



HAL
open science

**Taxonomies moléculaire et morphologique chez les
foraminifères planctoniques : élaboration d'un référentiel
et cas particuliers de Globigerinoides sacculifer et
Neogloboquadrina pachyderma**

Aurore André

► **To cite this version:**

Aurore André. Taxonomies moléculaire et morphologique chez les foraminifères planctoniques : élaboration d'un référentiel et cas particuliers de Globigerinoides sacculifer et Neogloboquadrina pachyderma. Paléontologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10200 . tel-01048643

HAL Id: tel-01048643

<https://theses.hal.science/tel-01048643>

Submitted on 25 Jul 2014

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE E2M2

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 14 Novembre 2013

par

Madame Aurore ANDRE

**Taxonomies moléculaire et morphologique chez les foraminifères
planctoniques : élaboration d'un référentiel et cas particuliers de
Globigerinoides sacculifer et *Neogloboquadrina pachyderma***

Directeurs

Gilles ESCARGUEL, Frédéric QUILLÉVERE, Thibault de GARIDEL-THORON

JURY :

M. J. Dolan	DR. CNRS	Observatoire Océanologique de Villefranche/mer
M. R. Schiebel	Pr.	Université d'Angers
M. C. Douady	Pr.	Université Lyon 1
M. C. de Vargas	DR. CNRS	Station biologique de Roscoff
M. T. de Garidel –Thoron	CR. CNRS	CEREGE, Université Aix-Marseille
M. G. Escarguel	MCF	Université Lyon 1
M. F. Quillévére	MCF	Université Lyon 1

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE E2M2

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 14 Novembre 2013

par

Madame Aurore ANDRE

**Taxonomies moléculaire et morphologique chez les foraminifères
planctoniques : élaboration d'un référentiel et cas particuliers de
Globigerinoides sacculifer et *Neogloboquadrina pachyderma***

Directeurs

Gilles ESCARGUEL, Frédéric QUILLÉVERE, Thibault de GARIDEL-THORON

JURY :

M. J. Dolan	DR. CNRS	Observatoire Océanologique de Villefranche/mer
M. R. Schiebel	Pr.	Université d'Angers
M. C. Douady	Pr.	Université Lyon 1
M. C. de Vargas	DR. CNRS	Station biologique de Roscoff
M. T. de Garidel –Thoron	CR. CNRS	CEREGE, Université Aix-Marseille
M. G. Escarguel	MCF	Université Lyon 1
M. F. Quillévére	MCF	Université Lyon 1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, Frédéric Quillévéré, Gilles Escarguel et Thibault de Garidel-Thoron de m'avoir encadrée sur ce sujet aux frontières de la biologie et de la géologie. Je les remercie également pour leur disponibilité et leur patience sans faille.

Je remercie Christophe Douady qui a supervisé les analyses moléculaires et m'a permis de hanter le LEHNA pendant une bonne partie de ces trois dernières années.

Je remercie Elisabeth Michel qui a collecté le matériel lors de la campagne OISO 21 et Colomban de Vargas qui a également fourni du matériel biologique.

Je remercie Ralf Schiebel d'avoir accepté de rapporter cette thèse et pour son accueil au sein du Laboratoire des Bio-Indicateurs Actuels et Fossiles d'Angers. Je remercie également John Dolan qui a accepté d'être rapporteur dans un délai aussi bref.

Je voudrais remercier pour leur aide :

Raphael Morard qui m'a appris les bases de l'analyse de l'ADN chez les foraminifères et la manipulation d'Adobe Illustrator. Je le remercie également pour son aide graphique et pour ses nombreuses discussions.

Lara Konecny et Marie-Rose Viricel pour les manips de biologie moléculaire, pour le bon fonctionnement du laboratoire tout au long de ces années de thèse et pour m'avoir gentiment accueillie dans leur bureau.

Michal Kucera, Ralph Aurahs et Agnes Weiner pour avoir partagé avec moi leur méthode de récolte ce qui a permis de donner un grand coup d'accélérateur à cette thèse. Je les remercie également de m'avoir accueilli à Tübingen en Juillet 2011.

Tristan Lefébure qui m'a montré comment utiliser le serveur Proasellus sans lequel le calcul de certains arbres ne serait toujours pas achevé.

Gilles Escarguel pour son aide et ses réponses rapides et claires sur les questions de statistique.

Noëlle Buchet et Yurika Ujiié qui m'ont initié à la collecte et au tri des foraminifères planctoniques. Je remercie Noëlle de m'avoir soutenu le moral durant la campagne Kh10-4.

Elisabeth Michel, Marie-Hélène Castéra, Linda Rossignol, Gulay Isguder et Julie Meilland pour leur aide lors de la campagne OISO 19.

Yves Gally pour avoir hébergé des foraminifères dans son congélateur à La Réunion.

Je remercie également mes amis doctorants. Alexandra que je connais depuis la L3, avec qui j'ai partagé rapports de terrain, appartements, cours de suédois, semestre Erasmus, préparation à l'agrégation, répétitions de théâtre, grandes discussions pas toujours très sérieuses, un nombre incalculable de repas... bref, une amie formidable. Je remercie aussi le reste de la bande, Delphine, Abel, Emmanuel et Kévin, qui ont rendu ces années de thèse bien agréables. Je n'oublie pas Gatsby et Elsa qui ont successivement partagé mon bureau.

Je voudrais également remercier mes amis chevaux : Fascinating, Thélème et Nataelle, et toute l'équipe des cavaliers: Florence, Jean-Marc, Marc, Marie, Martin, Morgane, Olivia, Olivier, Stéphane, Véronique, Virginie, et notre moniteur, Gérard. Grace à vous, la semaine ne peut que bien se terminer.

Je n'oublie pas mes professeurs de SVT, Thierry Decaux (6^{ième} 5^{ième} 3^{ième}), Agnès Ménéroud (2nd 1^{ière} TS) et Olivier Monnier dit « Momo » (Math sup), qui m'ont fait aimer la géologie et la biologie.

Enfin je remercie ma grand'mère Mireille, ma famille et ma grand-mère de cœur, Nini, pour leur soutien et leur affection tout au long de mes études.

Cette thèse est dédiée à mes merveilleux parents, Lyne et Frédéric, et à mon grand 'père René qui me manque énormément.

RESUME

Les morpho-espèces de foraminifères planctoniques sont composées d'éco-génotypes parfois différenciables sur la base de la morphologie de leur coquille. Cette découverte récente d'une diversité ainsi qualifiée de « pseudo-cryptique » ouvre des perspectives d'amélioration de la précision des reconstructions paléocéanographiques. Malheureusement, ces génotypes ont été définis de façon subjective et ne sont pas homogènes quant à leur rang taxinomique, ce qui est pourtant un pré-requis pour leur intégration dans les modèles de reconstruction. Grâce à l'application de méthodes quantitatives de délimitation d'unités taxinomiques sur les séquences partielles de la petite sous-unité ribosomale (SSU) disponibles chez l'ensemble des morpho-espèces de foraminifères planctoniques, nous montrons que 49 de ces génotypes sont suffisamment divergents pour constituer d'authentiques espèces. Deux morpho-espèces clés de la paléocéanographie sont étudiées plus en détail. Chez *Neogloboquadrina pachyderma*, l'obtention des premières séquences complètes de la SSU et la comparaison morphogénétique de spécimens (sub)polaires permettent de proposer un nouveau scénario évolutif et de montrer que les variations morphologiques sont ici d'origine éco-phénotypique, et donc indépendantes de la diversité génétique. Chez *Globigerinoides sacculifer*, caractérisé par une forte diversité morphologique, il existe au contraire une seule et unique espèce cosmopolite dans les eaux (sub)tropicales de l'Océan mondial. Ces deux cas particuliers montrent que, contrairement à ce que suggéraient les études précédentes, la spéciation pseudo-cryptique n'a pas valeur de règle chez les foraminifères planctoniques.

Mots-clés : foraminifères planctoniques, délimitation des unités taxinomiques, ABGD, GMYC, SSUrDNA (partiel et complet), ITSrDNA, biogéographie, morphométrie, écophénotypes.

ABSTRACT

Morphospecies of planktonic foraminifera are clusters of eco-genotypes that show small but significant shell morphological differences (pseudo-cryptic species). This discovery opens a new perspective for improving the accuracy and resolving power of paleoceanographic reconstructions. Unfortunately, current genetic type delimitations suffer subjectivity, inducing non-homogenous taxonomic status while homogenous taxonomic status is a prerequisite for including genetic types in reconstruction models. By applying quantitative and complementary methods for taxonomic units delimitation to the available dataset of partial sequences of SSU (ribosomal small sub-unit), we delimited 49 genuine (pseudo)cryptic species of planktonic foraminifera. We studied two paleoceanographic key-species. Complete sequencing of the SSU and morpho-genetic comparison within austral (sub)polar genetic types of *Neogloboquadrina pachyderma* lead to a new phylogeographic hypothesis and showed that morphological variations are the result of ecophenotypic effects and are not related with genetic types. The morphologically diverse *Globigerinoides sacculifer* is the first case of a planktonic foraminifera morphospecies corresponding to a single genetic type distributed world-wide in (sub)tropical waters. These two cases show that, contrary to previous studies conclusions, pseudo-cryptic speciation is not a rule within planktonic foraminifera.

Keywords: planktonic foraminifera, species delimitation, ABGD, GMYC, SSUrDNA (partial and complete), ITSrDNA, biogeography, morphometry, ecophenotypes.

SOMMAIRE

<i>Remerciements</i>	2
<i>Résumé</i>	4
<i>Abstract</i>	5
<i>Sommaire</i>	6
INTRODUCTION.....	10
1. Découverte de la diversité cryptique	10
2. Les foraminifères planctoniques	13
3. Objectifs	24
PARTIE I: TAXONOMIE MOLECULAIRE CHEZ LES FORAMINIFERES PLANCTONIQUES.....	30
<u>Chapitre 1 : taxonomie moléculaire chez les foraminifères planctoniques, élaboration d'un référentiel</u>	31
<i>Abstract</i>	32
1. Introduction	33
2. Material	36
3. Methods	37
<i>3.1. Extraction, amplification and sequencing of newly assembled data</i>	37
<i>3.2. Synonymy, ambiguous assignation and dataset assembly</i>	37
<i>3.3. Patristic distances</i>	39
<i>3.4. Automatic genetic types delimitation methods</i>	41
3.4.1. Automatic Barcode Gap Delimitation (ABGD).....	41
3.4.2. General Mixed Yule Coalescent (GMYC).....	42
4. Results	44
<i>4.1. Patristic distances</i>	44
<i>4.2. Automatic genetic type delimitation methods</i>	47
4.2.1. ABGD.....	47
4.2.2. GMYC.....	51
5. Discussion	58
<i>5.1. Heterogeneity of previous genetic type delimitations</i>	58
<i>5.2. ABGD: an efficient method to build species delimitation hypotheses in planktonic foraminifera</i>	59

5.3. <i>GMYC: a distance-independent method for building species delimitations in planktonic foraminifera</i>	60
5.4. <i>Towards a molecular taxonomy of planktonic foraminifera</i>	62
5.5. <i>Integrative taxonomy and biogeography of planktonic foraminiferal cryptic species</i>	64
5.5.1. <i>Macroperforate spinoses</i>	64
5.5.2. <i>Macroperforate non-spinose</i>	68
5.5.3. <i>Microperforate clade</i>	70
6. Conclusions	75
<i>Acknowledgements</i>	77
<i>References</i>	78
<u>Chapitre 2 : apport des séquences complètes de la SSU chez une morpho-espèce dont la délimitation des types génétiques est problématique</u>	83
<i>Résumé</i>	84
<i>Abstract</i>	85
1. Introduction	86
2. Matériel et Méthodes	89
2.1. <i>Reconstructions phylogénétiques à partir des séquences de la fin de la SSU</i>	89
2.2. <i>Obtention de séquences complètes de la SSU</i>	90
2.3. <i>Analyses phylogénétiques à partir des séquences complètes de la SSU</i>	92
3. Résultats	93
3.1. <i>Analyses phylogénétiques obtenues à partir des séquences de la fin de la SSU</i>	93
3.2. <i>Analyse des séquences complètes</i>	96
4. Discussion	101
4.1. <i>Implications phylogénétiques</i>	101
4.2. <i>Statut taxonomique des types génétiques de <u>N. pachyderma</u> et <u>N. incompta</u> à partir de séquences complètes</i>	102
4.3. <i>Révision des scénarios phylogéographiques de <u>N. pachyderma</u></i>	103
5. Conclusions	106
<i>Remerciements</i>	107
<i>Références</i>	108

PARTIE II : TAXONOMIES MORPHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE : CAS DE *Globigerinoides sacculifer* ET *Neogloboquadrina pachyderma*.....112

Chapitre 1 : un cas particulier, *Globigerinoides sacculifer*, morpho-espèce présentant une forte diversité morphologique associée à une très faible diversité génétique..... 113

Abstract..... 115

1. Introduction..... 116

2. Material and Methods..... 120

2.1. *Sampling*..... 120

2.2. *DNA Extraction, Amplification, and Sequencing*..... 123

2.3. *Phylogenetic and Phylogeographic Analyse*..... 125

2.4. *CHRONOS Database*..... 126

3. Results..... 127

4. Discussion..... 131

4.1. *Genetic Diversity in Globigerinoides sacculifer*..... 131

4.2. *Morphological Taxonomy versus Genetic Divergence*..... 132

4.3. *Significance of Morphological Variation in the Globigerinoides sacculifer Plexus*..... 134

4.4. *Global Dispersal and Gene Flow in Globigerinoides sacculifer*..... 137

5. Conclusions..... 141

Acknowledgements..... 142

References..... 143

Chapitre 2 : un cas particulier, *Neogloboquadrina pachyderma*, morpho-espèce présentant une diversité morphologique d'origine écophénotypique..... 148

Abstract..... 149

1. Introduction..... 150

2. Material and Methods..... 153

2.1. *Samples collection*..... 153

2.2. *Hydrographic data*..... 155

2.3. *Sequencing and genotyping*..... 155

2.3.1. *DNA extraction, amplification and sequencing*..... 155

2.3.2. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis*..... 156

2.4. *Morphological analyses*..... 157

3. Results..... 159

3.1. Identification of genetic types.....	159
3.2. Hydrography and geographic distribution of genetic types.....	160
3.3. Morphological analysis.....	164
4. Discussion.....	175
4.1. Collection methods.....	175
4.2. Environmental controls on the distribution of genetic types of <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> in the Southern Ocean.....	175
4.3. A case for true cryptic species in <i>Neogloboquadrina pachyderma</i>	179
4.4. Ecophenotypic variations in genetic types of <i>Neogloboquadrina pachyderma</i>	182
5. Conclusions.....	185
<i>Acknowledgements</i>	186
<i>References</i>	187
CONCLUSIONS GENERALES.....	192
REFERENCES.....	204
ANNEXE : Méthodes d'étude de la diversité génétique des foraminifères planctoniques...	220
1. Récolte et conditionnement des foraminifères planctoniques.....	221
2. Extraction de l'ADN.....	222
3. Amplification de l'ADN.....	223
4. Géotypage.....	223
5. Clonage.....	224
<i>Remerciements</i>	224
FICHE I : Récolte de foraminifères pour analyses génétiques.....	225
FICHE II : Récolte de foraminifères pour analyses génétiques.....	226
FICHE III : Fabrication du GITC*	227
FICHE IV : Extraction de l'ADN.....	228
FICHE V : Amplification de l'ADN par PCR.....	229
FICHE VI : Géotypage de <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> Types II, III et IV.....	230
FICHE VII : Clonage de produits PCR kit TOPO TA K4510-20.....	231
FICHE VIII : Scripts sous R.....	233

INTRODUCTION

1. Diversité cryptique et domaine pélagique

Découverte de la diversité cryptique

Estimer et décrire la biodiversité est fondamental pour pouvoir comprendre le fonctionnement des écosystèmes et donc pour permettre une protection et/ou gestion efficace des environnements naturels. Ces estimations nécessitent l'identification d'espèces valides (Bickford et al., 2006). Avant le développement, dans les années 1990, des techniques d'amplification de l'ADN permettant le séquençage et/ou le génotypage de nombreux individus et donc la caractérisation d'espèces au sens génétique, la taxonomie de la majorité des organismes se basait sur le concept de morpho-espèce. Une des premières définitions de l'espèce au sens biologique se réfère au critère d'interfécondité et de fécondité et viabilité de la descendance (Mayr, 1995 in de Quierroz, 2005). Cette définition, couramment employée (de Quierroz, 2005), est rarement remise en cause, même si quelques rares groupes, principalement chez les plantes, posent problème (Coyne et Orr, 2004). Cependant, utiliser le critère d'interfécondité implique de pouvoir observer des cycles complets de reproduction des organismes. Cette observation peut parfois se faire en milieu naturel (pour les organismes de grande taille notamment) mais implique le plus souvent de pouvoir cultiver/élever les organismes en laboratoire. Au final, le critère d'interfécondité n'est pas testable pour la majorité des organismes, soit du fait de l'impossibilité de les maintenir en laboratoire, soit du fait qu'ils n'ont pas de reproduction sexuée. La biologie moléculaire a permis de décrire des génotypes et de s'affranchir du critère d'interfécondité et du concept de morpho-espèce. De nouveaux critères, basés sur les reconstitutions phylogénétiques, ont été proposés, pour définir des espèces, alors dites espèces génétiques (Coyne et Orr, 2004 ; Bickford et al., 2006) et pouvant être comparées aux morpho-espèces décrites par les taxonomistes. De nombreuses études (Fig. 1) ont mis en évidence une diversité cryptique c'est-à-dire que la diversité génétique de nombreux organismes est bien supérieure à leur diversité morphologique. Ainsi, les morpho-espèces correspondent à un regroupement de plusieurs espèces, identiques du point de vue de la morphologie, appelées espèces cryptiques (Knowlton 1993 ; Norris, 2000 ; Fenchel, 2005 ; Bickford et al., 2006). Ces espèces cryptiques peuvent toutefois présenter de légères différences qui étaient jusqu'alors interprétées comme des variantes

écophénotypiques ou comme du polymorphisme ; elles sont donc alors appelées espèces pseudo-cryptiques (par exemple, Saez et al., 2003 ; Morard et al., 2011).

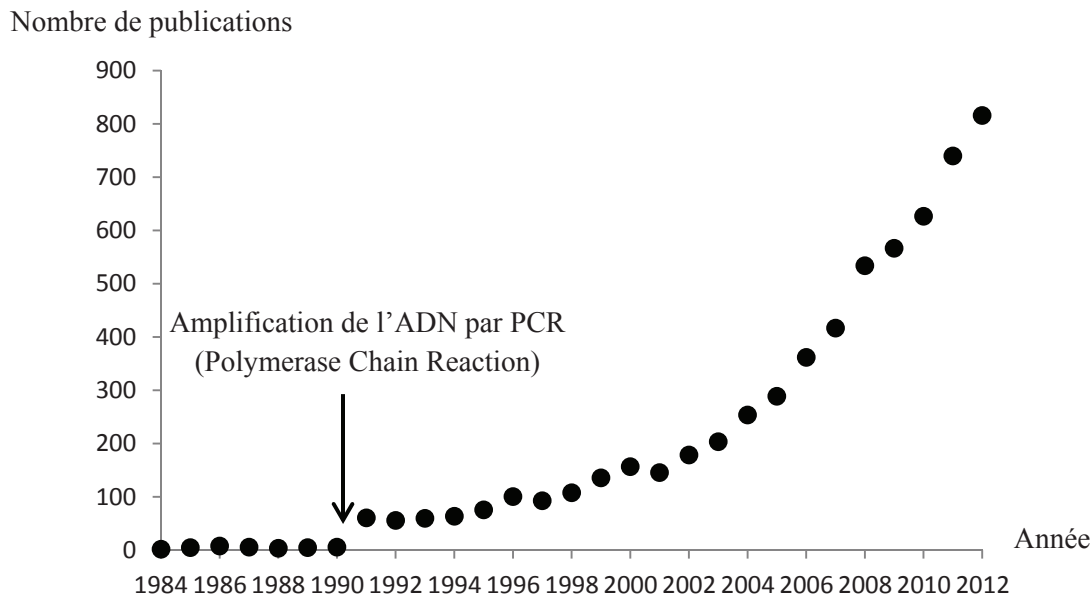


Figure 1 : nombre de publications référencées dans le Science Citation Index contenant le terme « espèce cryptique » dans le titre et/ou le résumé

La diversité cryptique concerne tous les groupes (par ex. amphibiens, arthropodes, champignons, bactéries, poissons, voir Bickford et al., 2006) et tous les milieux (des pôles aux forêts tropicales en passant par les océans et les rivières). La découverte des espèces cryptiques a permis de mettre en évidence une biodiversité insoupçonnée et a de nombreuses implications pour la compréhension et la préservation des écosystèmes (Bickford et al., 2006).

Le domaine pélagique

Jusqu'à la fin du 20^{ième} siècle, le domaine pélagique était perçu comme une vaste étendue d'eau, plutôt stable et homogène, structurée principalement par le gradient latitudinal de température (par exemple, Emery et Meincke, 1986). Depuis, il est apparu que l'océan ouvert est beaucoup plus hétérogène. Les habitats sont nombreux et variés du fait des variations de température, de salinité et des nutriments au sein de la colonne d'eau ; de plus cette stratification varie au cours des saisons (par exemple, Fairbanks et Weibe, 1980 ; Platt et Sathyendranath, 1999 ; Hess, 2004). Ainsi, les hautes latitudes sont caractérisées par de faibles températures et des eaux non stratifiées ; les latitudes moyennes présentent une instabilité liée à une saisonnalité marquée détruisant la stratification de la partie supérieure de

la colonne d'eau ; les régions équatoriales possèdent une stratification marquée, notamment une thermocline nette et peu profonde (Rutherford et al., 1999). Le milieu pélagique reste néanmoins un domaine vaste et il est difficile de distinguer des limites nettes entre ses différentes parties. Certains auteurs ont proposé les fronts océaniques comme possibles barrières, principalement pour le plancton (Rutherford et al., 1999 ; Boltovskoy et al., 2003), mais ces fronts semblent loin d'être infranchissables comme le montre le maintien d'un flux génique entre organismes planctoniques (foraminifères notamment) arctiques et antarctiques (Norris et de Vargas, 2000).

Diversité cryptique en domaine pélagique

En 1994, Briggs estimait la diversité marine totale à 200 000 taxons (organismes pluricellulaires), soit une diversité au moins 50 fois inférieure à celle du domaine terrestre qui ne représente pourtant que 30% de la surface du globe. Cette faible diversité a été interprétée comme résultant du fort potentiel de dispersion des organismes dans le milieu pélagique, ce qui rend plus difficile la spéciation, en particulier si l'allopatrie en est la modalité principale (Norris, 2000). Des études génétiques ont été réalisées sur des organismes pélagiques très divers : bactéries (par ex. Moore et al., 1998), phytoplancton (par ex. Kooistra et al., 2008), zooplancton (par ex. Laakmann et al., 2009 ; Bachy et al., 2013) ou ostéichthyens (par ex, Miya et Nishida, 1997). Toutes montrent que la diversité cryptique est la règle chez les organismes pélagiques. Cette découverte a bouleversé la perception du domaine pélagique en montrant que la diversité des océans ouverts avait été largement sous-estimée. Pour expliquer une telle diversité, il a fallu repenser les écosystèmes pélagiques comme un ensemble de nombreuses niches écologiques abritant des espèces spécialisées (Laakmann et al., 2009 ; Levine et HillRisLambers, 2009) ; les mécanismes de la spéciation sympatrique permettent d'expliquer l'apparition d'espèces en l'absence de barrière physique et seraient donc particulièrement à même de rendre compte de la spéciation en domaine pélagique (Norris, 2000; De Aguiar et al., 2009). La découverte de nombreuses espèces cryptiques a bien sûr eu d'importantes répercussions : elle montre en particulier que l'inventaire de la biodiversité marine est encore très incomplet et elle a des conséquences sur les mesures de conservation des espèces et de leurs habitats, celles-ci étant plus spécialisées qu'initialement envisagé (Bickford et al., 2006).

2. Les foraminifères planctoniques

Les morpho-espèces de foraminifères planctoniques

Les foraminifères planctoniques sont des organismes unicellulaires du super-groupe des Rhizaria (Adl et al., 2005). Omniprésents en milieu marin, ils occupent des niches écologiques très diverses et font partie des proies du métazooplancton (Hemleben et al., 1989). Ces « protozoaires » pélagiques sécrètent une coquille calcitique (aussi appelée test) submillimétrique (<500 μm), faisant des foraminifères planctoniques un contributeur important dans le cycle du carbone (Schiebel, 2002). Leur registre fossile s'étend du Jurassique inférieur à l'Actuel (Hart et al., 2003). Les très vastes répartitions biogéographiques des morpho-espèces de foraminifères planctoniques permettent des corrélations biostratigraphiques à l'échelle mondiale et font donc des foraminifères planctoniques d'excellents marqueurs pour reconstituer la chronologie des dépôts sédimentaires pélagiques (Kenneth et Srinivasan, 1983). L'utilisation biostratigraphique des foraminifères planctoniques, dès le XIX^{ème} siècle, explique que leur taxonomie repose essentiellement sur la caractérisation de descripteurs morphologiques des tests (concept de morpho-espèce) (Kennett et Srinivasan, 1983). Ce concept de morpho-espèce, hérité des approches linnéennes et paléontologiques, prévaut toujours, à tel point que la majorité des holotypes de taxons actuels sont des spécimens fossilisés (Bolli et Saunders, 1985). Cette prééminence des caractères morphologiques dans la définition des espèces trouve aussi son origine dans le fait que le critère d'interfécondité (concept d'espèce biologique) de ces organismes n'a jamais pu être testé en laboratoire chez ces organismes difficiles à cultiver (Hemleben et al., 1989). Néanmoins, dès le milieu du XX^{ème} siècle, la libération de nombreuses cellules flagellées en fin de cycle a été observée chez des individus cultivés, ce qui a conduit à supposer un cycle de vie sexué chez les foraminifères planctoniques (Hemleben et al., 1989). Ce cycle de vie semble suivre une périodicité lunaire ou semi-lunaire chez les espèces vivant en surface alors que les espèces plus profondes ont un cycle plus long, pouvant atteindre une année (Schiebel et Hemleben, 2005).

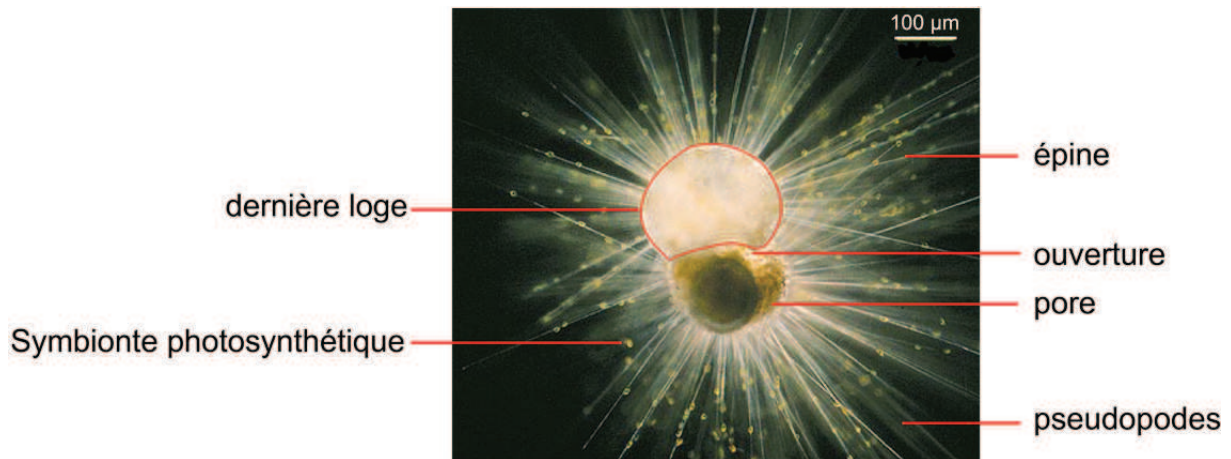


Figure 2 : foraminifère épineux vivant (*Globigerinoides* sp, photo O. R. Andersson)

La coquille des foraminifères planctoniques est incluse dans la cellule et permet la différenciation d'un endoplasme, à l'intérieur de la coquille, et d'un ectoplasme constitué d'un réseau de pseudopodes à l'extérieur (Fig. 2) (Hemleben et al., 1989). Cette coquille se forme par l'addition, à partir d'une loge initiale (ou proloculus), de plusieurs loges selon un arrangement planispiralé, trochospiralé ou plus rarement sérié ou streptospiralé (Schiebel et Hemleben, 2005). La continuité au sein du cytoplasme est maintenue par les forams permettant la communication d'une loge à l'autre ainsi que par les pores et l'ouverture qui mettent en relation endoplasme et ectoplasme (Hemleben et al., 1989). Une cinquantaine de morpho-espèces actuelles de foraminifères planctoniques ont été décrites sur la base de la morphologie de la coquille (Hemleben et al., 1989). Elles peuvent être regroupées en 3 clades (Darling et al., 1999, Fig. 3): les épineux macroperforés (19 morpho-espèces, présence d'épines et diamètre des pores $> 2,5 \mu\text{m}$), les non épineux macroperforés (17 morpho-espèces, sans épines et diamètre des pores $> 1 \mu\text{m}$) et les non épineux microperforés (7 morpho-espèces, sans épines et diamètre des pores $< 1 \mu\text{m}$) (Hemleben et al., 1989 ; Huber et Leckie, 2011).

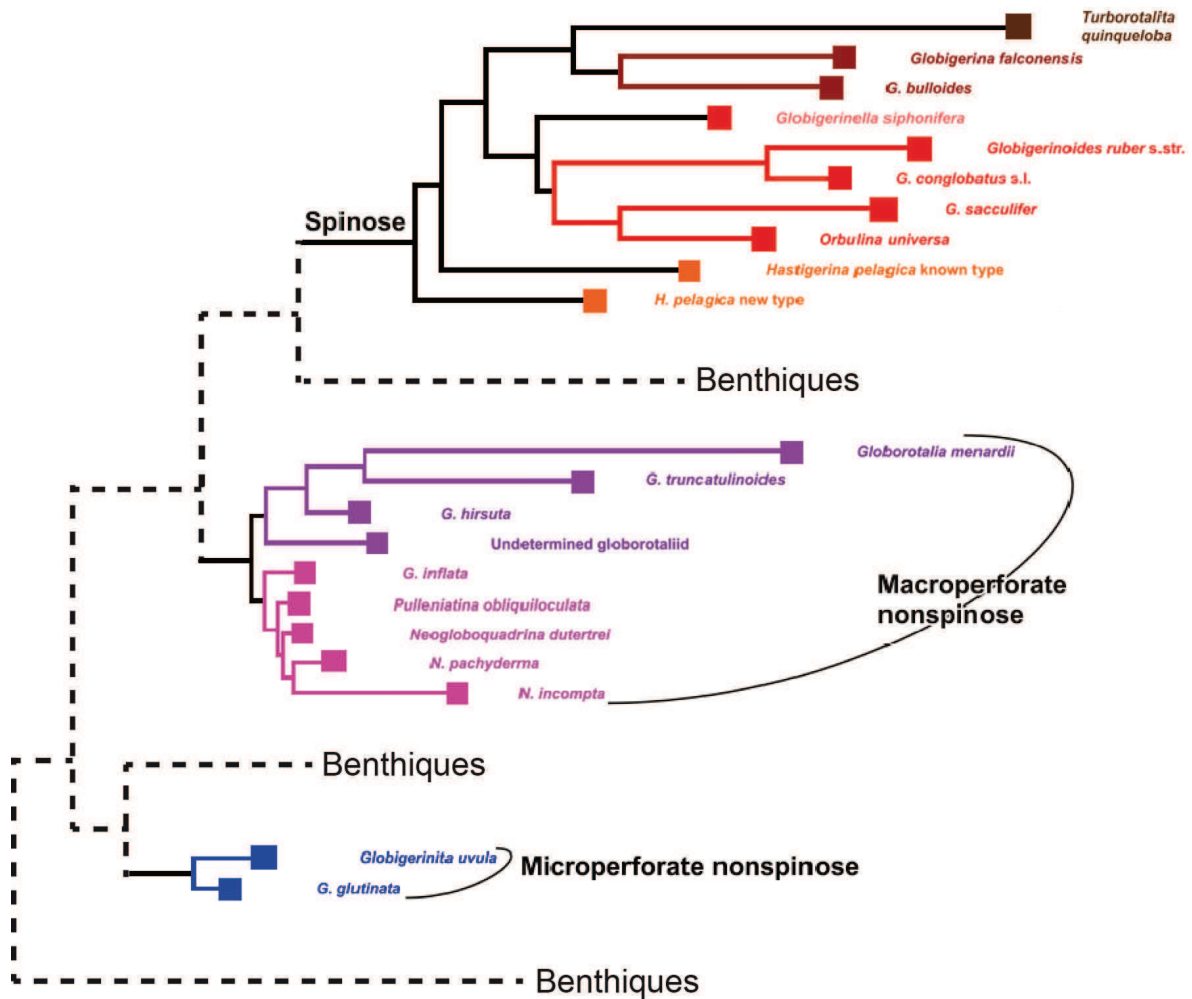


Figure 3 : Phylogénie des morpho-espèces de foraminifères planctoniques d'après Aurahs et al. (2009) ; les relations phylogénétiques entre les trois clades (pointillés) sont issues des travaux de Darling et al. (1999).

Les foraminifères planctoniques sont exclusivement marins. Ils vivent au sein de la colonne d'eau, de la surface aux eaux plus profondes en dessous de la zone photique (jusqu'à plus de 1000 m chez *Truncorotalia truncatulinoides* ; Schiebel et Hemleben, 2005). La profondeur du milieu de vie dépend à la fois de la morpho-espèce : par exemple, *Globigerinoides ruber* et *Globigerinoides sacculifer* vivent dans les eaux de surface alors que *T. truncatulinoides* et *Hirsutella hirsuta* sont des espèces d'eaux profondes (Schiebel et Hemleben, 2005) ; mais aussi du stade dans le cycle de vie. En effet, chez de nombreuses morpho-espèces, la calcification gamétogénétique s'accompagne d'une migration dans la colonne d'eau (Schiebel et Hemleben, 2005). Parmi les espèces vivant dans les eaux de surface, certaines abritent, de façon obligatoire ou facultative, des symbiontes photosynthétiques (chrysophycées ou dinoflagellés) leur conférant une autotrophie partielle (Hemleben et al., 1989). Les autres espèces sont hétérotrophes. Les morpho-espèces épineuses

hétérotrophes se nourrissent principalement de zooplancton (copépodes) (Caron et Bé, 1984) alors que les morpho-espèces non épineuses privilégient le phytoplancton (Diatomées surtout) (Spindler et al., 1984).

Taxonomie morphologique chez les foraminifères planctoniques

L'utilisation historique des foraminifères comme marqueurs stratigraphiques est à l'origine de leur taxonomie basée sur la morphologie du test. L'aspect des coquilles, extrêmement variable, peut être décrit principalement par la forme et agencement des loges, la microstructure (épines, pustules, pores, carènes) et les caractéristiques de l'ouverture (Kennett et Srinivasan, 1983). Néanmoins, la question du sens biologique et donc taxonomique de ces caractères est cruciale (Parker, 1962). Par exemple, la dernière loge de forme allongée (appelée « sac ») de *Globigerinoides sacculifer* a longtemps été utilisée comme principal critère d'identification de cette morpho-espèce jusqu'à ce que des cultures (Bé, 1980 ; Bé et al., 1983, Hemleben et al., 1987 ; Bijma et al., 1992) montrent que cette loge pourrait correspondre à un stade ontogénétique facultatif, donc sans valeur taxonomique. La difficulté d'observation de la microstructure des tests avant la généralisation des clichés MEB dans les années 1970 (Hemleben et al., 1989) a entraîné de nombreux débats quant à la classification et l'appartenance taxonomique des morpho-espèces. Ainsi, la morpho-espèce non épineuse *Neogloboquadrina pachyderma* a longtemps été classée dans le genre épineux *Globigerina* (par exemple, Banner et Blow, 1960). De même, certaines confusions entre stades juvéniles et espèces n'ont pu être levées qu'à partir du développement des cultures et des études ontogénétiques (par exemple, le cas de *Globigerina bulloides* var. *borealis* ; Bé, 1960).

