



HAL
open science

Subterranean species inventory in the molecular era

Florian Malard, Héloïse Verdier, Lara Konecny-Dupré, David Eme,
Christophe J Douady, Tristan Lefébure

► **To cite this version:**

Florian Malard, Héloïse Verdier, Lara Konecny-Dupré, David Eme, Christophe J Douady, et al..
Subterranean species inventory in the molecular era. *Karstologia*, 2022. hal-03810304

HAL Id: hal-03810304

<https://hal.inrae.fr/hal-03810304>

Submitted on 11 Oct 2022

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

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

Florian MALARD¹,
Héloïse VERDIER¹,
Lara KONECNY-DUPRÉ¹,
David EME²⁻³,
Christophe J. DOUADY¹
et Tristan LEFÉBURE¹

(1) Université Claude Bernard Lyon 1,
CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA,
F-69622, Villeurbanne, France

(2) IFREMER Centre Atlantique,
Unité Écologie et Modèles pour
l'Halleutique, rue de l'Île d'Yeu,
Nantes, 44980, France

(3) RiverLY Research Unit, National
Research Institute for Agriculture
Food and Environment (INRAE),
Villeurbanne, France

Subterranean species inventory in the molecular era

Inventaire des espèces souterraines dans l'ère moléculaire

ABSTRACT: Since the first discoveries in the 1860s of subterranean organisms in France, there has been a sustained effort in sampling and identifying subterranean species. Yet, the species inventory is still largely incomplete. Since the nineties, breakthrough in molecular methods has revolutionized concepts and practices guiding species inventory. Here, we provide a brief overview of how molecular methods have changed ways of delimiting, identifying and sampling species. Within the framework of integrative taxonomy, species taxa are now routinely delimited both on morphological and molecular grounds. Molecular delimitation methods often provide many more taxa with smaller range size than morphology. Species molecular inventory has simultaneously shifted from the sampling of specimens to that of environmental DNA (eDNA) and from the identification of a single organism (i.e. barcoding) to the simultaneous identification of a whole community (i.e. metabarcoding). Yet, there are still a number of challenges to be addressed for eDNA and metabarcoding to be applied routinely to the inventory of subterranean biodiversity.

KEYWORDS: biodiversity, subterranean fauna, integrative taxonomy, DNA taxonomy, DNA barcoding, metabarcoding, environmental DNA.

RÉSUMÉ : Depuis les premières découvertes dans les années 1860 d'organismes souterrains en France, l'effort d'échantillonnage et d'identification des espèces souterraines est resté soutenu. Pourtant, l'inventaire des espèces est encore largement incomplet. Depuis les années 1990, la percée des méthodes moléculaires a révolutionné les concepts et les pratiques guidant l'inventaire des espèces. Ici, nous expliquons comment les méthodes moléculaires ont changé la façon de délimiter, d'identifier et d'échantillonner les espèces. Dans le cadre de la taxinomie intégrative, les espèces sont désormais délimitées à la fois sur des bases morphologiques et moléculaires. Les méthodes de délimitation moléculaire fournissent souvent beaucoup plus de taxons avec des aires de distribution plus restreintes que la morphologie. L'inventaire moléculaire des espèces est simultanément passé de l'échantillonnage des spécimens à celui de l'ADN environnemental (ADNe) et de l'identification d'un seul organisme (barcoding) à l'identification en masse de toute une communauté (metabarcoding). Toutefois, il existe encore un certain nombre de défis à relever pour que l'ADN environnemental et le metabarcoding soient appliqués en routine à l'inventaire de la biodiversité souterraine.

MOTS-CLÉS : biodiversité, faune souterraine, taxinomie intégrative, taxinomie moléculaire, identification moléculaire, barcoding moléculaire, ADN environnemental/

Species inventory: a long tradition

In France, the first discoveries of subterranean organisms date back to the 1860s [Ferreira *et al.*, 2003; bibliographic synthesis in Ferreira, 2005]. Since then, sustained efforts have been made to sample and identify subterranean species, both aquatic [Gibert and Culver, 2009; Zigmajster *et al.*, 2014] and terrestrial [Juberthie and Ginet, 1994; Faille, 2006; Mammola *et al.*, 2019a]. Yet, the species inventory is still largely incomplete. Among the groundwater fauna, crustaceans have received much research attention because of their high diversity. The number of groundwater crustacean species in Europe exceeds that of surface-dwelling crustacean species [Stoch and Galassi, 2010]. A total of 247 described species and subspecies of groundwater crustacean species are known for France and 48 await description: species occurrences are more numerous in Southern and Eastern France but this distributional pattern partly reflects a sampling bias linked to the geographical location of research laboratories

Inventaire des espèces : une longue tradition

En France, les premières découvertes d'organismes souterrains remontent aux années 1860 [Ferreira *et al.*, 2003 ; synthèse bibliographique dans Ferreira, 2005]. Depuis, des efforts soutenus ont été déployés pour échantillonner et identifier les espèces souterraines tant aquatiques [Gibert et Culver, 2009 ; Zigmajster *et al.*, 2014] que terrestres [Juberthie et Ginet, 1994 ; Faille, 2006 ; Mammola *et al.*, 2019a]. Pourtant, l'inventaire des espèces est encore largement incomplet. Parmi la faune aquatique, les crustacés souterrains ont beaucoup retenu l'attention des chercheurs en raison de leur grande diversité. Le nombre d'espèces de crustacés souterrains en Europe dépasse celui des espèces de crustacés vivant en surface [Stoch et Galassi, 2010]. Au total, 247 espèces et sous-espèces de crustacés souterrains sont connues en France et au moins 48 attendent d'être décrites. Les occurrences d'espèces sont plus nombreuses dans le Sud et l'Est de la France mais cette

