vente.

Les séquences générées pour les régions ITS et *trnL-F* sont disponibles sur Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Elles pourront servir de code à barres (barcode), pour l'identification ou la certification de cette espèce, quoique ces régions du génome ne soient pas officiellement utilisées comme barcode chez les plantes. L'unicité du choix de la ou les région(s) d'ADN chloroplastique ou nucléaire comme code à barres pour les végétaux serait souhaitable afin d'utiliser pleinement et efficacement ces données, par exemple pour confirmer l'identité taxonomique de plantes médicinales.

3.2 Phylogéographie

Les séquences d'ADN chloroplastique *trnL-F* nous ont révélé deux duplications (figure 8-9) présentes seulement chez une partie de nos échantillons de *R. rosea* provenant d'Amérique du Nord (Nunavik, Maritimes et Minganie) et de Scandinavie. Un regroupement similaire a été observé chez *Arabis alpina* où un seul haplotype de *trnL-F* avait été retrouvé pour le Canada et le Nord de l'Europe (Koch et al. 2006), leur regroupement comprenait également d'autres régions (Groenland, Islande et Svalbard) non-présentes dans notre échantillonnage. Ces duplications supposent une relation plus étroite entre les populations de ce sous-groupe comparativement à celles qui sont d'Eurasie (Russie, Europe centrale). Cette différence se reflète également dans les types d'habitats occupés par *R. rosea*. Les populations d'Eurasie se retrouvent dans des régions alpines, tandis que les populations en Amérique du Nord et en Scandinavie se retrouvent généralement sur les côtes de l'océan Atlantique.

Les données chloroplastiques combinées aux différents résultats obtenus avec les analyses d'AFLP ont permis d'émettre trois hypothèses pour expliquer la dispersion de *R. rosea* en Amérique du Nord. Dans les trois cas, la dispersion par longue distance peut être invoquée car il est possible que des propagules (minuscules semences ailées) aient traversé à l'aide du vent sur la glace (Clausen 1975). Dans nos cas de dispersion longue distance, nous présumons que *R. rosea* provient des régions scandinaves, mais il est possible que d'autres régions soient impliquées.

La première hypothèse est que des propagules en provenance de Scandinavie aient traversé jusqu'en Amérique du Nord probablement durant ou après la dernière glaciation du Quaternaire (Wisconsinien). Peu importe l'époque de cette dispersion, les populations ont poussé au sud de la calotte glaciaire ou le long de la côte est exposé car le niveau de la mer avait jusqu'à 200 m de moins (Brouillet et Whetstone 1993). Puis la colonisation vers le Nord a suivi le retrait des glaciers jusqu'à la présente distribution.

La deuxième hypothèse invoque la présence de refuge au sud et à l'est de la couverture de glace lors de la dernière glaciation ainsi que la possibilité de refuges au nord de celle-ci. Certaines parties à l'est de l'île de Baffin étaient possiblement non recouvertes de glaces, et des nunataks exposés pourraient avoir été présents (Delcourt et Delcourt 1993). Les possibilités de refuges plus au nord existent, mais elles sont mal connues. On suppose donc que la recolonisation aurait pu se faire dans les deux sens. Les refuges au sud ayant permis de recoloniser les Maritimes, tandis que le Nunavik aurait été recolonisé par les refuges au nord ou par d'autres événements de dispersion longue distance en provenance de la Scandinavie ou du Groenland.

La troisième hypothèse propose qu'une première dispersion longue distance ait eu lieu de l'Europe vers l'Amérique du Nord probablement à la fin du Tertiaire par le passage de l'Atlantique Nord ou lors des premières glaciations du Quaternaire. Durant chacune des glaciations, les populations de *R. rosea* ont poussé au sud des glaces, puis ont recolonisé le nord au fur et à mesure que les glaces se sont retirées. Une seconde dispersion longue distance de l'Amérique du Nord (Nunavik) vers la Scandinavie a eu lieu grâce au vent qui souffle majoritairement de l'ouest. Cette seconde dispersion expliquerait la présence des duplications en Amérique du Nord et en Scandinavie. Il est difficile d'évaluer le moment de cet événement. Une dispersion avant la dernière glaciation expliquerait pourquoi les individus de la Scandinavie ont eu le temps de se différencier de ceux d'Amérique du Nord (figure 13). Cependant une dispersion aurait aussi pu survenir lors de la dernière glaciation. L'effet d'étranglement permet seulement à certains individus de survivre, ainsi les populations de la Scandinavie peuvent être assez différentes de la population mère. Les quelques survivants ont pu coloniser les nouveaux habitats libres de glace (effet fondateur), cela expliquerait le peu de variation génétique menant au regroupement des individus de Scandinavie sans distinction de leur origine (Norvège ou Finlande). Une dispersion similaire a été rapportée pour l'espèce amphi-atlantique *Saxifraga paniculata*, où une grande différenciation entre les échantillons nord-américains et européens a été observée. On explique la différenciation par un premier événement de dispersion avant ou au début

des glaciations, où ils ont survécu dans les refuges plus au sud des glaces, suivi d'une recolonisation postglaciaire vers l'Islande et le Nord de la Norvège (Reisch 2008).

Ces hypothèses préliminaires nécessitent d'être confirmées par un échantillonnage plus étendu et par des analyses plus poussées. Nos hypothèses de dispersion ne permettent pas d'expliquer toutes les relations observées dans le dendrogramme (figure 13), plusieurs d'entre elles étant inattendues. La deuxième et la troisième hypothèse tente d'expliquer le regroupement entre les Maritimes et l'Europe. La présence de regroupements géographiques observés au sein du dendrogramme pour la Scandinavie, les Maritimes et l'Eurasie contraste avec notre analyse de variance allélique (Tableau 4). On s'attend à peu de différenciation entre les regroupements géographiques puisque seulement un quart de la variance allélique se retrouve entre les régions. Ce résultat peut être dû à la surreprésentation des échantillons du Nunavik dans cette analyse, région qui ne présente aucun regroupement particulier.