Les classifications morphologiques actuelles (Kennett et Srinivasan, 1983, Hemleben et al., 1989, Aze et al., 2011) recourent largement les classifications phylogénétiques (Aurahs et al., 2009). Elles délimitent les trois principaux clades de foraminifères planctoniques en se basant sur la microstructure de la coquille : présence d'épines et aspect général de la porosité. Au sein de ces clades, les morpho-espèces sont délimitées le plus souvent à l'aide de la forme et de l'agencement des loges et des caractéristiques de l'ouverture. Néanmoins, l'identification de la limite entre variations écophénotypiques au sein d'une espèce et différences morphologiques entre espèces proches est un obstacle majeur pour ces taxonomies basées uniquement sur la morphologie (Parker, 1962). Cette limite est d'autant plus difficile à établir que l'on observe parfois des clines morphologiques (Hilbrecht, 1997). Ainsi, la distinction entre *Neogloboquadrina dutertrei*, *Neogloboquadrina incompta* et *N. pachyderma*

est restée longtemps problématique : certains, comme Cifelli (1961), les classaient comme des espèces distinctes alors que d'autres, au contraire, les considéraient comme une seule espèce présentant deux pôles morphologiques reliés par des « pachyderma-dutertrei intergrades » (par exemple, Rohling et Gieskers, 1989 ; Parker et Berger, 1971). Finalement, les critères morpho-anatomiques retenus semblent pertinents pour une classification à l'échelle des morpho-espèces mais trouvent cependant leur limite chez les clades présentant d'importantes variations intra-spécifiques.

Biogéographie des foraminifères planctoniques et applications paléocéanographiques

Les foraminifères planctoniques occupent les eaux de l'océan mondial, de la banquise antarctique (*Neogloboquadrina pachyderma* ; Dieckmann et al., 1991) aux eaux tropicales et équatoriales (par exemple, *Globigerinoides ruber* ; Hemleben et al., 1989). Chaque morpho-espèce présente des affinités environnementales qui lui sont propres et qui contrôlent donc sa distribution biogéographique (Hilbrecht, 1996 ; Fig. 4). Ces affinités environnementales ont été déduites de l'analyse des sédiments de surface (par exemple, Hilbrecht 1996), des récoltes, parfois stratifiées, de foraminifères vivants grâce à des filets à plancton (par exemple, Bé, 1959) ainsi que d'expériences de culture en laboratoire (par exemple, Bé, 1980 ; Bijma et al., 1992). Certaines morpho-espèces sont généralistes comme *Globigerinita glutinata* ou *Globigerina bulloides* qui pourraient supporter des températures allant de presque 0°C à plus de 30°C (Hilbrecht, 1996) alors que d'autres ont des affinités plus strictes comme *G. ruber pink* qui est exclusivement tropicale (Hilbrecht, 1996). Dans le cas des espèces polaires à tempérées on observe des distributions bipolaires (par exemple, *N. pachyderma*, Hemleben et al., 1989).

Figure 4 : affinités environnementales vis-à-vis de la température des principales morpho-espèces de foraminifères planctoniques ; les épaisseurs du trait donnent les abondances relatives (Darling et Wade, 2008, modifié de Bé et Tolderlund, 1971).

Les coquilles de foraminifères planctoniques représentent 30 à 80% du bilan carbonaté profond ce qui explique leur registre fossile particulièrement complet et abondant (Schiebel et Hemleben, 2005). Rutherford et al. (1999) ont montré que la répartition des assemblages de morpho-espèces est corrélée aux conditions environnementales, et plus particulièrement à la température et, dans une moindre mesure, à la productivité des eaux de surface. Les foraminifères planctoniques sont donc à la fois abondants et sensibles aux changements climatiques, ce qui en fait un groupe fondamental pour les reconstructions paléocéanographiques. Les fonctions de transfert permettent de relier assemblages fossiles et conditions paléoenvironnementales. Elles sont calibrées à partir des abondances relatives des

tests des différentes morpho-espèces de foraminifères actuels recueillis dans les sédiments de surface. Ces assemblages sont alors mis en relation avec la température mesurée à 10 m de profondeur à la verticale des sédiments de surface (Kucera et al., 2005). D'après le principe d'actualisme, ces fonctions de transfert restent valables tant que les morpho-espèces peuvent être reconnues, en supposant que leurs caractéristiques éco-physiologiques et leurs distributions géographiques sont restées stables au cours du temps. Elles permettent donc l'estimation des paléotempératures océaniques, en particulier au cours du Quaternaire (Kucera et al., 2005). Par ailleurs, les compositions isotopiques et élémentaires ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$, Mg/Ca, Katz et al., 2010) des coquilles ont été empiriquement mises en relation avec les conditions environnementales (le plus souvent, la température). Ces équations ont ensuite pu être appliquées dans le registre fossile pour en déduire les caractéristiques des océans anciens (pour une synthèse voir Katz et al., 2010).

Diversité cryptique chez les foraminifères planctoniques

La première séquence d'ADN de foraminifère planctonique a été obtenue par Merle et al. (1994). Plus tard, Holzman et Pawlowski (1996) ont publié les premières méthodes d'extraction et d'amplification par PCR spécifiquement adaptées aux foraminifères. Les premières études génétiques ont eu pour objet principal la phylogénie des foraminifères (benthiques et planctoniques) et la question de leur divergence possiblement très précoce au sein des eucaryotes (Pawlowski et al., 1996). Les premiers travaux portant sur la diversité génétique au sein des morpho-espèces chez les foraminifères planctoniques datent de 1997 (de Vargas et al., 1997 ; Darling et al., 1997 ; Huber et al., 1997). A l'exception de quelques rares séquences de régions codantes utilisées dans le cadre de phylogénies de foraminifères (actine, Flakowski et al., 2005 ; ARN polymérase II, Longet et al., 2007), l'étude de la diversité des foraminifères planctonique se base sur des séquences partielles de l'ADN ribosomal 18S (SSU, petite sous-unité ribosomale) et des ITS (internal transcribed spacer) (Fig. 5).

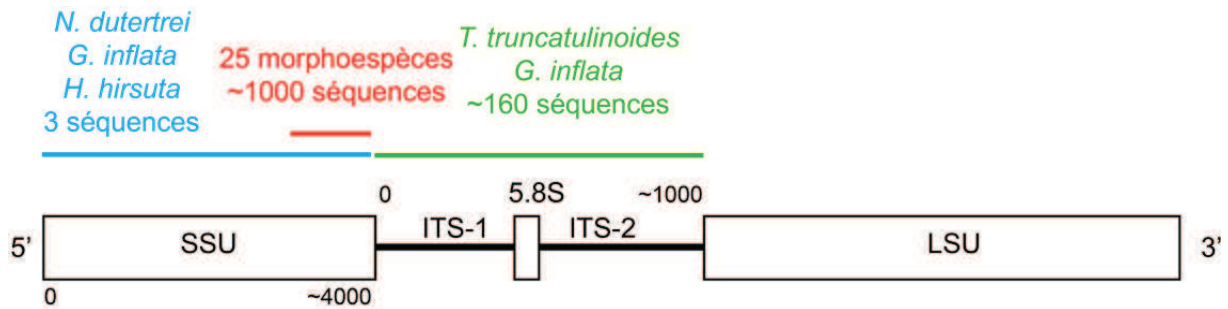


Figure 5 : organisation de l'ADN ribosomal nucléaire et régions séquencées chez les foraminifères planctoniques. Les rectangles correspondent aux régions transcrites incorporées dans les ribosomes, les traits représentent les régions transcrites mais non incorporées aux ribosomes. Les ordres de grandeur des tailles de la SSU et de l'ITS sont donnés en paires de bases.

Darling et al. (1997) et de Vargas et al. (1997) ont montré que la SSU des foraminifères est particulièrement longue et présente des boucles variables spécifiques à ce groupe. De plus, cette région évolue de façon inhabituellement rapide (30 à 50 fois plus vite que chez les métazoaires ; de Vargas et al., 1997) ce qui en fait un bon marqueur pour étudier la diversité génétique au sein des morpho-espèces. L'ITS est une région transcrite non incorporée aux ribosomes et qui évolue donc à un rythme encore plus rapide que la SSU. Cette région n'a été jusqu'à présent étudiée que chez deux morpho-espèces, *T. truncatulinoides* et *Globoconella inflata* (de Vargas et al., 2001 ; Morard et al., 2011).

Les séquences de la fin de la SSU ont permis de proposer une phylogénie des morpho-espèces de foraminifères planctoniques (Aurahs et al., 2009). Ces derniers forment un groupe polyphylétique au sein des foraminifères benthiques (Fig. 3) ; les trois groupes (macroperforés épineux, macroperforés non épineux et microperforés) correspondent chacun à un clade différent (Darling et al., 1999 ; Aurahs et al., 2009).

Les études se focalisant sur la diversité génétique au sein des morpho-espèces (tableau 1) ont montré que la diversité génétique des foraminifères planctoniques ne fait pas exception à la règle dans le domaine pélagique. Parmi la cinquantaine de morpho-espèces décrites (Hemleben et al., 1989), 11 ont été étudiées avec obtention de nombreuses séquences d'individus provenant d'environnements contrastés et géographiquement éloignés. Ces 11 morpho-espèces sont en réalité constituées d'un ensemble de 2 à 7 types génétiques pouvant correspondre à des espèces cryptiques (Tableau 1).

morphoespèce	nombre de génotypes	marqueur génétique utilisé	références
<i>Neogloboquadrina pachyderma</i>	7	SSUrDNA	4,6,8
<i>Turborotalia quinqueloba</i>	6	SSUrDNA	4,5,9
<i>Neogloboquadrina incompta</i>	2	SSUrDNA	4,6,7
<i>Globigerina bulloides</i>	7	SSUrDNA	3,4,5,8
<i>Truncorotalia truncatulinoïdes</i>	5	SSUrDNA et ITSrDNA	10,12,14
<i>Orbulina universa</i>	3	SSUrDNA	1,2,10,11
<i>Globigerinella siphonifera</i>	7	SSUrDNA	1,2,3
<i>Globigerinoides ruber</i>	5	SSUrDNA	1,2,3,10
<i>Globoconella inflata</i>	2	ITSrDNA	13
<i>Hastigerina pelagica</i>	3	SSUrDNA	15
<i>Pulleniatina obliquiloculata</i>	3	SSUrDNA	16

Tableau 1 : nombre de types génétiques identifiés au sein des morpho-espèces bien échantillonnées. Références : (1) Darling et al. (1996) ; (2) Darling et al. (1997) ; (3) Darling et al. (1999) ; (4) Darling et al. (2000) ; (5) Darling et al. (2003) (6) Darling et al. 2004 ; (7) Darling et al. (2006) ; (8) Darling et al. (2007) ; (9) Stewart et al. (2001) ; (10) de Vargas et al. (1997) ; (11) de Vargas et al. (1999) ; (12) de Vargas et al. (2001) ; (13) Morard et al. (2009) ; (14) Ujiï et Lipps (2009) ; (15) Weiner et al. (2012) ; (16) Ujiï et al. (2013).

Chacune de ces espèces cryptiques est associée à des conditions environnementales particulières (Darling et Wade, 2008), plus restreintes que celles de la morpho-espèce, il s'agit donc d'éco-génotypes. Ainsi, de Vargas et al. (1999) ont montré que les trois types génétiques d'*Orbulina universa* étaient associés à des conditions trophiques distinctes : une espèce est caractéristique des zones d'upwellings, une autre des gyres oligotrophes et une dernière semble avoir une affinité pour l'oligotrophie extrême. La morphologie des espèces cryptiques a été particulièrement étudiée chez 5 morpho-espèces: *Globigerina siphonifera* (Huber et al., 1997), *G. ruber* (Aurahs et al., 2011), *O. universa* (de Vargas et al., 1999 ; Morard et al., 2009), *Globoconella inflata* (Morard et al., 2011) et *T. truncatulinoïdes* (de Vargas et al., 2001 ; Quillévére et al., 2013). Les différents auteurs ont pu mettre en évidence des différences morphologiques ténues mais statistiquement significatives entre les différentes espèces cryptiques, qui peuvent donc être qualifiées de pseudo-cryptiques. Par exemple, les espèces cryptiques d'*O. universa* présentent des différences significatives de la porosité de leur test qui étaient auparavant interprétées comme écophénotypiques (Fig. 6) (Morard et al., 2009). Il ressort donc de l'étude de la diversité génétique au sein des morpho-espèces de foraminifères planctoniques une sorte de règle : chaque morpho-espèce est le regroupement de plusieurs éco-génotypes présentant de légères différences morphologiques.

Figure 6 : Vues de détail au microscope électronique à balayage de la face interne des tests des trois espèces cryptiques d'*Orbulina universa* (Morard et al., 2009)

Implications paléocéanographiques de la mise en évidence d'une diversité cryptique chez les foraminifères planctoniques

La présence d'espèces pseudo-cryptiques a des conséquences sur les reconstitutions paléoenvironnementales basées sur les foraminifères planctoniques. Les méthodes employées, fonctions de transfert ou équations de paléotempérature font implicitement l'hypothèse que les morpho-espèces ont chacune des affinités écologiques homogènes. Or, ces fonctions de transfert utilisent en fait des morpho-espèces qui sont constituées de plusieurs types génétiques ayant chacun des exigences écologiques qui leur sont propres. Ceci entraîne une augmentation de la variance thermique et donc un accroissement des marges d'erreur et même, une sur- ou sous-estimation des paléotempératures si une ou plusieurs espèces cryptiques sont absentes de la base de données utilisée pour la calibration des fonctions de transfert. Les reconstitutions paléocéanographiques du Quaternaire, largement basées sur les fonctions de transfert perdent alors en précision (Kucera et Darling, 2002 ; Kucera et al., 2005). Les équations de calibration en géochimie, pour le $\delta^{18}\text{O}$, le $\delta^{13}\text{C}$ et le rapport Mg/Ca, sont réalisées à partir d'individus appartenant à la même morpho-espèce, mais les différentes espèces cryptiques la constituant ne sont pas prises en compte (Erez et Luz, 1983 ; Anand et Elderfield, 2003). Or, des individus provenant d'espèces cryptiques différentes pourraient avoir des fractionnements isotopiques ou élémentaires différents (Darling et Wade, 2008), ce qui augmenterait la marge d'erreur des équations et donc des reconstructions, voire biaiserait systématiquement les estimations de paléotempératures si ces équations sont appliquées à des espèces cryptiques n'ayant pas été prises en compte dans les calibrations.

Cependant, comme il semble que les espèces cryptiques de foraminifères planctoniques correspondent généralement à des éco-génotypes et des espèces pseudo-cryptiques, il est possible de transformer cet obstacle de la diversité cryptique en une opportunité d'améliorer les reconstructions paléoclimatiques. Connaissant les affinités environnementales actuelles des espèces cryptiques, il devient possible d'intégrer les préférences environnementales propres aux génotypes dans la calibration des fonctions de transfert. Les affinités thermiques correspondant aux espèces sont alors plus réduites, ce qui permet de reconstituer de façon plus précise la température des eaux de surface anciennes. Kucera et Darling (2002) ont ainsi estimé que pour les meilleures reconstitutions, la marge d'erreur pourrait passer en dessous d'1°C, précision maximale des fonctions de transfert basées sur les morpho-espèces (Malmgren et al., 2001). Depuis, Morard et al. (2013) ont montré que l'intégration de la diversité cryptique de seulement 4 morpho-espèces (*Globigerina bulloides*, *Orbulina universa*, *Truncorotalia truncatulinoides* et *Globoconella inflata*) suffisait à réduire la marge à moins de 1°C dans l'application de fonctions de transfert dans l'hémisphère sud. De même, calibrer les équations de paléo-températures basées sur les compositions isotopiques et élémentaires à partir des espèces cryptiques permettra de réduire le bruit dû aux différences d'affinité écologiques entre espèces. Comme d'après les horloges moléculaires certaines spéciations cryptiques ont eu lieu il y a plusieurs millions d'années (6 à 12 Ma pour *O. universa*; de Vargas et al., 1999), l'amélioration des reconstitutions paléoclimatiques basées sur les foraminifères planctoniques est donc possible pour les derniers millions d'années et plus particulièrement pour le Pléistocène-Holocène dont le spectre de morpho-espèces est sensiblement identique à celui de l'Actuel.

3. Objectifs

L'objectif de cette thèse est de poursuivre l'investigation de la diversité pseudo-cryptique chez les foraminifères planctoniques. Cette investigation implique la mise en relation de la taxonomie moléculaire, c'est-à-dire les différents types génétiques décrits à partir d'individus actuels, avec la morpho-taxonomie qui est la seule utilisable dans le registre fossile.

Délimitation des espèces chez les foraminifères planctoniques

La première partie de mon travail a pour but : (1) de proposer et de comparer des méthodes quantitatives de délimitation des espèces à partir des séquences d'ADN ; (2) de faire une mise au point taxonomique des espèces cryptiques chez les foraminifères planctoniques à partir des séquences déposées sur NCBI augmentées de nouvelles données et (3) de réaliser une synthèse des données biogéographiques associées à cette nouvelle taxonomie. Le découpage des morpho-espèces en espèces cryptiques a été jusqu'à présent défini de façon qualitative à partir des groupements de séquences observés sur les arbres phylogénétiques. Ces définitions sont donc subjectives et de nombreux auteurs ont décrit des « génotypes », « types » et « sous-types » dont le rang taxonomique (c'est-à-dire, espèce, sous-espèce ou population) n'est pas clairement établi (Kucera et Darling, 2002). Or, l'utilisation des espèces cryptiques en paléocéanographie requiert une grande cohérence taxonomique. De plus, la mise au point d'un cadre de référence permettant la définition des espèces cryptiques à partir des séquences ADN ouvre la voie à l'interprétation des jeux de données issus du séquençage environnemental, qui est une fabuleuse opportunité de dévoiler la biogéographie des espèces cryptiques.

Phylogénies basées sur des séquences complètes de la SSU

Les relations phylogénétiques entre les types génétiques de quelques morpho-espèces et/ou le statut taxonomique de leurs différents types génétiques restent encore mal résolus. Dans ces cas particuliers, les séquences partielles de la SSU semblent donc insuffisamment informatives. Pourtant, les séquences complètes de la SSU restent très rares chez les foraminifères planctoniques (Schweizer et al., 2008 ; Seears, 2011). De plus, ces séquences, utilisées uniquement dans le cadre de phylogénies à l'échelle des principaux clades, ne permettent pas l'étude de la diversité cryptique au sein des morpho-espèces. En réalisant, pour la première fois, le séquençage de la SSU complète des Types II, III et IV de

Neogloboquadrina pachyderma, nous allons mettre en évidence l'intérêt des séquences complètes de la SSU pour des phylogénies à l'échelle de la morpho-espèce.

Diversité cryptique au sein de la morpho-espèce *Globigerinoides sacculifer*

Ce troisième chapitre s'intéresse à la morpho-espèce *Globigerinoides sacculifer* dont la diversité génétique est encore sous-échantillonnée. *Globigerinoides sacculifer* est un foraminifère planctonique épineux de la super-famille des Globigerinoidea (groupe des foraminifères macroperforés épineux : Schiebel et Hemleben, 2005). Il est apparu au Miocène inférieur il y a 19,3 à 18,7 Ma (Kennett et Srinivasan, 1983 ; Berggren et al., 1995) ce qui en fait une des plus anciennes morpho-espèces encore présentes actuellement. Le test de *G. sacculifer* est trochospiralé avec des loges sphériques sauf la dernière, appelée le « sac » qui peut présenter une élongation distale très typique (Fig. 7). Il possède en outre une microstructure en nid d'abeille caractéristique. Ce foraminifère est très abondant (base de données du Projet Margo, 2009, Fig. 7) dans les eaux tropicales et sub-tropicales et supporte d'assez larges gammes de température et de salinité : de 14°C à 31°C et de 24‰ à 47‰ avec une température optimale de croissance de 28°C (Hemleben et al., 1989 ; Bijma et al., 1990). *Globigerinoides sacculifer* vit dans la partie supérieure de la zone photique (20-30m) durant la majeure partie de son développement où il profite d'une autotrophie partielle grâce à l'activité photosynthétique de ses symbiontes (le dinoflagellé *Gymnodinium bei* ; Gast et Caron, 1996). Bé et Hemleben (1970) interprètent la calcification gamétogénétique et la perte des épines qui lui est associée comme un alourdissement du test permettant au foraminifère de couler et donc de se reproduire plus en profondeur dans la colonne d'eau.

Du fait de sa grande abondance, *G. sacculifer* est une espèce-clef pour les reconstructions paléocéanographiques des régions de basse latitude. Cette espèce a aussi été utilisée pour calibrer des équations de paléotempérature basées sur le $\delta^{18}\text{O}$ (Erez et Luz, 1983) et le rapport Mg/Ca (Nurnberg et al., 1996). De plus, la diversité morphologique est particulièrement importante chez cette morpho-espèce, ce qui a conduit à la prolifération des termes taxonomiques : *G. sacculifer* avec sac ; *G. sacculifer* sans sac, *G. trilobus*, *G. trilobus immaturus*, *G. quadrilobatus* (Hemleben et al., 1987). De par ses larges affinités écologiques et sa grande diversité morphologique, il semble *a priori* très probable que *G. sacculifer* soit un regroupement de morphotypes correspondant à différents éco-génotypes. Cette étude se propose de tester cette hypothèse en se basant sur un large panel d'échantillons, incluant les différents morphotypes connus, en provenance des différents bassins océaniques et de régions

aux températures et à la productivité primaire contrastées. La diversité génétique chez *G. sacculifer* a été estimée grâce au séquençage de la fin de la SSU ainsi que de l'ITS-1 dont le taux d'évolution plus élevé permet d'accéder à l'histoire récente de la morpho-espèce.

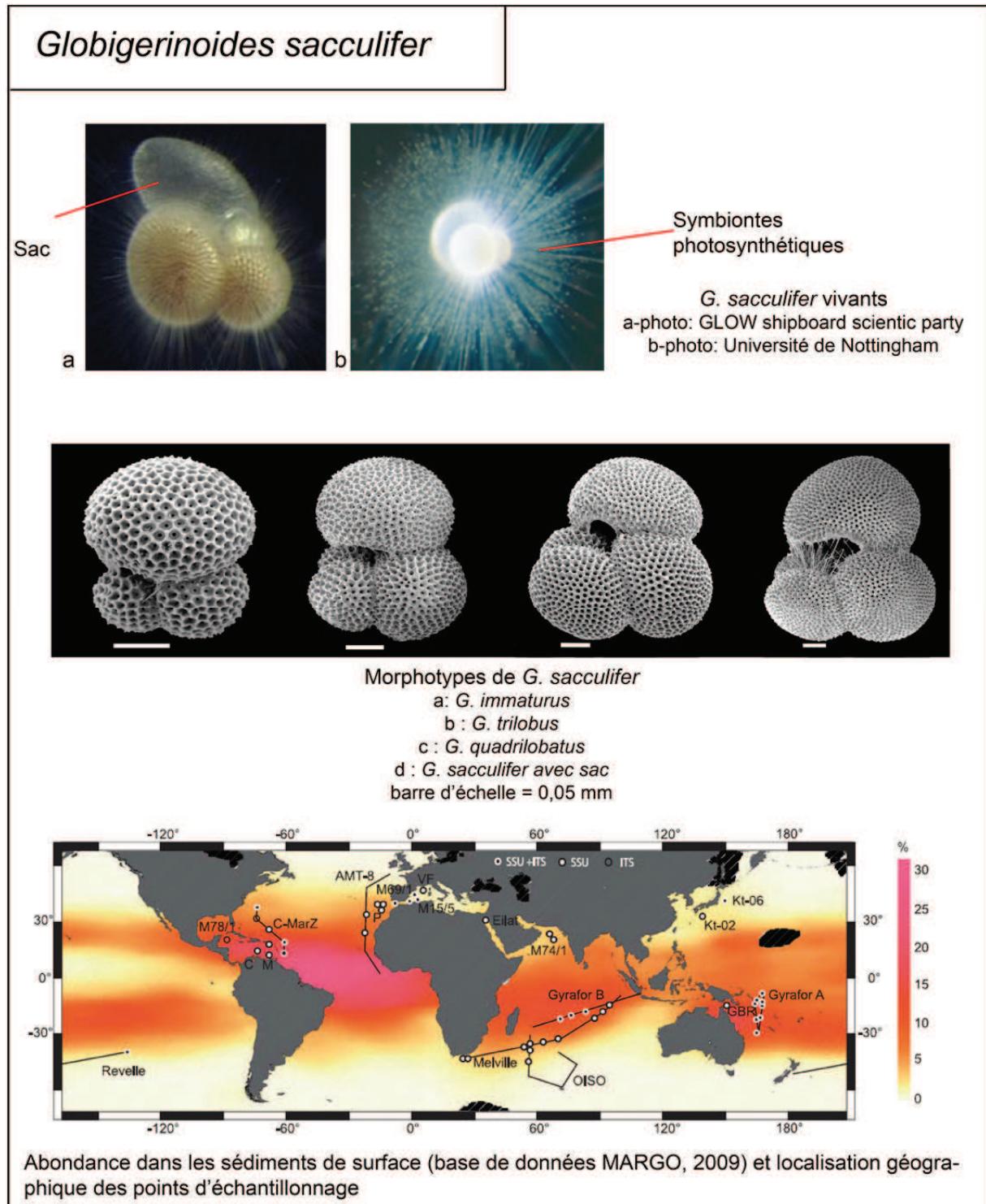


Figure 7 : présentation de *Globigerinoides sacculifer*

Biogéographie et caractérisation morphologique des géotypes de *Neogloboquadrina pachyderma*

La difficile observation de la microstructure des foraminifères planctoniques avant la généralisation des clichés MEB, dans les années 1970, a généré beaucoup de confusions quant à l'identité taxonomique de *Neogloboquadrina pachyderma*. Cette morpho-espèce a été initialement intégrée au genre épineux *Globigerina* (d'Orbigny, 1846), et ce n'est qu'avec les premiers clichés précis de la surface du test que l'appartenance de ce foraminifère au groupe des macroperforés a été démontrée (Collen et Vella, 1973). Les références à « *Globigerina* », « *Globoquadrina* » ou « *Globorotalia* » *pachyderma* ne sont tombées en désuétude qu'au début des années 1980 (Kennett et Srinivasan, 1983), au profit de *Neogloboquadrina pachyderma*. En disséquant des *N. pachyderma* matures, Bé (1960) a montré que les individus traditionnellement diagnostiqués comme des *Globigerina bulloides* atypiques correspondaient en fait aux juvéniles de *N. pachyderma*.

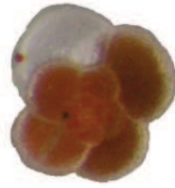
Par ailleurs, la distinction entre *N. pachyderma* et ses proches parents *Neogloboquadrina incompta* (= *N. pachyderma* dextre) et *N. dutertrei* est restée longtemps problématique. Certains auteurs comme Ciffeli (1961) considéraient ces morpho-espèces comme suffisamment différentes morphologiquement pour être considérées comme des espèces distinctes alors que la plupart les considéraient comme une seule espèce avec deux pôles morphologiques reliés par des formes intermédiaires (par exemple, Parker et Berger, 1971). Cette question n'a été définitivement tranchée que grâce aux analyses génétiques de Darling et al. (2003) : *N. pachyderma* dextre que l'on trouve dans les eaux tempérées, et *N. pachyderma* sénestre d'affinités sub-polaires à polaires (Hemleben et al., 1989) correspondent à deux espèces clairement distinctes. Le morphotype dextre doit donc être nommé *Neogloboquadrina incompta* (Darling et al., 2006). Dans mon travail, le nom *N. pachyderma* ne s'applique donc qu'au morphotype à enroulement sénestre.

Neogloboquadrina pachyderma (Fig. 8) est un foraminifère planctonique du groupe des macroperforés sans épines. Ses loges sont globuleuses et présentent un enroulement sénestre suivant une trochospire comprimée. Le test de la forme mature possède 4 à 5 loges sur le dernier tour et est épais avec des pores réduits suite à un encroutement de calcite qui lui donne une silhouette sub-quadrangulaire caractéristique (Kennett et Srinivasan, 1983). Le clade formé par *N. pachyderma* et *N. incompta* a divergé au Miocène supérieur, il y a 11,2 Ma (Aze et al., 2011). *Neogloboquadrina pachyderma* vit dans les eaux sub-polaires à

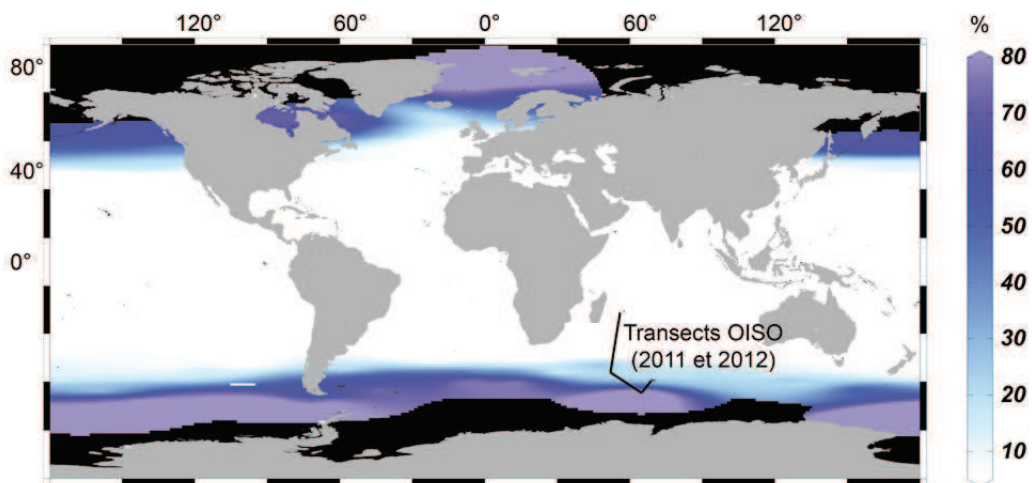
polaires des deux hémisphères (Hemleben et al., 1989). Elle supporte une large gamme de température allant des négatives à environ 12°C. En Antarctique, *N. pachyderma* peut survivre dans la glace de la banquise (Dieckmann et al., 1991) et de ce fait tolère les salinités extrêmes pouvant aller jusqu'à 82 ‰ du liquide résiduel de cristallisation (Hemleben et al., 1989). *Neogloboquadrina pachyderma* vit dans la zone photique même si elle ne possède pas de symbiotes photosynthétiques (Hemleben et al., 1989). Cet habitat peu profond peut trouver son origine dans la répartition des proies car ce foraminifère se nourrit principalement de phytoplancton, avec une préférence pour les diatomées (Hemleben et al., 1989).

Neogloboquadrina pachyderma est le foraminifère planctonique le plus abondant dans les régions polaires où elle représente jusqu'à 100 % des coquilles recueillies dans les sédiments de surface (Base de donnée du projet Margo, 2009, Fig. 8). C'est donc une espèce-clé pour les reconstructions des paléotempératures de hautes latitudes et notamment celles de l'océan austral. Or, l'océan austral est un carrefour majeur de la circulation océanique globale contrôlant les échanges de chaleur et jouant un rôle important dans la chimie de l'océan mondial (Keir, 1988; Beckey et al., 2003; Broecker, 1982). De plus, cette région joue un rôle fondamental dans le climat global : la mise en place du courant circum-antarctique a entraîné l'englacement de l'Antarctique et par-delà un refroidissement global des climats depuis l'Oligocène (Zachos et al., 2001). Les travaux de Darling et al. (2004, 2006, 2007) ont permis de définir 7 génotypes au sein cette morpho-espèce (Fig. 8), mais, comme la méthode d'extraction de l'ADN employée était destructive, cette diversité génétique n'a pas été mise en relation avec la diversité morphologique observée chez ce taxon (par exemple, Healy-Williams, 1984). Mon travail se concentre sur le cas des 3 génotypes présents dans l'océan austral à partir d'individus récoltés lors des campagnes OISO 19 (2011) et 21 (2012) (Fig.8). Cette région est la seule qui abrite plusieurs génotypes de *N. pachyderma* au contraire de l'Atlantique Nord et du Pacifique Nord qui ne livrent chacun qu'un seul génotype. De plus une étude précédente (Darling et al., 2004) a suggéré que la distribution des génotypes serait corrélable à la position des fronts océaniques, ce qui pourrait permettre le développement de nouveaux marqueurs paléocéanographiques. Mon travail a donc ici pour but de décrire précisément l'écologie des génotypes austraux de *N. pachyderma* ainsi que de mettre en relation génotypes, morphologie et écologie.

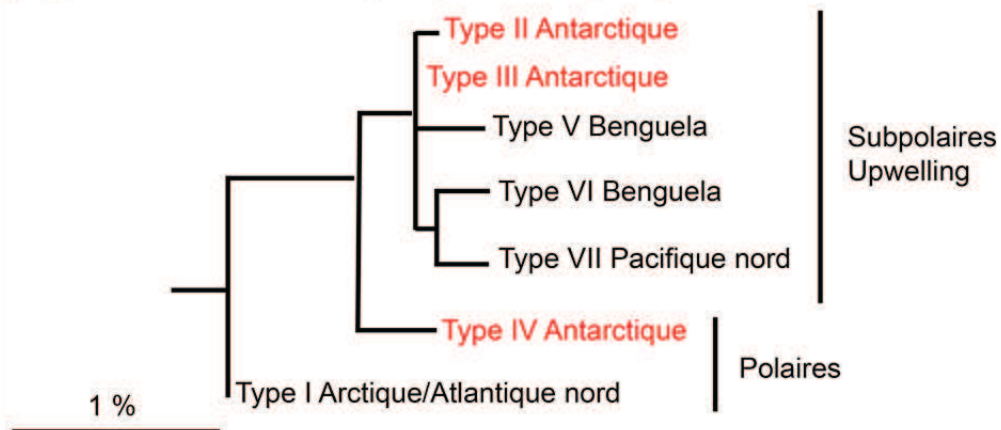
Neogloboquadrina pachyderma



N. pachyderma fraîchement récoltée
Photo: V. Peck, British Antarctic Survey



Abondance dans les sédiments de surface (base de données MARGO, 2009) et localisation géographique des transects OISO-19 (2011) et OISO-21 (2012)



Phylogénie des génotypes de *N. pachyderma* (d'après Darling et Wade, 2008), les espèces antarctiques (= attendues sur les transects OISO) sont notées en rouge

Figure 8 : présentation de *Neogloboquadrina pachyderma*

PARTIE I
TAXONOMIE MOLECULAIRE CHEZ LES
FORAMINIFERES PLANCTONIQUES

Chapitre 1 : taxonomie moléculaire chez les foraminifères planctoniques, élaboration d'un référentiel

Ce premier chapitre a pour objectif de discuter du rang taxonomique des « géotypes », « types », « types génétiques » ou « espèces cryptiques » de foraminifères planctoniques définis par la littérature et dont des séquences, correspondant à la fin de la SSU (petite sous-unité ribosomique), sont disponibles à partir de la base de données NCBI. La définition des unités taxonomiques chez les foraminifères planctoniques souffre en effet d'un manque de critères objectifs. Ceci a entraîné une hétérogénéité des rangs taxonomiques entre les différents types génétiques décrits par la littérature comme le montre l'analyse des distances patristiques au sein des différentes morpho-espèces. Ce chapitre teste deux méthodes quantitatives complémentaires et indépendantes, ABGD (Automatic Barcode Gap Detection, Puillandre et al., 2012) et GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent, Pons et al., 2006) permettant la définition objective d'unités taxonomiques. Ces méthodes permettent l'élaboration d'une taxonomie de référence qui est confrontée aux données biogéographiques et morphologiques disponibles. Néanmoins une utilisation généralisée et optimale de ces méthodes quantitatives nécessite une standardisation des méthodes d'obtention des séquences. Ces séquences doivent être suffisamment longues, homologues et nombreuses ; le séquençage de plusieurs clones issus du même individu permet de détecter les cas de sur-découpage des morpho-espèces.