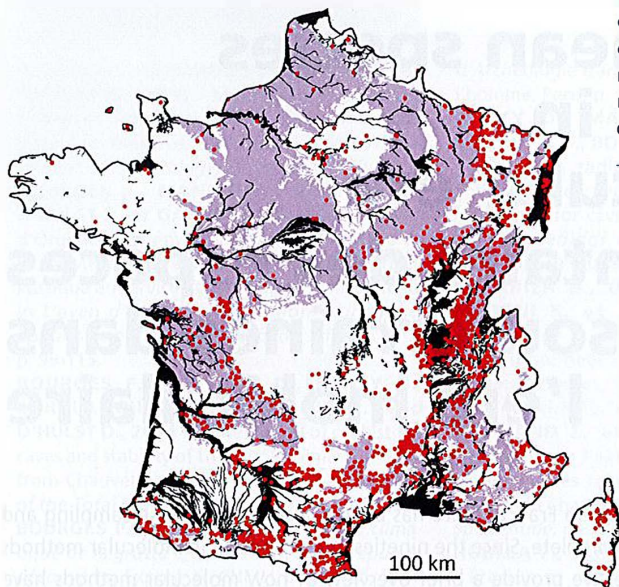


Figure 1 : Occurrence records (red dots, n=5311) of obligate groundwater crustacean species (n=295) in France. Black and purple patterns show quaternary deposits and karsts, respectively. Occurrences (points rouges, n=5311) d'espèces de crustacés souterrains (n=295) en France. Les trames noires et violettes représentent respectivement des dépôts quaternaires et des roches karstiques.

(figure 1). Since the nineties, breakthrough in molecular methods has revolutionized concepts and practices guiding species inventory.

I. DNA taxonomy: species concept and delimitation of species taxa

We refer to DNA taxonomy as the delimitation and/or description of species using molecular methods. To understand the contribution of molecular methods to taxonomic thought, let's start by distinguishing between two separate meanings of the word "species": a concept and a taxon [de Queiroz, 2007]. The species concept accepted by most biologists treats species as evolutionary entities which are temporally delimited by speciation events. Species taxa – for example the amphipod *Niphargus rhenorhodanensis* – are hypotheses of the evolutionary entities emerging during speciation. They are used by biologists as operational taxonomic units (OTU) to quantify biodiversity. To make these hypotheses, biologists use many different criteria – among which morphological and molecular criteria – which evolve differently during speciation (figure 2). In literature, species hypotheses based on molecular criteria are often called OTU (or MOTU for molecular operational taxonomic units). However, note, that species hypotheses based on morphological criteria are also OTUs. Much of the debate around the "species problem" arose from the fact that numerous criteria were unnecessarily used to formulate multiple definitions or concepts of the species [de Queiroz, 1998; Hey, 2006]. Not surprisingly, hypotheses may differ depending on the criteria used: these hypotheses are iteratively tested in a process called "integrative taxonomy" [Yeates et al., 2011]. That process has provided newspecies databases in which individual specimens can be assigned to different species taxa according to different criteria (figure 2). A key feature of such databases is that each morphologically distinguishable species taxon can be associated to one or several DNA barcodes - a section of a DNA sequence from a specific gene. The DNA barcodes can

répartition traduit en partie un biais d'échantillonnage lié à la localisation géographique des laboratoires de recherche (figure 1). Depuis les années 1990, la percée des méthodes moléculaires a révolutionné les concepts et les pratiques guidant l'inventaire des espèces.

I. Taxinomie moléculaire : concept d'espèce et délimitation des taxons

Nous considérons ici que la taxinomie moléculaire correspond à la délimitation et / ou à la description d'espèces à l'aide de méthodes moléculaires. Pour comprendre la contribution des méthodes moléculaires à la taxinomie, commençons par distinguer deux sens distincts du mot « espèce » : un concept et un taxon [de Queiroz, 2007]. Le concept d'espèce retenu par la grande majorité des biologistes traite les espèces comme des entités évolutives qui sont temporellement délimitées par des événements de spéciation. Les taxons – par exemple l'amphipode *Niphargus rhenorhodanensis* – sont des hypothèses d'entités évolutives émergent au cours de la spéciation. Ils sont utilisés par les biologistes comme des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) pour quantifier la biodiversité. Pour réaliser ces hypothèses, les biologistes utilisent de nombreux critères – parmi lesquels des critères morphologiques et moléculaires – qui évoluent différemment au cours de la spéciation (figure 2). Dans la littérature, les hypothèses d'espèces réalisées sur la base de critères moléculaires sont souvent appelées OTU (ou MOTU pour *molecular operational taxonomic units*). Soulignons toutefois que les hypothèses d'espèces réalisées sur la base de critères morphologiques sont aussi des OTUs. Les débats sur ce qui a longtemps été nommé « le problème de l'espèce » sont nés du fait que ces nombreux critères ont eux-mêmes été utilisés, sans réelle nécessité, pour formuler de multiples définitions ou concepts de l'espèce [de Queiroz, 1998 ; Hey, 2006]. Ainsi, les hypothèses peuvent différer selon les critères utilisés : elles sont testées de manière itérative selon une méthode appelée « taxinomie intégrative » [Yeates et al., 2011]. Cette méthode fournit des bases de données d'un nouveau genre dans lesquelles les individus peuvent être attribués à différents taxons en fonction des critères utilisés (figure 2). Une caractéristique clé de ces bases de données est que chaque taxon morphologiquement distinct peut être associé à un ou plusieurs code(s) – barre(s) ADN – une partie d'une séquence d'ADN d'un gène spécifique. Ces codes-barres peuvent ensuite être utilisés pour identifier ce taxon s'il est à nouveau collecté dans l'environnement (voir section III ci-dessous).

Les méthodes de délimitation moléculaire sont maintenant couramment utilisées pour délimiter les espèces souterraines aquatiques et terrestres [Faille et al., 2015 ; Eme et al., 2018 ; Parimuchova et al., 2020]. Eme et al. [2018] ont utilisé 2205 séquences du gène cytochrome

be used, afterwards, to identify the taxon if it is collected once again (see section III below).