Aucun regroupement au niveau des populations n'a été observé, et ce peu importe la région. Le temps de colonisation depuis la dernière glaciation étant relativement court, il est certain que certaines régions, et donc populations, ne se soient pas encore bien différenciées. À plus petite échelle, la présence de flux génique entre les populations ou son interruption récente peut expliquer en partie l'absence de structure au niveau des populations. Plusieurs variables géographiques, temporelles et environnementales peuvent avoir affecté les populations de *R. rosea* rendant difficile l'explication de leur histoire.

La région des Maritimes est la seule en Amérique du Nord qui semble bien différenciée dans notre dendrogramme. Les échantillons provenant du Nunavik et de Mingan y sont répartis aléatoirement. Le test de Mantel pour l'Amérique du Nord confirme la relation entre la distance génétique et géographique. Cependant les échantillons provenant des Maritimes sont principalement responsables du fort support de cette corrélation. Les échantillons provenant des Maritimes se distinguent aussi sur le plan morphologique par leur taille, leur étiolement et la couleur de leurs feuilles. Les conditions

environnementales sont également différentes des populations situées plus au nord, elles peuvent expliquer une partie de cette variance morphologique. Le Nunavik est la région ayant été colonisée la plus tardivement dans notre échantillonnage, il n'est donc pas surprenant de ne pas y retrouver de structure quelconque.

3.3 Perspectives

La science, les idées et les hypothèses sont en constante évolution. Chaque projet a un début, un milieu, mais rarement une fin. Plusieurs perspectives sont possibles pour continuer ce projet. Afin de mieux affiner nos hypothèses de dispersion, il faudrait avoir un échantillonnage comprenant plus d'individus provenant de populations naturelles en incluant les régions suivantes : Labrador, Terre-Neuve, côte est américaine, Groenland, Islande, Irlande, Écosse, Angleterre, Svalbard, le centre de l'Europe, la Russie (Sibérie, Altaï et autres régions) et le Japon. Avec un échantillonnage plus étendue, il pourrait être possible de faire des réseaux d'haplotypes en utilisant des marqueurs chloroplastiques comme *trnL-F* ou autres. Ces réseaux pourraient aider notre compréhension de la migration de cette espèce au cours du temps surtout lors de la dernière glaciation. Dans la même lancée, il pourrait aussi être intéressant de dater les différents évènements de dispersion. Au niveau des analyses des AFLP, la différence de taille d'échantillonnage entre les populations a pu affecter nos résultats. Un échantillonnage plus constant et plus élargi, en utilisant plus de fragments et plus de combinaisons d'amorces permettraient sûrement d'obtenir une plus grande résolution pour les analyses de regroupement. Il découlerait également de ces analyses une plus grande identification et délimitation génétique des populations du Nunavik surtout si elles sont couplées à des analyses phytochimiques et pharmacologiques.

Un des buts initiaux était de créer un test PCR rapide et fiable pour faciliter la certification taxonomique de cette plante médicinale, étant donné son potentiel commercial.

Nous voulions développer des amorces spécifiques à un taxon en s'inspirant de ce qui a déjà été développé chez les animaux (Noël et al. 2004; Tessier et al. 2004; Noël et al. 2008). Nous voulions à l'aide d'une seule amplification pouvoir vérifier si nous étions en présence de l'espèce recherchée et effectuer un contrôle positif direct de l'échantillon. Nous avons créé trois amorces : une spécifique à *R. rosea*, une non spécifique (région conservée) et une amorce en sens contraire. Cela nous aurait permis de faire une PCR en utilisant 3 amorces en même temps pour obtenir deux fragments (un spécifique et un non spécifique) pour les échantillons de *R. rosea* et un seul fragment (non spécifique) pour les autres échantillons. Le contrôle positif permet de s'assurer que l'absence du fragment spécifique n'est pas due à une mauvaise amplification ou à une mauvaise qualité d'ADN. Malgré les efforts, ce test basé sur une amplification par PCR avec des amorces spécifiques à *R. rosea*, n'a pas vu le jour. Les deux régions d'ADN utilisées (ITS et *trnL-F*) n'étaient pas suffisamment variables pour cette application et la présence de multiples copies chez ITS (Chase et al. 2007) n'a pas donné de résultats satisfaisants. Cependant, cette approche pourrait vraiment aider l'identification et la certification taxonomique. Il serait donc intéressant de poursuivre dans cette direction en explorant d'autres régions chloroplastiques. Et cela est d'autant plus important que le Canada s'est muni en 2004 d'une politique sur les produits de santé naturels. Cette politique est régie sous la bannière de la Direction sur les Produits de Santé Naturels (DPSN). Cet organisme demande aux divers fabricants de faire produire un certificat d'authenticité. Il serait donc judicieux de poursuivre un tel travail pour une éventuelle commercialisation des produits à base du *Rhodiola rosea* du Nunavik ou tout simplement pour s'assurer que la matière première utilisée par d'autres compagnies est bel et bien de *R. rosea*.

Le projet *Rhodiola rosea* a beaucoup progressé. Les analyses de Vicky Filion (Filion 2008; Filion et al. 2008) ont permis de valider la présence des composés phytochimiques considérée comme cruciale pour les propriétés médicinales. La distribution de *R. rosea* au Nunavik est maintenant mieux connue grâce aux différentes excursions lors du travail de terrain. Les récoltes de semences en 2005 et 2006 ont permis de partir des