Mots-clefs : espèces, unités taxonomiques, foraminifères planctoniques, distances patristiques, ABGD, GMYC, biogéographie

Fiches-méthodes : VIII

Ce manuscrit va être soumis prochainement à PLoS One

Ont participé à ce manuscrit : Aurore ANDRE (analyses, interprétation, rédaction, illustration), Raphael MORARD (récolte des données, illustration), Frédéric QUILLEVERE (interprétation, rédaction), Christophe DOUADY (interprétation, rédaction), Yurika UJIIE (acquisition de séquences).

SSU rDNA divergence in planktonic foraminifera: molecular taxonomy and biogeographic implications

Abstract

Ribosomal small subunit (SSU) DNA analyses have revealed that most of the modern morpho-species of planktonic foraminifera are composed of a complex of several distinct genetic types that may correspond to cryptic species. These genetic types are usually delimited using partial sequences located at the 3' end of the SSU, but these delimitations are empirical and inherently subjective. Here, on the basis of patristic distances values calculated within and among genetic types of 24 morpho-species of planktonic foraminifera, we show that the taxonomic level of these genetic types is not homogenous and has been even sometimes inconsistently defined. In order to further evaluate the species status of these genetic types, we apply two quantitative and independent methods, ABGD (Automatic Barcode Gap Detection) and GMYC (General Mixed Yule Coalescent), to a dataset of published and newly obtained sequences located at the 3' end of the SSU. Results of these complementary approaches are highly congruent and lead to a molecular taxonomy that qualify 49 genetic types of planktonic foraminifera as genuine (pseudo)cryptic species.

Our results advocate for a standardized sequencing procedure allowing objective and homogenous delimitations of the (pseudo)cryptic species of planktonic foraminifera. Since our data have also significant repercussions for our knowledge of planktonic foraminiferal biogeography, we finally provide an updated integrative taxonomy in which we synthesize geographic, ecological and morphological differentiations that can occur among the genuine (pseudo)cryptic species. Due to molecular, environmental or morphological data scarcities, many aspects of our proposed integrative taxonomy remain unclear. On the other hand, our study opens up the challenging potential for a correct interpretation of environmental datasets that may overcome open-ocean sampling insufficiency.

Key-words: cryptic species, taxonomic units, planktonic foraminifera, patristic distances, ABGD, GMYC, biogeography

1. Introduction

Fossil shells of planktonic foraminifera constitute one of the most informative archive of changes in biodiversity that are used as a proxy to reconstruct past ocean conditions (e.g., Kucera, 2007). Since these reconstructions are empirically derived from species-specific calibrations between extant environmental parameters and the abundance or chemical composition of shells of modern individual species, they require an accurate taxonomic consistency and a precise assessment of the biogeography and ecology of species (Kucera et al., 2005; Katz et al., 2010; Morard et al., 2013). Yet, very little is known about the biology of planktonic foraminifera (Lee and Andersson, 1991; Hemleben et al., 1989). Consequently, following the paleontological use, the taxonomy of living species has been solely defined based on diagnostic characters of their shells (morpho-species concept), occasionally described from fossil type specimens extracted from sediments (Kennett and Srinivasan, 1983; Bolli and Saunders, 1985).

Molecular analyses revealed that the morphological taxonomy in planktonic foraminifera led to underestimating biodiversity (for a review, see Darling and Wade, 2008). Ribosomal SSU (Small Sub-Unit) sequences are usually used for phylogeny involving high taxonomic ranks (e.g., Pace et al., 1986; Cavalier-Smith and Chao, 2003), but extensive sequencing in planktonic foraminifera revealed an unexpected high rate of substitution within these organisms, making this region of rDNA a suitable marker for studying genetic diversity within and among closely related species (Darling et al., 1996; de Vargas et al., 1997; Pawlowski et al., 1997; Pawlowski, 2000). Sequences of the even faster evolving region of the ITS were also obtained for three morpho-species: *Truncorotalia truncatulinoides* (de Vargas et al., 2001), *Globoconella inflata* (Morard et al., 2011) and *Globigerinoides sacculifer* (André et al., 2013). Despite numerous attempts, mitochondrial genes such as COI, which are often regarded as most convenient molecular targets for putative species delimitation, are still unknown for those taxa. As a consequence, the SSU rDNA is for the time being the most widely used marker for putative species delimitation in planktonic foraminifera. Among the 24 morpho-species for which rDNA sequences are available, 49 genetic types, variously labeled “genotypes”, “types”, “subtypes” or “cryptic species” have been published so far (NCBI database, January 17th 2013). Apart from one exception (André et al., 2013), the studied morpho-species comprise more than one and up to seven distinct genetic types (Darling and Wade, 2008; Aurahs et al., 2009a; 2011; Morard et al., 2011),

several of which exhibiting a distinct biogeography and/or ecology (de Vargas et al., 1999; 2001; 2002; Darling et al., 1999; 2003; 2004; 2007; Weiner et al., 2012). Most of these genetic types have been further suggested to be reproductively isolated and have thus been considered as cryptic or rather pseudo-cryptic species when subtle differences in shell morphology were detected (Huber et al., 1997; Morard et al., 2009; 2011; Aurahs et al., 2011).

Nevertheless, a number of genetic types within a morpho-species, or a number of “subtypes” within a genetic type, exhibit at least partially or even totally sympatric distributions and/or similar shell morphologies (Darling and Wade., 2008; Kuroyanagi et al., 2008; Aurahs et al., 2011; Weiner et al., 2012; Quillévéré et al., 2013). Many genetic types have been solely defined on the basis of genetic differences without any additional DNA-independent investigation that may help validating their species status. Such difficulties, associated with the ongoing exponential increase of SSU rDNA sequences available, calls for the development of a standardized protocol to help species delimitation using DNA sequences. Definitions of the published genetic types through the last 15 years are the result of subjective delimitations of sequences clusters, making their direct comparison rather speculative. Most of these delimitations are based on studies at the morpho-species level mainly because of the high and variable SSU rDNA substitution rates among planktonic foraminifera, which induced highly ambiguous sequence alignments when datasets include loosely related species (Aurahs et al., 2009b). Furthermore and because no common primers have been found, sequences available are heterogeneous in length and cover different parts of the 3' end of the SSU region. Assessed altogether, this explains why no molecular threshold has ever been discussed in the case of planktonic foraminifera.

A first empirical, quantitative approach of species delimitation using a clustering method has been attempted by Görker et al. (2010). Although the resulting optimized taxonomic units were mostly in agreement with those determined based on a morphological taxonomy, this attempt failed to separate several morphologically highly divergent morpho-species (e.g., *Neogloboquadrina dutertrei* and *Pulleniatina obliquiloculata*) and some well-supported genetic types now recognized as pseudo-cryptic species (e.g., those of *Orbulina universa*; de Vargas et al., 1999; Morard et al., 2009). Furthermore, such clustering-based solution is not actually appropriate for molecular threshold definition and genetic type delimitation, as the taxonomic level of the resulting classification directly relies on the design of the reference dataset.

In this paper, using patristic distances calculations among genetic types, we first evaluate the consistency of empirical genetic type definitions. Such an evaluation is based on the assumption that within a given morpho-species, the genetic types validate a species status as soon as distances values are smaller within than among genetic types (Lefébure et al., 2006; Puillandre et al., 2012a). This approach has limitations because 16 of the previously defined genetic types are known from only one rDNA sequence, preventing any calculation of distances within genetic types. Furthermore, sequences that lack genetic type assignment in sequence databases such as GenBank, or for which a genetic type could not be inferred from original publication, could not be considered for patristic distance calculations. Consequently, we secondly test two independent and complementary automatic methods for molecular operational taxonomic unit (MOTU) delimitations: the Automatic Barcode Gap Delimitation (ABGD; Puillandre et al., 2012a), which allows calculation of genetic distances within and among genetic types, and the General Mixed Yule Coalescent (GMYC; Pons et al., 2006), which uses phylogenetic trees to determine the transition signal from coalescent to speciation branching patterns. These methods provide alternative delimitations and offer the opportunity to analyze sequences that lack former assignment in their genetic type. Finally, we confront the results of the different methods in order to establish which of the previously and newly defined genetic types may correspond to genuine species. This molecular taxonomy has significant implications for our knowledge of planktonic foraminiferal species biogeography. We consequently propose an updated integrative taxonomy (Dayrat, 2005; de Quieroz, 2007; Puillandre et al., 2012b) of modern planktonic foraminifera, in which biogeographical, ecological and/or morphological differentiations that can occur among species validated as genuine are synthetized.

2. Material

Putative species delimitations relying implicitly or explicitly on genetic distances should be based on the same genetic marker to insure that they correspond to the same taxonomic level (e.g., Coleman, 2003; Logares et al., 2007). Most of planktonic foraminiferal sequences (~80%) used for genetic types delimitations are localized within a 1200 bp-long region of the 3' end of the SSU (Darling and Wade, 2008; Ujiié and Lipps, 2009; Aurahs et al., 2009a; Weiner et al., 2012; Ujiié et al., 2012). Alternatively, ITS sequences were characterized in the case of *Truncorotalia truncatulinoides* (de Vargas et al., 2001), *Globoconella inflata* (Morard et al., 2011) and *Globigerinoides sacculifer* (André et al., 2013). The ITS locus is more commonly used than the SSU for genetic type delimitation and barcoding (e.g., Grimm et al., 2007; Coleman, 2009), but foraminiferal ITS evolves at such fast rates that even sequences from closely related morpho-species cannot be aligned without ambiguity (André et al., 2013), and comparisons among morpho-species based on ITS datasets would be consequently not pertinent or doubtful.

Planktonic foraminiferal SSU rDNA data were extracted from the NCBI query portal (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery>) on January 17th, 2013, representing a total of 1232 SSU rDNA sequences. Additional SSU rDNA data were gathered from living foraminifera we collected with plankton tows (64 to 100 µm mesh sizes) in the North Atlantic (cruises C-MarZ and FORCLIM7), Pacific (cruises REVELLE, KT-06 and GYRAFOR-A) and Indian (cruises OISO-4, OISO-19, Melville and GYRAFOR-B) Oceans. During these cruises, specimens were taxonomically identified at the morpho-species level before being individually isolated into the GITC* DNA extraction buffer (Morard et al., 2009). Information about morpho-species assignment and sampling locality is provided in supplementary data 1.

3. Methods

3.1. DNA Extraction, amplification and sequencing of newly assembled data

DNA extraction of 63 collected planktonic foraminifera belonging to 12 morpho-species were performed using the GITC* extraction protocol (Morard et al., 2009). For 34 specimens, a fragment of ~ 1000 bp located at the 3' end of the SSU rDNA was amplified using the foraminiferal specific primer S14F (5'-AAGGGCACCACAAGAACGC-3') coupled with the universal primer SB (5'-GATGCCTTGTTACGACTTCTCTTTC-3') of Ujiie and Lipps (2009). For the 29 remaining foraminifera, a shorter fragment of ~650 bp, included in the S14F-SB region, was amplified using the couple of specific primers S15rF (5'-CATGGCCGTTCTTAGTTC-3') and S19F (5'-CCCGTACRAGGCATTCCTAG-3') of André et al. (2013). For the morpho-species *Globorotalia unguolata*, *Globorotalia tumida*, *Menardella menardii*, *Globoconella inflata*, *Globoquadrina conglomerata* and *Truncorotalia truncatulinoides*, the amplified PCR products were cloned using the TOPO TA cloning kit of Invitrogen following manufacturer's recommendations. To evaluate intra-individual variability, 2 to 7 clones were selected per individual for sequencing. For the morpho-species *Globigerina bulloides*, *Beela digitata*, *Orbulina universa* and *Sphaeroidinella dehiscens*, the amplified PCR products were directly sequenced. The clones and PCR products were sequenced using an ABI prism 3100 sequencer (Applied Biosystems) at the Station Biologique de Roscoff and an ABI prism 3730XL sequencer (Applied Biosystems) from Biofidal (Vaulx-en-Velin, France) service provider.

3.2. Synonymy, ambiguous assignation and dataset assembly

From the 1232 rDNA SSU sequences downloaded from NCBI, 5 had no taxonomic assignation at a specific rank and were not retained for further analyses. The 12 sequences labeled *Globigerinella aequilateralis* were renamed *Globigerinella siphonifera* following Hemleben et al. (1989). The 9 sequences corresponding to the right-coiled morphotype of *Neogloboquadrina pachyderma* were renamed *Neogloboquadrina incompta* following Darling et al. (2006). Finally, because of the polyphyletic nature of sequences from specimens identified as *Globigerinoides ruber* (Aurahs et al., 2009a), we clustered *Globigerinoides ruber* and *Globigerinoides conglobatus* as a single taxonomic unit here termed "*G. ruber+conglobatus*". Several sequences were found to be highly divergent from other

sequences attributed to the same morpho-species and/or identical to sequences attributed to a different morpho-species. Sequence Z69600 assigned to *Globigerinoides sacculifer* in NCBI database was more probably obtained from a *Gs. conglobatus* individual. Sequence AY453134 stored as *Globorotalia crassaformis* is identical to sequences of *Globoconella inflata*. Sequences Z83960 and JQ743485 recognized as *Globigerinella calida* are identical to sequences of one of the genetic type of *Ge. siphonifera*. Among the 6 sequences assigned to *Globorotalia scitula*, sequences FJ643321, FJ643380 and FJ643381 were found to be identical to sequences of *Hirsutella hirsuta*. Since horizontal gene transfer is rare in eukaryotes taxa and has never been evidenced for rDNA (Andersson, 2005), we consider that these seven sequences have been mis-assigned because of taxonomic misidentification (Aurahs et al., 2009b) or PCR contamination. These sequences were thus excluded from subsequent analyses. Following Aurahs et al. (2009b) and due to ambiguous identification we also excluded from our analyses the remaining 3 sequences stored as *Gr. scitula*.

Finally, adding our own sequences, a total of 1356 sequences belonging to 25 morpho-species were retained for further analysis (Supplementary data 1; Table 2). Due to differences in scientific objectives and amplification strategies, the assembled dataset contains sequences of various lengths (from 196 to 3412 bp) which do not overlap systematically. As a consequence, we defined a block of sites representing the best compromise between sequence length and number of sequences. This block of ~700 bp, located between the universal primers SR2 (Elwood et al., 1985; position 1277-1263 in *Saccharomyces cerevisiae*, 5'-GGTGGTGCATGGCCGG-3') and BMB-CR (Lane et al., 1985; position 1624-1646 in *S. cerevisiae*, 5'-CGACGGGCGGTGTGTAC-3'), covers the variable fragments F2, V7 and V8 (Darling et al., 1997) and is documented for 714 sequences.

Morpho-species	NCBI+new	Patristic literature			ABGD	GMYC
		inter	intra	intraG		
<i>T. quinqueloba</i>	8	5	0	0	6	7
<i>G. bulloides</i>	83	14	3	0	14	23
<i>G. falconensis</i>	5	0	0	0	0	5
<i>G. siphonifera</i>	47	8	7	7	14	24
<i>B. digitata</i>	4	3*	0	0	3	3
<i>S. dehiscens</i>	6	0	0	0	0	2
<i>G. sacculifer</i>	113		10	8	10	29
<i>O. universa</i>	50	7	7	4	7	27
<i>G. ruber+conglobatus</i>	331	33	31	21	36	58
<i>H. pelagica</i>	145	9	9	12	14	
<i>T. truncatulinoïdes</i>	51	9	5	28	41	46
<i>H. hirsuta</i>	19	8*	0	6	8	12
<i>G. tumida</i>	18	11*	0	11	11	14
<i>G. ungulata</i>	37	23*	0	21	23	31
<i>M. menardii</i>	14	11*	0	10	14	11
<i>G. conglomerata</i>	8	5*	0	5	5	6
<i>G. inflata</i>	69	14	0	11	14	48
<i>P. obliquiloculata</i>	258	175	175	164	186	239
<i>N. dutertrei</i>	10	7	0	1	7	8
<i>N. pachyderma</i>	15	9	4	0	14	15
<i>N. incompta</i>	13	3	2	0	7	8
<i>G. glutinata</i>	38	20*	0	17	20	38
<i>C. nitida</i>	7	5*	0	0	5	5
<i>G. uvula</i>	7	6*	0	4	6	7

Table 2: number of sequences analyzed in the different datasets. NCBI+new: number of sequences available on NCBI and number of new sequences added. Patristic literature: number of sequences included in the dataset based on literature species definitions; inter, intra, intraG: number of sequences used for inter-genetic type, intra-genetic type and intra genomic distances calculations, respectively. * : number of sequences used for total distances calculation (for the morphospecies for which no cryptic diversity have been identified). ABGD: number of sequences included in the dataset used for ABGD species delimitation. GMYC: number of sequences included in the dataset used for GMYC species delimitation.

3.3. Patristic distances

For each morpho-species, sequence alignments were separately and automatically generated using the Mafft software (Kato and Toh, 2008). Best substitution models were determined using Modeltest (Posada and Crandall, 1998) and most likely phylogenetic relationships were reconstructed using PHYML (Guindon and Gascuel, 2003). Patristic distance (path length between tips in the most likely topology) matrices were then calculated

using the APE package of R software (R Development Core Team, 2004; Paradis et al., 2004). Patristic distances were preferred over pairwise distances to better account for multiple substitutions at the same site. For some of the studied morpho-species, as for example *Gs. ruber* and *Gs. sacculifer*, many of the available sequences were identical while for others, as for example *Turborotalia quinqueloba* and *Neogloboquadrina pachyderma*, almost all the deposited sequences corresponded to different haplotypes. This phenomenon is probably an artifact reflecting the number of sequences available, the quality of sampling and/or an arbitrary selection performed by the authors for sequences to be deposited. As a consequence, in our calculations, we retained a single sequence per haplotype (i.e., a unique sequence per pool of identical sequences). We calculated patristic distances within each morpho-species and extracted distances within the defined genetic types and among individuals from different genetic types. We also calculated intra-genomic distances for each morpho-species. Since this calculation only requires individual and morpho-species identifications, sequences that lack information on their genetic type in NCBI have been added to the analysis. Considering the lack of several genotype labels in NCBI and the shortness of many sequences, it appears finally that the dataset that have been used for calculation of patristic distance values was reduced to less than 30% of the available sequences (Table 2). In particular, all sequences of the Type II of *Orbulina universa* (de Vargas et al., 1999), and all sequences of *Globoconella inflata* with identified genetic types were excluded from our analysis. In addition, cryptic diversity has never been studied in the case of several morpho-species (e.g., *Globorotalia tumida* and *Globoquadrina conglomerata*). For comparing intra- and inter-genetic type and overall patristic distance distributions we used the Kolmogorov-Smirnov and Mann-Whitney tests implemented in PAST v. 2.17c (Hammer et al., 2001)

Distances between genetic types (inter-type distances) are expected to be higher than distances within genetic types (intra-type distances) whenever the genetic types correspond to genuine species. In this case, inter- and intra-type distances are separated by a distance gap (e.g., Lefébure et al., 2006, Puillandre et al., 2012a). Distances within individuals (intra-genomic distances) should be included in the intra-type distance range. Consequently, whenever a morpho-species displays these distance patterns, we consider here its genetic types as most probably accurately delimited.

3.4. Automatic genetic type delimitation methods

Genetic type delimitations used for the patristic distances approach were suggested empirically and thus rely on each author's, potentially subjective reading and interpretation of phylogenetic trees. To avoid this, we used the Automatic Barcode Gap Detection (ABGD; Puillandre et al., 2012a) and General Mixed Yule Coalescent (GMYC; Pons et al., 2006) methods as complementary approaches for species delimitation in modern planktonic foraminifera. ABGD and GMYC newly-defined delimitations were evaluated through the patristic distance approach; we consider as most probably accurate the delimitations that are cross-validated with the patristic distance approach.

3.4.1 Automatic Barcode Gap Delimitation (ABGD)

ABGD is an automatic procedure that sorts sequences into putative species based on a barcode gap, i.e., the gap in genetic distances distribution between intraspecific and interspecific diversity (Puillandre et al., 2012a). This barcode gap is observed whenever the divergence among organisms belonging to the same species is lower than divergence among organisms from different species (Puillandre et al., 2012a). The ABGD method is more efficient when the number of species is not too large and the evolutionary rate differences between species are limited (Puillandre et al., 2012a). Consequently, given the particularly heterogeneous rates of molecular evolution in planktonic foraminifera (de Vargas et al., 1997), we ran ABGD for each morpho-species alignment independently, using the default settings and the K-80 pairwise distance method (Kimura, 1980). As this method does not rely on a prior definition of taxonomic units, the analyzed dataset includes the sequences that lacked genetic type label.

In some cases, the ABGD method identifies several MOTUs plateaus corresponding to decreasing number of genetic types delimited within the dataset. First, when necessary, we discarded the delimitation hypotheses that assigned clones from the same individual to distinct genetic types. Among the remaining hypotheses, we considered the first MOTUs plateau (i.e. maximum number of MOTUs) as corresponding to the putative species delimitation (Puillandre et al., 2012a ; Laetsch et al., 2012). Indeed, this first MOTU plateau is most likely marking the distance gap between intra-species distances (i.e., the shortest distances within the dataset) and the distances between the closest putative species (Laetsch et

al., 2012), whereas the second plateau usually reflects the distance gap between clades of putative species.

3.4.2. General Mixed Yule Coalescent (GMYC)

The GMYC approach (Pons et al., 2006) identifies boundaries between evolutionary units on the basis of shifts in branching rates. Branching within species is the result of coalescent processes, whereas branching between species reflects the timing of speciation events (Fontaneto et al., 2007). This approach is thus independent from both previous taxonomic delimitations and genetic distances. As a consequence, all planktonic foraminiferal sequences can be equally treated. The study of Hoef-Emden (2012) demonstrates that GMYC can be successfully applied to multi-copy ribosomal genes. Preliminary experiments suggest that it requires a minimum number of biological species for accurately rejecting the null hypothesis that all sequences belong to the same species. In our analysis, given the genetic distances encountered between planktonic foraminifera, we selected 5 subsets of sequences (each of them including 3 to 7 morpho-species) from the phylogeny published by Aurahs et al. (2009b) in order to avoid ambiguous alignments (Table 3): (i) the two clades within the spinose taxa, (ii) the two clades within the macroperforate non-spinose taxa, and (iii) the microperforate clade. Multiple species alignments were automatically generated using the Mafft software (Kato and Toh, 2008) and checked manually for alignment errors. A single sequence per haplotype was retained and the best substitution model was selected using Modeltest (Posada and Crandall, 1998) under AIC criterion (Akaike, 1974). Ultrametric trees were generated with the BEAST software (Lemey et al., 2010) using a log-normal relaxed molecular clock (Drummond et al., 2012) without calibration point. These trees were then used as an input for GMYC species delimitation using the Splits package (Ezard et al., 2009) for R software (R Development Core Team, 2004).

Tree name	LR test	sequences nb	seq / sp	sequences sizes (bp)	Morphospecies
Spinose A	***	143	9.5	196 - 1059 , 772	<i>G. sacculifer</i> , <i>O. universa</i> , <i>S. dehiscens</i> , <i>G. siphonifera</i> , <i>B. digitata</i> , <i>G. ruber</i> , <i>G. conglobatus</i>
Spinose B	ns	33	1.83	323 - 1169 , 882	<i>G. bulloides</i> , <i>G. falconensis</i> , <i>T. quinqueloba</i>
Macro A	*	123	12.3	1021 - 3592 , 1173	<i>T. truncatulinoides</i> , <i>H. hirsuta</i> , <i>G. conglomerata</i> , <i>M. menardii</i> , <i>G. ungulata</i> , <i>G. tumida</i>
Macro B	**	121	8.1	469 - 3412 , 1028	<i>N. pachyderma</i> , <i>N. incompta</i> , <i>N. dutertrei</i> , <i>P. obliquiloculata</i> , <i>G. inflata</i> , <i>G. conglomerata</i>
Micro	ns	37	ns	436 - 1022 , 922	<i>G. uvula</i> , <i>C. nitida</i> , <i>G. glutinata</i>

LR test: likelihood ratio test, n.s.=non significant, *, **, ***=significant. seq/sp: mean number of sequences per morphospecies, size of the sequences as min-max, mean.

Table 3: ultrametric trees used for GMYC species delimitation.

4. Results

4.1. Patristic distances

As a result of procedure requirement, inter-type and intra-type distances could be estimated for 10 morpho-species out of 22 (Fig. 9A). Inter-type distances are highly variable between morpho-species, ranging from 0.12 % (minimum, *Turborotalia quinqueloba*) to more than 60% (maximum, *Globigerinoides ruber+conglobatus* and *Hastigerina pelagica*). Intra-type distances are less variable than inter-type distances as they range from 0% (minimum as nearly all species include identical sequences) to 4.5% (maximum, *Truncorotalia truncatulinoides*). Overall intra-type distances are significantly lower than inter-type distances (Table 4), implying that patristic distances can be used as a criterion for genetic type delimitation. For 4 morpho-species (*Globigerinella siphonifera*, *O. universa*, *Hastigerina pelagica* and *Neogloboquadrina incompta*), we observed a clear distance gap between inter-type and intra-type distances. Distance gap is reduced in the cases of *Neogloboquadrina pachyderma* and *Globigerina bulloides*; for 3 morpho-species (*Gs. ruber+conglobatus*, *Pulleniatina obliquiloculata* and *T. truncatulinoides*), intra-type and inter-type distances overlap. Intra-type distances could not be calculated in the case of *Turborotalia quinqueloba* as all haplotypes correspond to different genetic types. Overall, intra-genomic distances could be estimated for 17 morpho-species. They range from 0% (identical sequences) to 4.8% (*T. truncatulinoides*). These distances are thus of the same range, or lower, than the intra-type distances within the same morpho-species (Table 5). For 11 morpho-species, neither inter-type nor intra-type distances could be estimated because none of their sequences retained for this analysis was assigned to their genetic type. In the case of *G. inflata*, *G. conglomerata*, *Hirsutella hirsuta*, *Gr. tumida*, *Gr. ungulata*, *Menardella menardii* and *Candeina nitida*, the total genetic distances are of the same range as the intra-genomic distances estimated for these morpho-species (Table 6). On the contrary, in the case of *Globigerinita uvula* and *Globigerinita glutinata*, these distances are significantly higher than the intra-genomic distances estimated for these morpho-species (Table 6).

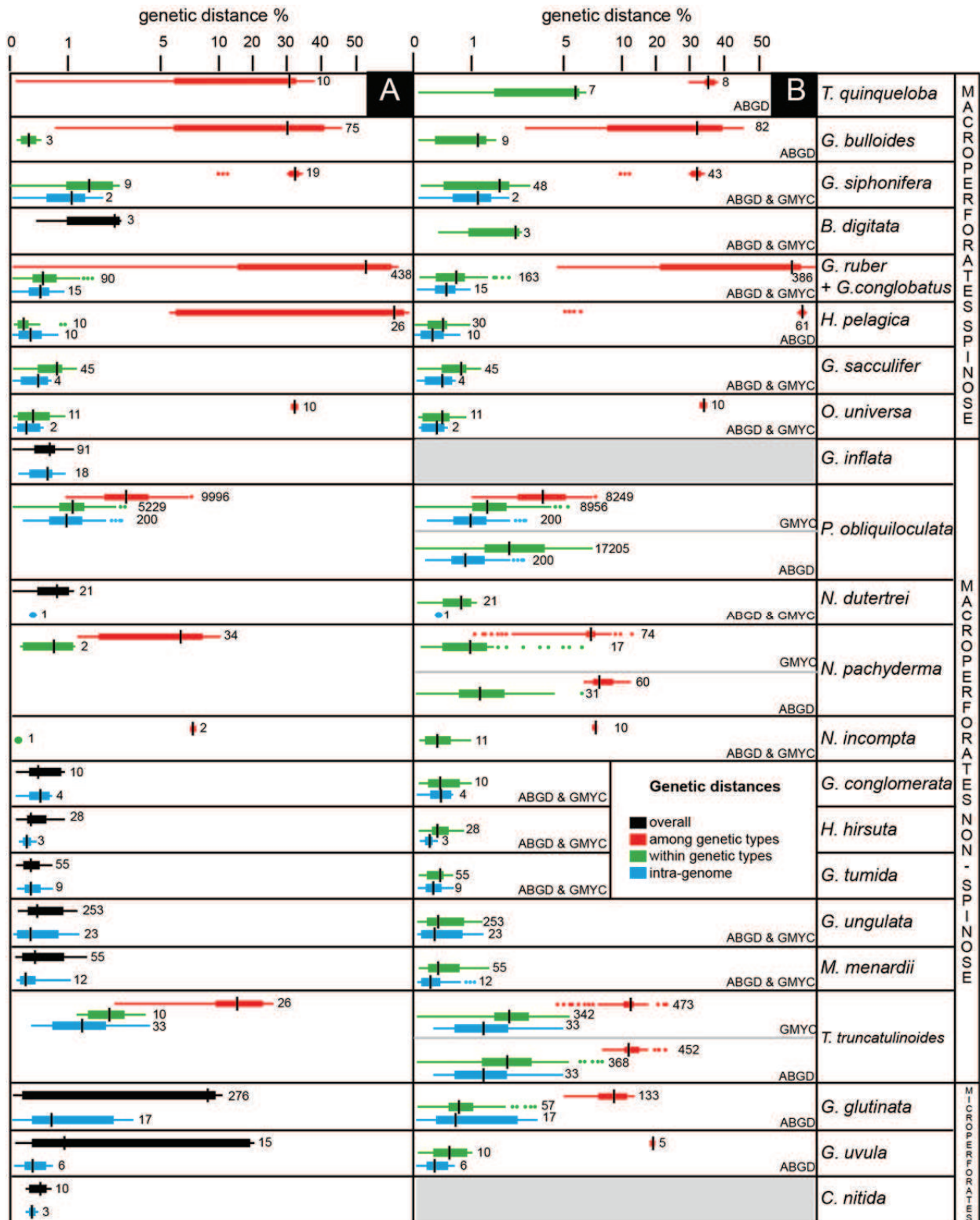


Figure 9: boxplot distribution of SSU genetic diversity (patristic distances, expressed as percent of nucleotide change) within each studied planktonic foraminiferal morpho-species. Boxplots (Tuckey, 1977) include median (central bar), position of the upper and lower quartiles (called Q1 and Q3, central box), extremes of the data (“whiskers”) and very extreme points of the distribution that can be considered as outliers (dots). Points are considered as outliers when they exceed Q3+1.5 IQ for the upper part of the

distribution or Q1+1.5 IQR for the lower part, where IQR is the inter quartile range (i.e., Q3–Q1).; numbers indicate the number of pairwise distances included in the distribution. **A: Boxplot distribution using species delimitations and specimens identifications according to NBCI database and literature; B: boxplot distribution using species delimitations and specimens identifications according to ABGD and GMYC analyses.**

morpho-species	Kolmogorov-Smirnov test			Mann-Whitney test		
	D	p(same)	p(permutation)	p(same)	p(exact)	p(MC)
<i>G. bulloides</i>	1	0.0016	0.0001	0.0035	n.a.	0.0001
<i>G. siphonifera</i>	1	$1.85 \cdot 10^{-6}$	0.0001	$2.85 \cdot 10^{-5}$	$2.9 \cdot 10^{-7}$	0.0001
<i>G. ruber+conglobatus</i>	0.89	$1 \cdot 10^{-53}$	0.0001	$4.58 \cdot 10^{-43}$	n.a.	0.0001
<i>H. pelagica</i>	1	$1.79 \cdot 10^{-7}$	0.0001	$4.6 \cdot 10^{-6}$	n.a.	0.0001
<i>O. universa</i>	1	$1.14 \cdot 10^{-5}$	0.0001	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$5.7 \cdot 10^{-6}$	0.0002
<i>N. pachyderma</i>	1	0.00025	0.0001	0.00086	n.a.	0.0001
<i>N. incompta</i>	1	0.047	0.1393	n.a.	n.a.	n.a.
<i>T. truncatulinoides</i>	0.96	$6.1 \cdot 10^{-7}$	0.0001	$1.1 \cdot 10^{-5}$	n.a.	0.0001
<i>P. obliquiloculata</i>	0.85	0	0.0001	0	n.a.	0.0001

Table 4: Kolmogorov-Smirnov and Mann-Whitney tests results for comparison of intra- and inter-genetic type defined by the literature distances. n.a.: calculation not available. The highly significant results for *P. obliquiloculata* are most probably due to the large quantity of data available for this morpho-species, inducing the test to be sensitive to even extremely small differences.

morpho-species	Kolmogorov-Smirnov test			Mann-Whitney test		
	D	p(same)	p(permutation)	p(same)	p(exacte)	p(MC)
<i>G. siphonifera</i>	0.44	0.36	0.37	0.15	0.15	0.15
<i>H. pelagica</i>	0.2	0.97	0.83	0.69	0.69	0.68
<i>G. sacculifer</i>	0.23	0.97	0.93	0.89	n.a.	0.89
<i>O. universa</i>	0.36	0.92	1	0.91	0.99	0.98
<i>T. truncatulinoides</i>	0.31	0.4	0.39	0.32	n.a.	0.33
<i>G. ruber+conglobatus</i>	0.25	0.11	0.1	0.05	n.a.	0.05
<i>P. obliquiloculata</i>	0.22	$3.8 \cdot 10^{-16}$	0.0001	$3.2 \cdot 10^{-15}$	n.a.	0.0001

Table 5: Kolmogorov-Smirnov and Mann-Whitney tests results for comparison of intra-genomic and intra-genetic type defined by the literature distances. n.a.: calculation not available. The highly significant results for *P. obliquiloculata* are most probably due to the large quantity of data available for this morpho-species, inducing the test to be sensitive to even extremely small differences.

morpho-species	Kolmogorov-Smirnov test			Mann-Whitney test		
	D	p(same)	p(permutation)	p(same)	pexact	p(MC)
<i>G. conglomerata</i>	0.4	0.47	0.42	0.2	0.23	0.23
<i>H. hirsuta</i>	0.71	0.16	0.31	0.29	0.34	0.35
<i>G. ungulata</i>	0.37	0.004	0.06	0.11	n.a.	0.12
<i>G. tumida</i>	0.29	0.4	0.43	0.29	n.a.	0.29
<i>M. menardii</i>	0.37	0.17	0.26	0.28	n.a.	0.28
<i>G. inflata</i>	0.22	0.45	0.4	0.9	n.a.	0.9
<i>C. nitida</i>	0.5	0.45	0.27	0.3	n.a.	0.29
<i>G. uvula</i>	0.6	0.05	0.055	0.039	0.034	0.04
<i>G. glutinata</i>	0.7	10 ⁻⁵	0.0001	10 ⁻⁴	n.a.	0.0001

Table 6: Kolmogorov-Smirnov and Mann-Whitney tests results for comparison of intra-genomic and overall distances for morpho-species without genetic type defined by the literature. n.a.: calculation not available.