Molecular delimitation methods are now commonly used to delimit aquatic and terrestrial subterranean species [Faille *et al.*, 2015; Eme *et al.*, 2018; Parimuchova *et al.*, 2020]. Eme *et al.* [2018] used 2205 sequences of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene to delimit species of obligate groundwater Aselloidea (Isopoda) and Niphargidae (Amphipoda) from Europe. These sequences came from 1075 sampling sites and collectively represented 263 morphologically distinguishable species (figure 3A). As is often the case, the authors found that molecular delimitation provided many more species hypotheses (OTUs) – in their study, 2.5 times as many - than morphological delimitation. Both delimitations revealed a ridge of high species richness at latitudes ranging from ca 42° to 46°N, although the ridge was more pronounced when using molecular delimitation (figure 3 B&C). Moreover, the increase in range size of species at higher latitudes was stronger using COI-based species (figure 3 D&E).

II. An extending panel of molecular approaches and tools

DNA barcoding - defined herein as the molecular identification of individuals of already known species - has transformed the way species are identified and inventoried [Hebert *et al.*, 2003] (figure 2). In subterranean environments, barcoding provided important information on many species for which morphological analysis was uninformative or ambiguous [Zagmajster *et al.*, 2021]. Since 2010, the emergence of new molecular technologies has extended barcoding in two ways: 1) a shift from specimens sampling to environmental samples (i.e. environmental DNA) and 2) a shift from the identification of a single

oxydase I (COI) pour délimiter les espèces souterraines d'Aselloidea (Isopoda) et de Niphargidae (Amphipoda) en Europe. Ces séquences provenaient de 1075 stations d'échantillonnage et représentaient collectivement 263 espèces morphologiquement distinctes (figure 3A). Comme souvent, les auteurs ont constaté que la délimitation moléculaire fournissait plus d'hypothèses d'espèces (OTU) – dans leur étude 2,5 fois plus – que la délimitation morphologique. Les deux délimitations ont révélé une crête de plus forte richesse en espèces à des latitudes s'étendant de 42° à 46° N. Toutefois, cette crête est plus clairement révélée par la délimitation moléculaire (figure 3 B&C). De plus, l'augmentation de la taille de l'aire de répartition des espèces avec la latitude apparaît aussi plus clairement avec les méthodes de délimitation moléculaire (figure 3 D&E).

II. Un panel étendu d'approches et d'outils moléculaires

Le barcoding – défini ici comme l'identification moléculaire d'individus d'espèces déjà connues – a transformé la façon dont les espèces sont identifiées et inventoriées [Hebert *et al.*, 2003] (figure 2). En milieu souterrain, le barcoding a fourni des informations importantes sur de nombreuses espèces pour lesquelles l'analyse morphologique était non informative ou ambiguë [Zagmajster *et al.*, 2022]. Depuis 2010, l'émergence de nouvelles technologies moléculaires a étendu le barcoding de deux manières: 1) un passage de l'échantillonnage de spécimens à des échantillons environnementaux (l'ADN environnemental) et 2) un passage de l'identification d'un seul organisme (barcoding) à l'identification de toute une communauté (métabarcoding) (figure 2). L'ADN environnemental (ADNe) – défini comme le matériel génétique obtenu directement à partir d'échantillons environnementaux (par exemple de l'eau, du

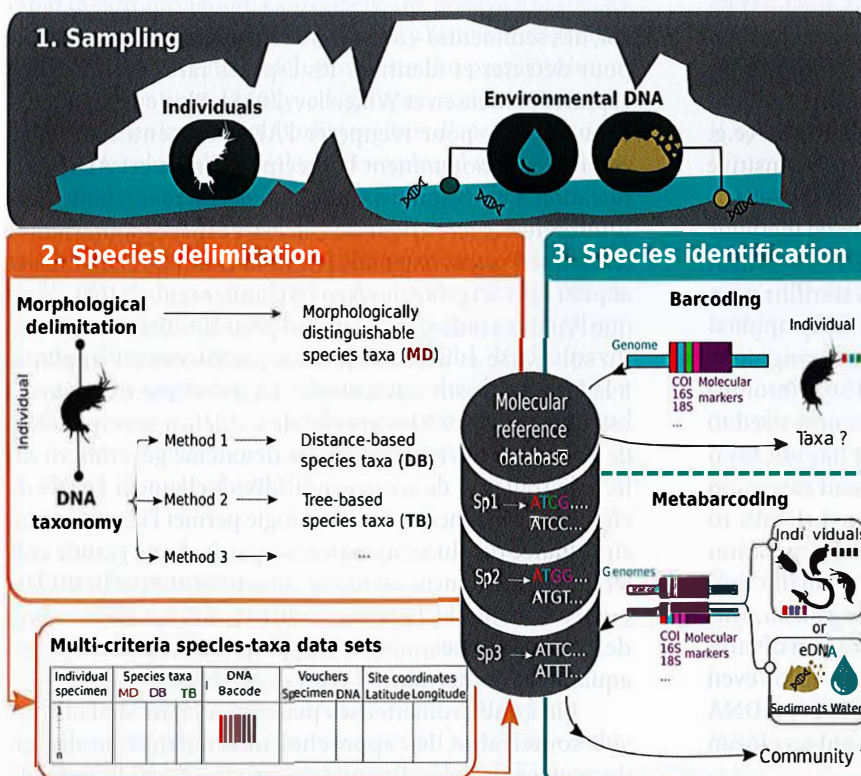


Figure 2 : Inventory of Subterranean biodiversity. 1. Sampling of specimens and environmental DNA from water and / or sediment. 2. Delimitation of species taxa (or species hypotheses, or operational taxonomic units, OTU) using morphological and molecular criteria and generation of molecular reference databases. Molecular species delimitation methods include distance-based (DB) and tree-based (TB) methods, for example [see review in Flot, 2015]. 3. Molecular species identification. Identification can be made from specimens or environmental DNA and can be performed on a single organism (barcoding) or multiple organisms (metabarcoding). Inventaire de la biodiversité souterraine. 1. Échantillonnage de spécimens et/ou de l'ADN environnemental dans l'eau ou les sédiments. 2. Délimitation des espèces (ou hypothèses d'espèces ou unités taxonomiques opérationnelles, OTU) à partir de critères morphologiques et moléculaires et génération des bases de données moléculaires de référence. 3. Identification moléculaire des espèces. L'identification a lieu à partir de spécimens ou d'ADN environnemental et elle cible un (barcoding) ou plusieurs (metabarcoding) taxon(s).