semis en serres en levant la dormance par l'ajout de gibbérelline. La première plantation plutôt modeste a été réalisée à l'été 2006 près de la communauté de Kangirsualujjuaq (Nunavik). Malgré nos appréhensions et la condition des semis après le transport en avion (Montréal à la communauté) ainsi que le lieu de plantation, le suivi à l'été 2007 a été concluant. Un taux très élevé de plantules avait survécu au premier hiver. La deuxième année, nous avons fait germer un grand nombre de semences et avons évalué les populations ayant un meilleur taux de germination et de survie après le repiquage des semis. Les taux de germination variaient d'une population à l'autre selon le lieu et la date de récolte des semences, mais les taux de survie des semis étaient relativement constants. En 2007, en plus du suivi de la plantation de l'année précédente, Vicky Fillion a effectué une deuxième plantation près du premier site dans la même communauté. Des essais de plantation ont également été faits dans la région de l'Outaouais, de la Gaspésie et dans les Laurentides (par la Clef des champs). Il faut maintenant attendre quelques années pour que les plants semés atteignent leur maturité. Le projet est toujours en cours d'évaluation par Nunavik Biosciences Inc. Un suivi au niveau de la quantité des composés phytochimiques devra être fait avant la mise en marché. Le temps nous permettra de voir si le projet s'ouvrira sur la mise en marché de produits naturels à base de *R. rosea* du Nunavik. Déjà, des travaux préliminaires ont montré que *R. rosea* du Nunavik possédait une activité anxiolitique. Ces mêmes extraits sont actuellement évalués quant à leurs propriétés antitumorales et antidiabétiques. Avec nos recherches à l'appui, *R. rosea* du Nunavik s'inscrit comme une plante ayant un excellent potentiel commercial pour les Inuits du Nord québécois.

Bibliographie

Abbott, R.J., et Brochmann, C. 2003. History and evolution of the arctic flora: in the footsteps of Eric Hulten. *Molecular Ecology* **12**: 299-313.

Aiken, S.G., Dallwitz, M.J., Consaul, L.L., McJannet, C.L., Gillespie, L.G., Boles, R.L., Argus, G.W., Gillett, J.M., Scott, P.J., Elven, R., LeBlanc, M.C., Brysting, A.K., et Solstad, H. 2003. Flora of the Canadian Archipelago: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Version 29th.

Alm, T. 2004. Ethnobotany of *Rhodiola rosea* (Crassulaceae) in Norway. *SIDA* **21**(1): 321-344.

Amano, M., Wakabayashi, M., et Ohba, H. 1995. Cytotaxonomical Studies of Siberian Sedoideae (Crassulaceae) I. Chromosomes of *Rhodiola* in the Altai Mountains. *Journal of Japanese Botany* **70**(6): 334-338.

Anderberg, A. 1999. Den Virtuella Floran. Available from <http://linnaeus.nrm.se/flora/> [cited 17 august 2008].

Anderson, J.P. 1939. Plants used by the eskimo of the northern Bering sea and Arctic regions of Alaska. *American Journal of Botany* **26**(9): 714-716.

ARRGO. 2008. Alberta *Rhodiola rosea* growers organization [cited 15 août 2008].

Asdal, Å., Galambosi, B., Olsson, K., Bladh, K.W., et Poorvaldsdóttir, E. 2006. Spice- and medicinal plants in the Nordic and Baltic countries. Conservation of genetic resources. *Rhodiola rosea* L. Edited by Nordic Gene Bank, Alnarp.

Avula, B., Wang, Y.-H., Ali, Z., Smillie, T.J., Filion, V., Cuerrier, A., Arnason, J.T., et Khan, I.A. *in press*. RP-HPLC Determination of phenylalkanoïds and monoterpenoids in *Rhodiola rosea* and identification by LC-ESI-TOF.

Bagozzi, D. 2004. Sécurité des patients et protection des plantes médicinales : lignes directrices destinées à une industrie qui vaut 60 milliards de dollars. Available from <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2004/np3/fr/index.html> [cited 16 avril 2009].

Bauert, M.R., Kälín, M., Baltisberger, M., et Edwards, P.J. 1998. No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers. *Molecular Ecology* 7: 1519-1527.

Baxter, M.L. 2004. The Promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 359: 669-679.

Benham, J. 2001. Genographer version 1.6. Montana State University. Available from : <http://hordeum.msu.montana.edu/genographer>.

Bonin, A., Ehrich, D., et Manel, S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* 16: 3737-3758.

Brekhman, I.I., et Dardymov, I.V. 1969. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Annual Review of Pharmacology* 9: 419-430.

Brigham, T., Schröder, M., et Cocksedge, W. 2004. Bonnes pratiques d'identification pour l'industrie des plantes et des herbes (médicinales, aromatiques, culinaires) et des épices. Saskatchewan Herb and Spice Association, La coalition Nationale de l'industrie des Herbes et des Épices, Agriculture et Agroalimentaire Canada. p. 62.

Brouillet, L., et Whetstone, R.D. 1993. Climate and Physiography. *In* Flora of North America North of Mexico. Edited by F.o.N.A.E. Committee. Oxford University Press, Oxford.

Brown, R.P., Gerbarg, P.L., et Graham, B. 2004. The Rhodiola revolution: transform your health with the herbal breakthrough of the 21st century. Rodale Inc., Unites States of America.

Brown, R.P., Gerbarg, P.L., et Ramazanov, Z. 2002. *Rhodiola rosea*: A phytomedicinal overview. *Herbal Gram* 56: 40-52.

Casgrain, P., et Legendre, P. 1999. The R Package version 4.0. Department of Biological Sciences, University of Montreal, Montreal.

Chan, L., Chik, S.C.C., Lau, A.S., et Liu, C.C. 2007. Identification of multiple markers for phylogenetic and DNA barcoding studies for medicinal plants. *In* Second international bracode of life conference, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.

Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Berg, C.V.D., Madriñán, S., Pedersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L., et Wilkinson, M. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* **56**(2): 295-299.

Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kaesnakurthi, R.P., Haidar, N., et Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical transactions of the Royal Society B* **360**: 1889-1895.

Clausen, R.T. 1975. *Sedum of North America north of the Mexican plateau*. Cornell University press, Ithaca, N.Y.

Cody, W.J. 2000. *Flora of Yukon Territory*. National Research Council of Canada, Ottawa.

Cuerrier, A., et Institut Culturel Avataq. 2005. *Le savoir botanique de Kangirsualujjuaq*. Edited by Administration régionale Kativik, Institut culturel Avataq, and Institut de recherche en biologie végétale, Kuujjuaq & Montréal.