4.2. Automatic genetic type delimitation methods

4.2.1 ABGD

No barcoding gap was identified for 7 morpho-species (*Globigerinoides sacculifer*, *Beela digitata*, *Globorotalia tumida*, *Hirsutella hirsuta*, *Neogloboquadrina dutertrei*, *Pulleniatina obliquiloculata* and *Globoconella inflata*). Consequently, according to this method, these morpho-species should correspond to single genuine species (Table 7). In the case of *Gc. inflata*, because of their short length, none of the initial sequences used to characterize the two identified genetic types (Morard et al., 2011) have been analyzed. Consequently, we cannot exclude that our dataset contains only sequences from one of the two types identified by Morard et al. (2011). For 6 morpho-species (*Orbulina universa*, *Turborotalia quinqueloba*, *Truncorotalia truncatulinoides*, *Neogloboquadrina pachyderma*, *Neogloboquadrina incompta*, and *Globigerinita uvula*) the ABGD method identifies only one species delimitation optimum (i.e., one MOTUs richness plateau). For the remaining 8 morpho-species, it identifies several species delimitations optima. Due to miss-assignment of clones, we retained the one-MOTU delimitation for *Globorotalia ungulata*, *Menardella menardii* and *Globoquadrina conglomerata*, and the four-MOTU delimitation for *Globigerinita glutinata*. For the remaining 4 morpho-species we considered the first MOTUs plateau for putative species delimitation. Consequently, 7 putative species within *Globigerina bulloides*, 5 putative species within *Globigerinodes ruber+conglobatus*, and 3 putative species within *Globigerinella siphonifera* and *Hastigerina pelagica* were retained.

Finally, ABGD putative species delimitations are similar to previously defined genetic types for 5 morpho-species: *O. universa*, *Gs. sacculifer*, *Ge. siphonifera*, *H. pelagica* and *N.*

incompta (Table 7). This method lumps some of the previously defined genetic types into the same species for 7 morpho-species: *T. quinqueloba*, *Gg. bulloides*, *Gs. ruber+conglobatus*, *N. pachyderma*, *P. obliquiloculata*, *Gc. inflata* and *T. truncatulinoides*. Putative species delimitations were obtained for the first time for 9 morpho-species: *B. digitata*, *N. dutertrei*, *Gr. tumida*, *Ht. hirsuta*, *Gr. ungulata*, *Gr. menardii*, *Gq. conglomerata*, *Ga. glutinata* and *G. uvula*.

We calculated patristic distances among and within putative species as they are defined by the ABGD method. As expected for a distance-based method (Puillandre et al., 2012a), patristic distances are compatible with the ABGD delimitations (Fig. 9B), except for *T. truncatulinoides*, which still exhibits a slight overlap between intra-genetic types and inter-genetic types (Fig. 9B).

morphospecies	literature	patristic	ABGD	GMYC
<i>T. quinqueloba</i>	Ia	invalidated (1)	I	<i>T. quinqueloba</i> *
	Ib			
	IIa		II	
	IIb			
	IIc			
	IId			
<i>G. bulloides</i>	Ia	invalidated (1)	Ia	<i>G. bulloides</i> *
	Ib		Ib-c-e	
	Ic			
	Ie			
	Id		Id	
	IIa		IIa	
	IIb		IIb-d-f	
	IId			
	IIf			
	IIe		IIe	
	IIc		IIc	
<i>B. digitata</i>	n. d.	<i>B. digitata</i>	<i>B. digitata</i>	<i>B. digitata</i>
<i>S. dehiscens</i>	n. d.	n. a.	n. a.	<i>S. dehiscens</i>
<i>G. siphonifera</i>	I	validated	I	I
	IIa=II		II	II
	IIb=III		III	III
<i>G. ruber + conglobatus</i>	<i>G. conglobatus</i>	invalidated (2)	<i>G. conglobatus</i>	<i>G. conglobatus</i>
	IIa		IIa	IIa
	IIa1		n. a.	IIb
	IIa2			
	IIb		Ia	Ia
	Ia		Ib	Ib
	Ib1		pink	pink
	Ib2			
pink	pink			
<i>G. sacculifer</i>	<i>G. sacculifer</i>	validated	<i>G. sacculifer</i>	<i>G. sacculifer</i>
<i>O. universa</i>	II	n. a.	n. a.	II
	I	validated	I	I
	III		III	IIIa IIIb = III
		n. a.	n. a.	
<i>H. pelagica</i>	I	validated	I	n. a.
	IIa		IIa	
	IIb		IIb	

<i>T. truncatulinoïdes</i>	I	invalidated (2)	I-II	I
	II		II	
	III		III-IV	III-IV
	IV		V	V
	V			
<i>H. hirsuta</i>	n. d.	<i>H. hirsuta</i>	<i>H. hirsuta</i>	<i>H. hirsuta</i>
<i>G. conglomerata</i>	n. d.	<i>G. conglomerata</i>	<i>G. conglomerata</i>	<i>G. conglomerata</i>
<i>M. menardii</i>	n. d.	<i>M. menardii</i>	<i>M. menardii</i>	<i>M. menardii</i>
<i>G. ungulata</i>	n. d.	<i>G. ungulata</i>	<i>G. ungulata</i>	<i>G. ungulata</i>
<i>G. tumida</i>	n. d.	<i>G. tumida</i>	<i>G. tumida</i>	<i>G. tumida</i>
<i>N. pachyderma</i>	I	validated	I	I
	II		II-III-V-VI	II-III-VI
	III			
	VI		V	
	V		IV	IV
	IV		VII	VIIa
	VII		VIIb	
<i>N. incompta</i>	I	validated	I	I
	II		II	II
<i>N. dutertrei</i>	<i>N. dutertrei</i>	inconclusive	<i>N. dutertrei</i>	<i>N. dutertrei</i>
<i>G. inflata</i>	I	inconclusive	I	I
	II		n.a.	II
<i>P. obliquiloculata</i>	I	invalidated (2)	<i>P. obliquiloculata</i>	I
	IIa			II
	IIb			
<i>G. uvula</i>	n. d.	inconclusive	I	<i>G. uvula</i> *
			II	
<i>G. glutinata</i>	n. d.	inconclusive	I	<i>G. glutinata</i> *
			II	
			III	
			IV	
<i>C. nitida</i>	n. d.	<i>C. nitida</i>	inconclusive	<i>C. nitida</i> *

Table 7. Species delimitation according to literature, literature delimitations checked by patristic distances, ABGD species delimitations and GMYC species delimitations. (1) delimitation invalidation due to improbable inter-species distances; (2) delimitation invalidation due to overlapping of intra- and inter-species distances ; n.d. no genetic type defined in the literature; n. a. genetic type not included in the dataset, * non-significant likelihood ratio test.

4.2.2. GMYC

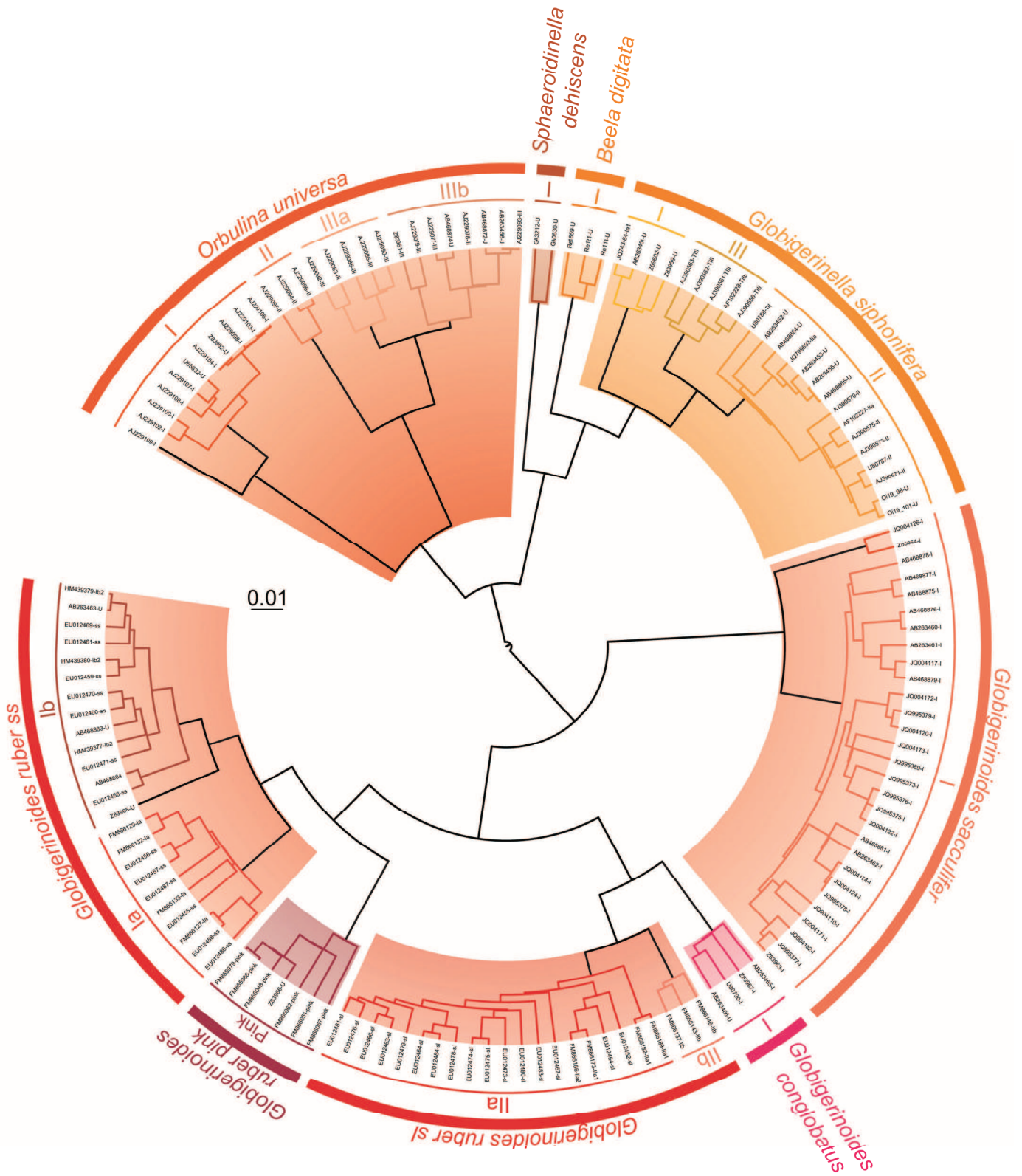
Likelihoods of the GMYC model were not significantly higher than that of the null model for the trees “Spinose B” and “Micro” (Fig. 10D, E; Table 3). The GMYC delimitations are indeed unlikely to correspond to genetic types. Even worse, if the null model was validated, each tree would correspond to a single genetic type including 3 very distinct morpho-species, which is also most unrealistic.

For the remaining 3 ultrametric trees (“Spinose A”, “MacroA” and “MacroB”; Fig. 10A-C; Table 3), the likelihood of the GMYC model was significantly higher than that of the null model and thus supported the hypothesis that those trees include several biological species. The GMYC method applied to the tree “Spinose A” lead to an estimate of 17 putative species, 2 of which containing a single individual (Fig. 10A). The GMYC method delimitates 5 clusters within *Orbulina universa*. Sequences of the previously defined Type III (de Vargas et al., 1999) are separated into two clusters corresponding to long (~1000 bp) and good-quality sequences and to short (<450 pb) and old sequences, respectively. We also note that the isolated sequence AJ229109 is a short (453 bp) and older (1999) sequence. The GMYC method identifies one cluster within *Globigerinoides sacculifer* plus one pair of isolated sequences (Fig. 10A). These two sequences are either short (500 pb, JQ004126) or old (1996, Z83964). The GMYC delimitates 7 putative species within *Globigerinoides ruber+conglobatus*. The Types IIa1 and IIa2 (Aurahs et al., 2009a) and the Types Ib1 and Ib2 (Darling and Wade, 2008) are clustered into single MOTUs, here renamed Type IIa and Type Ib, respectively. We note that the singleton PR22 is an old sequence that concentrates substitution on the 3’ end region. The GMYC method delimitates 3 putative species within *Globigerinella siphonifera* corresponding to the previously defined genetic types (Darling et al., 2008). Finally, it delimitates one cluster for each of the newly sequenced morpho-species *Sphaeroidinella dehiscens* and *Beela digitata* (Fig. 10A).

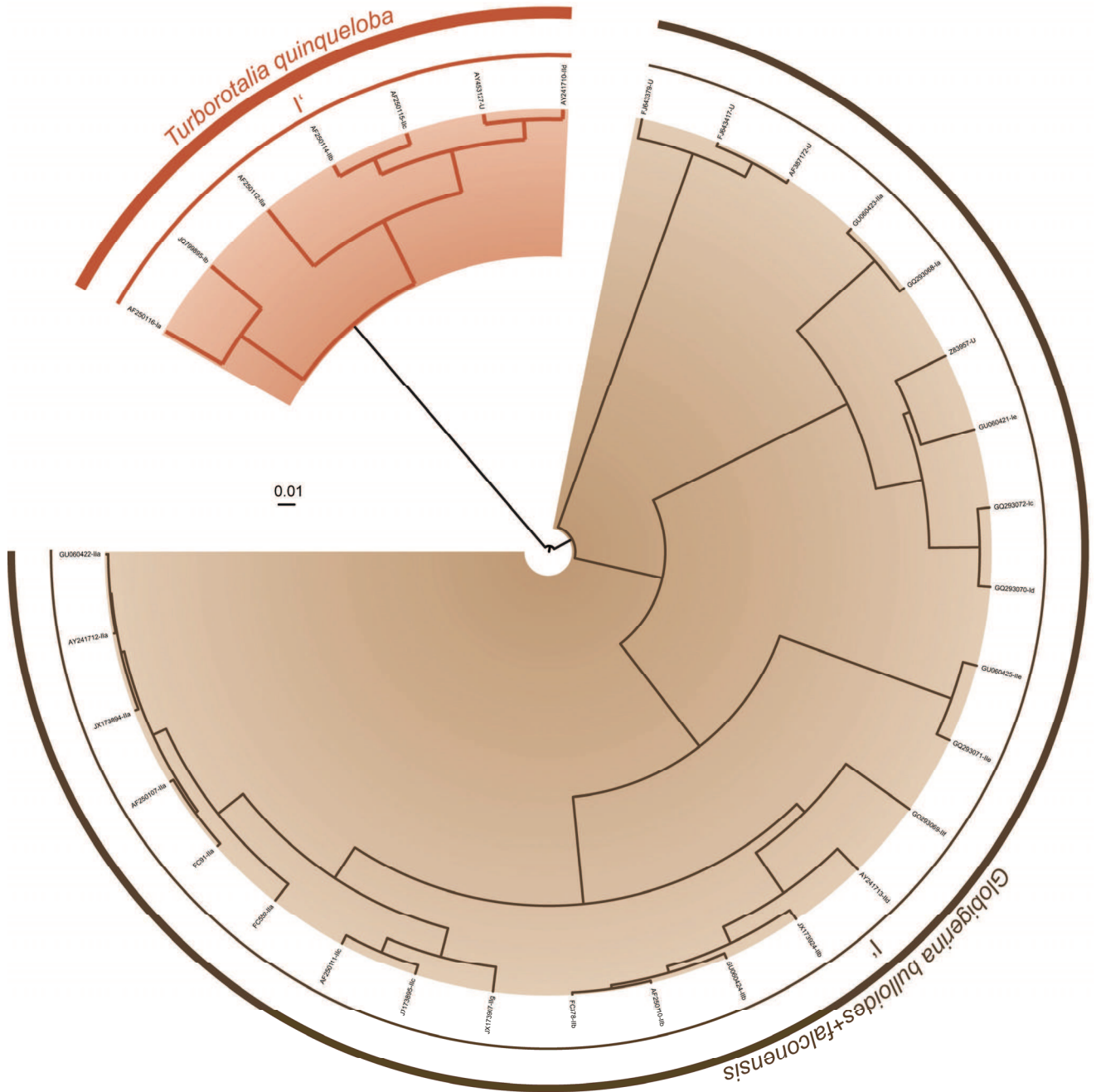
The GMYC method applied to the tree “Macro A” lead to an estimate of 12 putative species, 3 of which based on a single individual (Fig. 10B). It delimitates 7 putative species within *Truncorotalia truncatulinoidea* but clusters the previously defined Types III and V (de Vargas et al., 2001; Ujiie and Lipps, 2009) as a single putative species. We notice that 4 clones of *T. truncatulinoidea* (Y1075_4, Y1317_12, FJ643341 and FJ343329) do not cluster with other clones from the same individuals. Furthermore, the GMYC analyses suggest that *Hirsutella hirsuta*, *Globorotalia tumida*, *Globorotalia unguolata*, *Menardella menardii* and *Globoquadrina conglomerata* do not contain cryptic diversity.

The GMYC method applied to the tree “Macro B” lead to an estimate of 25 putative species, 8 of which containing a single individual (Fig. 10C). Six putative species are delimited within *Neogloboquadrina pachyderma*. The Types II, III and VI of Darling et al. (2004) are clustered into a single putative species and 2 sequences without former genetic type assignation are identified as a new putative species (Type VIIb). Application of the GMYC method delimitates 2 putative species within *Neogloboquadrina incompta*, corresponding to the previously defined genetic types of Darling et al. (2006), and isolates the sequence AY453130 as a possible third species. It also suggests that there are 2 putative species within *Neogloboquadrina dutertrei*, one of which containing a single individual. According to the GMYC species delimitation, the sampled specimens of *Gq. conglomerata* do not contain cryptic diversity. Last, GMYC delimitates 4 clusters and one isolated sequence within *Globoconella inflata*. We note that clones from the same individual are often clustered into different putative genetic types (see discussion below, Section 5.3.). The same is true for the 5 clusters and 4 isolated sequences delimited within *Pulleniatina obliquiloculata*.

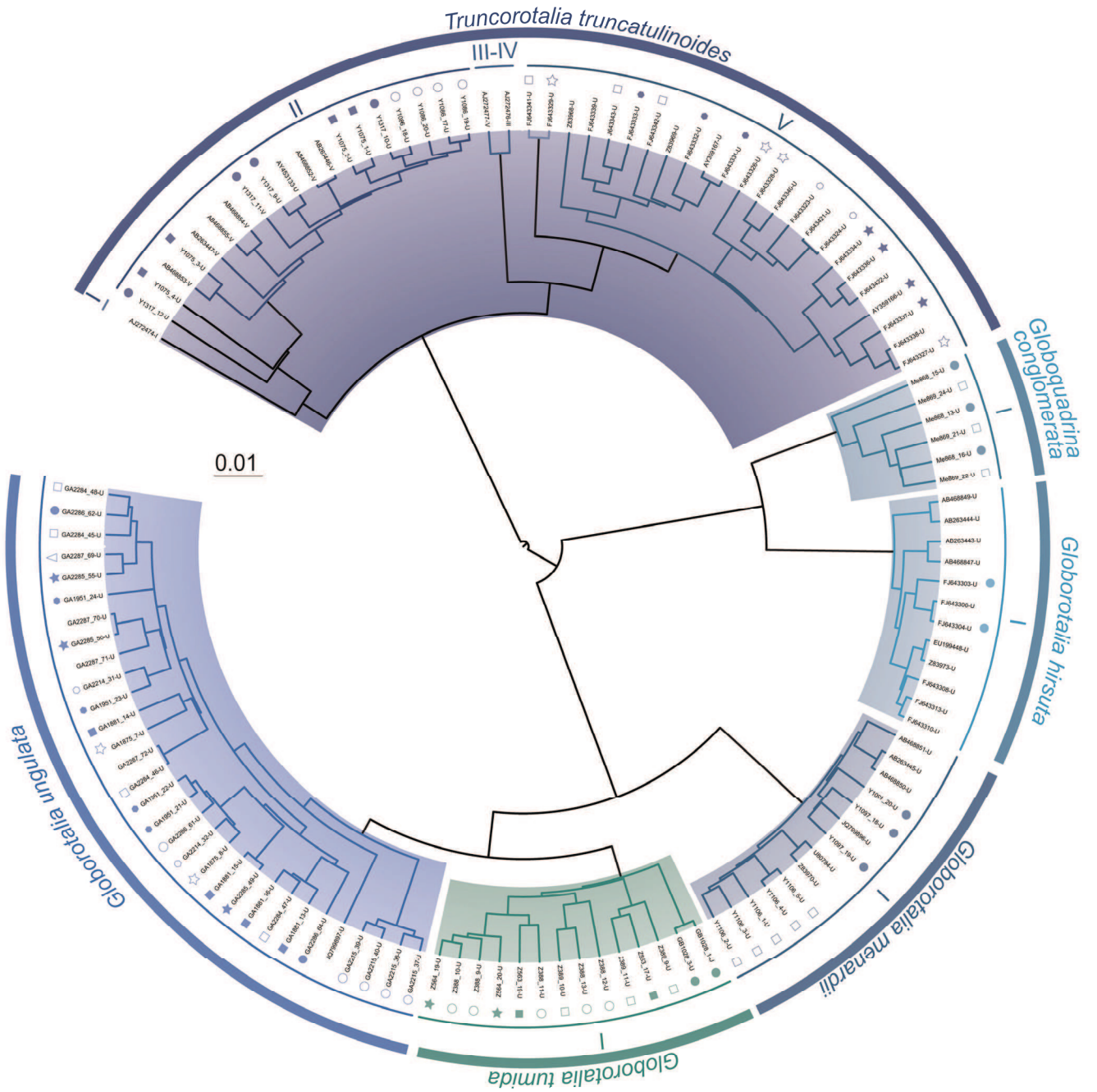
Figure 10: ultrametric trees with GMYC species delimitations. The delimitation is significant for A, B and C (see Table 3). Colored branches correspond to GMYC clusters and outer circle to names of plausible species (see also Table 7). Symbols associated to specific colors indicate clones sequenced from the same individuals.



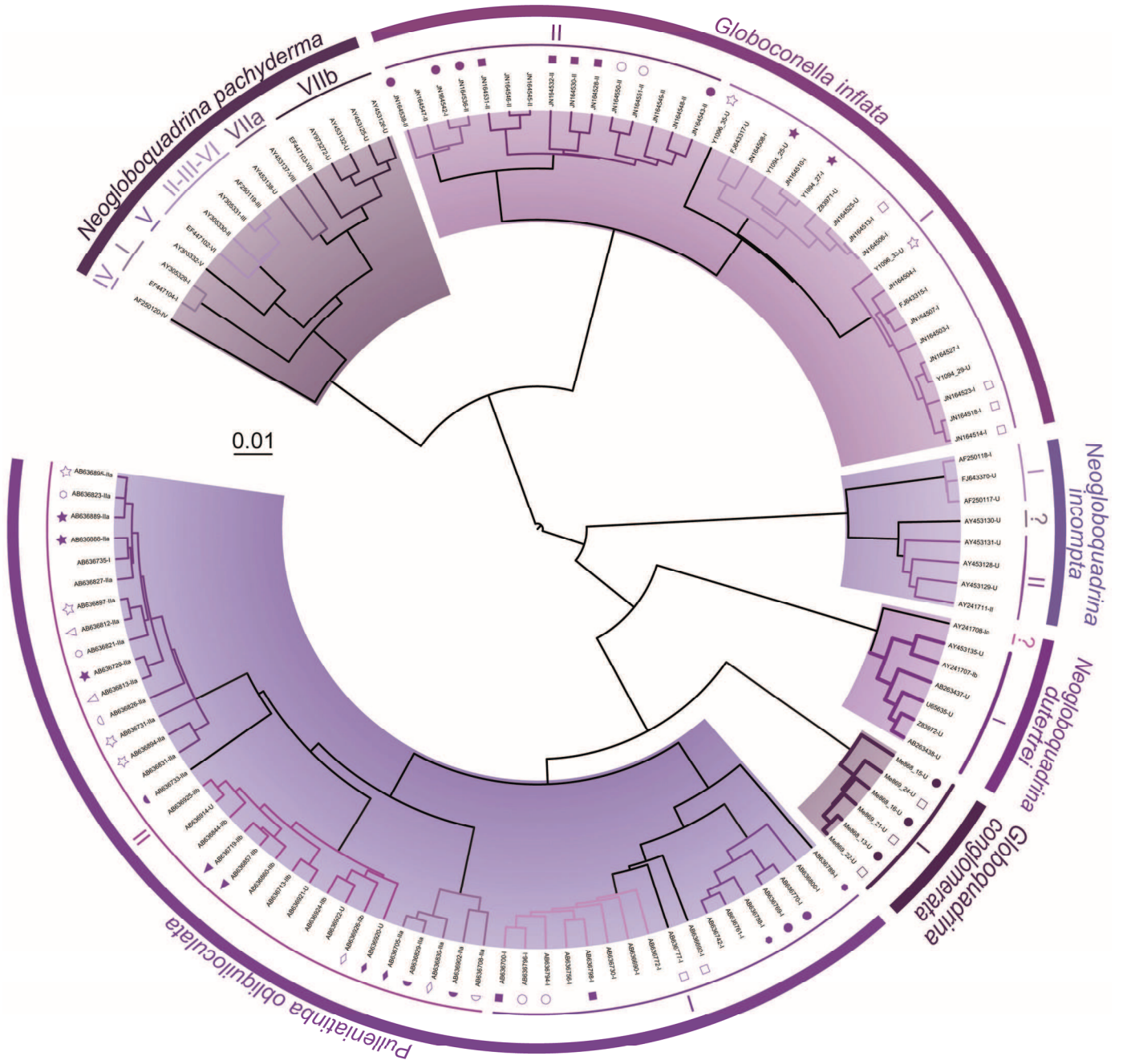
A- Spinose A



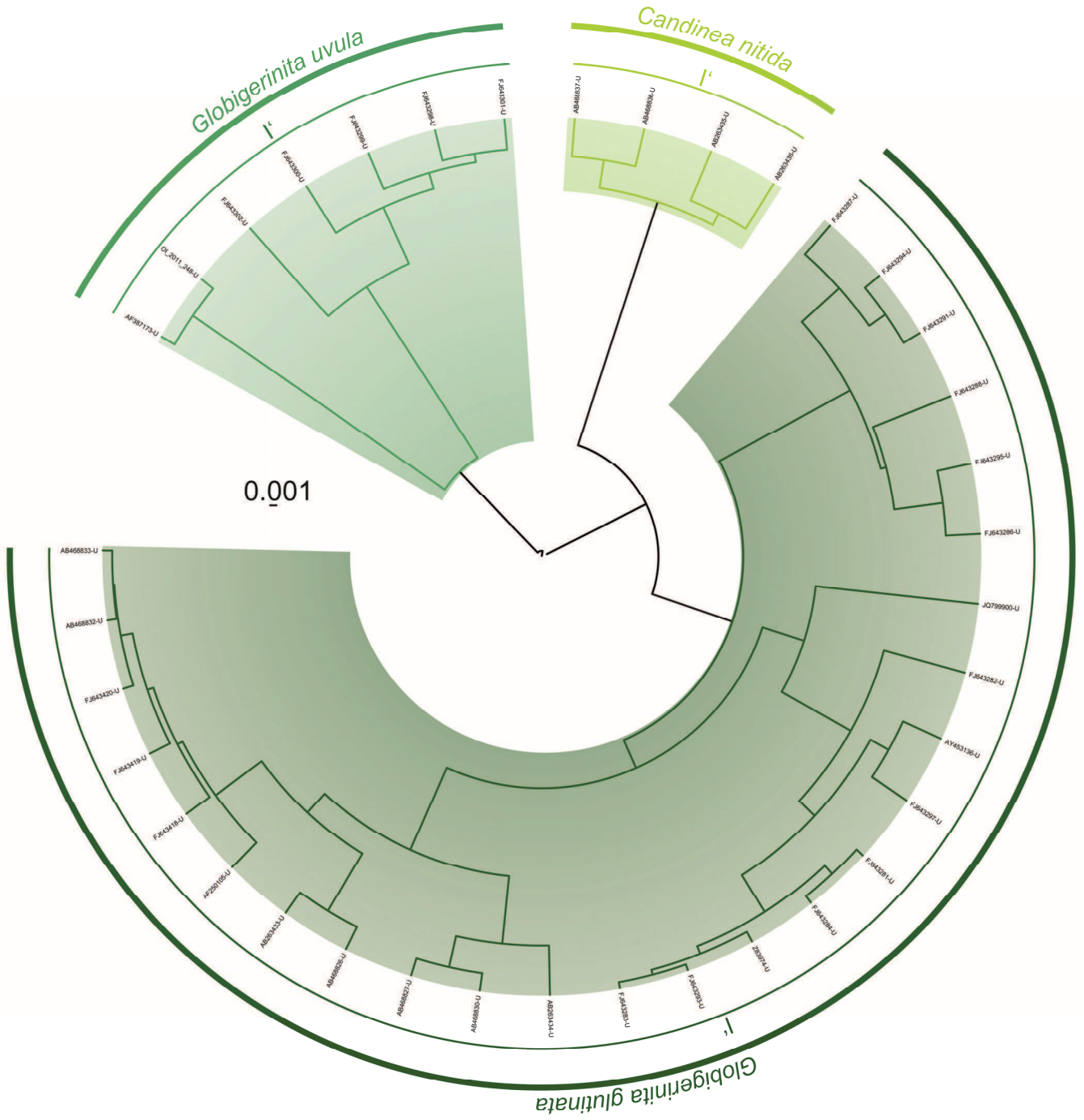
B- Spinose B



C- Macro A



D- Macro B



E- Micro

5. Discussion

5.1. Heterogeneity of previous genetic type delimitations

According to patristic distance analyses, previous genetic type delimitations correspond to genuine cryptic species in only 4 morpho-species (*Globigerinella siphonifera*, *Orbulina universa*, *Hastigerina pelagica* and *Neogloboquadrina incompta*; Table 7). Because *Globigerinoides sacculifer* overall and intra-genomic distances are within the same range, the absence of cryptic diversity within this morpho-species (André et al., 2013) is validated. The case of *Neogloboquadrina pachyderma* remains potentially ambiguous, as intra-specific and inter-specific distances are separated by virtually no distance gap (0.09 %). Within *Globigerina bulloides*, the distance gap is also reduced (0.4 %) and the diversity between some of the previously defined genetic types is very low (0.9 %). It corresponds to intra-type distances in other morpho-species (Fig. 9A), suggesting that this morpho-species may have been oversplit. The same apply to *Turborotalia quinqueloba* for which the difference between some of the previously defined genetic types is extremely low (0.12%). Likewise, the overlap between intra-type and inter-type distances in *Globigerinoides ruber+conglobatus* and *Pulleniatina obliquiloculata* shows that at least some of the previously defined genetic types within these morpho-species may not correspond to genuine species. Results suggest that *Globoconella inflata*, *Globoquadrina conglomerata*, *Hirsutella hirsuta*, *Globorotalia tumida*, *Globorotalia ungulata*, *Menardella menardii* and *Candeina nitida* do not hide cryptic diversity given their reduced overall patristic distances. Overall distances within *Neogloboquadrina dutertrei* and *Beela digitata* seem to match intra-type distances but data are too scarce to draw firm conclusions. Genetic distances within *Globigerinina uvula* and *Globigerinina glutinata* are particularly high and clearly out of range of intra-type distances, suggesting that both these morpho-species may constitute complexes of yet unknown cryptic species. The case of these species points to a major drawback of the patristic distance approach: it requires a-priori genetic type delimitations.

Our study shows that the empirical delimitations available in the literature suffer from subjectivity and are thus not homogenous: some previously-defined genetic types are likely to correspond to valid taxonomic units whereas others probably represent sub-species or population level structuration. Among the morpho-species for which genetic type delimitation seems accurate, intra-specific distances are quite variable as well as the range of the distance

gap between intra-specific and inter-specific distances (Fig. 9). This phenomenon may be the result of the heterogeneity of substitution rates observed between planktonic foraminiferal lineages and even sometimes between more closely related morpho-species (de Vargas et al., 1997). Consequently, we hypothesize that the design of a unique threshold value between intra-specific and inter-specific distances would not be appropriate in the case of planktonic foraminifera.

5.2. ABGD: an efficient method to build species delimitation hypotheses in planktonic foraminifera

As expected for a distance-based method, delimitations resulting from ABGD are validated through the patristic distance approach (Fig. 9, Table 7). However, *Neogloboquadrina pachyderma* and *Truncorotalia truncatulinoides* constitute two exceptions. In *N. pachyderma*, ABGD favors an alternative genetic type delimitation (Table 7) that is clearly cross-validated by the patristic distances approach. Although the gap between intra-type and inter-type distances was extremely reduced, published genetic types are also validated and we consequently cannot determine which delimitation (i.e., literature or ABGD) should be favored. In *T. truncatulinoides*, delimitation resulting from ABGD is not cross-validated through the patristic distances approach. Nevertheless, the overlap between intra-type and inter-type distances is much reduced using the ABGD delimitation compared to the literature-based delimitation (Fig. 9).

We also calculated patristic distances for the genetic type delimitations corresponding to the second MOTUs plateaus generated by ABGD in the cases of *Globigerinella siphonifera*, *Hastigerina pelagica*, *Globigerina bulloides* and *Globigerinoides ruber+conglobatus* (supplementary data 2). We obtained high intra-specific distances (up to 10%) corresponding to 4 to 8 times the intra-genomic distances. Consequently, these alternative species delimitations appear to be less likely and the first MOTUs plateau is comforted as the optimal genetic type delimitation.

Finally, even if the ABGD and patristic distances approaches are highly congruent, calculation of patristic distances is still of interest as it comforts genuine species delimitations by screening unrealistic hypotheses. Running ABGD is fast enough and efficient for building species delimitation hypotheses, even when only a few sequences are available, as for example in *Globigerinita uvula*. Consequently, this method should be intended first for

planktonic foraminiferal species delimitation hypotheses. Importantly, a current limit to this method is the requirement that the alignment is void of missing data. A direct consequence is the exclusion of potential cryptic species from analyses (for example the Types II and IIIb of *Orbulina universa*, the Type IIb of *Globigerinoides ruber* and the Type II of *Globoconella inflata*). Thus, the generalized use of ABGD for planktonic foraminiferal species delimitation would require a standardization of the sequenced and deposited SSU regions.

5.3. GMYC: a distance-independent method for building species delimitations in planktonic foraminifera

The GMYC method isolates numerous divergent haplotypes as putative species (Fig. 10). All of these sequences in *Orbulina universa* (AJ229109), *Globigerinoides ruber* (Z839665) and *Globigerinoides sacculifer* (JQ004126 and Z83964), correspond to old (submitted to the NCBI database back in 1996) or short sequences (~500 bp). Furthermore, they concentrate substitutions on the 5' end region. We speculate that the apparent divergence of these sequences is thus likely to be the result of PCR and/or sequencing artifacts that were more frequent with older amplification and sequencing chemistry. Consequently, we do not retain these sequences as genuine species. Furthermore, patristic distances between these divergent haplotypes within *Gs. ruber* and *G. sacculifer* and the other sequences from their closest putative species were clearly of intra-type distance range, confirming that the corresponding sequences should not be considered as separate species (supplementary data 2). GMYC classification of the sequences of the Type III of *O. universa* into two putative species is also a likely artifact as it only reflects differences in length and quality of the sequences. As a conclusion, after close examination on the GMYC results, the number of putative species delimited by the GMYC method is reduced to 3 within *O. universa*, 6 within *Gs. ruber+conglobatus*, and 1 within *Gs. sacculifer* (Table 7).