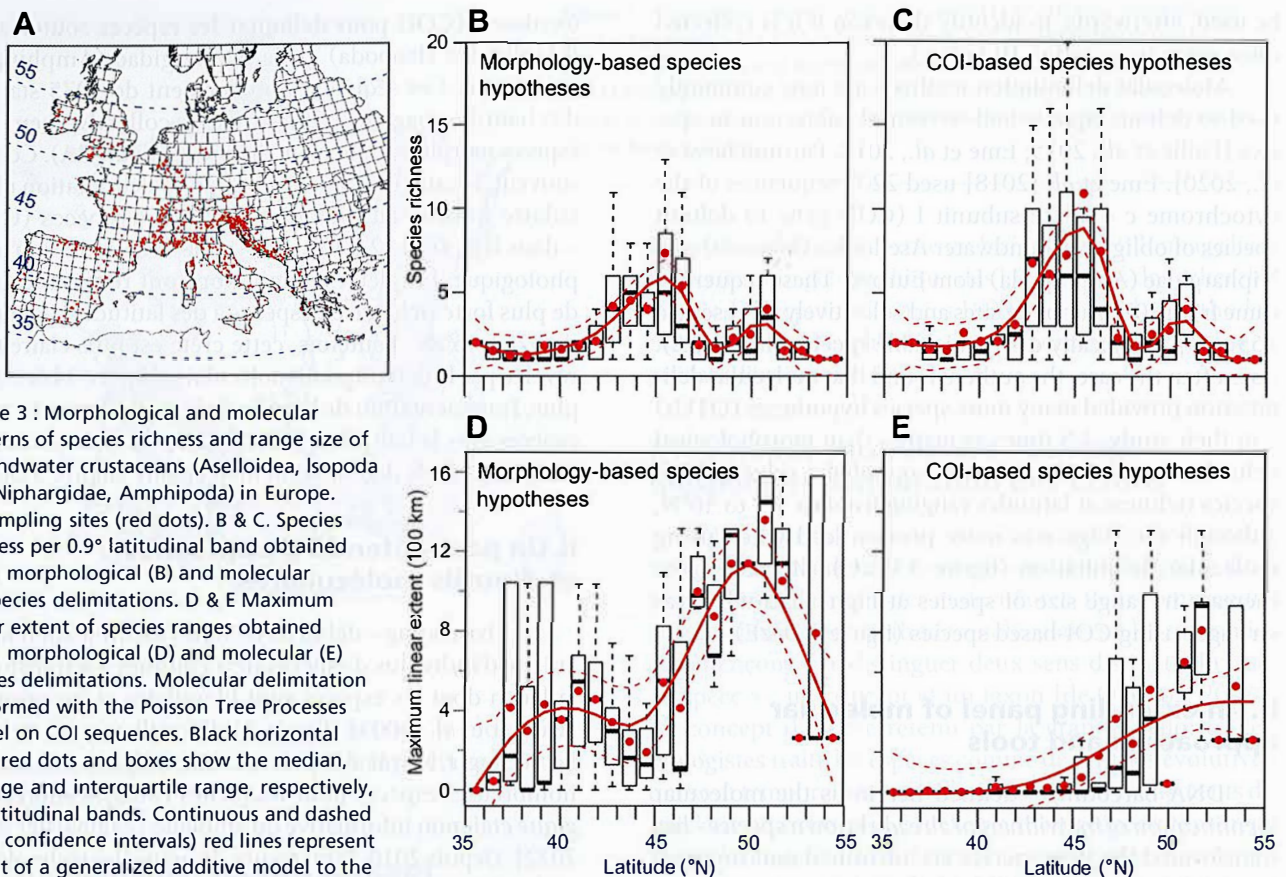


Figure 3 : Morphological and molecular patterns of species richness and range size of groundwater crustaceans (Aselloidea, Isopoda and Niphargidae, Amphipoda) in Europe. A. Sampling sites (red dots). B & C. Species richness per 0.9° latitudinal band obtained using morphological (B) and molecular (C) species delimitations. D & E. Maximum linear extent of species ranges obtained using morphological (D) and molecular (E) species delimitations. Molecular delimitation performed with the Poisson Tree Processes model on COI sequences. Black horizontal bars, red dots and boxes show the median, average and interquartile range, respectively, for latitudinal bands. Continuous and dashed (95% confidence intervals) red lines represent the fit of a generalized additive model to the averages of latitudinal bands. Modified from Eme et al. [2018].