Dahl, E. 1963. Plant migrations across the North Atlantic Ocean and their importance for the paleogeography of the region. *In North Atlantic biota and their history*. Edited by A. Löve, and D. Löve. Pergamon Press, Oxford. pp. 173-188.

Darbinyan, V., Aslanyan, G., Amroyan, E., Gabrielyan, E., Malmström, C., et Panossian, A. 2007. Clinical trial of *Rhodiola rosea* L. extract SHR-5 in the treatment of mild to moderate depression. *Nordic Journal of Psychiatry* **61**(5): 343-348.

Delcourt, P.A., et Delcourt, H.R. 1993. Paleoclimates, paleovegetation, and paleofloras during the late Quaternary. *In Flora of North America North of Mexico*. Edited by F.o.N.A.E. Committee. Oxford University Press, Oxford.

Dodson, C., et Dunmire, W.W. 2007. *Mountain Wilflowers of the Southern Rockies*. University of New Mexico Press.

Douzery, E.J.P., Pridgeon, A.M., Korses, P., Linder, H.P., Kurzweil, H., et Chase, M.W. 1999. Molecular phylogenetics of *Diseae* (Orchidaceae): A contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. *American Journal of Botany* **86**(6): 887-899.

Doyle, J.J., et Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**(1): 11-15.

Erickson, D.L., Spouge, J., Resch, A., Weigt, L.A., et Kress, W.J. 2008. DNA barcoding in land plants: developing standards to quantify and maximize success. *Taxon* **57**(4): 1304-1316.

Excoffier, L., Laval, G., et Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrative software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.

Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M., et Barrett, S.C.H. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* **3**(7): e2802-.

Filion, V.J. 2008. A novel phytochemical and ecological study of the Nunavik medicinal plant *Rhodiola rosea* L. Thesis by article, Ottawa-Carleton Institute of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Canada.

Filion, V.J., Saleem, A., Rochefort, G., Allard, M., Cuerrier, A., et Arnason, J.T. 2008. Phytochemical Analysis of Nunavik *Rhodiola rosea* L. *Natural Product Communications* **3**(5): 721-726.

Fröderström, H. 1936. The Genus *Sedum* L. - A systematic essay, Göteborg.

Furmanowa, M., Hartwich, M., Alfermann, A.W., Kozminski, W., et Olejnik, M. 1999. Rosavin as a product of glycolisation by *Rhodiola rosea* (roseroot) cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **56**: 105-110.

Furmanowa, M., Oledzka, H., Michalska, M., Sokolnicka, I., et Radomska, D. 1995. XXIII *Rhodiola rosea* L. (Roseroot): In vitro regeneration and the biological activity of roots. *In Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.33, Medicinal and Aromatic Plants VIII. Edited by Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 412-426.*

Gabrielsen, T.M., Bachmann, K., Jakobsen, K.S., et Brochmann, C. 1997. Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia*. *Molecular Ecology* **6**: 831-842.

Galambosi, B. 2005. *Rhodiola rosea* L., from wild collection to field production. *Medicinal Plant Conservation* **11**: 31-35.

- Galambosi, B. 2006. Demand and availability of *Rhodiola rosea* L. raw material. In Medicinal and Aromatic Plants. Edited by R.J. Bogers, L.E. Cracker, and D. Lange. Springer, Netherlands. pp. 223-236.
- Germano, C., et Ramazanov, Z. 1999. Arctic root (*Rhodiola rosea*). Kensington Publishing Corp., New York.
- Gleason, H.A., et Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of Northeastern United States and adjacent Canada, Bronx, New York.
- Gontcharova, S.B. 1999. Conspectus of Sedoideae (Crassulaceae) of the Russian far East. Bulletin of the National Science Museum of Tokyo Série B **25**(2): 49-63.
- Gontcharova, S.B., Artyukova, E.V., et Gontcharov, A.A. 2006. Phylogenetic relationships among members of the subfamily Sedoideae (Crassulaceae) inferred from the ITS region sequences of nuclear rDNA. Russian Journal of Genetics **42**(6): 654-661.
- Gontcharova, S.B., Gontcharov, A.A., Yakubov, V.V., et Kondo, K. 2009. Seed surface morphology in some representatives of the Genus *Rhodiola* sect. *Rhodiola* (Crassulaceae) in the Russian Far East Flora **204**: 17-24.
- Guest, H.J., et Allen, G.A. 2008. Molecular phylogeography of *Rhodiola integrifolia* (Crassulaceae): postglacial recolonization of western North America. In Botany 2008. Botanical Society of America, University of British Columbia, Vancouver.
- György, Z. 2006. Glycoside production by in vitro *Rhodiola rosea* cultures. Academic dissertation, Department of Process and Environmental Engineering, Faculty of Technology, University of Oulu, Oulu, Finland.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series **41**: 95-98.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, a., Ball, S.L., et deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Procedure of the Royal Society of London B **270**: 313-321.
- Hinds, H.R. 2000. Flora of New Brunswick: a manual for the identification of the vascular plants of New Brunswick (2nd edition). University of New Brunswick, Fredericton.
- Hulten, E. 1937. Outline of the history of Arctic and Boreal biota during the Quaternary period. Bokförlags Aktiebolaget Thule, Stockholm.