The GMYC method also assigned SSU copies from the same individuals to different putative species. This assignment may be the result of 3 phenomena: (i) non-concerted evolution between copies within the genome (Mayol and Rosello, 2001); (ii) when genetic distances are low, PCR and/or sequencing errors can produce enough noise obliterating the true phylogenetic signal (Maddison and Knowles, 2006); and (iii) horizontal gene transfer, a rare phenomenon in eukaryotes taxa that has never been evidenced for rDNA (Andersson,

2005). Consequently we chose to assign clones from the same individuals to the same putative species. The number of putative species within *Truncorotalia truncatulinoides* is thus reduced to 4 (Fig. 10B). Likewise, diversities in *Globoconella inflata* and *Pulleniatina obliquiloculata* are reduced to 2 putative species. Genetic diversity within *Gc. inflata* was mostly studied on the fast-evolving ITS genes because SSU divergence is particularly low (Morard et al., 2011). Consequently, a few PCR and/or sequencing artifacts might have induced the assignment of clones to different putative species. As the intra-genomic diversity is extensive within *P. obliquiloculata*, we speculate that non-concerted evolution of SSU rDNA copies within genomes may have generated the widespread sorting of clones from the same individuals into different clusters observed for this morpho-species.

Together, GMYC delimitations corroborate all previous genetic type delimitations supported as genuine species using the patristic distance approach, with the exception of *Neogloboquadrina pachyderma* (Table 7). Importantly, the taxonomic status of previously described genetic types of *N. pachyderma* was slightly ambiguous according to patristic distances. The new putative species delimitations obtained through the GMYC method were tested with the patristic distance approach. For all morpho-species but *T. truncatulinoides*, *N. pachyderma* and *P. obliquiloculata*, these new delimitations are supported as genuine species by the patristic approach as we observed a clear distance gap between intra-type and inter-type distances, or, in the case of the morpho-species without cryptic diversity, plausible intra-specific distance ranges (Fig. 9). Still, we were not able to cross-check the species status of the Type II and IIIb of *O. universa* (Fig. 10A) and the isolated sequence AJ229109, as well as that of the Type II of *Gc. inflata*, the sequence AY241708 of *Neogloboquadrina dutertrei*, and the sequence JQ004126 of *Gs. sacculifer*. In the case of *N. pachyderma*, *P. obliquiloculata* and *T. truncatulinoides*, GMYC-delimited and genetic types defined in the literature both lead to overlap between intra- and inter-type patristic distances (Fig. 9). For *T. truncatulinoides* we note that the overlap between intra-type and inter-type distances is reduced compared to the patristic approach based on previous genetic type delimitations. The topology of the *N. pachyderma* tree is highly sensitive to model and/or method changes, probably because only one sequence is available for 5 out of the 7 genetic types defined by Darling et al. (2004). Given that *N. pachyderma* phylogram (PHYML) and ultrametric tree (BEAST) recover quite different relationships (supplementary data 2), patristic distances were not pertinent for testing GMYC delimitations. Last, even after close examination of the

dataset of *P. obliquiloculata*, we were not able to infer possible artifact that might explain why species delimitation is unsatisfactory within this morpho-species.

Our study shows that GMYC is an efficient genetic distance-independent method for planktonic foraminiferal species delimitation using SSU rDNA sequences. However, results also demonstrate that delimitations can be heavily impacted by data quality and thus requires thorough inspection. Because the sequence overlap/missing data criteria are less critical than in distance-based methods, the GMYC analysis includes more putative species than ABGD and patristic distances analyses (Table 7, Fig. 10). Still, as GMYC is a time-consuming method, it should not be used in a first approach but rather as a cross-checking method. While GMYC proves useful, we also recover very doubtful results where the GMYC model could not be favored over the null model of a single coalescent population (i.e., trees “Spinose B” and “Microperforates”; Fig. 10D, E, Table 3 and supplementary data 2). Comparison of these cases provides guidelines on how to design sequence datasets for GMYC analysis. We notice that the statistically significant GMYC species delimitations tend to be associated with: (i) large datasets involving more than 2 morpho-species; (ii) datasets with few ambiguously aligned regions, i.e. datasets including closely related morpho-species; and (iii) datasets with overall homogenous sequence length. Indeed, the reduced size of the dataset might explain failure to reject the null model for “Spinose B” and “Microperforates” species delimitations and calls for more sequences from a larger set of morpho-species. In the case of the tree “Spinose B”, integration of the divergent morpho-species *Turborotalia quinqueloba* might also be at stake in putative species delimitation failure. Finally, the GMYC-delimited clusters within the Type III of *O. universa* (Fig. 10A), which apparently does not correspond to a genuine species, show that sequence length heterogeneity may strongly influence GMYC-based species delimitation.

5.4. Towards a molecular taxonomy of planktonic foraminifera

Patristic distance analyses show that only 6 out of the 12 morpho-species in which cryptic diversity was evidenced on more or less empirical grounds have their putative species correctly delimited (Table 7). The ABGD and GMYC methods gave the opportunity to cross-check validated delimitations, and to establish new hypotheses for invalidated cases. Overall, whatever the method used, our results clearly show that about half of the genetic types identified in the literature are unlikely to represent genuine biological species (Table 7).

Whereas the ABGD and GMYC putative species delimitation methods are independent, their results appear highly congruent: within the SSU rDNA sequences considered by both approaches, the ABGD method delimitates 29 genetic types, 25 (86%) of which being identical to those defined on the basis of the GMYC method (Table 7). Among putative species, those identically and independently defined by both methods are most probably genuine cryptic or pseudo-cryptic biological species. The high congruence between the two methods clearly suggests that the genetic types delimited using a single approach are plausible hypotheses. Our data confirm that GMYC, when compared to distance methods, has a tendency towards over-splitting groups (Puillandre et al., 2012b ; Miralles and Vince, 2013), whereas ABGD tends to over-lump previously defined or GMYC-defined genetic types (e.g., *N. pachyderma* in Table 7).

Finally, putative species delimitations remain ambiguous only for *N. pachyderma*, *T. truncatulinoides* and *P. obliquiloculata*. In the case of *N. pachyderma*, GMYC delimitations are clearly invalidated as genuine species through the patristic distance approach but ABGD and literature delimitations are both possible (Fig. 9). All delimitation hypotheses for *T. truncatulinoides* are invalidated through the patristic distance approach. Exploring cryptic genetic diversity in *T. truncatulinoides* suffers for a lack of molecular homogeneity, since the Types I, II, III and IV have been characterized based on ITS sequences (de Vargas et al., 2001), whereas the Type V was characterized based on SSU sequences (Ujiié and Lipps, 2009). Only one SSU sequence has been deposited in NCBI for the Types I, III and IV of *T. truncatulinoides* and the resolving power of the GYMC and ABGD methods for species delimitation is therefore reduced (Puillandre et al., 2012a). In particular, ABGD and GMYC disagree on the taxonomic status of the closely related Types I and II (Table 7). Using ITS sequences, de Vargas et al. (2001) suggested genetic isolation between these two genetic types that may be explained by a recent (100 to 200 kyrs) speciation event. Consequently, conflicting species delimitations between ABGD and GMYC methods may be an opportunity to detect recent speciation events that should be investigated using the ITS marker. Literature and GMYC genetic type delimitations for *P. obliquiloculata* are clearly invalidated as genuine species through the patristic distance approach. Although application of ABGD lumps all the available sequences into a single MOTU, its specific status is still not clearly confirmed on the basis of patristic distance values. Distance values within *P. obliquiloculata* are high (up to 7.6%) and, if compared with intra-genetic type distances calculated within the other morpho-

species, may correspond to both intra-type and inter-type distances (Fig. 9B). Nevertheless, these overall distance values represent only twice the intra-genomic distances which are also particularly high (up to 3.3%), supporting then the hypothesis that this morphospecies do not hide cryptic diversity. The lack of barcode gap within *P. obliquiloculata* either suggests that the potential speciation events, if any, have occurred very recently (Pons et al., 2006; Puillandre et al., 2012a) and/or that the high intra-genomic diversity have erased the barcoding gap. Likewise, heterogeneous evolutionary rates between *P. obliquiloculata* genetic types may generate similar values for intra-genetic type distances within fast evolving types and for inter-genetic type distances.

5.5. Integrative taxonomy and biogeography of planktonic foraminiferal cryptic species

The new or confirmed cryptic species delimitations discussed above are based on molecular data which have their own limitats, in particular when dealing with closely-related and young species (de Queiroz, 2007). Below, in an attempt to review the species status of modern planktonic foraminifera based on an integrative taxonomy (Dayrat, 2005), we compile our data with previously published non-molecular evidences, mostly including ecological and/or morphological differentiations occurring among putative cryptic species.

5.5.1 Macroperforate spinoses

Patristic distances and ABGD analyses agree on the species status of the previously defined genetic Types I, IIa and IIb of *Hastigerina pelagica* (Aurahs et al., 2009b; Weiner et al., 2012). These cryptic species, collected so far in the North Atlantic, Mediterranean and NW Pacific (Fig. 11; de Vargas et al., 1997, Ujiie and Lipps, 2009; Weiner et al., 2012), exhibit apparently cosmopolitan sympatric distributions in temperate to tropical water masses. Their taxonomic status is reinforced by the evidence of depth-related specializations in Types IIa and IIb (Weiner et al., 2012). The GMYC method could not be applied to *H. pelagica*, since its SSU rDNA sequences are highly divergent, leading to highly ambiguous alignments when compared with other spinose morpho-species.

Within *Turborotalia quinqueloba*, SSU rDNA studies have identified six genetic types (Darling and Wade, 2008) but the application of the ABGD method lumps these genetic types into two cryptic species whose patristic distances are compatible with this status (Fig. 9B).

These species match the two main ecological groups evidenced by Darling and Wade (2008). The first species, here named Type I (Table 7), has been collected in Coral and Arabian Seas (Fig. 11), and seems to be associated with warm waters of the (sub)tropical Indian and Pacific Oceans. The second species, here named Type II (Table 7), exhibits a bipolar distribution in cooler (sub)polar and transitional waters of both Hemispheres (Fig. 11; Darling et al., 2003). Parker (1962) reported that at polar latitudes, surface sediment samples of *Tb. quinqueloba* yield larger individuals than at lower latitudes. This author also noticed that specimens of *Tb. quinqueloba* exhibit more spiny tests with latitude in the North Pacific. We speculate that there could be a relationship between these observed morphological changes that appear to follow water masses and the patchy distribution of the Types I and II of *Tb. quinqueloba*.

Application of the ABGD method lumps the eleven previously identified genetic types of *Globigerina bulloides* (Darling and Wade, 2008; Morard et al., 2013; Kurasawa et al., unpublished) into seven species whose patristic distances are compatible with this status (Fig. 9B). The newly defined Type Iib-d-f (Table 7) lumps sequences of individuals that apparently share similar ecology in transitional to sub-polar water masses of both hemispheres (Darling et al., 2007; Kurasawa et al., unpublished), then making Type Iib-d-f a cosmopolitan species with a bipolar distribution (Fig. 11). Sequences of Types Ic and Ie (Kurasawa et al., unpublished) from the Pacific Ocean cluster with the Type Ib sequence from the Atlantic Ocean, suggesting that Type Ib-c-e is also a cosmopolitan species. Unfortunately, since the exact sampling locations of Types Ic and Ie are not available, the ecological affinities of this species remain unknown. Data is still insufficient to evidence biogeographical or ecological differentiations between the Indo-pacific tropical Types Ia and Id. Types Iia, Iic and Iie from colder water masses also correspond to cryptic species. Type Iie is apparently restricted to the North Pacific (Darling and Wade, 2008). Darling et al. (2003) evidenced different timings of reproduction which may explain genetic isolation (Norris, 2000) of the otherwise sympatric Types Iia and Iib-d-f. Still, an integrative taxonomy for *Gg. bulloides* genetic types is limited because of the scarcity of the SSU rDNA data. For example, environmental data and sampling through different seasons are insufficient to detect potential ecological differences between the apparently sympatric Types Iic, Type Iib-d-f and Type Iia.

Our data show that only one single species of *Beela digitata* has been sampled so far. On the other hand, the distribution patterns of this rare morpho-species (Hemleben et al., 1989) cannot be discussed in this paper, since the studied sequences originate from specimens collected at two stations only, both located in the South Pacific (Fig. 11).

All methods agree on the species status of the previously defined genetic Types I, II and III of *Globigerinella siphonifera* (Darling et al., 1997; Huber et al., 1997; de Vargas et al., 2002). Although the three cryptic species exhibit wide biogeographic distributions in the world ocean, their observed distribution pattern suggests ecological differences that seem to be related to nutrient availability of water masses (Fig. 11; de Vargas et al., 2002). The biogeographic distribution and the $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ and Mg/Ca values of the Type I suggest that this species is a surface-dweller from low nutrient water masses of the Indian, Pacific and Atlantic Oceans (Huber et al., 1997; de Vargas et al., 2002). The cosmopolitan Type II has been collected in tropical to transitional water masses of the world ocean. This species may have a deeper depth habitat than the other cryptic species, since laboratory culture and collections in the Ocean suggest that it could favor the deep chlorophyll maximum layers of the water column (Huber et al., 1997; Bijma et al., 1998; de Vargas et al., 2002). Finally, the Type III species is also a surface-dweller, but it is apparently associated with highly productive transitional water masses and upwelling systems (de Vargas et al., 2002). Species of *Ge. siphonifera* may be pseudo-cryptic, since Huber et al. (1997) evidenced clear differences in shell porosity between Type I and Type II specimens collected from the Caribbean.

All methods converge on the species status of the previously defined Caribbean, Sargasso and Mediterranean genetic types of *Orbulina universa* (de Vargas et al., 1999), respectively re-designated as Types I, II and III by de Vargas et al. (2004). The ABGD method clearly delimitates the Types I and III as independent species, while sequences of the Type II were too short to be included in the ABGD dataset. The species status of the Type II is however supported on the basis of the GMYC method. In the world ocean, the three species of *O. universa* have distributions that are apparently correlated with the productivity of the surface waters (Fig. 11; de Vargas et al., 1999; Morard et al., 2009). Types I and II inhabit stratified and nutrient-depleted subtropical waters (the Type II occurring in extreme oligotrophic environments), whereas the Type III favors vertically-mixed and nutrient-rich environments of the tropical to temperate water masses. Biometric analyses by Morard et al. (2009) demonstrate that the Types I, II and III of *O. universa* are pseudo-cryptic species. Shells of the Type I species exhibit larger pore area and higher porosity values than those of the Types II and III, whereas the two later species can be further distinguished on the basis of shell thickness, which is significantly thinner in the case of the Type II species.

Our data confirm that the morphologically diverse plexus *Globigerinoides sacculifer*, including the *Gs. trilobus*, *Gs. immaturus*, *Gs. quadrilobatus* and *Gs. sacculifer s.s.* morphotypes, constitutes a single species (André et al., 2013). *Globigerinoides sacculifer* is so far a unique example in planktonic foraminifera where the morphological variability exceeds the rDNA genetic variability. Considering the worldwide sampling representativity of the available genetic data, *Gs. sacculifer* should be considered as a true cosmopolitan and morphologically diverse (sub)tropical species (Fig. 11).

We retained six out of the nine genetic types previously defined within the *Globigerinoides ruber*+*conglobatus* complex (Darling and Wade, 2008; Aurahs et al., 2009a) (Table 7). The sympatric Types IIa, IIa1 and IIa2 (Aurahs et al., 2009a), which appear widely distributed in tropical to transitional waters of the world ocean, are lumped into a single species here termed Type IIa (Table 7; Fig. 11). The tropical Type Ib1 and tropical to transitional Type Ib2 (Darling and Wade, 2008), found in sympatry in the Arabian Sea, are also lumped into a single species here termed Type Ib. The peculiar pink color of this *Gs. ruber* morph reinforces the species status of this genetic type. Types IIa and IIb of *Gs. ruber*, re-named *Gs. elongatus* after Aurahs et al. (2011) are distinguished from other *Gs. ruber* genetic types thanks to their flattened final chamber. Morphological criteria can further be argued to reinforce the species status of Type IIb, which has significantly smaller shells than other *Gs. ruber* species (Aurahs et al., 2009a), and of Type IIa, which is the only large-sized *Gs. elongatus* species (Aurahs et al., 2011). The distinct species status of *Gs. conglobatus* is supported by its divergent morphological features which promoted its classification as a separate morpho-species (Brady, 1879). Our revised species delimitation in *Gs. ruber*+*conglobatus* suggests that the species distributions are nearly sympatric in tropical to transitional water masses (Fig. 11). On the other hand, different timing of reproduction evidenced by Aurahs et al. (2009a) between the Type Ia and *Gs. ruber* (pink) may suggest ecological and/or behavioral differences among species of the group.

Finally, our data show that only one single species of *Sphaeroidinella dehiscens* has been sampled so far. Since the studied sequences originate from specimens collected at stations located in the tropical Indo-Pacific, the distribution pattern of this rare morphospecies (Hemleben et al., 1989) cannot be discussed further.

5.5.2 Macroperforate non-spinose

Genetic sequencing studies have identified five genetic types within *Truncorotalia truncatulinoides* (de Vargas et al., 2001; Ujiie et al., 2009), but applications of the ABGD and GMYC methods suggest that this morpho-species harbors only 3 or 4 species, respectively (Table 7). All methods agree on the species status of the right-coiled Type V (Ujiie et al., 2009), which is apparently restricted to the NW Pacific where no other putative cryptic species occurs (Fig. 11). ABGD is the only approach that significantly reduces intra-genetic type and inter-genetic type patristic distances overlapping (Fig. 9B). It clusters Types I and II on the one hand, and Types III and IV on the other hand (de Vargas et al., 2001), into two distinct species with contrasted environmental affinities (Table 7). Type I-II is a warm water species restricted to the (sub)tropical oceans, whereas Type III-IV appears to be restricted to the productive subtropical and the colder subpolar frontal zones of the Southern Ocean (Fig. 11). Both species are pseudo-cryptic, since they can be differentiated on the basis of shell morphology: Type I-II specimens exhibit large, highly conical left or right-coiled shells, and Type III-IV specimens typically show smaller, axially-compressed and biconvex left-coiled shells (Quillévére et al., 2013).

Our data show that to date, no cryptic species have been sampled in the oceans for the morpho-species *Hirsutella hirsuta*, *Menardella menardii*, *Globorotalia tumida*, *Globorotalia unguolata* and *Globoquadrina conglomerata* (Table 7; Fig. 11). Considering the solid sampling effort achieved for *Ht. hirsuta* in the Indian, Pacific and Atlantic Oceans (Fig. 11), we speculate that *Ht. hirsuta* may be a single, cosmopolitan species of planktonic foraminifera. The sequences available for *M. menardii*, *Gr. tumida*, *Gr. unguolata* and *Gr. conglomerata* originate from too scarce and isolated locations of the world ocean (Fig. 11), then precluding any further discussion about their cryptic diversity and biogeography.

Regarding *Neogloboquadrina incompta*, all methods agree on the species status of the Types I and II of Darling et al. (2006). These two species have distinct distributions, the Type I inhabiting the Southern Ocean and the North Atlantic, and the Type II inhabiting the North Pacific (Darling et al., 2006; Fig. 11). Sequence AY453130, isolated as a possible third species on the basis of GMYC analysis, is characterized by numerous substitutions that were not found in any other *N. incompta* specimens from the NW Pacific (Kimoto and Tsuchiya, unpublished), making the taxonomic status of this sequence unclear until further sampling.

Genetic sequencing studies have identified seven genetic types within *Neogloboquadrina pachyderma* (Table 7, Darling and Wade, 2008) whose patristic distance

values are compatible with a species status (Fig. 9A), although the distance gap is much reduced. Application of the ABGD method leads to an alternative species delimitation hypothesis which is also cross-validated by patristic distances (Table 7; Fig. 9B). The distribution pattern of the genetic types defined in the literature tends to show that most of them are allopatric and related to specific water masses (Fig. 11). The Type I was found in polar waters of the North Atlantic (Darling et al., 2004). Types II, III and IV were found in the Southern Ocean; Type IV appears to be a polar species, whereas Types II and III prefer subpolar and transitional water masses (Darling et al., 2004). Types V and VI were only collected in the South Atlantic, in the vicinity of the Benguela upwelling (Darling and Wade, 2008). Finally, specimens of Type VII seem to be restricted to transitional waters of the North Pacific (Darling et al., 2007). Contrary to Darling et al. (2004), the ABGD method clusters all sub-polar types from the South Hemisphere (Fig. 11), i.e., the Types II, III, V and VI, as a single species.

Our study suggests that *N. dutertrei* constitutes a unique species that is cosmopolitan in (sub)tropical waters of the world oceans (Table 7; Fig. 11). The GMYC method isolated the sequence AY241708 as a putative second species (Fig. 10C). Because of its short length, isolation of this sequence as a putative species may be an artifact. On the other hand, we speculate that this sequence may represent another cryptic species restricted to the North Pacific Ocean, a region that is known for harboring endemic cryptic species of planktonic foraminifera (Darling and Wade, 2008).

Previous studies of the ITS genes have identified two genetic types of *Globoconella inflata* (Morard et al., 2011). ABGD and patristic distances methods agree on the species status of the Type I. However, due to the shortness of available sequences, these methods cannot be used to test whether the Type II belongs to the same species as the Type I or is indeed an independent species. Application of the GYMC method confirms the species status of the Type I, which has been found to inhabit transitional to subtropical waters of both hemispheres, and of the Type II, which is apparently restricted to the Antarctic subpolar waters (Morard et al., 2011; Fig. 11). Species of *Gc. inflata* may be pseudo-cryptic, since Morard et al. (2011) evidenced significant differences in shell morphology in modern populations collected north and south of the Antarctic subpolar front.

Finally, genetic sequencing studies have identified three genetic types within *Pulleniatina obliquiloculata* (Ujjié et al., 2012) but application of the ABGD and GMYC methods suggest that those three types should be lumped into one or two species (Table 7).

Patristic distances approach fails to cross-validate any of these delimitations (Fig. 9). Based on GMYC analyses, the Type I (Ujiié et al., 2012) of *P. obliquiloculata* is an independent species, when the Types IIa and IIb (Ujiié et al., 2012) constitute a single species. The Type I of *P. obliquiloculata* occurs in tropical waters of the Indian and western Pacific Oceans (Fig. 11). In warmer waters of the tropical western Pacific, the Types I and II are found in sympatry without any depth partitioning (Ujiié et al., 2012).

5.5.3. Microperforate clade

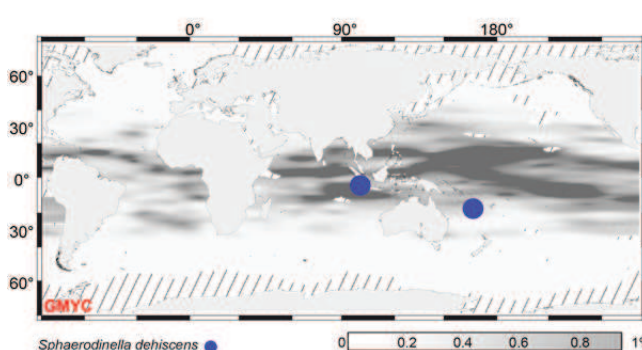
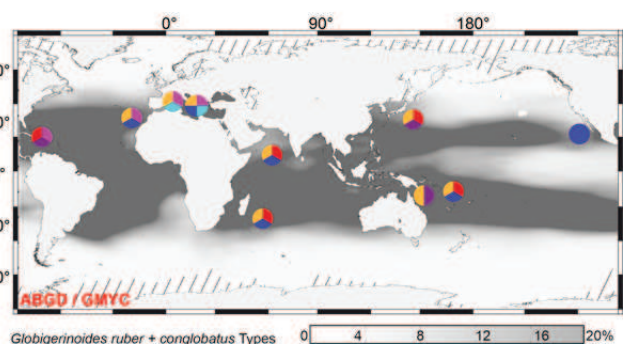
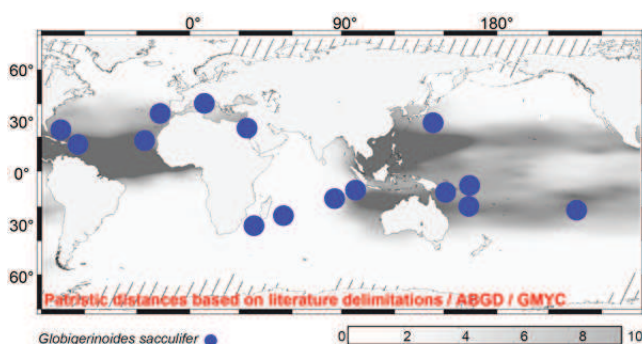
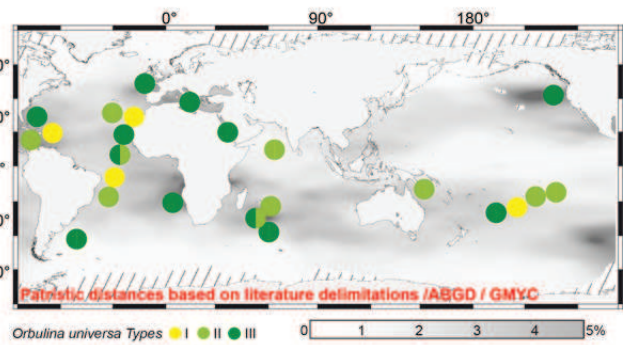
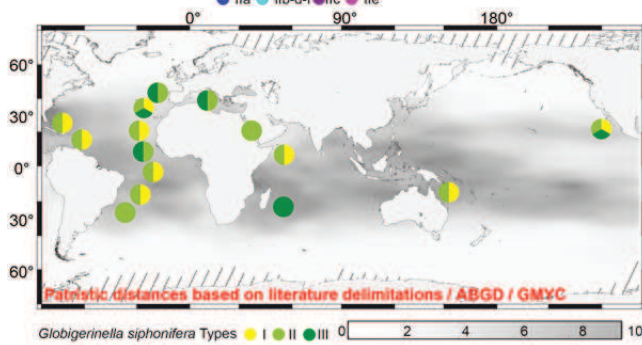
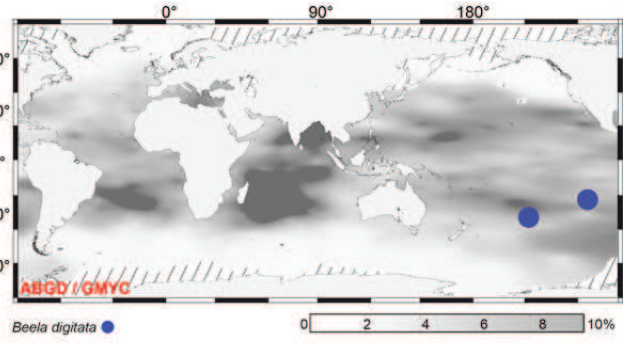
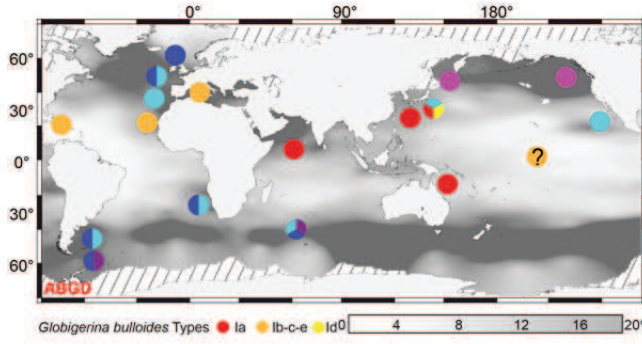
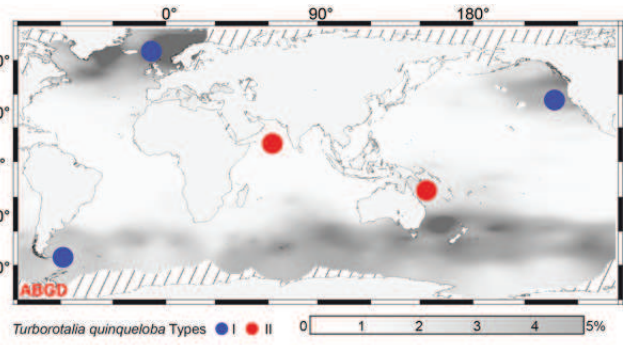
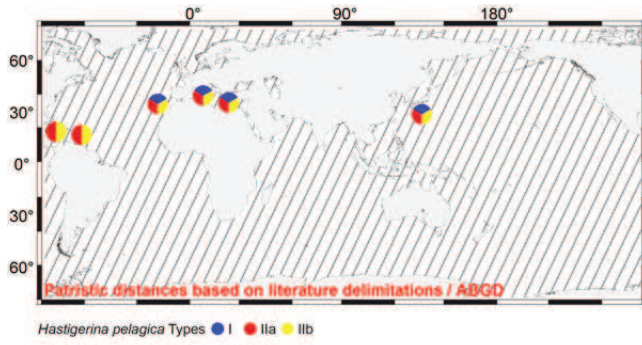
Up to now, no detailed genetic study has focused on the microperforate planktonic foraminifera, probably because this clade includes rare morpho-species (Hemleben et al., 1989), and because plankton net mesh and sieve sizes classically used for collecting living foraminifera may have been too large for these typically small-sized taxa. Here, our models for species delimitation are based solely on distance methods (patristic and ABGD), since GMYC delimitations were not significantly better than the null hypothesis of a pure coalescent model (Table 3).

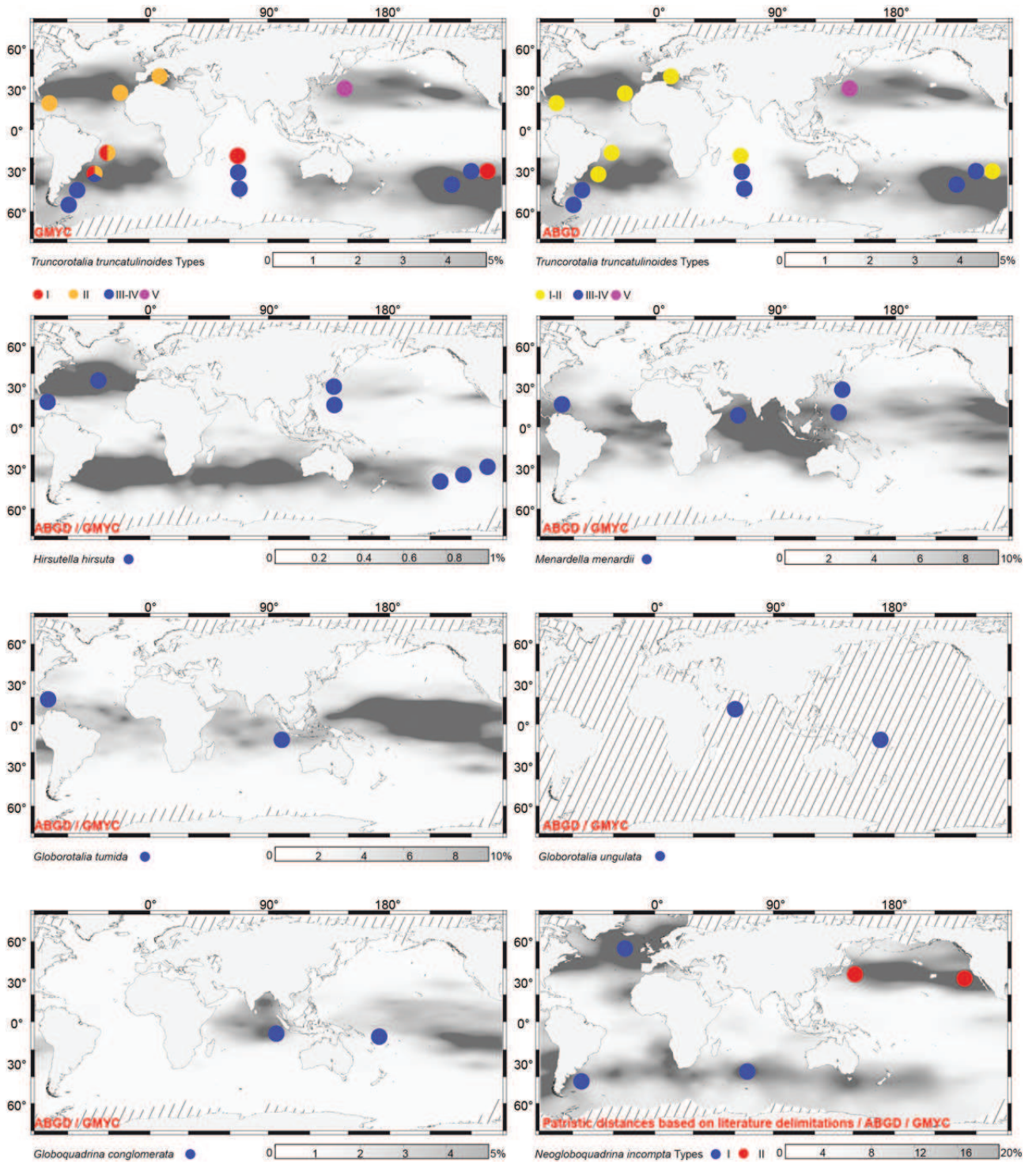
For the sequences of *Candeina nitida*, estimation of patristic distance values (Fig. 9A) suggests that only one cosmopolitan species has been sampled so far in the Caribbean Sea and NW Pacific (Fig. 11).

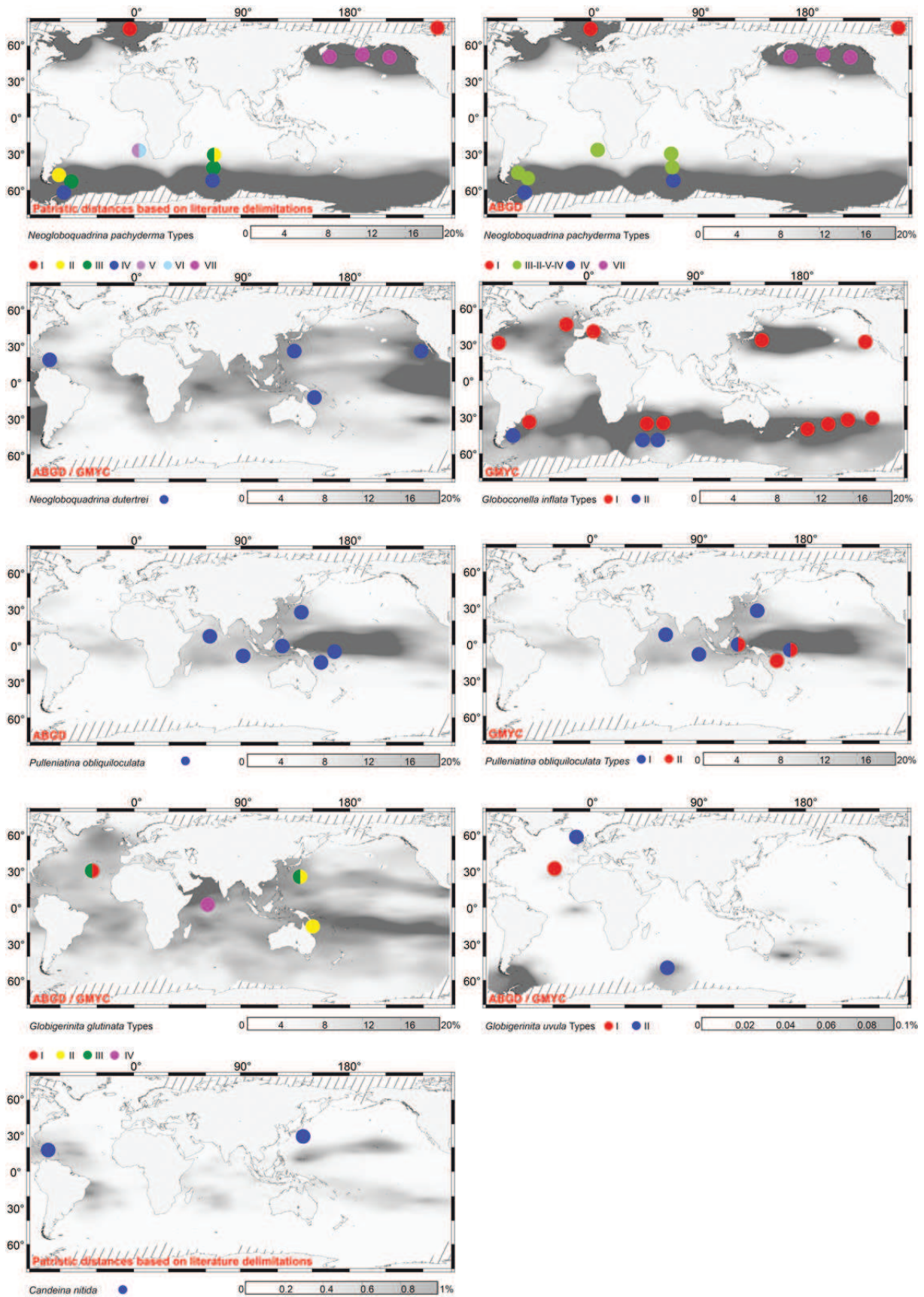
Application of the ABGD method on the dataset of *Globigerinita glutinata* lumps the sequences into four distinct clusters (Table 7) whose patristic distances are compatible with the species status (Fig. 9B). Type I has been found in the subtropical north Atlantic, Type II in the subtropical NW and SW Pacific, Type III in the subtropical north Atlantic and NW Pacific, and Type IV has been found only in the Arabian Sea (Fig. 11). Considering the tropical to polar waters geographic range of this morpho-species (Hemleben et al., 1989), we speculate that yet unsampled cryptic species of *Ga. glutinata* may inhabit colder high latitude surface waters.