Approches morphologique et moléculaire de la richesse et de l'étendue des aires de distribution des crustacés aquatiques souterrains (Aselloidea, Isopoda et Niphargidae, Amphipoda) en Europe. A. Stations d'échantillonnage (points rouges) des crustacés en Europe. B & C. Richesses spécifiques des crustacés par bande latitudinale de 0,9° obtenues par délimitations morphologiques (B) et moléculaire (C) des espèces. D & E. Étendues maximales de l'aire de distribution des crustacés obtenues par délimitations morphologique (D) et moléculaire (E) des espèces. La délimitation moléculaire est effectuée par la méthode du PTP (Poisson tree processes model) sur des séquences du gène COI. Les barres horizontales noires, les points rouges et les boîtes indiquent respectivement la médiane, la moyenne et l'intervalle interquartile pour les bandes latitudinales. Les lignes rouges continues et en pointillé (intervalles de confiance à 95 %) représentent l'ajustement d'un modèle additif généralisé aux moyennes des bandes latitudinales. Modifiée d'après Eme et al. [2018].

organism (i.e. barcoding) to the simultaneous identification of a whole community (i.e. metabarcoding) (figure 2). Environmental DNA (i.e. eDNA) - defined as genetic material obtained directly from environmental samples (e.g. water, soil, sediment, etc.) - has proved to be a sensitive approach to detect and identify rare and hard-to-catch species [Thomsen and Willerslev, 2015]. Several methods are used to collect eDNA from water samples, among which the ethanol precipitation method and the water filtration method. Water filtration, has been successfully applied to detect subterranean species such as *Proteus anguinus* [Goricki et al., 2017; Vörös et al., 2017] and *Stygobromus hayi* [Niemiller et al., 2018]. While eDNA is now used to inventorize soil fauna [Kirse et al., 2021], it has not been applied to terrestrial cave fauna yet. The second extension - from barcoding to metabarcoding - emerged thanks to the capacity of parallel sequencing in second generation high-throughput sequencers. Instead of individually processing and sequencing the DNA of each organism, this technology allows the simultaneous identification of multiple species from a large collection of specimens or even directly from environmental DNA [Critescu 2014]. eDNA metabarcoding has recently been applied to subterranean aquatic communities [West et al., 2020].

sol, des sédiments) – s'est avéré être une approche sensible pour détecter et identifier les espèces rares et difficiles à capturer [Thomsen et Willerslev, 2015]. Plusieurs méthodes sont utilisées pour récupérer l'ADN contenu dans l'eau des milieux, notamment la précipitation de cet ADN et la filtration d'un volume d'eau. Cette dernière méthode a été utilisée avec succès pour détecter des espèces souterraines telles que *Proteus anguinus* [Goricki et al., 2017; Vörös et al., 2017] et *Stygobromus hayi* [Niemiller et al., 2018]. Alors que l'ADNe est désormais utilisé pour inventorier la faune du sol [Kirse et al., 2021], il n'a pas encore été appliqué à la faune terrestre cavernicole. La deuxième extension – est apparue grâce à la capacité de séquençage en parallèle des séquenceurs à haut débit de deuxième génération. Au lieu de traiter et de séquencer individuellement l'ADN de chaque organisme, cette technologie permet l'identification simultanée de plusieurs espèces à partir d'une grande collection de spécimens ou même directement à partir d'ADN environnemental [Critescu, 2014]. Le metabarcoding de l'ADNe a récemment été appliqué aux communautés aquatiques souterraines [West et al., 2020].

Bien que prometteuses pour l'inventaire de la diversité souterraine, les approches moléculaires soulèvent de nouveaux défis. Premièrement en raison de la faible

Although promising for the inventory of subterranean diversity, these new molecular approaches raise new challenges. First, most approaches developed for surface habitat may turn out to be unsuitable to sample subterranean eDNA. For example, due to the low density of organisms in subterranean habitats, eDNA is likely to be in very low concentration, requiring much larger volumes of environmental samples, whose collection may happen to be unfeasible in many situations. Second, one crucial element of a molecular identification analysis is the comprehensiveness of the reference database (figure 2). With many species or, even worse, entire groups not referenced, the identification will fail. Another pernicious effect of the lack of molecular reference data for many subterranean groups is that molecular methods are likely to be biased when applied to poorly known groups. Once collected, eDNA are extracted and then barcodes are amplified before being sequenced in parallel. At each step of the process, but particularly at the amplification one, protocols are by definition not optimized for poorly known groups. Therefore, the discovery of the latter may decrease and their mischaracterization be emphasized.

III. Beyond species inventory

Molecular approaches also foster the understanding of processes causing geographic variation in species richness. The number of species in a region ultimately depends on three processes: speciation, extinction and dispersal. Phylogenetic inferences made from DNA sequences on the evolutionary relationships among species can, for example, help to disentangle the relative influence of the three processes in shaping the European ridge of high subterranean species richness (see figure 3) [Zagmajster et al., 2018]. The occurrence within that ridge of many short-branch closely-related species may reflect a process of recent and rapid in-situ speciation. Conversely, the presence of species showing long independent evolutionary histories may reflect a low extinction rate which promotes the preservation of diversity over time. Finally, a high species richness may be due to species from neighboring regions dispersing into the ridge. The role of dispersal can be explored using methods such as the decomposition of phylobetadiversity indices [Leprieur et al., 2012] and Bayesian phylogeographic diffusion models [Eme et al., 2013]. The growing availability of molecular datasets over large spatial scales offers a unique opportunity to understand spatial variation in subterranean species diversity [Mammola et al., 2019b]. It also paves the way for exploring factors causing the diversification [Ribera et al., 2010], as well as the morphological and molecular evolution of subterranean species [Saclier et al., 2020; Fiser et al., 2019].

Acknowledgments

We thank all the people, including many speleologists, who contribute to subterranean biodiversity inventory. Our acknowledgement goes to the French National Research Agency and EUR H2O'Lyons (ANR-17-EURE-0018) for their financial support. We are also grateful to A. Faille and R. Centelles Bascuas for revising an early draft of that paper.

densité d'organismes dans les habitats souterrains, l'ADNe est susceptible d'être présent en très faible concentration. Ce qui nécessitera la collecte de volumes d'échantillons environnementaux très importants. Deuxièmement, l'élément clé d'une approche d'identification moléculaire est l'exhaustivité de la base de données de référence (figure 2). Lorsque de nombreuses espèces, voire même des groupes entiers, ne sont pas référencés, l'identification peut échouer. Le manque de données moléculaires de référence pour de nombreux groupes souterrains peut également biaiser les méthodes moléculaires. Une fois collectés, les ADNe sont extraits, puis les barcodes sont amplifiés avant d'être séquencés en parallèle. À toutes ces étapes, mais particulièrement au niveau de l'amplification, les protocoles ne sont, par définition, pas optimisés pour les groupes peu connus, ce qui peut diminuer leur découverte et accentuer leur mauvaise caractérisation.