- Hulten, E. 1958. *Amphi-atlantic plants and their phytogeographical connections*. Almqvist & Wiskell, Stockholm.
- Hulten, E., et Fries, M. 1986. *Atlas of North European vascular plants north of the Tropic of Cancer* Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany.
- Jaccard, P. 1900. Contribution au problème de l'immigration post-glaciaire de la flore alpine. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* **36**: 87-130.
- Joly, S., et Bruneau, A. 2007. Delimiting species boundary in *Rosa* Sect. *Cinnamomeae* (Rosaceae) in Eastern North America. *Systematic Botany* **32**(4): 819-836.
- Joly, S., Starr, J.R., Lewis, W.H., et Bruneau, A. 2006. Polyploid and hybrid evolution in roses east of the rocky mountains. *American Journal of Botany* **93**(3): 412-425.
- Kelly, G.S. 2001. *Rhodiola rosea*: A Possible Plant Adaptogen. *Alternative Medicine Review* **6**(3): 293-302.
- Kim, K.-J., Lee, H.-L., Yi, D.-K., et Kim, J.-S. 2007. Development of plant DNA barcoding markers from the variable noncoding regions of chloroplast genome of species identification via simulation. *In* Second International Barcode of Life Conference. http://www.bolinfonet.org/conferences/assets/files/conference_abstract_book.pdf, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.
- Koch, M.A., Kiefer, C., Ehrich, D., Vogel, J., Brochmann, C., et Mummenhoff, K. 2006. Three times out of Asia minor: the phylogeography of *Arabis alpina* L. (Brassicaceae). *Molecular Ecology* **15**: 825-839.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., et Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**(23): 8369-8374.
- Kuhajek, J.M., Clark, A.M., et Slattery, M. 2003. Ecological patterns in the antifungal activity of roots extracts from Rocky Mountain wetlands plants. *Pharmaceutical Biology* **41**(7): 522-530.
- Lahaye, R., Bank, M.v.d., Diego Bogarin, J.W., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G., et Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(8): 2923-2928.

- Löve, D. 1963. Dispersal and survival of plants. *In* North Atlantic biota and their history. Edited by Å. Löve, and D. Löve. Pergamon Press, Oxford. pp. 189-205.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
- Mayuzumi, S., et Ohba, H. 2004. The phylogenetic position of Eastern Asian Sedoideae (Crassulaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Systematic Botany* **29**(3): 587-598.
- Meudt, H.M., et Clarke, A.C. 2007. Almost Forgotten or Latest Practice ? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* **12**(3): 106-117.
- Moran, R. 2000. *Rhodiola integrifolia* RAF. - A rambling account, with two new combinations. *Cactus and Succulent Journal* **72**(3): 137-139.
- Moran, R. In press. Crassulaceae. *Flora of North America North of America*, New York and Oxford.
- Mueller, U.G., et Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in ecology and evolution* **14**(10): 389-394.
- Müller, K. 2006. Incorporating information from length-mutational events into phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 667-676.
- Muschner, V.C., Lorenz, A.P., Cervi, A.C., Bonatto, S.L., Souza-Chiez, T.T., Salzano, F.M., et Freitas, L.B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* **90**(8): 1229-1238.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., et Ragupathy, S. 2006. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Canadian Journal of Botany* **84**: 335-341.
- Noël, S., Dumoulin, J., Ouellet, M., Galois, P., et Lapointe, F.-J. 2008. Rapid identification of salamanders from the Jefferson complex with taxon-specific primers. *Copeia* **1**: 158-161.
- Noël, S., Tessier, N., Angers, B., Wood, D.M., et Lapointe, F.-J. 2004. Molecular identification of two species of myiasis-causing *Cuterebra* by multiplex PCR and RFLP. *Medical and Veterinary Entomology* **18**: 161-166.

- Nordal, I. 1987. Tabula rasa after all? Botanical evidence for ice-free refugia in Scandinavia reviewed. *Journal of Biogeography* **14**: 377-388.
- Ohba, H. 2002. *Rhodiola*. In *Illustrated handbook of succulent plants : Crassulaceae*. Edited by U. Eggli. Springer - Verlag, Berlin; Heidelberg.
- Olfelt, J.P., Furnier, G.R., et Luby, J.J. 2001. What data determine whether a plant taxon is distinct enough to merit legal protection ? A case study of *Sedum integrifolium* (Crassulaceae). *American Journal of Botany* **88**(3): 401-410.
- Olfelt, J.P., Furnier, G.R., et Luby, J.L. 1998. Reproduction and development of the endangered *Sedum integrifolium* ssp. *leedyi* (Crassulaceae). *American Journal of Botany* **85**(3): 346-351.
- Organisation Mondiale de la Santé. 2002. Stratégies de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. Organisation Mondiale de la Santé, Genève. p. 78 pages.
- Pennisi, E. 2007. Wanted: a barcode for plants. *Science* **318**: 190-191.
- Pielou, E.C. 1994. *A naturalist's guide to the Arctic*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Polunin, N.V. 1940. *Botany of the Canadian Eastern Arctic : part I: Pteridophyta and Spermatophyta*. Canada Department of Mines and Ressources, Ottawa.
- Polunin, O. 1969. *Flowers of Europe: a field guide*. Oxford University Press, Toronto.
- Reisch, C. 2008. Glacial history of *Saxifraga paniculata* (Saxifragaceae) molecular biogeography of a disjunct arctic-alpine species from Europe and North America. *Biological Journal of the Linnean Society* **93**: 385-398.
- Roland, A.E., et Zinck, M. 1998. *Roland's Flora of Nova Scotia*. Nimbus Publishing & Nova Scotia Museum, Halifax.
- Rousseau, C. 1974. Géographie floristique du Québec/Labrador : Distribution des principales espèces vasculaires. *Travaux et documents du centre d'études nordiques*: 7, Québec.
- Santé Canada. 2006. *Bonnes Pratiques de Fabrication : Document de Référence*. Edited by D.d.p.d.s. naturels. Santé Canada.