Finally, application of the ABGD method on the dataset of *Globigerinita uvula* lumps sequences into two distinct clusters (Table 7) whose patristic distances are compatible with the species status (Fig. 9B). Such a species status of the Types I and II of *Ga. uvula* is apparently reinforced on the basis of observational geographical data, which suggest that the first species inhabits subtropical environments, when the second species may be restricted to subpolar environments (Fig. 11).

Figure 11: geographic distribution of cryptic species of planktonic foraminifera (see Table 7). Gray shading indicates the relative abundance of each morpho-species in planktonic foraminiferal assemblages from surface sediments, interpolated from data in the MARGO database (Kucera et al., 2005; MARGO project members, 2009). The species delimitations are according to the method(s) noted in red in the maps' left corner and refer to Table 7. Only patristic-distances cross-validated delimitations are shown except for *T. truncatulinoides* and *P. obliquiloculata* for which such cross-validated delimitations are not available. Geographic location data from: André et al. (2013, unpublished data); Aurahs et al. (2009a, 2009b, 2011); Darling et al. (1996, 1997, 1999, 2000, 2003, 2004, 2006, 2007) ; Darling and Wade (2008) ; Huber et al. (1997) ; Kimoto and Tsuchiya (unpublished) ; Kurasawa and Tsuchiya (unpublished) ; Kuroyanagi et al. (2008) ; Morard et al.(2009, 2011, 2013); Stewart et al. (2001) ; Ujiie and Lipps (2009) ; Ujiie et al. (2012) ; de Vargas et al. (1997, 1999, 2001, 2002) ; Weiner et al. (2012).







6. Conclusions

Two independent and quantitative methods, the ABGD and GMYC, coupled with calculation of patristic distances within and among genetic types, were tested to quantify and compare SSU rDNA divergences in planktonic foraminifera. Planktonic foraminiferal putative species should be delimited using these objective methods. The ABGD method should be used in a first attempt because it is rapid and works at the morpho-species level. A GMYC analysis may then be run in order to independently confirm the ABGD putative species delimitations. Whenever delimitations are ambiguous or whenever several hypotheses are possible, estimation of the patristic distances helps choosing the most plausible delimitation. Nevertheless, our analyses show that the heterogeneity of sequence datasets is detrimental for objective species delimitation. The ABGD method requires long enough and strictly overlapping sequences. Consequently, the design of the ABGD dataset excluded part of the original information, thus entirely excluding some potential cryptic species. Even if the GMYC method requirements are less strict, our study shows that heterogeneity in length and/or quality of the sequences can lead to non-significant results, causing unreliable species delimitations. Furthermore, in the case of the GMYC method, more sequencing is required to get significant species delimitations or to conclude on the taxonomic status of some of the singletons defined by this method.

As a consequence, objective delimitation of foraminiferal cryptic species calls for a standardization of the sequencing procedures. Sequence length should be standardized and include at least the region used for species delimitation in this study. Several individuals should be sequenced for each putative cryptic species in order to get a good estimation of the intraspecific distances, which is crucial for ABGD and patristic distance methods, and in order to enable GMYC to accurately identify the boundary between dichotomic (interspecific) and coalescent (intra-specific) branching patterns. Several clones should be sequenced, at least from a few individuals. Cloning gives the opportunity to estimate intragenomic distances and to detect possible species oversplits whenever the automatic methods separate clones from the same individuals into different putative species.

Our proposed taxonomic (re)assignment of planktonic foraminifera suggests that in *Globigerinella siphonifera* (3 species), *Globigerinoides sacculifer* (1 species), *Orbulina universa* (3 species), *Hastigerina pelagica* (3 species), *Neogloboquadrina incompta* (2

species), *Neogloboquadrina dutertrei* (1 species) and *Globoconella inflata* (2 species), all the genetic types defined in the literature correspond to (pseudo)cryptic species. In *Beela digitata* (1 species), *Sphaerodinella dehiscens* (1 species), *Hirsutella hirsuta* (1 species), *Globoquadrina conglomerata* (1 species), *Menardella menardii* (1 species), *Globorotalia ungulata* (1 species), *Globorotalia tumida* (1 species), *Globigerinita uvula* (2 species), *Globigerinita glutinata* (4 species) and *Candeina nitida* (1 species), 13 species are for the first time delimited within the plankton-tow material available from the World Ocean. In *Turborotalia quinqueloba* (2 species), *Globigerina bulloides* (7 species), and *Globigerinoides ruber+conglobatus* (6 species), we show that only 15 out of the 26 previously described genetic types constitute genuine species. Species delimitation within *Truncorotalia truncatulinoides* (4 species), *Neogloboquadrina pachyderma* (4 species) and *Pulleniatina obliquiloculata* (2 species) remains ambiguous, although our analyses suggest that some of the characterized genetic types do not correspond to genuine species. All in all, our study suggests that within the 55 genetic types described to date in the literature, only 29 constitute cryptic or pseudo-cryptic species.

Such taxonomic (re)assignment complements and, in some cases modifies our knowledge of the geographic distribution of planktonic foraminiferal species, which remains complex with some species being cosmopolitan and others being narrower specialists. Sampling sites are in most cases limited, studies of seasonal distribution variations are rare, and the vertical distribution of species in the water column remains largely unknown, preventing a finer understanding of the ecology (e.g., niche partitioning) and biogeographical history of these species, especially when they are found sympatrically. From that point of view, environmental sampling would be a great opportunity to better characterize the distribution of planktonic foraminiferal cryptic species. Such datasets are bound to multiply as high throughput sequencing methods are becoming more commonplace. Nevertheless, the correct interpretation of environmental datasets first needs accurate species definitions, i.e., an unambiguous reference database connecting sequences to identified true species, that we hope promoting by this analysis.

Acknowledgments

We thank T. Lefébure for his help with BEAST and G. Escarguel for comments on the manuscript. We acknowledge the assistance of the Master and the crew of the cruises during which the new material has been collected: AMT-8, Revelle, OISO, C-MarZ, Kt-02 and Kt-06, Melville, Gyrafor A and B, FORCLIM. Special thanks are given to the Institut Polaire Français Paul Emile Victor (IPEV). This work was supported by grants from the Institut National des Sciences de l'Univers (INSU) INTERRVIE program (F.Q.).

Supplementary data 1

information on planktonic foraminifera sequences available on NCBI.

Supplementary data 2

A- sequence alignments; B- PhyML trees used for patristic distance calculation; C- BEAST ultrametric trees; D- Patristic distance matrices.

References

- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. Institute of Electrical and Electronics Engineers Transactions on Automatic Control, 19: 716-723.
- Andersson, J.O., 2005. Lateral gene transfert in eucaryotes. Cellular and Molecular Life Science, 62: 1182-1197.
- André, A., Weiner, A., Quillévéré, F., Aurahs, R., Morard, R., Douady, C., de Garidel-Thoron, T., Escarguel, G., de Vargas, C. and Kucera, M., 2013. The cryptic and the apparent reversed: lack of genetic differentiation within the morphologically diverse plexus of the planktonic foraminifer *Globigerinoides sacculifer*. Paleobiology, 39: 21-39.
- Aurahs, R., Göker, M., Grimm, G., Hemleben, V., Hemleben, C., Schiebel, R. and Kucera, M., 2009. Using the multiple analysis approach to reconstruct phylogenetic relationships among planktonic foraminifera from highly divergent and length-polymorphic SSU rDNA sequences. Bioinformatics and Biology Insights, 3: 155-177.
- Aurahs, R., Grimm, G., Hemleben, V., Hemleben, C. and Kucera, M., 2009. Geographical distribution of cryptic genetic types in the planktonic foraminifer *Globigerinoides ruber*. Molecular Ecology, 18: 1692-1706.
- Aurahs, R., Treis, Y., Darling, K. and Kucera, M., 2011. A revised taxonomic and phylogenetic concept for the planktonic foraminifer species *Globigerinoides ruber* based on molecular and morphometric evidence. Marine Micropaleontology, 79: 1-14.
- Bijma, J., Hemleben, C., Huber, B.T., Erlenkeuser, H. and Kroon, D., 1998. Experimental determination of the ontogenetic stable isotope variability in two morphotypes of *Globigerinella siphonifera* (d'Orbigny). Marine Micropaleontology, 35: 141-160.
- Bolli, H. and Saunders, J., 1985. Oligocene to Holocene low latitude planktic foraminifera. Plankton stratigraphy. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cavalier-Smith, T. and Chao, E.E.Y., 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). Protist, 154: 341-358.
- Coleman, A.W., 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. Trends in Genetics, 19: 370-375.
- Coleman, A.W., 2009. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. Molecular Phylogenetics and Evolution, 50: 197-203.
- Darling, K.F., Kroon, D., Wade, C.M. and Leigh Brown, A.J., 1996. Molecular phylogeny of the planktic foraminifera. Journal of Foraminiferal Research, 26: 324-330.
- Darling, K.F., Wade, C.M., Kroon, D., Brown, A.J.L. and Bijma, J., 1999. The diversity and distribution of modern planktic foraminiferal small subunit ribosomal RNA genotypes and their potential as tracers of present and past circulation. Paleoceanography, 14: 3-12.
- Darling, K.F., Wade, C.M., Stewart, I.A., Kroon, D., Dingle R. and Brown, A.J., 2000. Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. Nature, 405: 43-47.

- Darling, K.F., Kucera, M., Wade, C.M., Langen, P.V. and Pak, D., 2003. Seasonal distribution of genetic types of planktonic foraminifer morphospecies in the Santa Barbara Channel and its paleoceanographic implications. *Paleoceanography*, 18: 1032-1042.
- Darling, K.F., Kucera, M., Pudsey, C.J. and Wade, C.M., 2004. Molecular evidence links cryptic diversification in polar planktonic protists to Quaternary climate dynamics. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 101: 7657-7662.
- Darling, K.F., Kucera, M., Kroon, D. and Wade, C.M., 2006. A resolution for the coiling direction paradox in *Neoglobobulimina pachyderma*. *Paleoceanography*, 21: 1-14.
- Darling, K.F., Kucera, M. and Wade, C.M., 2007. Global molecular phylogeography reveals persistent arctic circumpolar isolation in a marine planktonic protist. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104: 5002-5007.
- Darling, K.F. and Wade, C.M., 2008. The genetic diversity of planktic foraminifera and the global distribution of ribosomal RNA genotypes. *Marine Micropaleontology*, 67: 216-238.
- Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 407-415.
- de Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56: 879-886.
- de Vargas, C., Zaninetti, L., Hilbrecht, H. and Pawlowski, J., 1997. Phylogeny and rates of molecular evolution of planktonic foraminifera: SSU rDNA sequences compared to the fossil record. *Journal of Molecular Evolution*, 45: 285-294.
- de Vargas, C., Norris, R.D., Zaninetti, L., Gibb, S.W. and Pawlowski, J., 1999. Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 2864-2868.
- de Vargas, C., Renaud, S., Hilbrecht, H. and Pawlowski, J., 2001. Pleistocene adaptive radiation in *Globobulimina truncatulinoidea*: genetic, morphologic, and environmental evidence. *Paleobiology*, 27: 104-125.
- de Vargas, C., Bonzon, M., Rees, N.W., Pawlowski, J. and Zaninetti, L., 2002. A molecular approach to biodiversity and biogeography in the planktonic foraminifer *Globobulimina siphonifera* (d'Orbigny). *Marine Micropaleontology*, 45: 101-116.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. and Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1969-1973.
- Ezard, T., Fujisawa, T. and Barraclough, T., 2009. Splits: SPecies' LLimits by Threshold Statistics. R package version 1.0-11/r29.
- Fontaneto, D., Herniou, E.A., Boschetti, C., Caprioli, M., Melone, G., Ricci, C. and Barraclough, T.G., 2007. Independently evolving species in asexual Bdelloid rotifers. *Public Library of Science Biology*, 5: e87.

- Görker, M., Grimm, G.W., Auch, A.F., Aurahs, R. and Kucera, M., 2010. A clustering optimization strategy for molecular taxonomy applied to planktonic foraminifera SSU rDNA. *Evolutionary Bioinformatics*, 6: 97-112.
- Grimm, G.W., Stogerer, K., Ertan, K., Kitazato, H., Kucera, M., Hemleben, V. and Hemleben, C., 2007. Diversity of rDNA in *Chilostomella*: molecular differentiation patterns and putative hermit types. *Marine Micropaleontology*, 62: 75-90.
- Guindon, S. and Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52:696-704.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. and Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 9.
- Hemleben, C., Spindler, M. and Anderson, O.R., 1989. *Modern Planktonic Foraminifera*. Springer, New York.
- Hoef-Emden, K., 2012. Pitfalls of establishing DNA barcoding systems in protists: the Chrysophyceae as a test case. *Public Library of Science One*, 7: e45632.
- Huber, B.T., Bijma, J. and Darling, K.F., 1997. Cryptic speciation in the living planktonic foraminifer *Globigerinella siphonifera* (d'Orbigny). *Paleobiology*, 23: 33-62.
- Katoh, K. and Toh, H., 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 276-285.
- Kennett, J.P. and Srinivasan, M.S., 1983. *Neogene Planktonic Foraminifera: a Phylogenetic Atlas*. Hutchinson Ross, Stroudsburg (Pennsylvania).
- Kimoto, K. and Tsuchiya, M., unpublished. Coiling direction changes in different generations of *Neogloboquadrina pachyderma*: importance on paleoceanographic reconstruction from the evidence of laboratory cultivation and molecular phylogenetic analysis.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 11-20.
- Kucera, M., Rosell-Melé, A., Schneider, R., Waelbroeck, C. and Weinelt, M., 2005. Multiproxy approach for the reconstruction of the glacial ocean surface (MARGO). *Quaternary Science Reviews*, 24: 813-819.
- Kucera, M., 2007. *Planktonic foraminifera as tracers of past oceanic environments. Proxies in Late Cenozoic Paleocyanography*, Elsevier, Amsterdam.
- Kurasawa, A., Tsuchiya, M., Toyofuku, T., Kitazato, H. and Nishi, H., unpublished. Genetic variability of *Globigerina bulloides* in the Eastern North Pacific subtropical region and the bipolarity of planktic foraminiferal genotypes.
- Kuroyanagi, A., Tsuchiya, M., Kawahata, H. and Kitazato, H., 2008. The occurrence of two genotypes of the planktonic foraminifer *Globigerinoides ruber* (white) and paleo-environmental implications. *Marine Micropaleontology*, 68: 236-243.
- Laetsch, D., Heitlinger, E., Taraschewski, H., Nadler, S. and Blaxter, M., 2012. The phylogenetics of *Anguillicolidae* (Nematoda: Anguillicolioidea), swimbladder parasites of eels. *BioMed Central Evolutionary Biology*, 12: 60.
- Lee, J. J. and Anderson, O. R., 1991. *Biology of Foraminifera*. Academic Press, London.

- Lefébure, T., Douady, C.J., Gouy, M. and Gibert, J., 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 435-447.
- Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J.J. and Suchard, M.A., 2010. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 1877-1885.
- Logares, R., Rengefors, K., Kremp, A., Shalchian-Tabrizi, K., Boltovskoy, A., Tengs, T., Shurtleff, A. and Klaveness, D., 2007. Phenotypically different microalgal morphospecies with identical ribosomal DNA: a case of rapid adaptive evolution? *Microbial Ecology*, 53: 549-561.
- Maddison, W.P. and Knowles, L.L., 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, 55: 21-30.
- Miralles, M. and Vence, A., 2013. New metrics for comparison of taxonomies reveal striking discrepancies among species delimitation methods in *Madascincus* lizards. *Public Library of Science One*, 8: e68242.
- Morard, R., Quillévéré, F., Escarguel, G., Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T. Norris, R.D. and de Vargas, C., 2009. Morphological recognition of cryptic species in the planktonic foraminifer *Orbulina universa*. *Marine Micropaleontology*, 71: 148-165.
- Morard, R., Quillévéré, F., Douady, C.J., de Vargas, C., de Garidel-Thoron, T. and Escarguel, G., 2011. Worldwide Genotyping in the Planktonic Foraminifer *Globoconella inflata*: Implications for Life History and Paleoceanography. *Public Library of Science One*, 6: e26665.
- Morard, R., Quillevere, F., Escarguel, G., de Garidel-Thoron, T., de Vargas, C. and Kucera, M., 2013. Ecological modeling of the temperature dependence of cryptic species of planktonic foraminifera in the Southern Hemisphere. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.palaeo.2013.05.011>
- Norris, R.D., 2000. Pelagic species diversity, biogeography and evolution. *Paleobiology*, 26: 236-258.
- Pace, N.R., Olsen, G.J. and Woese, C.R., 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*, 45: 325-326.
- Paradis, E., Claude, J. and Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20: 289-290.
- Parker, F.L., 1962. Planktonic foraminiferal species in Pacific sediments. *Micropaleontology*, 8: 219-254.
- Pawlowski, J., Bolivar, I., Fahrni, J., de Vargas, C., Gouy, M. and Zaninetti, L., 1997. Extreme differences in rates of molecular evolution of foraminifera revealed by comparison of ribosomal DNA sequences and the fossil record. *Molecular Biology and Evolution*, 14:498-505.
- Pawlowski, J., 2000. Introduction to the molecular systematics of foraminifera. *Micropaleontology*, 46: 1-12.

- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D. and Vogler, A.P., 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55: 595-609.
- Posada, D. and Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. and Achaz, G., 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21: 1864-1877.
- Puillandre, N., Modica, M.V., Zhang, Y., Sirovich, L., Boisselier, M.-C., Cruaud, C., Holford, M. and Samadi, S., 2012. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology*, 21: 2671-2691.
- Quillévéré, F., Morard, R., Escarguel, G., Douady, C.J., Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T. and de Vargas, C., in press. Global scale same-specimen morpho-genetic analysis of *Truncorotalia truncatulinoides*: A perspective on the morphological species concept in planktonic foraminifera. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*.
- R Development Core Team, 2004. R: a language and environment for statistical computing.
- Stewart, I.A., Darling, K.F., Kroon, D., Wade, C.M. and Troelstra, S.R., 2001. Genotypic variability in subarctic Atlantic planktic foraminifera. *Marine Micropaleontology*, 43: 143-153.
- Ujiie, Y. and Lipps, J.H., 2009. Cryptic diversity in planktic foraminifera in the northwest Pacific Ocean. *Journal of Foraminiferal Research*, 39: 145-154.
- Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T., Watanabe, S., Wiebe, P. and de Vargas, C., 2010. Coiling dimorphism within a genetic type of the planktonic foraminifer *Globorotalia truncatulinoides*. *Marine Micropaleontology*, 77: 145-153.
- Weiner, A., Aurahs, R., Kurasawa, A., Kitazato, H. and Kucera, M., 2012. Vertical niche partitioning between cryptic sibling species of a cosmopolitan marine planktonic protist. *Molecular Ecology*, 21: 4063-4073.

Chapitre 2 : apport des séquences complètes de la SSU chez une morpho-espèce dont la délimitation des types génétiques est problématique

Ce deuxième chapitre est une ébauche concernant la phylogénie des types génétiques de *Neogloboquadrina pachyderma* et l'intérêt des séquences complètes de la SSU (petite sous-unité ribosomale) chez une morpho-espèce dont la délimitation des types génétiques à partir de séquences partielles reste problématique (chapitre 1). Diverses méthodes de reconstruction phylogénétique ont été testées sur le jeu de données correspondant à la fin de la SSU, ce qui a permis de mettre en évidence la grande sensibilité des reconstructions aux conditions analytiques (méthode d'alignement et modèle de reconstruction phylogénétique) chez *N. pachyderma*. Les premières séquences complètes de la SSU des Types II, III et IV de *N. pachyderma* et du Type I de *Neogloboquadrina incompta* (hémisphère sud) ont été obtenues ; elles s'ajoutent à la séquence du Type I de *N. pachyderma* et à celle du Type I de *N. incompta* (hémisphère nord) disponibles dans la littérature. L'utilisation de séquences complètes semble prometteuse pour résoudre la question des relations phylogénétiques au sein de *N. pachyderma*, notamment parce que la région correspondant au début de la SSU est plus variable que la fin. Déjà, les données acquises montrent qu'il est très probable que le premier embranchement chez *N. pachyderma* corresponde au Type IV et non pas au Type I comme précédemment publié, ce qui modifie alors le scénario évolutif au sein de cette morpho-espèce. Cette étude nécessite néanmoins d'être encore approfondie, notamment par l'obtention d'un plus grand nombre de séquences et le séquençage d'individus clonés afin d'estimer la variabilité intra-génomique chez *N. pachyderma*.

Mots-clefs : *Neogloboquadrina pachyderma*, *Neogloboquadrina incompta*, séquences complètes SSU, diversité cryptique, phylogénie

Fiches-méthodes : IV, V, VIII

Ont participé à ce chapitre : Aurore ANDRE (analyses, interprétation, rédaction), Frédéric QUILLEVERE (rédaction)

Des séquences complètes de la SSU peuvent-elles résoudre la question des relations phylogénétiques entre les types génétiques de *Neogloboquadrina pachyderma* (Ehrenberg) ?

Résumé

La définition des unités taxonomiques chez les foraminifères planctoniques ainsi que leurs relations phylogénétiques sont établies à partir de séquences de la fin de la petite sous-unité ribosomale (SSU). Les données actuellement disponibles pour la morpho-espèce *Neogloboquadrina pachyderma* ne permettent cependant pas de conclure quant au statut taxonomique de ses sept types génétiques et quant à leurs relations phylogénétiques. La comparaison des arbres obtenus selon diverses méthodes montre que deux scénarios évolutifs sont possibles, tous deux contredisant celui préalablement publié. Ces deux scénarios considèrent que le premier embranchement chez *N. pachyderma* correspond à l'adaptation du Type IV aux conditions polaires extrêmes de l'océan austral. La rupture du flux génétique entre les deux hémisphères est plus tardive et pourrait être liée à la mise en place des cycles glaciaire-interglaciaires de 100ka, il y a environ 1 Ma. Les relations au sein du clade formé par les *N. pachyderma* subantarctiques (Types II, III, V et VI) ne sont pas résolues, ce qui pourrait suggérer que ces types génétiques ne correspondent pas tous à des espèces cryptiques distinctes. L'étude des séquences complètes de la SSU chez les Types I, II, III et IV de *N. pachyderma* et chez *N. incompta* montre que la variabilité génétique est répartie de façon non homogène le long de la SSU et en particulier que le début de la SSU est plus variable que la fin. Les reconstructions obtenues à partir de ces séquences favorisent l'hypothèse du Type IV comme branche basale. La comparaison des séquences complètes semble montrer que Types II et III peuvent être deux espèces distinctes et qu'il existe des différences génétiques entre les Types I de *N. incompta* des hémisphères nord et sud. Le séquençage complet de la SSU, bien que techniquement difficile, est donc prometteur à la fois pour la résolution des relations phylogénétiques et pour la délimitation des unités taxonomiques chez *N. pachyderma*.

Mots-clef : phylogénie, SSU complète, diversité cryptique, *Neogloboquadrina pachyderma*

Abstract

Planktonic foraminiferal species delimitation and phylogeny are based on partial 3' end sequences of the ribosomal small sub-unit (SSU). These data are still insufficient to reach a consensus on the delimitation of the genetic types of *Neogloboquadrina pachyderma*. The phylogeny of its seven possible genetic types also remains unsolved. Two different tree topologies are possible according to comparisons of phylogenetic trees obtained through various reconstruction methods. Both these topologies are in conflict with the published Neogloboquadrinid tree. The ensuing new evolutionary history hypotheses suggest that the austral Type IV of *N. pachyderma* diverged first when it acquired its extreme polar affinities. The transequatorial gene flow stopped later, possibly as a consequence of the 100 kyr glacial cycles onset that occurred about 1 myrs ago. Phylogenetic relationships between the genetic types among the sub-Antarctic clade (Types II, III, V, VI) are unclear, suggesting that some of these types may correspond to intra-specific variants. Complete SSU sequences of the Types I, II, III and IV of *N. pachyderma* and the Type I of *N. incompta* show that variable regions are concentrated on the 5' end of the SSU whereas the 3' end corresponds to more conserved regions. Reconstructions based on complete sequences support the Type IV as the earliest diverging genetic type. Comparisons of complete sequences of the SSU suggest that the Types II and III may indeed correspond to distinct species. Likewise, genetic divergence between southern and northern hemisphere Types I of *N. incompta* is for the first time evidenced. Although complete sequencing of planktonic foraminiferal SSU is technically difficult and time consuming, it is a challenging opportunity to resolve delimitations and phylogeny within *N. pachyderma*.

Keywords: phylogeny, complete SSU, cryptic diversity, *Neogloboquadrina pachyderma*

1. Introduction

De nombreuses études ont montré que les morpho-espèces de foraminifères planctoniques regroupent jusqu'à sept unités taxonomiques (André et al., en préparation A ; cette thèse, Partie I Chapitre 1), souvent appelées espèces cryptiques (par exemple, Weiner et al., 2012) ou types génétiques (par exemple, Ujiie et al., 2010), qui peuvent être prises en compte afin d'améliorer la précision des fonctions de transfert utilisées pour les reconstructions paléocéanographiques au Quaternaire (Morard et al., 2013). La définition de ces unités taxonomiques ainsi que leurs relations phylogénétiques sont établies à partir de séquences de l'extrémité 3' de la petite sous-unité ribosomale (SSU) (par exemple : Darling et Wade, 2008 ; Aurahs et al., 2009 ; André et al., en préparation A). Or, pour une utilisation optimale des foraminifères planctoniques en tant que proxy paléoclimatique, une délimitation rigoureuse de ces unités taxonomiques est un pré-requis (Kucera et Darling, 2002).

Neogloboquadrina pachyderma est une espèce-clef pour les reconstructions paléoclimatiques en hautes latitudes où elle représente jusqu'à 100 % des assemblages de foraminifères planctoniques (base de données MARGO, 2009). *Neogloboquadrina pachyderma* est aussi un marqueur biostratigraphique aux hautes latitudes; ainsi son apparition dans les sédiments de l'Atlantique nord marque le passage entre Pliocène et Pléistocène (Speigler et Janssen, 1989). L'histoire évolutive de *N. pachyderma* est fortement liée à celle des glaciations qui sont une caractéristique majeure du climat de ces derniers millions d'années (Bartoli et al., 2005 ; Becquey et al., 2003). Démêler la phylogéographie des différents types génétiques de *N. pachyderma* est donc une opportunité de mieux comprendre l'histoire climatique du Quaternaire et son impact sur l'évolution des foraminifères planctoniques.

La délimitation des unités taxonomiques au sein de la morpho-espèce *Neogloboquadrina pachyderma* pose problème. Sept types génétiques ont été initialement définis par Darling et al. (2004 ; 2007) (Fig. 12) mais André et al. (en préparation A) ont montré qu'un découpage en quatre unités taxonomiques seulement est également probable. Dans cette hypothèse, les *N. pachyderma* subantarctiques, c'est-à-dire les Types II, III, V, VI sensu Darling et al. (2004), forment une seule et même espèce. Les données biogéographiques et environnementales ne permettent pas de trancher entre ces deux délimitations. André et al. (en préparation B) ont établi que le Type II a des affinités écologiques plus restreintes que le Type III mais ces deux types génétiques présentent néanmoins des distributions biogéographiques qui se recouvrent.

De plus, aucune différence de profondeur de milieu de vie et /ou de saison de reproduction n'a encore pu être clairement mise en évidence. Darling et al. (2004) ont montré que les Types V et VI sont isolés dans l'upwelling du Benguela mais les données disponibles sur ces types génétiques sont encore très insuffisantes. Des individus d'affinités subantarctiques ont en effet pu envahir l'upwelling du Benguela lors du déplacement vers le nord de la convergence subtropicale au cours des glaciations quaternaires (Ufkes et al., 2000). La question qui se pose est donc de comprendre si le flux génétique a ensuite pu être réduit voire interrompu durant les périodes interglaciaires.

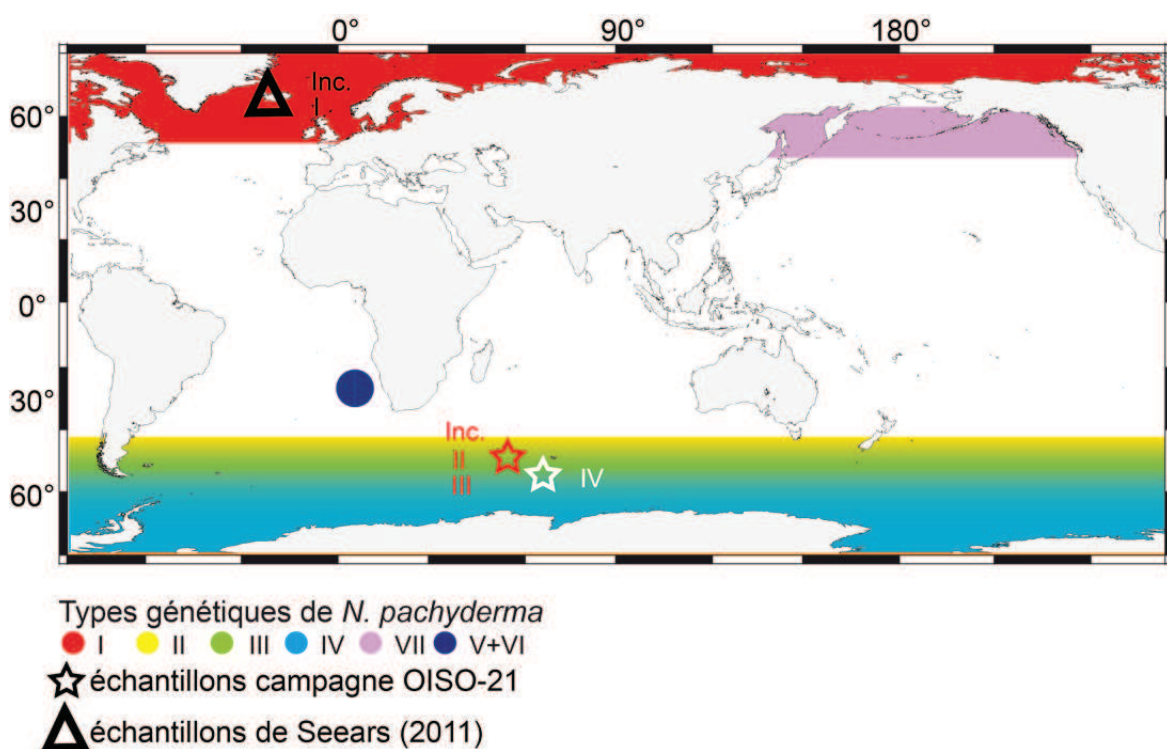


Figure 12 : distribution schématique des types génétiques de *Neogloboquadrina pachyderma* sensu Darling et al. (2007) (Darling et al., 2004 ; 2007 ; André et al., en préparation B). Localisation des échantillons utilisés pour obtenir les séquences complètes de la SSU (Inc. : *Neogloboquadrina incompta* (Type I), I : *N. pachyderma* Type I, II : *N. pachyderma* Type II, III : *N. pachyderma* Type III, IV : *N. pachyderma* Type IV).

Schweizer et al. (2008) ont montré que les phylogénies des foraminifères benthiques obtenues à partir de séquences complètes de la SSU sont plus robustes que celles basées sur les séquences de la fin de cette région ; chez les foraminifères planctoniques, Sears (2011) a montré que les séquences complètes de la SSU sont effectivement plus informatives même si elles restent insuffisantes pour la résolution des nœuds basaux entre les grands clades. Dans

cette étude, au contraire, nous allons tenter de réaliser une phylogénie à l'échelle de la morpho-espèce utilisant des séquences complètes de la SSU. De telles reconstructions impliquent des séquences peu divergentes, ce qui réduit donc la taille des régions non alignables, peu informatives, qui se sont révélées constituer un obstacle majeur pour les reconstructions phylogénétiques à plus grande échelle (Seears, 2011). Utiliser des séquences complètes de la SSU semble particulièrement intéressant dans le cas des morpho-espèces comme *N. pachyderma*, pour lesquelles la définition des unités taxonomiques pose problème (André et al., en préparation A). Cependant, les séquences complètes restent rares chez les foraminifères planctoniques. Seulement 16 séquences complètes ou sub-complètes sont disponibles sur NCBI (*Neogloboquadrina dutertrei*, *Hirsutella hirsuta* et *Globoconella inflata*, Schweizer et al., 2008) ou dans les travaux de thèse de Seears (2011) (*Globigerina bulloides*, *Globigerinoides sacculifer*, *Globigerinita glutinata*, *Neogloboquadrina dutertrei*, *Pulleniatina obliquiloculata*, *Globoconella inflata*, *Neogloboquadrina incompta* Type I, *Globigerinita uvula*, *Neogloboquadrina pachyderma* Type I, *Globorotalia unguolata*, *Menardella menardii* et *Streptochilus globigerus*).