III. Au-delà de l'inventaire des espèces

Les approches moléculaires permettent également de mieux appréhender les causes des variations géographiques du nombre d'espèces. Le nombre d'espèces dans une région dépend en fin de compte de trois processus : la spéciation, l'extinction et la dispersion. Les inférences phylogénétiques réalisées à partir des séquences d'ADN sur les relations de parenté entre les espèces permettent de démêler l'influence relative de ces trois processus sur la crête de forte richesse en espèces observée en Europe (voir figure 3) [Zagmajster et al., 2018]. Sur les arbres phylogénétiques, la présence à l'intérieur de cette crête de nombreuses espèces « jeunes » et étroitement apparentées peut refléter une forte spéciation *in situ*. Inversement, la présence d'espèces présentant de longues histoires évolutives indépendantes peut refléter un faible taux d'extinction qui favorise la préservation de la diversité au cours du temps. Enfin, une richesse spécifique élevée peut aussi provenir de la dispersion au sein de la crête d'espèces en provenance des régions voisines. Le rôle de la dispersion peut être exploré à l'aide de méthodes telles que la décomposition des indices de phylobétadiversité [Leprieur et al., 2012] et des modèles bayésiens de diffusion [Eme et al., 2013]. La disponibilité croissante de données moléculaires à de grandes échelles spatiales offre une occasion unique de comprendre les causes des variations régionales de la diversité des espèces souterraines [Mammola et al., 2019b]. Elle ouvre aussi de nombreuses possibilités comme celles de dater plus précisément les événements de diversification en milieu souterrain [Ribera et al., 2010] et de comprendre les mécanismes à l'origine de l'évolution morphologique et moléculaire en milieu souterrain [Saclier et al., 2020 ; Fiser et al., 2019].

Remerciements

Nous remercions tous les collecteurs, parmi lesquels de nombreux spéléologues, qui contribuent à l'inventaire de la biodiversité souterraine. Cette étude a bénéficié du soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche et de l'EUR H2O'Lyons (ANR-17-EURE-0018). Nous remercions A. Faille et R. Centelles Bascuas pour la révision de cet article.