- Sarris, J. 2007. Herbal Medicines in the Treatment of Psychiatric Disorders: A Systematic Review. *Phytotherapy Research* **21**: 703-716.
- Savolainen, V., Cowan, R.S., Vogler, A.P., Roderick, G.K., et Lane, R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **360**: 1805-1811.
- Scoggan, H.J. 1978. *Flora of Canada. Part 3: Dicotyledonae (Saururaceae to Violaceae)*, Ottawa.
- Scott, M., Leduc, R.I., Burt, A.J., Marles, R.J., Arnason, J.T., et Foster, B.C. 2006. The Inhibition of Human Cytochrome P450 by Ethanol Extracts of North American Botanicals. *Pharmaceutical Biology* **44**(5): 315-327.
- Simmons, M.P., et Ochoterena, H. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* **49**(2): 369-381.
- Small, E., et Catling, P.M. 2000. *Rhodiola rosea* (L.) Scop. In *Les cultures médicinales canadiennes*. Edited by CNRC. Presses Scientifiques du CNRC, Ottawa (On), Canada.
- Soltis, et Gitzendanner, M. 1999. Soltis lab AFLP protocol.
- St-Pierre, R. 2006. *Ex Situ* Conservation of wild plant species at plant gene resources of Canada. Plant Gene Ressources of Canada, Agriculture et agroalimentaire Canada.
- Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience* **53**(9): 796-797.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Edited by S. Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermet, T., Corthier, G., Brochmann, C., et Willerslev, E. 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* **35**(3): e14.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., et Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105-1109.
- Tessier, N., Noël, S., et Lapointe, F.-J. 2004. A new method to discriminate the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) from the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) using species-specific primers in multiples PCR. *Canadian Journal of Zoology* **82**: 1832-1835.

The R Foundation for Statistical Computing. 2005. R version 2.2.1. <http://www.r-project.org/>.

Uhl, C.H. 1952. Heteroploidy in *Sedum rosea* (L.) Scop. *Evolution* **6**: 81-86.

United States Department of Agriculture. 1999. Natural Resources Conservation Service: Plants Database. Available from <http://plants.usda.gov/> [cited 10 January 2008].

Vladimir Leont'evic Komarov. 1971. Flora of the U.S.S.R IX: Rosales and Sarraceniales. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., et Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**(21): 4407-4414.

Ward, J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of American Statistical Association* **58**(301): 236-244.

Winston, D., et Maimes, S. 2007. *Adaptogens: Herbs for Strength, Stamina, and Stress Relief* (Paperback). Healing Arts Press.

Xia, T., Chen, S., Chen, S., et Ge, X. 2005. Genetic variation within and among populations of *Rhodiola alsia* (crassulaceae) native to the tibetan plateau as detected by ISSR markers. *Biochemical Genetics* **43**(3/4): 87-101.

Annexe 1

Détails sur le travail de terrain réalisé au Nunavik

L'échantillonnage principal (figure 6) a été réalisé au Nunavik sur les côtes de la baie d'Ungava. Le terrain a été réalisé en août 2005 et 2006 autour de plusieurs communautés inuites: Kuujjuaq, Kangirsuk, Quaqlaq, Kangirsualujjuaq et Killiniq. Pour chaque population échantillonnée, nous avons noté les coordonnées GPS et les caractéristiques de l'habitat, récolté un spécimen d'herbier, une dizaine de feuilles que nous faisons sécher dans du gel de silice pour dix à vingt individus. Les racines des cinq à sept premiers individus ont également été récoltées et mises dans l'alcool 90% pour les analyses phytochimiques faites par Vicky Filion (Université d'Ottawa). Les coordonnées GPS des régions échantillonnées sans que la plante soit présente ont été notées afin de mieux connaître la distribution de la plante au Nunavik. Nous avons également récolté des fruits (follicules), les plus mûrs possibles, de *R. rosea* lors des deux étés pour récupérer les semences, afin de tester la germination et le potentiel de culture.

À l'été 2005, nous avons récolté 10 individus pour 14 populations dont sept provenaient des alentours de Kangirsualujjuaq et sept autres près de Kuujjuaq, le long de la rivière Koksoak. La région autour de Kangirsuk et les berges de la côte ouest de la baie d'Ungava (Kangirsuk jusqu'à la hauteur de l'île Akpatok) ont également été explorées sans succès malgré le fait que quelques aînés de la région aient mentionné la plante.

À l'été 2006, nous avons récolté 20 individus pour chaque population. Nous avons exploré la côte est de la baie d'Ungava, de Kangirsualujjuaq à Killiniq (pointe est de la baie d'Ungava) où nous avons récolté des échantillons pour 12 populations. Nous avons aussi trouvé trois populations sur les côtes près de Quaqlaq et trois populations de plus à l'embouchure de la rivière Koksoak vers la baie d'Ungava.

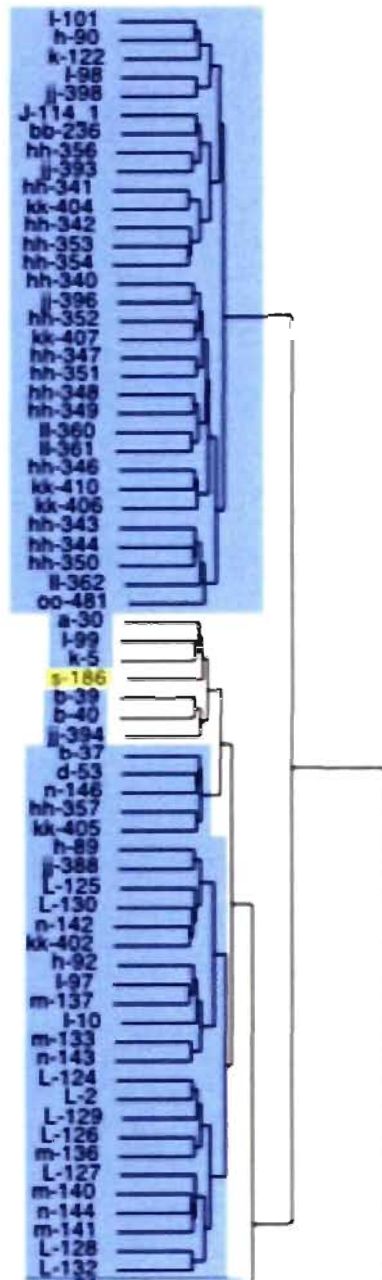
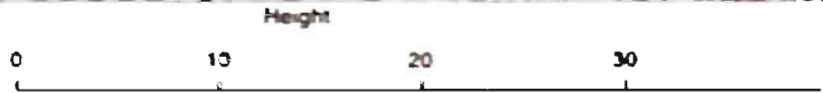
Lors du terrain, nous avons remarqué une excroissance jaunâtre (déformation) présente sur certains individus principalement au niveau de l'inflorescence et parfois sur