Cette étude se propose de revenir sur les reconstructions phylogénétiques de *N. pachyderma* basées sur la fin de la SSU afin de mettre clairement en évidence les embranchements résolus mais aussi ceux qui ne le sont pas. La première tentative de délimitation objective des types génétiques de *N. pachyderma* (André et al., en préparation A) a suggéré que la topologie de l'arbre, et donc le scénario évolutif proposé par Darling et al. (2007) pourraient être remis en cause. Cette étude présente donc de nouvelles hypothèses phylogéographiques retraçant l'histoire des types génétiques de *N. pachyderma*. Au vu de l'insuffisance de ces données à la fois pour résoudre les questions de phylogénie et de délimitation des unités taxonomiques, des séquences complètes de la SSU des Types II, III et IV de *N. pachyderma* et du Type I de *N. incompta* ont été obtenues pour la première fois. Les séquences sub-complètes du Type I de *N. pachyderma* et du Type I de *N. incompta* obtenues par Seears (2001) viennent compléter ce jeu de données. L'identification des régions conservées et variables à plusieurs échelles permet de mieux estimer la divergence entre les différents types génétiques. Une première tentative de phylogénie permet de tester la robustesse des différents scénarios évolutifs proposés.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Reconstructions phylogénétiques à partir des séquences de la fin de la SSU

Les séquences publiées correspondant à la fin de la SSU de *Neogloboquadrina pachyderma* (n=17), *Neogloboquadrina incompta* (n=13), *Neogloboquadrina dutertrei* (n=10), une séquence de *Globoconella inflata* (NCBI Z83971, de Vargas et al., 1997) et une de *Pulleniatina obliquiloculata* (NCBI AY241709, Darling et al., 2003) ont été compilées à partir de NCBI (14 Juin 2013). Les séquences de *N. pachyderma* de génotype non identifié provenant du Pacifique Nord ont été attribuées au Type VII comme le suggèrent André et al. (en préparation A) et Darling et al. (2007).

Plusieurs méthodes d'alignement de séquences et de reconstruction phylogénétique associés à différents groupes externes ont été employées afin d'estimer la sensibilité des reconstructions phylogénétiques aux conditions analytiques chez *N. pachyderma*. Pour s'affranchir de la subjectivité et de la non-reproductibilité d'un alignement manuel, les séquences ont été alignées automatiquement grâce aux programmes MUSCLE v.3.7 (Edgar, 2004) et MAFFT v.7. (Kato et Toh, 2008). Les régions dont l'alignement est ambigu ont été retirées grâce à GBlocks 0.91b (Castresana, 2000). Cependant, comme la taille des fragments obtenus est alors très réduite (279 à 404 pb), des analyses ont aussi été réalisées sur les alignements bruts. Trois groupes externes ont été testés : *N. dutertrei* seul, *N. dutertrei* et *N. incompta* ; *N. dutertrei*, *P. obliquiloculata* et *G. inflata*. Ce dernier cas correspond à celui utilisé dans la seule phylogénie complète des types génétiques de *N. pachyderma* publiée (Darling et al., 2007). Les arbres phylogénétiques ont été générés grâce aux différentes méthodes implémentées dans SEAVIEW v.4.1. (Gouy et al., 2009) : maximum de vraisemblance (PhyML, Guignon et Gascuel, 2003), Neighbour-Joining (Saitou et Nei, 1987 ; Studier et Keppler, 1988) et une variante du Neighbour-Joining, BIONJ (Gascuel, 1997). Dans le cas des arbres générés par PHYML, les modèles de substitution nucléotidique les plus appropriés selon l'Akaike Information Criterion (AIC, Akaike, 1974) ont été choisis grâce au logiciel MODELTEST 0.1.1. (Posada et Crandall, 1998). La robustesse des nœuds a été estimée à l'aide de 1000 « bootstraps ». Ces arbres ont été enracinés manuellement grâce aux groupes externes. Les différentes topologies obtenues ont été reportées, la longueur des branches n'est pas prise en compte dans cette étude.

2.2. Obtention de séquences complètes de la SSU

Trois *N. pachyderma* correspondant aux Types II, III et IV (Darling et al. 2004) et une *N. incompta* de Type I (Darling et al., 2006) ont été sélectionnées parmi les individus récoltés dans le sud de l'Océan Indien lors de la campagne OISO-21, à la fin de l'été austral de l'année 2012 (Fig. 12 ; André et al., en préparation B). Les Types II et III de *N. pachyderma* ainsi que le Type I de *N. incompta* proviennent de la station 7 (47,5°S, 57.5°E) et le spécimen de Type IV de *N. pachyderma* a été récolté sur la station 11 (56°S, 63°E). Leur ADN a été préalablement extrait et la fin de la SSU séquencée afin d'identifier leur type génétique selon la méthode décrite par André et al. (en préparation B). Ces *N. pachyderma* et *N. incompta* ont été choisis pour leur rendement d'amplification par PCR particulièrement bon au vu de l'épaisseur des bandes visualisées par électrophorèse après amplification de l'ADN.

Afin d'établir les séquences complètes de la SSU, un ensemble de fragments courts et longs ont été amplifiés (Tables 8 et 9 Fig. 13) grâce à de nouvelles amorces venant compléter celles disponibles dans la littérature (Table 8). L'amplification par PCR suit la procédure décrite par André et al. (en préparation B) avec, pour les fragments longs (>1000 pb) un temps de polymérisation augmenté (3 min au lieu de 30s). Les tentatives de clonage ayant échoué, les séquences ont été obtenues par séquençage direct selon la méthode de Sanger (Smith et al., 1986) par Biofidal (Vaulx-en-Velin, France) à l'aide d'un séquenceur ABI prism 3730XL (Applied Biosystems). Seules ont été conservées les régions dont le chromatogramme était non ambigu, ce qui a nécessité l'amplification de multiples fragments partiellement redondants (Fig. 13). Les fragments courts ont été séquencés dans les deux sens avec les amorces utilisées pour l'amplification alors que les fragments longs ont été séquencés en plusieurs parties à l'aide d'amorces internes, car la réaction de séquençage est peu efficace au-delà de 500 à 1000 pb selon les individus. Les fragments ont ensuite été alignés manuellement grâce au logiciel SEAVIEW (Gouy et al., 2009) puis concaténés afin d'obtenir la séquence complète. La redondance des fragments a facilité cette étape.

numéro	amorce	type	cible	séquence (5'-3')	références
1	Sa10	F	F	CTTAAAGATTAAGCCATGCAAGTGG	Schweizer et al., 2008
2	Sa30f	F	F	GAAGAGTAGTTTCTGATCC	nouveau
3	Sa60r	R	F	CTGTCATTGGGCAATTTACG	nouveau
4	GAP1f	F	F	TCTGAATTTCAAGTGGAGG	nouveau
5	S6F	F	F	CCGCGGTAATAACCAGCTC	Schweizer et al., 2008
6	S13	R	F	GCAACAATGATTGTATAGGC	Pawlowski et al., 1996
7	S13f	F	F	GCCTATAACAATCATTGTTGC	nouveau
8	MS1f	F	F	TGTTGCGGTTAAGAGGCTCG	nouveau
9	GAP5r	R	F	CATGATAAGACATACAATGC	nouveau
10	GAP3f	F	F	ATTGTATGTCTTATCATGGG	nouveau
11	MD1r	R	F	CAATGCATTTCCACCGCTC	nouveau
12	MS4r	R	F	GACGAGGGTATCTGATCC	nouveau
13	GAP4r	R	F	GTAACAAATGGGACGACGAGG	nouveau
14	MS3r	R	F	AAGCTCCGAAAATCAAGTGC	nouveau
15*	NS4	R	U	CTTCCGTC AATTCCTTAAAG	White et al., 1990
16	S14p	F	F	AAGGGCACCAACAAGAGCG	Ujiié et Lipps, 2009
17	NP1fB	F	F	CCGGACACACTGAGGATTGACAGGCAATATC	André et al., in prep.
18	S15rf	F	F	GTGCATGGCCGTTCTTAGTTC	Morard et al., 2011
19	NP5r	R	N	CTGTTGGGCTCTGAAAGCAACGAACGTG	André et al., in prep.
20	S19f	R	F	CCCGTACTAGGCATTCCTAG	Morard et al., 2011
21	SBf	R	F	TGATCCATCAGCAGGTTACCTAC	Ujiié et Lipps, 2009

Table 8 : amorces utilisées pour l'amplification des séquences complètes de la SSU. Le numéro correspond à la position sur la figure 13, le primer * ne peut être utilisé que pour le séquençage. Type : F= sens, R= anti-sens. Spécificité du primer (cible) : F= foraminifères, U= universel, N= *Neogloboquadrina*.

Sens	Antisens
Sa10 (1)	Sa60r(3)
Sa30f(2)	S13(6)
GAP1f(4)	GAP5r(9)
S6F(5)	NP5r(19), S19f(20)
S13f(7)	MD1r(11) , MS4r(12)
MS1f(8)	MS3r(14)
GAP3f(10)	GAP4r(13)
S14p(16)	SBf(21)
NP1fB(17)	NP5r(19), SBf(21)
S15rf(18)	S19f(20)

Table 9 : couples d'amorces utilisées pour l'amplification. Les numéros font référence à la table 8 et figure 13 pour la localisation.

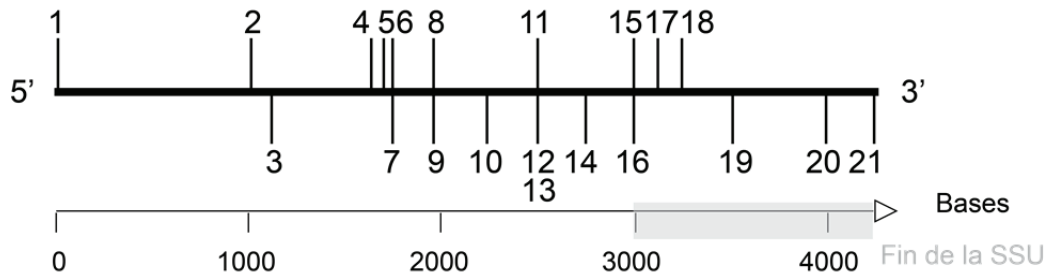


Figure 13 : localisation des amorces (Tables 8 et 9) sur la SSU complète. La région grisée correspond à la fin de la SSU, c'est-à-dire la région utilisée pour les reconstructions phylogénétiques chez les foraminifères planctoniques.

2.3. Analyses phylogénétiques à partir des séquences complètes de la SSU

Les séquences complètes de la SSU de *N. pachyderma* et *N. incompta* ont été alignées automatiquement grâce à MUSCLE (Edgar, 2004) avec les séquences complètes de *N. dutertrei* (NCBI : EU199449) et *Hirsutella hirsuta* (NCBI : EU199448) obtenues par Schweizer et al. (2008) et les séquences sub-complètes des Types I de *N. pachyderma* *N. incompta* en provenance de l'Atlantique nord (Seears, 2011). Les zones correspondant à des régions conservées chez les eucaryotes ont été identifiées par comparaison avec une séquence de *Pelagodinium beii* (Dinophyceae, NCBI U374006, Gast et Caron, 1996). Des arbres phylogénétiques incluant les Types I, II, III, et IV de *N. pachyderma* ont été générés selon la même méthode que celle employée pour le jeu de données de la fin de la SSU et leur topologie reportée. Deux matrices de distances patristiques incluant les Types I, II, III et IV de *N. pachyderma*, le Type I de *N. incompta* et *N. dutertrei* ont été calculées grâce au package « ape » (Paradis et al., 2004) du logiciel R V. 2.1.4.1 (R development core team, 2004). La première matrice a été obtenue à partir de l'alignement correspondant à la fin de la SSU alors que la deuxième prend en compte les séquences complètes. La comparaison des matrices permet de déceler l'influence de la taille de la région étudiée sur les distances génétiques.

3. Résultats

3.1. Analyses phylogénétiques obtenues à partir des séquences de la fin de la SSU

Trente-six arbres phylogénétiques ont été générés. Cependant, onze d'entre eux présentent des nœuds irrésolus et trois d'entre eux ne respectent pas la monophylie des morpho-espèces. Au final, vingt-deux arbres peuvent donc être considérés comme plausibles (Table 10). Ces 22 arbres présentent 10 topologies différentes mais aucune d'entre elles ne correspond à celle proposée par Darling et al. (2007) (Fig. 14). Les reconstructions phylogénétiques chez *Neogloboquadrina pachyderma* sont très sensibles aux méthodes employées et aucune topologie ne fait consensus. Ainsi, modifier la méthode d'alignement des séquences modifie la topologie de l'arbre dans 50 % des cas ; de même, retirer les régions difficilement alignables entraîne l'obtention d'une nouvelle topologie ; enfin, pour un même alignement, il n'y a concordance entre les trois méthodes de reconstruction que dans un cas sur cinq (Table 10). L'utilisation de Gblocks (Castresana, 2000) pour s'affranchir du bruit découlant de la présence de régions difficilement alignables s'est révélée peu fructueuse : 13 des 14 arbres non résolus ont été obtenus à partir de tels alignements (Table 10). Ce phénomène n'est pas inattendu car les alignements obtenus sont très courts (279 à 404 pb), ce qui réduit drastiquement le signal phylogénétique. Néanmoins, tous les arbres générés proposent le Type IV comme branche basale et considèrent que les Types subantarctiques, en incluant les types récoltés dans l'upwelling du Benguela (Types II, III, V et VI sensu Darling et al., 2007) forment un clade. Ces embranchements sont bien soutenus : en moyenne 84 % pour l'embranchement du Type IV et 89% pour le clade subantarctique.

espèces	alignement	Gblock	PHYML	NJ	BioNJ
Np+Nd	muscle	x	ns	ns	ns
		–	A	A	A
	mafft	x	ns	ns	B
		–	E	A	A
Np+Nd+Ni	muscle	x	inc	inc	inc
		–	A	C	C
	mafft	x	ns	G	J
		–	H	A	I
Np+Nd+Po+Gi	muscle	x	ns	ns	ns
		–	F	D	D
	mafft	x	ns	B	B
		–	ns	A	A

Table 10 : topologies obtenues pour différents modes de reconstruction phylogénétique des types génétiques de *Neogloboquadrina pachyderma*. Les lettres réfèrent aux arbres de la figure 14. Espèces : espèces utilisées pour l'alignement ; Np + Nd : *N. pachyderma* et *Neogloboquadrina dutertrei* ; Np+Nd+Ni : *N. pachyderma*, *N. dutertrei*, *Neogloboquadrina incompta* ; Np+Nd+Po+Gi : *N. pachyderma*, *N. dutertrei*, *Pulleniatina obliquiloculata*, *Globoconella inflata*. Ns : arbres présentant des nœuds non résolus, inc : arbres dont la topologie ne respecte pas la monophylie des morpho-espèces.

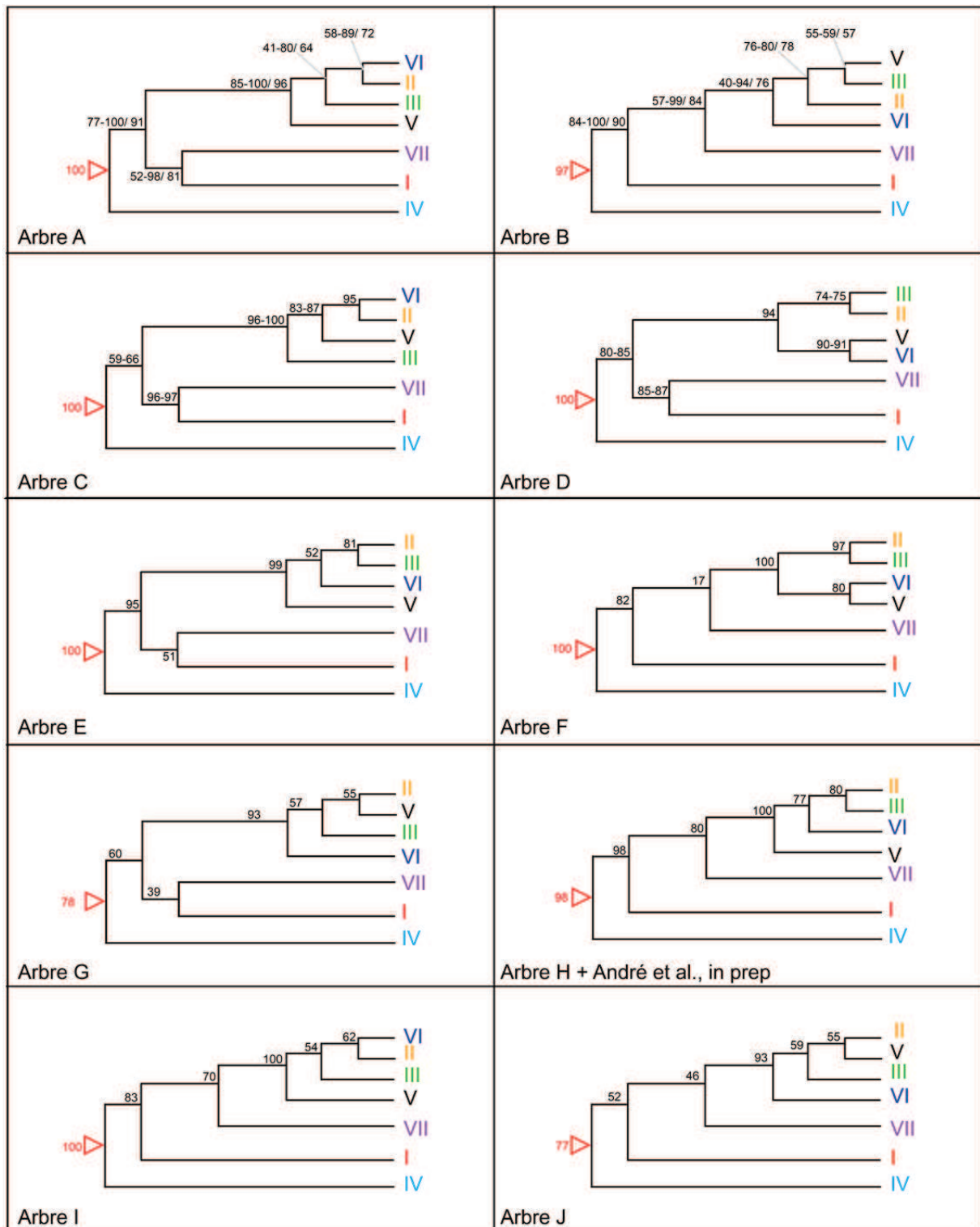


Figure 14A : topologies obtenues pour différents modes de reconstruction phylogénétique des Types I à VII de *Neogloboquadrina pachyderma* (Table 11). Les longueurs de branches ne sont pas prises en compte. Les arbres sont enracinés grâce aux groupes externes (triangle rouge). La robustesse des nœuds (en %) est reportée : valeurs minimale, maximale et moyenne si plus la topologie a été retrouvée pour plus de 2 arbres, toutes les valeurs sinon. L'arbre H correspond aussi à celui obtenu par André et al. (en préparation A) à partir d'une méthode de reconstruction bayésienne.

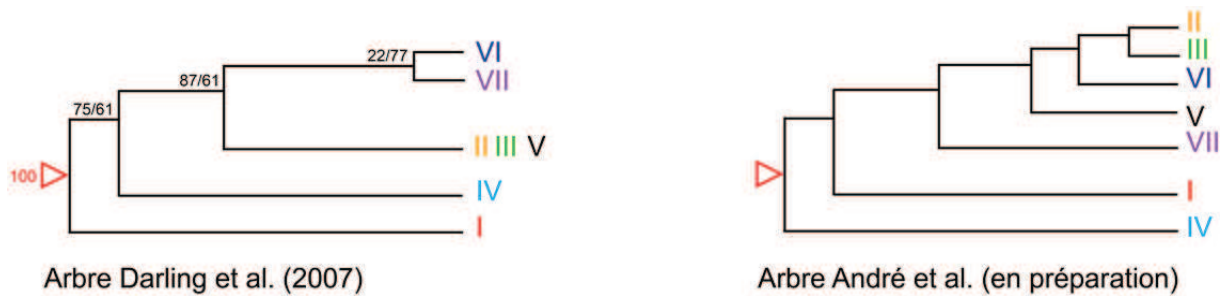


Figure 14B : arbres phylogénétiques des Types I à VII de *Neogloboquadrina pachyderma* obtenus par Darling et al. (2007) et André et al. (en préparation A).

3.2. Analyse des séquences complètes

L'alignement avec les séquences déjà publiées permet de conclure que les séquences obtenues pour *Neogloboquadrina incompta* (3339 pb) et pour le Type IV de *N. pachyderma* (3456 pb) correspondent à la SSU complète de ces organismes. Les séquences du Type II (3816 pb) et du Type III (3798 pb) de *N. pachyderma* sont sub-complètes : il ne manque que quelques bases en début de séquence et au niveau des nucléotides 1507 (Type II) et 1488 (Type III) (voir supplément). Néanmoins, cette dernière région correspond à la fin de la région conservée C3 des eucaryotes (Ertan et al., 2004) et ne présente pratiquement aucune variation à l'échelle des foraminifères planctoniques ce qui permet d'inférer la séquence présente chez les Types II et III.

Les régions conservées et variables de la SSU ne sont pas réparties de façon homogène : la fin de la SSU (1000 dernières bases) inclut moins de variabilité que les régions situées en amont (Fig. 15). La fin de la SSU se compose de courtes (jusqu'à ~125 pb) boucles variables situées entre des régions conservées légèrement plus longues (jusqu'à ~200 pb). Au contraire, le début de la SSU inclut de longues boucles variables de tailles supérieures (jusqu'à ~250 pb) à celles des régions conservées (jusqu'à ~ 200 pb).

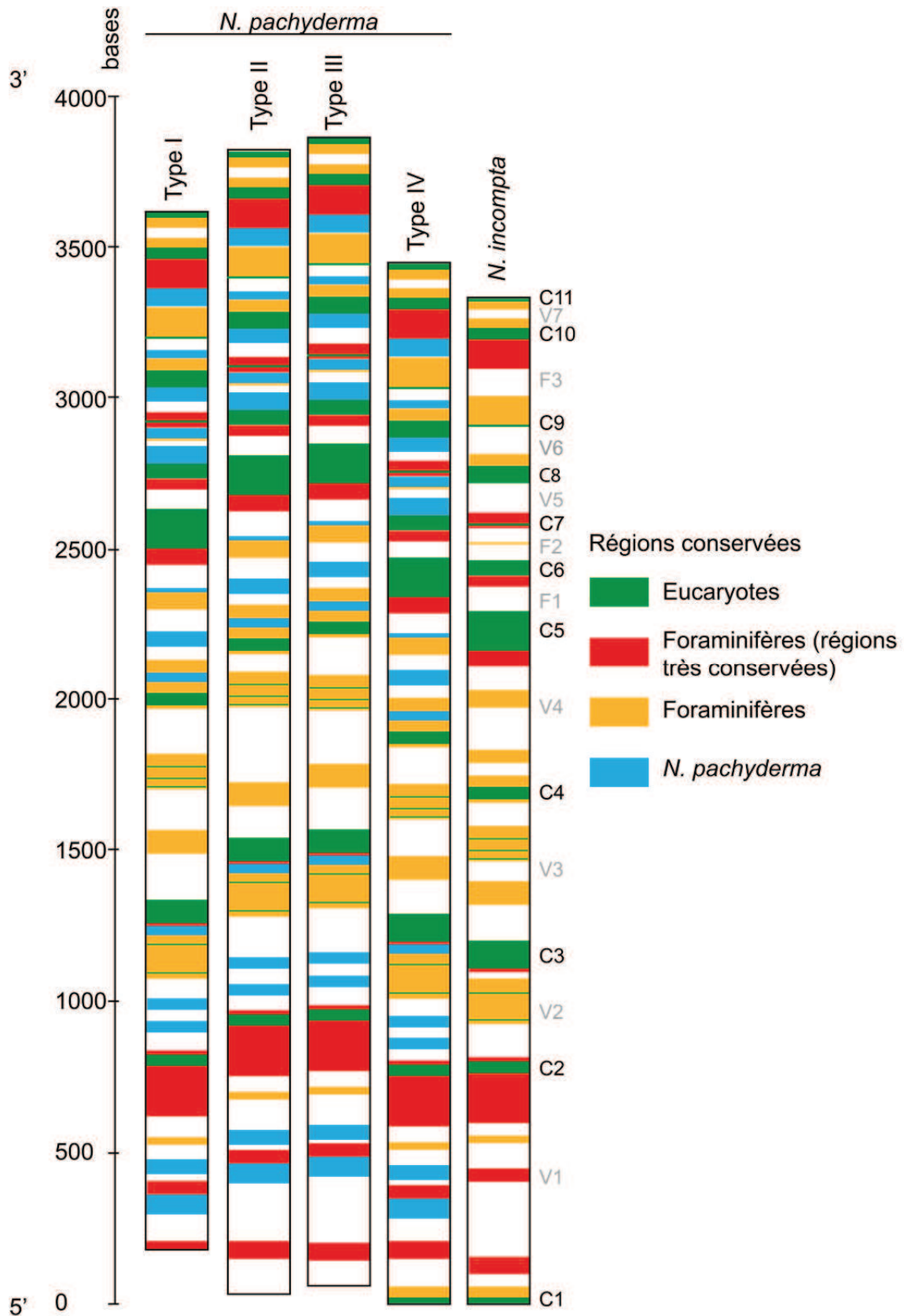


Figure 15: schéma de la SSU complète de *Neogloboquadrina pachyderma* et *Neogloboquadrina incompta*. C1 à 9 : régions conservées chez les eucaryotes, V1 à 7 : régions variables, F1 à 3 : régions variables de la fin de la SSU spécifiques des foraminifères (nomenclature d'après Ertan et al., 2004).

La comparaison des séquences complètes des Types II et III de *N. pachyderma* montre que les différences entre ces deux types génétiques consistent en de nombreuses substitutions isolées ainsi qu'en quelques courtes régions variables (Fig. 16). L'essentiel de cette variabilité est concentrée sur le début de la SSU, et était donc inconnue jusqu'à présent. En particulier, on remarque une région variable d'une centaine de nucléotides en début de SSU. Cette région ne correspondant pas à un insert, elle est vraisemblablement issue de multiples événements de mutation, délétion et insertions.

La comparaison des séquences du Type I de *N. incompta* de l'océan austral et de l'Atlantique nord (Sears, 2011) montre que l'essentiel de la variabilité se concentre dans la première moitié de la SSU alors que ces séquences sont identiques, à une substitution près, sur les 1000 dernières bases (Fig. 16). Ces deux séquences diffèrent par quelques substitutions, par le nombre de répétitions au niveau de deux régions répétées et par un insert de 93 pb. Les chromatogrammes obtenus par séquençage direct de l'individu de l'hémisphère sud ne présentent aucun pic ambigu ou multiple au niveau de ces régions variables ; il est donc peu probable que la divergence observée entre les séquences de *N. incompta* de l'hémisphère nord et sud soit le reflet de la diversité intra-génomique.

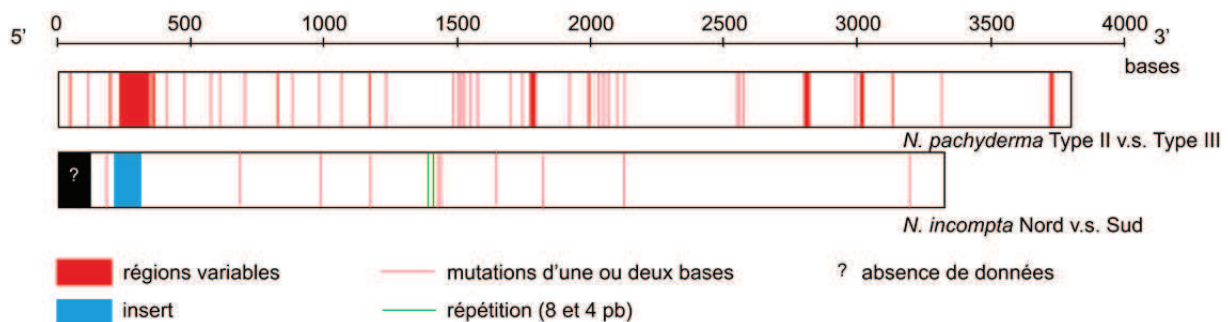


Figure 16 : schéma comparatif des SSU complètes de *Neogloboquadrina pachyderma* Types II et III et *Neogloboquadrina incompta* Type I des hémisphères Nord (Sears, 2011) et Sud.

Les distances génétiques augmentent lorsque l'intégralité de la SSU est prise en compte (Table 11). Cette augmentation n'est cependant pas homogène entre les branches : elle concerne principalement les distances entre les types génétiques de *N. pachyderma*, à l'exception de la distance entre Types II et III.

	Type 4	Type 1	Type 2	Type 3	<i>N. incompta</i>	<i>N. dutertrei</i>
Type 4	n.a.	8,2	7,7	8,2	31,4	13,4
Type 1	18,0	0,9	6,7	7,2	34,2	16,2
Type 2	20,8	16,1	na	2,2	33,7	15,7
Type 3	20,0	15,4	3,3	0,8	34,2	16,2
<i>N. incompta</i>	60,4	64,2	67,0	66,2	0,46/0,12	26,7
<i>N. dutertrei</i>	26,0	29,7	32,5	31,8	58,2	1,4

	Type 4	Type 1	Type 2	Type 3	<i>N. incompta</i>	<i>N. dutertrei</i>
Type 4						
Type 1	119%					
Type 2	170%	140%				
Type 3	144%	114%	50%			
<i>N. incompta</i>	92%				278%	
<i>N. dutertrei</i>	94%				118%	

Table 11 :

A : distances patristiques moyennes entre les Types I, II, III de *Neogloboquadrina pachyderma*, IV, le Type I de *Neogloboquadrina incompta* et *Neogloboquadrina dutertrei*. Les distances intra-spécifiques sont également reportées, n.a. = absence de données. En gris ou en italique : distances calculées à partir des séquences complètes de la SSU, en blanc : distances calculées à partir de séquences de la fin de la SSU.

B : variation entre les distances patristiques calculées à partir des séquences complètes et partielles (fin) de la SSU. Les valeurs positives montrent un accroissement des distances pour les séquences complètes.

Trente-six arbres phylogénétiques ont été obtenus à partir des alignements des séquences complètes (Table 12). Trente-trois d'entre eux présentent des nœuds soutenus au moins à 80% au niveau de la morpho-espèce *N. pachyderma*. Ces 33 arbres correspondent tous à la même topologie (Fig. 17). Deux méthodes de reconstruction proposent une topologie alternative (Fig. 17), similaire à celle publiée par Darling et al. (2004), mais la robustesse du nœud basal est clairement insuffisante et largement inférieure à celles obtenues pour toutes les autres reconstructions.



Figure 17 : topologies obtenues pour différents modes de reconstruction phylogénétique entre les séquences complètes des types génétiques de *Neogloboquadrina pachyderma* (Table 12). Les longueurs de branches ne sont pas prises en compte. Les arbres sont enracinés grâce aux outgroups (triangle rouge). La robustesse moyenne des nœuds (en %) est reportée.

espèces	alignement	Gblock	PHYML	NJ	BioNJ
Np+Nd	muscle	x	I/84	I/94	I/96
		–	I/80	I/91	I/89
	mafft	x	I/93	I/99	I/99
		–	I/99	I/99	I/99
Np+Nd+Ni	muscle	x	I/53	II/54	II/68
		–	I/99	I/100	I/96
	mafft	x	I/100	I/100	I/99
		–	I/100	I/100	I/100
Np+Nd+Po+Gi	muscle	x	I/97	I/92	I/91
		–	I/99	I/88	I/86
	mafft	x	I/95	I/96	I/94
		–	I/97	I/98	I/97

Table 12 : topologies obtenues pour différents modes de reconstruction phylogénétique entre les types génétiques de *Neogloboquadrina pachyderma*. I ou II se réfèrent aux arbres de la figure 17, le nombre suivant représente la robustesse du nœud (en %) entre le Type IV et le clade sub-antarctique. Espèces : groupes extérieurs utilisés ; Np + Nd : *N. pachyderma* et *Neogloboquadrina dutertrei* ; Np+Nd+Ni : *N. pachyderma*, *N. dutertrei*, *Neogloboquadrina incompta* ; Np+Nd+Po+Gi : *N. pachyderma*, *N. dutertrei*, *Pulleniatina obliquiloculata*, *Globoconella inflata*.

4. Discussion

4.1. Implications phylogénétiques

Lors de cette étude nous avons généré des arbres phylogénétiques à partir des séquences de la fin de la SSU en utilisant des modèles se référant au maximum de vraisemblance et au « neighbor-joining ». L'arbre obtenu par André et al. (en préparation A) grâce à une méthode bayésienne est identique à l'un d'entre eux (Fig. 14, Table 10). Pourtant, aucun de ces arbres phylogénétiques ne correspond à celui publié par Darling et al. (2007) (Fig. 14). Ceci est d'autant plus étonnant que la phylogénie de Darling et al. (2007) est basée sur ces mêmes modèles de reconstruction. Cette non-reproductibilité de l'arbre proposé par la littérature est donc vraisemblablement due à des différences au niveau des alignements : Darling et al. (2007) ont aligné les séquences manuellement alors que nous avons utilisé des logiciels d'alignement automatique; or, la comparaison des arbres obtenus selon les différentes méthodes a montré la sensibilité des reconstructions à la méthode d'alignement. Les relations phylogénétiques entre les différents types génétiques de *N. pachyderma* basées sur les séquences de la fin de la SSU sont donc très sensibles aux conditions analytiques (Fig. 14 ; Table 10) et on ne peut pas considérer cette phylogénie comme résolue de façon satisfaisante.

Les reconstructions phylogénétiques basées sur les séquences complètes présentant des nœuds suffisamment robustes (Table 12), validant le Type IV comme premier embranchement au sein de *N. pachyderma* comme le suggéraient les arbres obtenus au cours de cette étude à partir des séquences de la fin de la SSU (Fig. 14). De façon générale, on remarque que les nœuds sont plus robustes avec les séquences complètes qu'avec les séquences partielles. De plus, l'utilisation des séquences complètes augmente les distances génétiques et donc l'information disponible pour les reconstructions phylogénétiques (Table 11). Cette augmentation est hétérogène entre les différentes branches, entraînant une augmentation de la résolution phylogénétique au niveau de la morpho-espèce *N. pachyderma* tout en limitant l'attraction des longues branches pour *N. incompta*. Ces premiers résultats suggèrent donc que l'obtention de séquences complètes permettrait de résoudre les relations phylogénétiques au sein de *N. pachyderma*. Néanmoins la diversité intra-génomique au niveau de la SSU est encore pratiquement inconnue chez *N. pachyderma* et pourrait, si elle est

conséquente, générer du bruit dans le signal phylogénétique, ce qui limiterait l'intérêt des séquences longues.

4.2. Statut taxonomique des types génétiques de *N. pachyderma* et *N. incompta* à partir de séquences complètes

La région la mieux connue de l'ADN ribosomal, la fin de la SSU, est aussi celle qui présente le moins de variabilité (Fig. 15). Or, le statut taxonomique des types subantarctiques qui présentent des séquences au niveau de la fin de la SSU peu divergentes, reste ambigu (Fig. 14 et André et al., en préparation A). Il semblerait donc judicieux d'utiliser des séquences complètes de la SSU au lieu de séquences partielles afin d'inclure plus de variabilité, donc d'information, pour résoudre la question du statut taxonomique de ces types génétiques. De plus, la région utilisée correspondrait alors à l'unité complète sur laquelle jouent les processus évolutifs, permettant ainsi de mieux estimer les distances génétiques, surtout entre espèces proches.

Les séquences complètes des Types II et III de *N. pachyderma* (Fig. 16) montrent que la divergence entre ces deux types génétiques a été sous-estimée d'environ 50 % (Table 11). Néanmoins, ces données restent insuffisantes pour affirmer que les Types II et III sont bien deux espèces distinctes. La présence d'une région variable conséquente (~100 pb) en début de SSU semble en faveur de l'hypothèse de deux espèces différentes mais la divergence totale entre les deux types génétiques reste globalement faible (3.3 %). Une étude de la diversité intra-génomique et l'obtention de plus de séquences reste donc impérative pour valider le statut taxonomique de ces deux types génétiques à l'aide de méthodes quantitatives (André et al., en préparation A).