- CRISTESCU M. E., 2014** - From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in ecology & evolution*, 29, 566-571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>
- DE QUEIROZ K., 1998** - The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation and terminological recommendations. pp. 57-75, in D. J. Howard and S. H. Berlocher (Eds.), *Endless forms: Species and speciation*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- DE QUEIROZ K., 2007** - Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879-886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- EME D., MALARD F., KONECNY-DUPRÉ L., LEFÉBURE T. & DOUADY C. J., 2013** - Bayesian phylogeographic inferences reveal contrasting colonization dynamics among European groundwater isopods. *Molecular Ecology*, 22, 5685-5699. <https://doi.org/10.1111/mec.12520>
- EME D., ZAGMAJSTER M., DELIĆ T., FIŠER C., FLOT J.-F., KONECNY-DUPRÉ L., PÁLSSON S., STOCH F., ZAKŠEK V., DOUADY C. J. & MALARD F., 2018** - Do cryptic species matter in macroecology? Sequencing European groundwater crustaceans yields smaller ranges but does not challenge biodiversity determinants. *Ecography*, 41, 424-436. <https://doi.org/10.1111/ecog.02683>
- FAILLE A., 2006** - *Endémisme et adaptation à la vie cavernicole chez les Trechinae pyrénéens (Coleoptera : Caraboidea) : approches moléculaire et morphométrique*. PhD Thesis, Muséum national d'histoire naturelle, Paris.
- FAILLE A., TÄNZLERR. & TOUSSAINT E. F. A., 2015** - On the way to speciation: shedding light on the karstic phylogeography of the microendemic cave beetle *Aphaenops cerberus* in the Pyrenees. *Journal of Heredity*, 106, 692-699. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv078>
- FERREIRA D., 2005** - *Biodiversité aquatique souterraine de France: base de données, patrons de distribution et implications en termes de conservation*. PhD thesis, University Lyon 1, Lyon.
- FERREIRA D., DOLE-OLIVIER M.-J., MALARD F., DEHARVENG L. & GIBERT J., 2003** - Faune aquatique souterraine de France: base de données et éléments de biogéographie. *Karstologia*, 42(2), 15-22. https://www.persee.fr/doc/karst_0751-7688_2003_num_42_1_2528
- FIŠER C., DELIĆ T., LUŠTRIK R., ZAGMAJSTER M. & ALTERMATT F., 2019** - Niches within a niche: Ecological differentiation of subterranean amphipods across Europe's interstitial waters. *Ecography*, 42, 1212-1223. <https://doi.org/10.1111/ecog.03983>
- GIBERT J. & CULVER D. C., 2009** - Assessing and conserving groundwater biodiversity: An introduction. *Freshwater Biology*, 54, 639-648. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02202.x>
- GORIČKI Š., STANKOVIĆ D., SNOJ A., KUNTNER M., JEFFERY W. R., TRONTELJ P., ... & ALJANČIĆ G. 2017** - Environmental DNA in subterranean biology: range extension and taxonomic implications for *Proteus*. *Scientific reports*, 7, 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep45054>
- HEBERT P. D., RATNASINGHAM S. & DE WAARD J. R., 2003** - Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, S96-S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- HEY J., 2006** - On the failure of modern species concepts. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 447-450. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.05.011>
- JUBERTHIE C. & GINET R., 1994** - France. pp. 665-692, in C. Juberthie and V. Decu (eds.), *Encyclopaedia Biospeologica*, Société de Biospéologie, Moulis, France.
- KIRSE A., BOURLAT S. J., LANGEN K. & FONSECA V.G., 2021** - Unearthing the potential of soil eDNA metabarcoding - Towards best practice advice for invertebrate biodiversity assessment. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9:630560. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.630560>
- LEPRIEUR F., ALBOUY C., DE BORTOLI J., COWMAN P. F., BELLWOOD D. R. & MOUILLOT D., 2012** - Quantifying phylogenetic beta diversity: distinguishing between 'true' turnover of lineages and phylogenetic diversity gradients. *PLoS ONE*, 7, e42760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042760>
- MAMMOLA S., CARDOSO P., ANGYAL D., BALÁZS G., BLICK T., BRUSTEL H., CARTER J., ČURČIĆ S., DANFLOUS S., DÁNYI L., DÉJEAN S., DELTSHEV C., ELVERICI M., FERNÁNDEZ J., GASPARO F., KOMNENOV M., KOMPOSCH C., KOVÁČ L., KUNT K. B., MOCK A., MOLDOVAN O., NAUMOVA M., PAVLEK M., PRIETO C. E., RIBERA C., ROZWAŁKA R., RŮŽIČKA V., VARGOVIŠH R. S., ZAENKER S. & ISAIA M., 2019a** - Continental data on cave-dwelling spider communities across Europe (Arachnida: Araneae). *Biodiversity Data Journal*, 7, e38492. <https://doi.org/10.3897/BDJ.7.e38492>
- MAMMOLA S., CARDOSO P., ANGYAL D., BALÁZS G., BLICK T., BRUSTEL H., CARTER J., ČURČIĆ S., DANFLOUS S., DÁNYI L., DÉJEAN S., DELTSHEV C., ELVERICI M., FERNÁNDEZ J., GASPARO F., KOMNENOV M., KOMPOSCH C., KOVÁČ L., KUNT K. B., MOCK A., MOLDOVAN O., NAUMOVA M., PAVLEK M., PRIETO C. E., RIBERA C., ROZWAŁKA R., RŮŽIČKA V., VARGOVIŠH R. S., ZAENKER S. & ISAIA M., 2019b** - Local-versus broad-scale environmental drivers of continental-diversity patterns in subterranean spider communities across Europe. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 286, 20191579. <http://doi.org/10.1098/rspb.2019.1579>
- NIEMILLER M.L., PORTER M.L., KEANY J., GILBERT H., FONG D. W., CULVER D. C., HOBSON C. S., KENDALL K. D., DAVIS M. A. & TAYLOR S. J. 2018** - Evaluation of eDNA for groundwater invertebrate detection and monitoring: a case study with endangered *Stygobromus* (Amphipoda: Crangonyctidae). *Conservation Genetics Resources*, 10, 247-257. <https://doi.org/10.1007/s12686-017-0785-2>
- PARIMUCHOVA A., ZUROVCOVA M., PAPAC V. & KOVAC L., 2020** - Subterranean *Deuteraphorura* Absolon, 1901, (Hexapoda, Collembola) of the Western Carpathians-Trogglomorphs at the northern distributional limit in Europe. *PLoS ONE*, 15(1): e0226966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226966>
- RIBERA I., FRESNEDA J., BUCUR R., IZQUIERDO A., VOGLER A. P., SALGADO J. M. & CIESLAK A., 2010** - Ancient origin of a Western Mediterranean radiation of subterranean beetles. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 29 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-29>
- SACLIER N., CHARDON P., MALARD F., KONECNY-DUPRÉ L., EME D., BELLEC A., BRETON V., DURET L., LEFÉBURE T. & DOUADY C. J., 2020** - Bedrock radioactivity influences the rate and spectrum of mutation. *eLife* 2020;9:e56830 doi: 10.7554/eLife.56830
- STOCH F. & GALASSI D. M. P., 2010** - Stygobiotic crustacean species richness: a question of numbers, a matter of scale. *Hydrobiologia*, 653, 217-234. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0356-y>
- THOMSEN P. F. & WILLERSLEV E., 2015** - Environmental DNA-An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological conservation*, 183, 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- VÖRÖS J., MÁRTON O., SCHMIDT B. R., GÁL J. T. & JELIĆ D., 2017** - Surveying Europe's only cave-dwelling chordate species (*Proteus anguinus*) using environmental DNA. *PLoS one*, 12(1), e0170945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170945>
- WEST K. M., RICHARDS Z. T., HARVEY E. S., SUSAC R., GREALY A. & HUNCE M., 2020** - Under the karst: detecting hidden subterranean assemblages using eDNA metabarcoding in the caves of Christmas Island, Australia. *Scientific reports*, 10(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78525-6>
- YEATES D. K., SEAGO A., NELSON L., CAMERON S. L., JOSEPH L. & TRUEMAN J. W. H., 2011** - Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Systematic Entomology*, 36, 209-217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2010.00558.x>
- ZAGMAJSTER M., BORKO S., DELIĆ T., DOUADY C. J., EME D., MALARD F., TRONTELJ P. & FIŠER C., 2022 (in press)** - Availability of DNA barcodes in subterranean amphipods in Europe. In: *Proceedings of the 18th International Congress of Speleology*, 24th - 31st July 2021, Savoie, France.
- ZAGMAJSTER M., EME D., FIŠER C., GALASSI D., MARMONIER P., STOCH F., CORNU J.-F. & MALARD F., 2014** - Geographic variation in range size and beta diversity of groundwater crustaceans: insights from habitats with low thermal seasonality. *Global Ecology and Biogeography*, 23, 1135-1145. <https://doi.org/10.1111/geb.12200>
- ZAGMAJSTER M., MALARD F., EME E., & CULVER D. C., 2018** - Subterranean biodiversity patterns from global to regional scales. In: Moldovan O.T., Kovac L. and Halse S. Eds., *Cave Ecology. Ecological Studies* 235. Springer Nature Switzerland, pp. 195-225. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98852-8_9