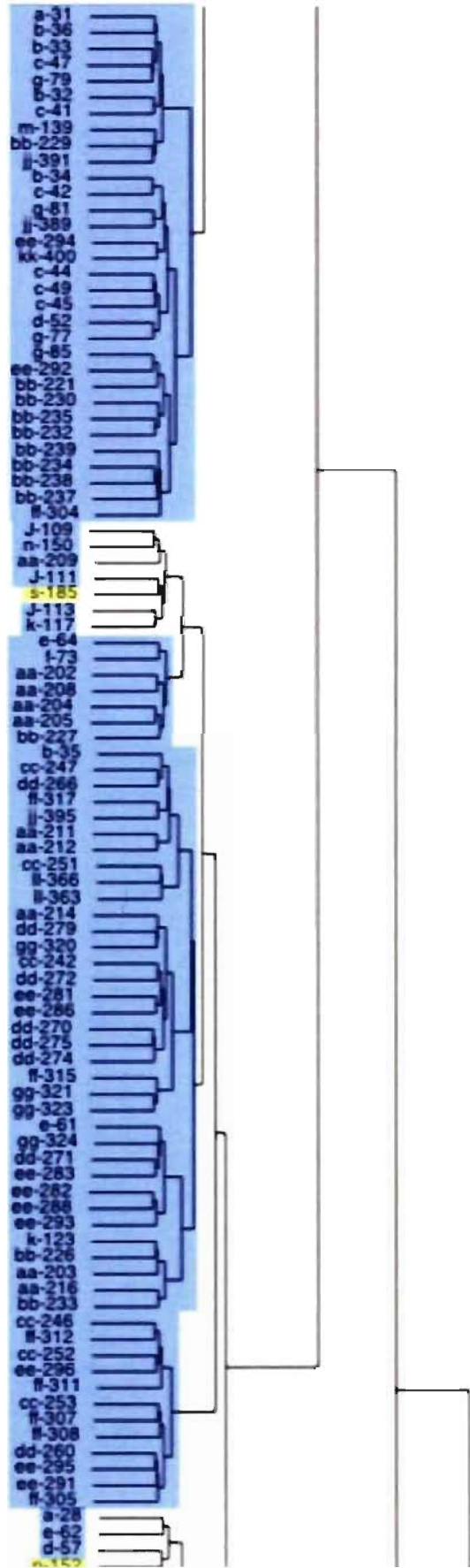
quelques feuilles. La répartition de ces déformations n'était pas nécessairement limitée à l'ensemble d'une population ni à une région particulière. Cela avait déjà été observé par Clausen (1975). Une recherche plus poussée a permis de déterminer que cette excroissance était causée par un petit ériophyide herbivore spécifique à cette espèce, *Aceria rhodiolae* Canestrini (Filion 2008). Il s'agissait de la première mention de cette espèce au Canada.

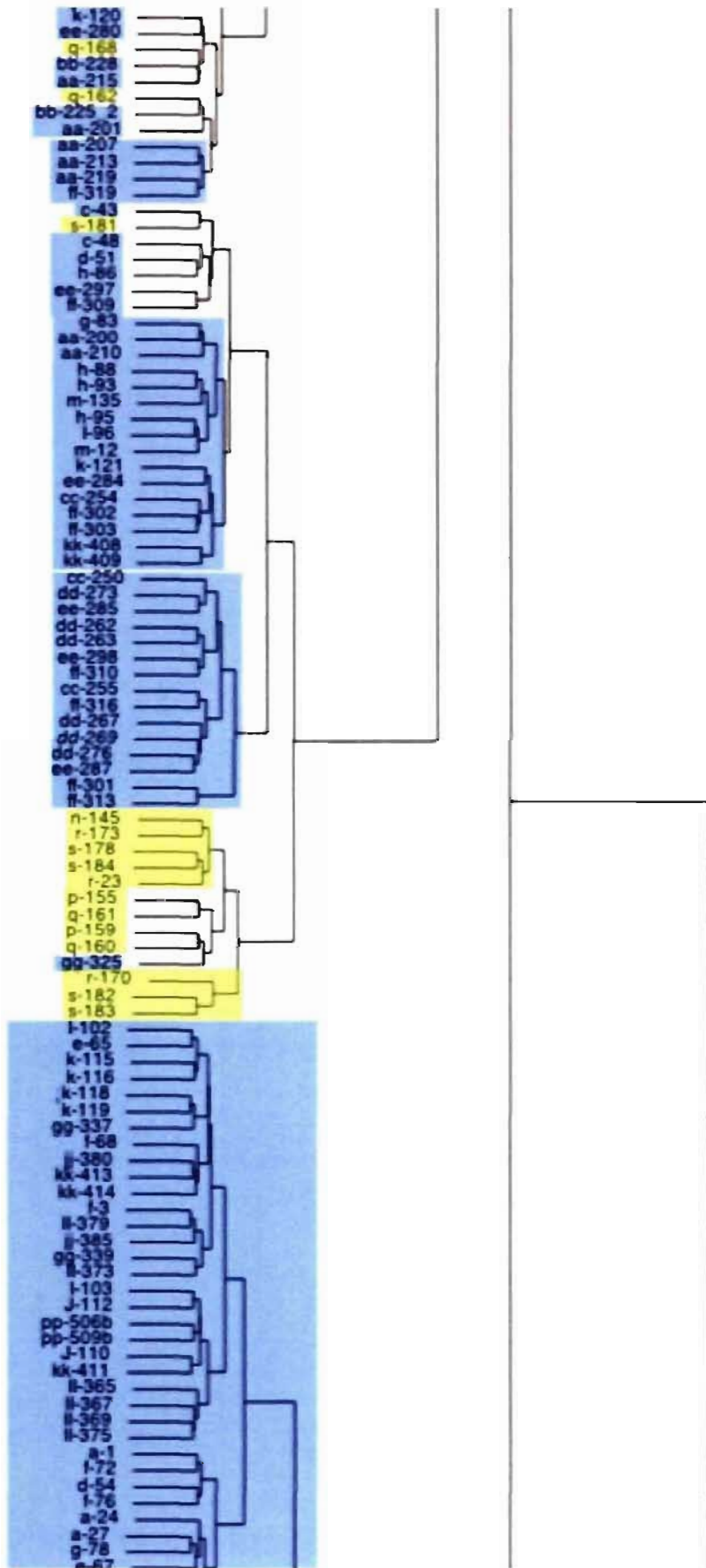
Les entretiens avec les aînés de différentes communautés inuites de la baie d'Ungava nous ont aidé pour repérer la plante sur le terrain et ont permis de confirmer que *R. rosea* n'était pas utilisé à des fins médicinales au Nunavik, mais que les feuilles étaient mangées comme un légume surtout lors d'expéditions car elles sont gorgées d'eau. D'autres communautés inuites du Nunavik consomment les feuilles et le rhizome de *R. rosea* en tant que plante bonne pour la santé (Cuerrier et Institut Culturel Avataq 2005). Deux noms Inuits ont été répertoriés au cours de nos entretiens soit «Tullirunaq» et «Utsutamaaq».