KARSTOLOGIA 79

1^{er} semestre 2022

ISSN 0751 - 7688

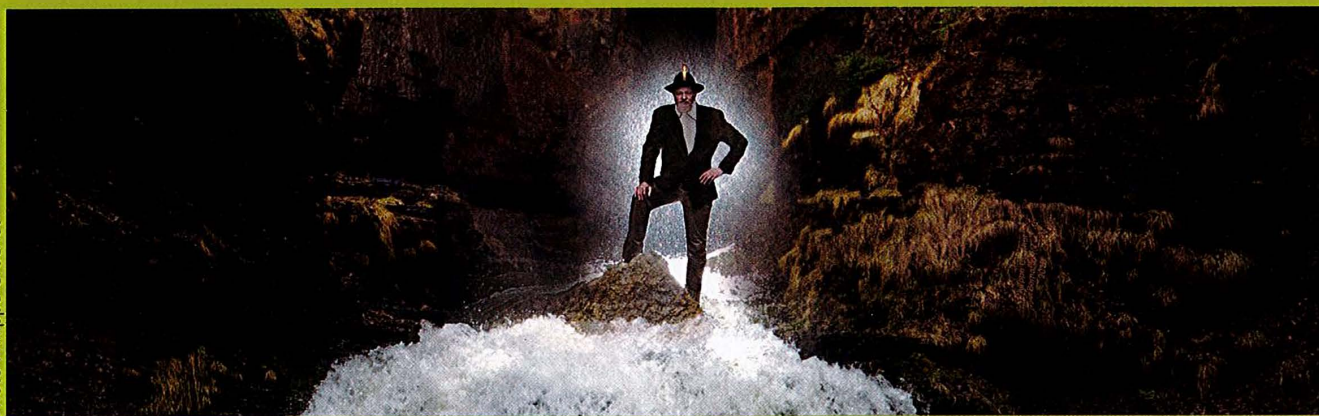


*Karsts and karstology
in France in the
21st century*

**Karsts et karstologie
en France au 21^e siècle**

Fédération française de spéléologie et Association française de karstologie
Revue soutenue par l'Institut des sciences humaines et sociales du CNRS





Contents Sommaire

- | | |
|---|--|
| <p>G. DANDURAND, A. DEVOS, É. HUSSON, J. BERTHE, N. BOLLOT, G. FRONTEAU, O. LEJEUNE et B. LOSSON 1</p> <p><i>Karsts of sedimentary basins: A comparison between the Paris and Aquitaine Basins</i>
Karsts des bassins sédimentaires : comparaison entre les Bassins parisien et aquitain</p> | <p>S. PISTRE, H. JOURDE, A. JOHANNET, M. BAKALOWICZ, V. LÉONARDI, C. BATIOU-GUILHE, V. DE MONTETY, G. ARTIGUE et J.-L. SEIDEL 61</p> <p><i>Karst hydrogeology: from early concepts to recent advances</i>
L'hydrogéologie karstique : des premiers concepts aux avancées récentes</p> |
| <p>L. BRUXELLES et D. CAILHOL 11</p> <p><i>Two plateau karsts at the origin of French karstology the Grands Causses and the plateaus of the Jura</i>
Deux karsts de plateaux à l'origine de la karstologie française : les Grands Causses et les plateaux du Jura</p> | <p>B. LISMONDE 67</p> <p><i>Karstological climatology research in France in the 21st century</i>
Les recherches sur la climatologie souterraine en France au XXI^e siècle</p> |
| <p>S. JAILLET, M. CALVET, J.-J. DELANNOY, F. HOBLÉA, R. MAIRE, Y. PERRETTE et P. VERNANT 21</p> <p><i>French mountain karsts, markers of landscape evolutions</i>
Les karsts des montagnes françaises, marqueurs des évolutions paysagères</p> | <p>F. MALARD, H. VERDIER, L. KONECNY-DUPRÉ, D. EME, C. J. DOUADY et T. LEFÉBURE 73</p> <p><i>Subterranean species inventory in the molecular era</i>
Inventaire des espèces souterraines dans l'ère moléculaire</p> |
| <p>B. ARFIB et L. MOCOCHAIN 35</p> <p><i>Deep flooded karsts of south-eastern France Genesis and hydrodynamic functioning</i>
Karsts noyés profonds du sud-est de la France Genèse et fonctionnement</p> | <p>J.-B. FOURVEL, C. GRIGGO, I. GAY, A. ARGANT et F. HOBLÉA 79</p> <p><i>Quaternary palaeontology and karst environments, a long relationship...</i>
Paléontologie quaternaire et milieu karstique, une longue histoire...</p> |
| <p>G. DANDURAND, H. CAMUS, C. PALLIER, J.-Y. BIGOT, L. BRUXELLES, D. CAILHOL, R. MAIRE et Y. QUINIF 45</p> <p><i>Speleogenesis challenged by new paradigms</i>
La spéléogénèse à l'épreuve des nouveaux paradigmes</p> | <p>P. GALANT 85</p> <p><i>Another look at the archaeology of karst environments</i>
Un autre regard sur l'archéologie des milieux karstiques</p> |
| <p>S. VERHEYDEN, C. NEHME et B. P. ONAC 53</p> <p><i>Speleothem science – A short review and state of the art</i>
Les spéléothèmes au fil du temps</p> | <p>C. GAUCHON et V. BIOT 91</p> <p><i>News about underground tourism in France</i>
Actualités du tourisme souterrain en France</p> |