Annexe 2

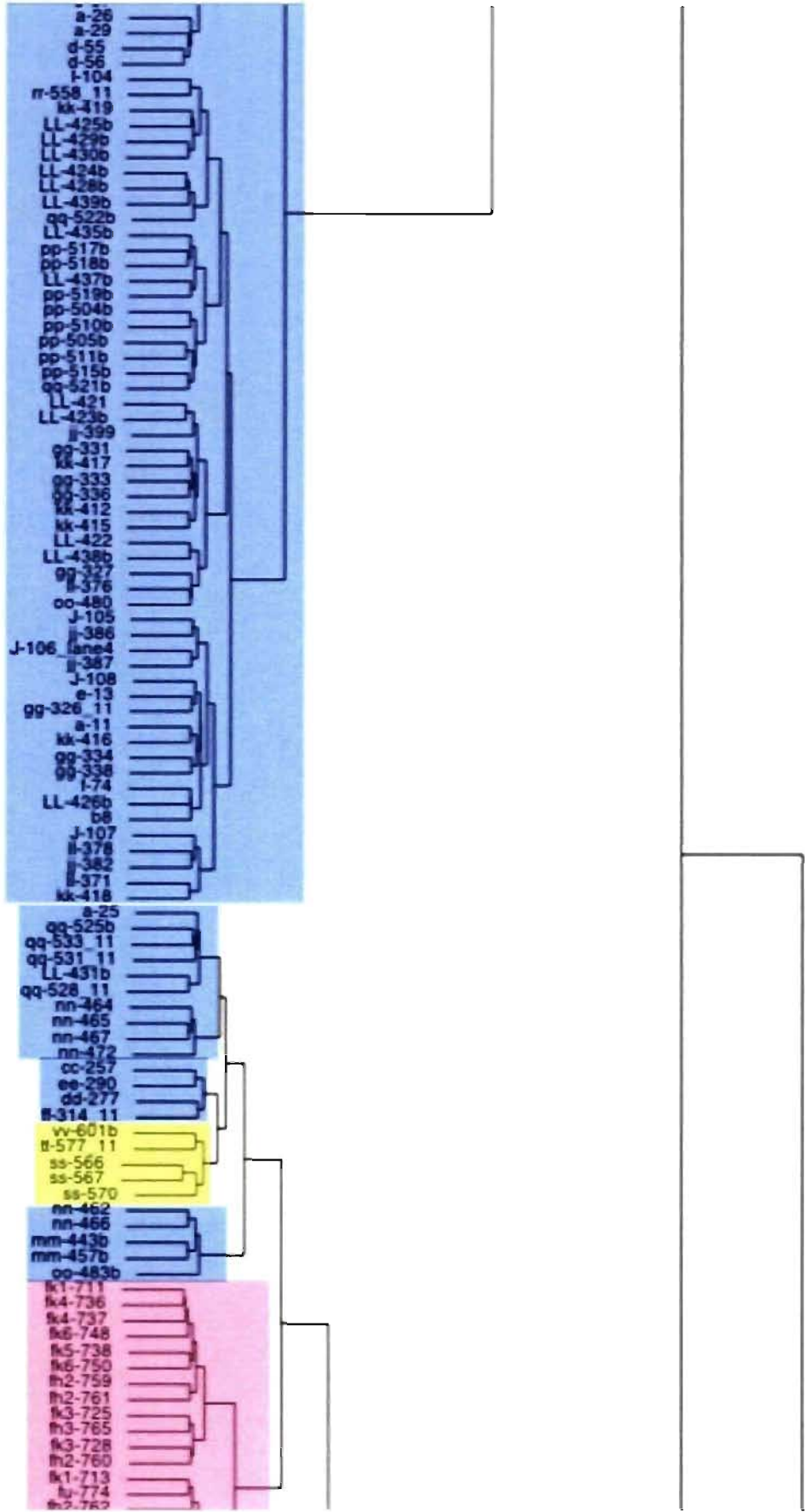
Dendrogramme complet issu de la méthode de Ward où les feuilles portent le numéro d'échantillon précédé de l'acronyme de chaque population que l'on peut retrouver dans le tableau 3 décrivant l'échantillonnage utilisé lors des analyses d'AFLP. Chaque région géographique s'est vue attribuer une couleur : jaune pour Mingan, vert pour les Maritimes (Nouveau-Brunswick et Nouvelle-Écosse), rouge pour l'Eurasie, bleu pour le Nunavik (est, sud, ouest) et rose pour la Scandinavie (Finlande et Norvège).







ogram of agnes(x = by, diss = TRUE, method = "ward")



by
Agglomerative Coefficient = 0.97