Des études précédentes (Darling et al., 2000, 2006 ; André et al., in prep A) ont montré, sur la base de séquences de la fin de la SSU, que les *N. incompta* de l'hémisphère sud et celles de l'Atlantique nord présentent des séquences largement identiques et correspondent donc à la même espèce. Cependant, les séquences complètes montrent que la diversité génétique réelle au sein de la SSU du Type I de *N. incompta* est presque 3 fois plus importante que celle estimée à partir de séquences partielles. On remarque de plus une structuration nette de cette variabilité en un insert et des répétitions (Fig. 16). Une structuration génétique Nord-Sud chez *N. incompta* est donc envisageable. Les échanges génétiques entre les deux hémisphères seraient donc plus sporadiques que ne l'envisageaient Darling et al. (2000). Néanmoins, la

distance génétique totale au sein du type génétique reste faible (1.4 %) ce qui suggère qu'il ne s'agirait pas d'espèces différentes. Ces observations nécessitent cependant d'être répliquées sur un nombre plus important d'individus afin d'établir clairement si ces différences génétiques sont systématiques et bien corrélées à la biogéographie.

4.3. Révision des scénarios phylogéographiques de *N. pachyderma*

Les relations phylogénétiques au sein de *N. pachyderma* ne sont pas totalement résolues. En particulier, il est impossible de dégager un consensus sur les relations entre les types génétiques au sein du clade formé par les *N. pachyderma* subantarctiques (Types II, III, V et VI) (Fig. 14) qui présentent des séquences très peu divergentes (Table 11). De plus, les données issues des séquences complètes et les données biogéographiques (André et al., en préparation B) sont encore largement insuffisantes pour conclure quant au statut taxonomique des Types II et III.

Si l'on se limite à l'étude des relations phylogénétiques entre les Types I, VI, VII et le clade subantarctique, les résultats obtenus se résument à seulement deux types d'arbres phylogénétiques (Fig. 18). Deux nouveaux scénarios évolutifs sont donc envisageables. Les *N. pachyderma* ancestrales, vraisemblablement d'affinité sub-polaire à polaire, présentaient une distribution bipolaire (Darling et al., 2004) mais avec un flux génétique efficace entre les deux hémisphères (Darling et al., 2000 ; Finlay, 2002). La première spéciation correspond à l'adaptation du Type IV aux conditions polaires extrêmes des eaux antarctiques à partir de ces formes ancestrales. Ce premier embranchement est différent de celui proposé par Darling et al. (2007), mais largement soutenu à la fois par les phylogénies basées sur la fin de la SSU et les séquences complètes (Fig. 14 et 17). Une première spéciation au niveau de l'Antarctique est plausible car au Pliocène (~4 Ma), des *N. pachyderma* sont déjà présentes à proximité du continent antarctique en association avec des marqueurs d'un climat polaire (Patterson et Ishman, 2012). Les occurrences plus anciennes de *N. pachyderma* restent sujettes à caution en raison de sa grande proximité morphologique avec l'espèce fossile *Neogloboquadrina acostaensis* pouvant entraîner des attributions taxonomiques erronées (Kennett et Srinivasan, 1983 ; Loubere et Moss, 1986). Plus tardivement, les échanges génétiques entre les deux hémisphères ont été rompus. D'après le registre fossile, on peut estimer la date de cet événement à ~1 Ma, date qui correspond à l'apparition de *N. pachyderma* d'affinités clairement polaires dans l'Atlantique nord (par exemple Speigler et Jansen, 1989 ; Huber et

al., 2000). Cette rupture du flux génétique coïncide avec l'intensification des périodes glaciaires liée au début de la périodicité de 100 ka des cycles glaciaires (Mudelsee et Schulz, 1997). Ces changements climatiques auraient entraîné une adaptation aux eaux polaires des *N. pachyderma* de l'hémisphère nord. Selon le scénario A (Fig. 17), cette rupture est synchrone entre océans Atlantique et Pacifique. L'étude de Kucera et Kennett (2002) basée sur des arguments morphologiques et géochimiques semblerait valider cette hypothèse : les auteurs ont conclu à l'apparition des *N. pachyderma* modernes vers 1 Ma de façon synchrone entre océans Atlantique et Pacifique. Selon le scénario B (Fig. 16), la rupture du flux génétique a d'abord eu lieu au niveau de l'océan Atlantique suite à l'adaptation aux environnements polaires du Type I. Cette hypothèse reste plausible car le début des glaciations dans l'Atlantique nord a entraîné la mise en place d'un domaine polaire (Mudelsee et Schulz, 1997). De plus, la présence du Gulf Stream et de la dérive nord Atlantique peuvent être une barrière au transit entre hémisphère nord et sud pour des espèces d'eaux froides (Darling et al., 2004). Au contraire, le flux génétique entre Pacifique nord et sud a pu se maintenir plus longtemps notamment du fait de l'absence de domaine véritablement polaire dans cette région (Lipps, 1972) et de la présence de longs upwellings côtiers pouvant servir de zone de transit pour les *N. pachyderma* (Darling et al., 2004).

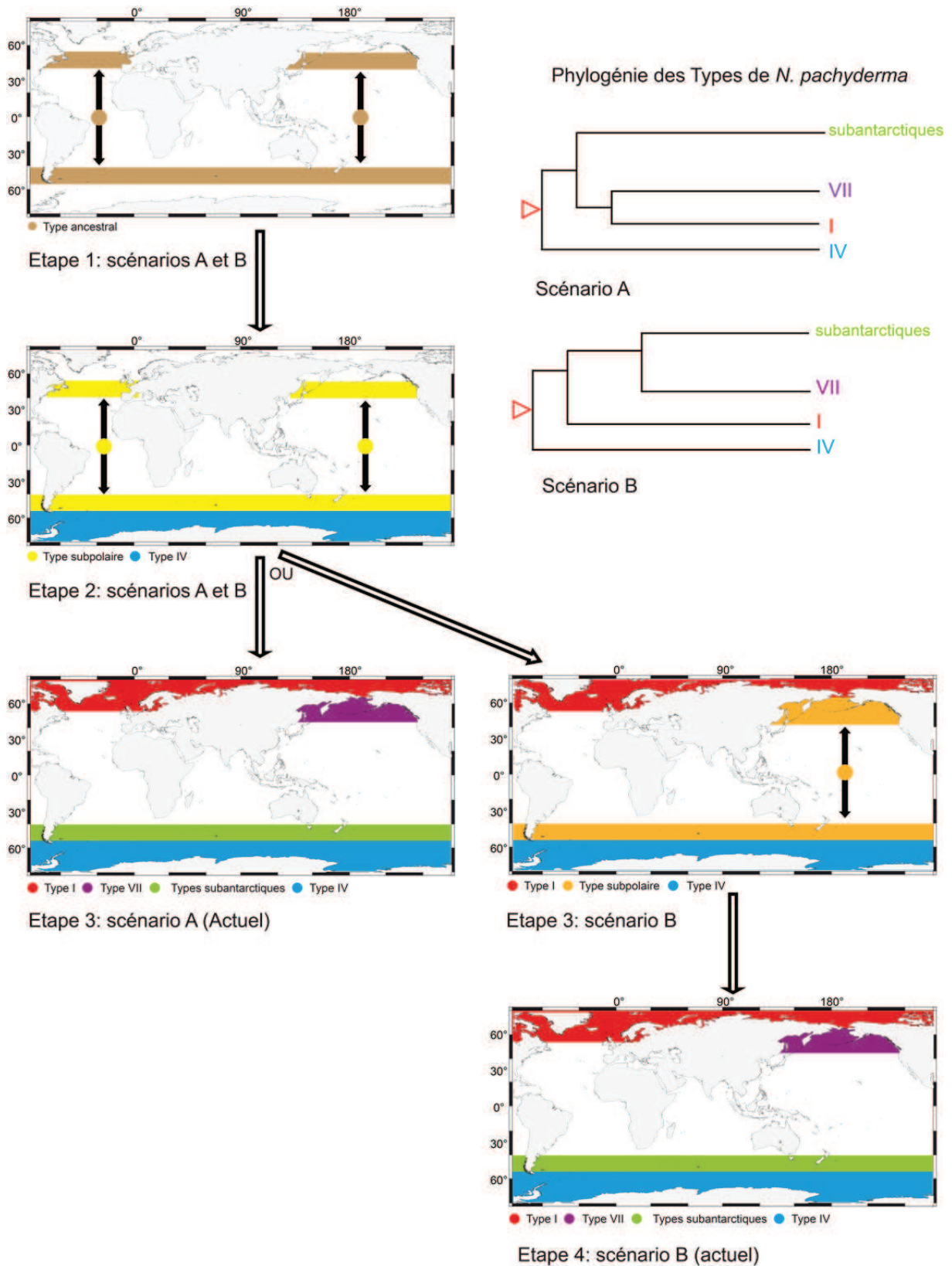


Figure 18 : scénarios évolutifs possibles d'après les reconstructions basées sur la fin de la SSU. Les doubles flèches noires matérialisent un flux génétique.

5. Conclusions

La phylogénie des types génétiques de *Neogloboquadrina pachyderma*, basée sur les 1000 dernières bases de la SSU, n'est pas suffisamment résolue ce qui limite la compréhension de l'histoire évolutive de cette morpho-espèce. Malgré une forte influence des méthodes employées sur la topologie des arbres phylogénétiques, quelques points constants ressortent comme le fait que la première spéciation soit liée à l'adaptation du Type IV aux conditions polaires extrêmes de l'Antarctique. La rupture du flux génétique entre les deux hémisphères est plus tardive et probablement concomitante à la mise en place des cycles glaciaire-interglaciaires de 100 ka. Une phylogénie plus robuste permettrait 1) de déterminer si la rupture du flux génétique a été synchrone entre les océans Pacifique et Atlantique, et 2) de déterminer le nombre d'espèces présentes au sein du clade formé par les *N. pachyderma* subantarctiques (Types II, III, V, VI).

Les premières séquences complètes de la SSU des Types I, II, III et IV de *N. pachyderma* et de *Neogloboquadrina incompta* montrent que le début de la SSU chez ces morpho-espèces comporte de longues régions variables alors que la fin de la SSU concentre de nombreuses régions conservées, ce qui pourrait expliquer la difficulté d'obtenir une reconstruction phylogénétique satisfaisante à partir de cette dernière région. L'utilisation des séquences complètes, qui incluent plus de variabilité, semble donc une solution prometteuse pour établir une phylogénie plus robuste d'autant plus que les premières séquences complètes obtenues valident la position phylogénétique du Type IV comme premier embranchement. La comparaison des séquences complètes des Types II et III suggère que ces deux types génétiques sont potentiellement deux espèces différentes et la comparaison des Types I de *N. incompta* des hémisphères nord et sud suggère une structuration nord-sud chez ce type génétique. Cette étude nécessite néanmoins d'être approfondie par l'ajout de séquences en provenance de tous les types génétiques connus de *N. pachyderma* (notamment le Type VII) et par le séquençage de clones afin d'évaluer la diversité intra-génomique. Même si l'obtention de séquences complètes reste fastidieuse notamment du fait de la grande longueur de la SSU chez les foraminifères planctoniques, l'obtention de séquences complètes devrait permettre de résoudre la question du statut taxonomique des types génétiques et de leurs relations phylogénétiques.

Remerciements

Je remercie Lara Konecny pour son assistance technique. Je remercie également Elisabeth Michel qui a récolté les échantillons lors de la campagne OISO-21, l'équipage et les équipes scientifiques du Marion-Dufresne ainsi que l'Institut Polaire Paul-Emile Victor (IPEV). Ce travail a pu être réalisé grâce au financement de l'Institut National des Sciences de l'Univers (INSU), programme INTERRVIE (F.Q.).

Supplément

Séquences complètes et alignements utilisés pour les reconstructions phylogénétiques

Références

- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. Institute of Electrical and Electronics Engineers Transactions on Automatic Control, 19: 716-723.
- André, A., Weiner, A., Quillévéré, F., Aurahs, R., Morard, R., Douady, C., de Garidel-Thoron, T., Escarguel, G., de Vargas, C. and Kucera, M., 2013. The cryptic and the apparent reversed: lack of genetic differentiation within the morphologically diverse plexus of the planktonic foraminifer *Globigerinoides sacculifer*. *Paleobiology*, 39: 21-39.
- André, A., Quillévéré, F., Morard, R., de Vargas, C., Ujiie, Y., and Douady, C., in prep. A. SSU rDNA divergence in planktonic foraminifera: molecular taxonomy and biogeographic implications.
- André, A., Quillévéré, F., Escarguel, G., Michel, E. and Douady, C., in prep. B. A case of true cryptic species within planktonic foraminifera: eco-phenotypic morphological variations of Southern Ocean *Neogloboquadrina pachyderma* genetic types.
- Aurahs, R., Göker, M., Grimm, G., Hemleben, V., Hemleben, C., Schiebel, R. and Kucera, M., 2009. Using the multiple analysis approach to reconstruct phylogenetic relationships among planktonic foraminifera from highly divergent and length-polymorphic SSU rDNA sequences. *Bioinformatics and Biology Insights*, 3: 155-177.
- Bartoli, G., Sarnthien, M., Weinelt, M., Erlenkeuser, H., Garbe-Schonberg, D. and Lea, D., 2005. Final closure of Panama and the onset of northern hemisphere glaciation. *Earth and Planetary Science letters*, 237: 33-44.
- Becquey, S. and Gersonde, R., 2003. A 0.55-Ma paleotemperature record from the subantarctic zone: implications for Antarctic Circumpolar Current development. *Paleoceanography*, 18: 1014-1028.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 540-552.
- Darling, K.F., Wade, C.M., Stewart, I.A., Kroon, D., Dingle R. and Brown, A.J., 2000. Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. *Nature*, 405: 43-47.
- Darling, K.F., Kucera, M., Wade, C.M., Langen, P.V. and Pak, D., 2003. Seasonal distribution of genetic types of planktonic foraminifer morphospecies in the Santa Barbara Channel and its paleoceanographic implications. *Paleoceanography*, 18: 1032-1042.
- Darling, K.F., Kucera, M., Pudsey, C.J. and Wade, C.M., 2004. Molecular evidence links cryptic diversification in polar planktonic protists to Quaternary climate dynamics. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 101: 7657-7662.
- Darling, K.F., Kucera, M., Kroon, D. and Wade, C.M., 2006. A resolution for the coiling direction paradox in *Neogloboquadrina pachyderma*. *Paleoceanography*, 21: 1-14.

- Darling, K.F., Kucera, M. and Wade, C.M., 2007. Global molecular phylogeography reveals persistent arctic circumpolar isolation in a marine planktonic protist. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104: 5002-5007.
- Darling, K.F. and Wade, C.M., 2008. The genetic diversity of planktic foraminifera and the global distribution of ribosomal RNA genotypes. *Marine Micropaleontology*, 67: 216-238.
- de Vargas, C., Zaninetti, L., Hilbrecht, H. and Pawlowski, J., 1997. Phylogeny and rates of molecular evolution of planktonic foraminifera: SSU rDNA sequences compared to the fossil record. *Journal of Molecular Evolution*, 45: 285-294.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797.
- Ertan, K.T., Hemleben, V. and Hemleben, C., 2004. Molecular evolution of some selected benthic foraminifera as inferred from sequences of the small subunit ribosomal DNA. *Marine Micropaleontology*, 53: 367-388.
- Finlay, B.J., 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, 296: 1061-1063.
- Gascuel, O., 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 685-695.
- Gast, R.J. and Caron, D.A., 1996. Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates from planktonic foraminifera and radiolaria. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 1192-1197.
- Gouy, M., Guindon, S.P. and Gascuel, O., 2010. SeaView Version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 221-224.
- Guindon, S. and Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52:696-704.
- Huber, R., Meggers, H., Baumann, K.-H., Raymo, M.E. and Henrich, R., 2000. Shell size variation of the planktonic foraminifer *Neogloboquadrina pachyderma sin.* in the Norwegian-Greenland Sea during the last 1.3 Myrs: implications for paleoceanographic reconstructions. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 160: 193-212.
- Katoh, K. and Toh, H., 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 276-285.
- Kennett, J.P. and Srinivasan, M.S., 1983. *Neogene Planktonic Foraminifera: a Phylogenetic Atlas*. Hutchinson Ross, Sroudsburg (Pennsylvania).
- Kucera, M. and Darling, K.F., 2002. Cryptic species of planktonic foraminifera: their effect on palaeoceanographic reconstructions. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London*, 360: 695-718.
- Kucera, M. and Kennett, J.P., 2002. Causes and consequences of a middle Pleistocene origin of the modern planktonic foraminifer *Neogloboquadrina pachyderma sinistral*. *Geology*, 30: 539-542.
- Lipps, J.H., 1972. Plankton biostratigraphy and paleoecology of the Eastern North Pacific Ocean: introduction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 12: 3-14.

- Loubere, P. and Moss, K., 1986. Pliocene climatic change and the onset of the Northern Hemisphere glaciation as recorded in the northeast Atlantic Ocean. *Geological Society of America Bulletin*, 97: 818-828.
- MARGO project members, 2009. Constraints on the magnitude and patterns of ocean cooling at the last glacial maximum. *Nature Geoscience*, 2: 127-132.
- Morard, R., Quillevère, F., Escarguel, G., de Garidel-Thoron, T., de Vargas, C. and Kucera, M., 2013. Ecological modeling of the temperature dependence of cryptic species of planktonic foraminifera in the Southern Hemisphere. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.palaeo.2013.05.011>
- Mudelsee, M. and Schulz, M., 1997. The Mid-Pleistocene climate transition: onset of 100 ka cycle lags ice volume build-up by 280 ka. *Earth and Planetary Science Letters*, 151: 117-123.
- Paradis, E., Claude, J. and Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20: 289-290.
- Patterson, M.O. and Ishman, S.E., 2012. Neogene benthic foraminiferal assemblages and paleoenvironmental record for McMurdo Sound, Antarctica. *Geosphere*, 8: 1331-1341.
- Pawlowski, J., Bolivar, I., Fahrni, J.F., Cavalier-Smith, T. and Gouy, M., 1996. Early origin of foraminifera suggested by SSU rRNA gene sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 445-450.
- Posada, D. and Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- R Development Core Team, 2004. R: a language and environment for statistical computing.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Schweizer, M., Pawlowski, J., Kouwenhoven, T.J., Guiard, J. and van der Zwaan, B., 2008. Molecular phylogeny of Rotaliida (Foraminifera) based on complete small subunit rDNA sequences. *Marine Micropaleontology*, 66: 233-246.
- Seears, H., 2011. Biogeography and phylogenetics of the planktonic foraminifera. PhD Thesis. University of Nottingham.
- Smith, L.M., Sanders, J., Kaiser, R., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C., Heiner, C., Kent, S. and Hood, L., 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321: 674-679.
- Spiegler, D. and Jansen, E., 1989. Planktonic foraminifer biostratigraphy of Norwegian Sea sediments: ODP LEG 104. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, 104: 681-696.
- Studier, J.A. and Keppler, K.J., 1988. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Molecular Biology and Evolution*, 5: 729-731.
- Ufkes, E., Jansen, J.H.F. and Schneider, R.R., 2000. Anomalous occurrences of *Neoglobobadrina pachyderma* (left) in a 420-ky upwelling record from Walvis Ridge (SE Atlantic). *Marine Micropaleontology*, 40: 23-42.

- Ujiie, Y. and Lipps, J.H., 2009. Cryptic diversity in planktic foraminifera in the northwest Pacific Ocean. *Journal of Foraminiferal Research*, 39: 145-154.
- Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T., Watanabe, S., Wiebe, P. and de Vargas, C., 2010. Coiling dimorphism within a genetic type of the planktonic foraminifer *Globorotalia truncatulinoides*. *Marine Micropaleontology*, 77: 145-153.
- Weiner, A., Aurahs, R., Kurasawa, A., Kitazato, H. and Kucera, M., 2012. Vertical niche partitioning between cryptic sibling species of a cosmopolitan marine planktonic protist. *Molecular Ecology*, 21: 4063-4073.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York.

PARTIE II

**TAXONOMIES MORPHOLOGIQUE ET
MOLECULAIRE**

**CAS DE *Globigerinoides sacculifer* ET
*Neogloboquadrina pachyderma***

Chapitre 1 : Un cas particulier, *Globigerinoides sacculifer*, morpho-espèce présentant une forte diversité morphologique associée à une très faible diversité génétique

De par sa vaste distribution géographique, ses larges affinités environnementales et sa grande diversité morphologique, il était attendu que *Globigerinoides sacculifer* corresponde au regroupement de plusieurs espèces cryptiques. Les séquences de la fin de la SSU et de l'ITS-1 obtenues à partir d'un échantillonnage à l'échelle mondiale montrent, au contraire, une diversité génétique très réduite chez cette morpho-espèce. La méthode d'extraction de l'ADN employée étant non destructrice, une absence de relation entre distance génétique et type morphologique a pu être mise en évidence. *Globigerinoides sacculifer* correspond donc à une unique espèce et est le premier cas chez les foraminifères planctoniques où la diversité morphologique d'une morpho-espèce est supérieure à sa diversité génétique.

Cette absence de diversité génétique est d'autant plus étonnante que *G. sacculifer* est une espèce ancienne (~ 19 Ma) et que les populations atlantiques sont pratiquement isolées de celles des océans indiens et pacifiques. La présence d'un haplotype de l'ITS-1 spécifique à l'océan atlantique suggère que les *G. sacculifer* de l'océan atlantique ont été récemment (dernier maximum glaciaire) isolés puis qu'un flux génétique unidirectionnel de l'océan indien vers l'atlantique s'est rétabli.

Mots-clefs : *Globigerinoides sacculifer*, *Globigerinoides trilobus*, *Globigerinoides quadrilobatus*, *Globigerinoides sacculifer immaturus*, SSU, ITS-1, diversité génétique, flux génétique unidirectionnel

Fiches-méthode (annexe) : I, III, IV, V, VII, VIII

Ce manuscrit a été publié dans la revue *Paleobiology* en Janvier 2013

The cryptic and the apparent reversed: lack of genetic differentiation within the morphologically diverse plexus of the planktonic foraminifer *Globigerinoides sacculifer*

Aurore André^a, Agnes Weiner^b, Frédéric Quillévéré^a, Ralf Aurahs^b, Raphaël Morard^c,
Christophe J. Douady^d, Thibault de Garidel-Thoron^e, Gilles Escarguel^a, Colomban de Vargas^c,
Michal Kucera^b

^a UMR CNRS 5276, Laboratoire de Géologie de Lyon: Terre, Planètes, Environnement, Université Lyon 1, 27-43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

^b Zentrum für marine Umweltwissenschaften MARUM, Universität Bremen, Leobener Strasse, 28359 Bremen, Germany

^c UMR CNRS 7144, Evolution du Plancton et PaléoOcéans, UPMC Université Paris 06, Station Biologique, BP 74, 29682 Roscoff, France

^d UMR5023, Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Université Lyon 1, ENTPE, CNRS, 6 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne, France

^e CEREGE UMR 6635, Université Aix-Marseille, 13545 Aix-en-Provence Cedex 4, France

Abstract

Previous genetic studies of extant planktonic foraminifera have provided evidence that the traditional, strictly morphological definition of species in these organisms underestimates their biodiversity. Here, we report the first case where this pattern is reversed. The modern (sub)tropical species plexus *Globigerinoides sacculifer* is characterized by large morphological variability, which has led to the proliferation of taxonomic names attributed to morphological end-members within the plexus. In order to clarify the taxonomic status of its morphotypes and to investigate the genetic connectivity among its currently partly disjunct (sub)tropical populations, we carried out a global survey of two ribosomal RNA regions (SSU and ITS-1) in all recent morphotypes of the plexus collected throughout (sub)tropical surface waters of the global ocean. Unexpectedly, we find an extremely reduced genetic variation within the plexus and no correlation between genetic and morphological divergence, suggesting taxonomical overinterpretation. The genetic homogeneity within the morphospecies is unexpected, considering its partly disjunct range in the (sub)tropical Atlantic and Indo-Pacific and its old age (early Miocene). A sequence variant in the rapidly evolving ITS-1 region indicates the existence of an exclusively Atlantic haplotype, which suggests an episode of relatively recent (last glacial) isolation, followed by subsequent resumption of unidirectional gene flow from the Indo-Pacific into the Atlantic. This is the first example in planktonic foraminifera where the morphological variability in a morphospecies exceeds its rDNA genetic variability. Such evidence for inconsistent scaling of morphological and genetic diversity in planktonic foraminifera could complicate the interpretation of evolutionary patterns in their fossil record.

Keywords: *Globigerinoides sacculifer*, *Globigerinoides trilobus*, *Globigerinoides quadrilobatus*, *Globigerinoides sacculifer immaturus*, SSU, ITS-1, genetic diversity, unidirectional gene flow

1. Introduction

The interpretation of biogeographical and evolutionary patterns of morphologically defined species in the plankton has been challenged by the discovery of cryptic genetic diversity often linked with distinct biogeography and ecological adaptation (e.g., Saez et al. 2003; Logares et al. 2007; Kooistra et al. 2008). The interpretation of modern and fossil species distribution patterns in these groups thus hinges on the degree of congruence between their morphological and genetic divergence. As long as the morphological taxonomy consistently underestimates biodiversity, analysis of the fossil record and modern assemblages may be expected to reflect processes scaled with those at the level of biological species. This issue is particularly important for the interpretation of diversity patterns in the fossil record, because the species concept in palaeontology (and in many cases in biology as well) is based solely on phenotypic traits manifested in the shape of the classified organisms.

Planktonic foraminifera provide an excellent opportunity to test the explanatory power of biogeographical and evolutionary patterns derived from morphologically defined species and to assess the degree of congruence between morphological distinction and genetic divergence. Their character-rich calcite shells are abundantly preserved in marine sediments and allow direct tracking of morphospecies occurrences in time and space (e.g., Aze et al. 2011). From these occurrences, paleoceanographers derive reconstructions that are of immense importance to our understanding of past climate changes. In recent years, molecular analyses have revealed that the classical, morphological definition of species in planktonic foraminifera hides cryptic genetic and ecological differentiation (for a review see Darling and Wade 2008). Global surveys of the Small Subunit (SSU) or Internal Transcribed Spacers (ITS) regions of ribosomal DNA (rDNA) in extant species allowed the recognition of distinct genotypes (e.g., de Vargas et al. 1999, 2001; Darling et al. 1999, 2006; Morard et al. 2009, 2011; Ujiie et al. 2010; Aurahs et al. 2011; Quillévéré et al. 2012). Considering the lack of evidence for introgression and the obligate sexual outbreeding reproductive modus in planktonic foraminifera, these genetic types have to be considered reproductively isolated and thus corresponding at least to the level of biological species. Many of these genetic types show more restricted biogeographical ranges than the morphospecies to which they have been assigned, implying that the distribution of these morphospecies does not reflect the true potential for dispersal of these organisms. Nonetheless, some of these genetic types occur throughout the range of their respective morphospecies, suggesting ongoing global gene flow.

At present, the degree to which morphological divergence reflects genetic distinction in planktonic foraminifera (and potentially other plankton) remains unclear, complicating the interpretation of biogeographical and evolutionary patterns in the fossil record of this group.

Here we report on a global survey of two of the ribosomal rDNA regions (SSU and ITS-1) in the abundant and paleoceanographically important (sub)tropical species *Globigerinoides sacculifer* (Brady 1877). The survey was carried out with the aim to determine the degree of congruence between morphology and genetic divergence within this morphologically diverse species plexus, and to investigate the genetic connectivity among its partly disjunct (sub)tropical populations. *Globigerinoides sacculifer* is one of the most commonly encountered planktonic foraminifera in the (sub)tropical waters of the world oceans (e.g., Tolderlund and Bé 1971). This cosmopolitan spinose species is limited by its photosymbiotic ecology to the euphotic zone of the oceans, where it reproduces on a synodic lunar cycle (Bijma et al. 1990).

The morphology associated with the species concept of *Globigerinoides sacculifer* initially occurred during the early Miocene ~20 Myr ago, having diverged from the morphospecies *Globigerinoides trilobus* (e.g., Kennett and Srinivasan 1983; Berggren et al. 1995). The exact dating of this divergence is potentially complicated by usage of the species names *G. sacculifer* and *G. trilobus* in a way not consistent with their original species description. Similarly, the taxonomic status of *G. sacculifer* in the modern ocean is ambiguous, because of a high morphological variability among specimens of this plexus. *Globigerinoides sacculifer* sensu stricto has been taxonomically distinguished from other *Globigerinoides* morphospecies with a honeycomb shell wall texture (Kennett and Srinivasan 1983) by the presence of a sac-like final chamber (Brady 1877). Whereas the other taxonomic concepts in the plexus (Fig. 19), *Globigerinoides quadrilobatus* (d'Orbigny 1846), *G. trilobus* (Reuss 1850) and *Globigerinoides immaturus* Leroy (1939), are based on fossil material, *G. sacculifer* was originally described from subfossil sediments and the original species description clearly refers to the occurrence and habitat of this species in the plankton (Brady 1877; see also Williams et al. 2006). Numerous studies have noticed that the shells of *G. trilobus*, *G. quadrilobatus*, and *G. immaturus* are virtually identical to those of *G. sacculifer* except for the lack of the final sac-like chamber (Hofker 1959; Banner and Blow 1960; Hecht 1974; Saito et al. 1981). As a consequence, these taxa were often considered phenotypic variants of the morphospecies *G. sacculifer* s.l. Culture experiments have provided support for this broader taxonomic concept, suggesting that the sac-like chamber is probably a terminal event of shell growth, manifested in some but not all of the cultured specimens (Bé 1980; Bé

et al. 1983; Hemleben et al. 1987; Bijma et al. 1992). Despite these culturing experiments, specimens with and without the sac-like last chamber have been continually recorded as separate taxa for paleoecological studies and transfer functions. Today, the most extensively used species names for members of the plexus are *G. trilobus* and *G. sacculifer*, but *G. quadrilobatus* and *G. immaturus* are still commonly reported, even in late Quaternary sediments (e.g., Spooner et al. 2005; Lim et al. 2006; Budillon et al. 2009; Siani et al. 2010; Wilson 2012).

Until now, only 16 SSU sequences of the *Globigerinoides sacculifer* plexus have been published, 11 originating from a single location in the NW Pacific and the five remaining originating from the South Pacific (Coral Sea), Atlantic (Caribbean Sea) and Mediterranean (Wade et al. 1996; Darling et al. 1997; de Vargas et al. 1997; Pawlowski et al. 1997; Ujiie and Lipps 2009). All these sequences were attributed to *G. sacculifer*. These sequences are virtually identical, but the available data are not sufficient to address the global diversification or to resolve the correlation between morphological and genetic divergence in the plexus. Here, we assess the rDNA genetic diversity of the SSU and ITS regions from the *G. sacculifer* plexus throughout the world oceans. Single-cell DNA analyses are performed on 148 individuals representative of all major morphotypes, i.e., *Globigerinoides trilobus*, *G. immaturus*, *G. quadrilobatus*, and *G. sacculifer* s.s. (Fig. 19). Such analyses allow us to determine whether or not there is cryptic diversity in *G. sacculifer* s.l. and to investigate the congruence between genetic and morphological diversity within the plexus.

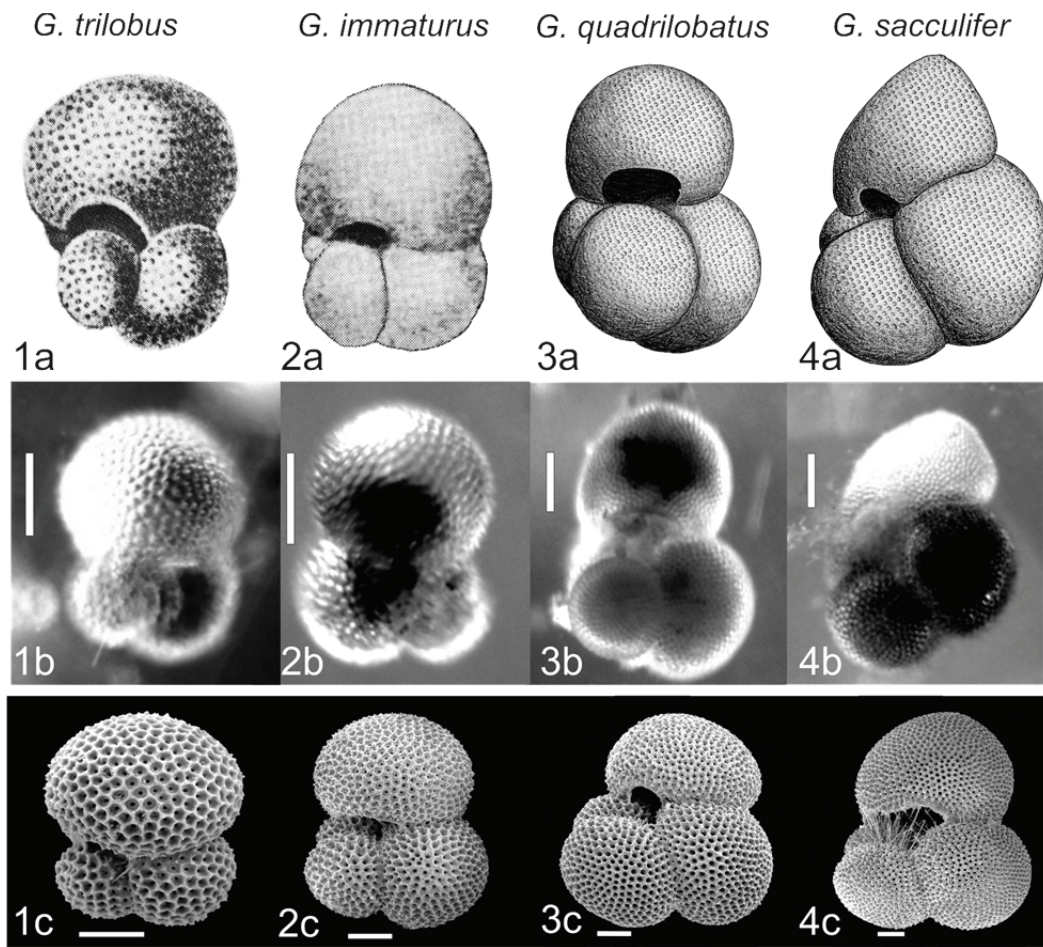


Figure 19: taxonomy of the *Globigerinoides sacculifer* plexus. Row (a) shows reproductions of line drawings of (1) the holotype of *Globigerinoides trilobus* (Reuss 1850), 60 \times ; (2), the holotype of *Globigerinoides immaturus* Leroy (1939), 60 \times , mirror image; (3) the lectotype selected by Banner and Blow (1960) for *Globigerinoides quadrilobatus* (d'Orbigny 1846), 100 \times ; (4), the lectotype selected by Banner and Blow (1960) for *Globigerinoides sacculifer* (Brady 1877), 100 \times . Row (b) shows light microscope images and row (c) SEM pictures of genetically analyzed specimens corresponding to the four taxonomic concepts shown in (a). *Globigerinoides sacculifer* is distinguished from the other members of the plexus by its elongate sac-like final chamber. Within the members of the plexus that lack the sac-like chamber, *G. quadrilobatus* differs in having a high aperture and a tendency to possess four chambers in the last whorl, and *G. immaturus* and *G. trilobus* both exhibit lower-arched primary and supplementary apertures, but, according to the original description, in *G. trilobus* the final chamber is larger than all the earlier chambers combined. The SSU and ITS-1 sequences corresponding to the specimens in the images are labeled in Supplementary Table 1. The scale bars in (b), 0.1 mm, and in (c), 0.05 mm.

2. Material and Methods

2.1. Sampling

Specimens of *Globigerinoides sacculifer*, *G. immaturus*, *G. trilobus*, and *G. quadrilobatus* were collected from ring and stratified plankton tows (64- μm to 200- μm mesh sizes) and by pumping surface water through a sieve with 64- μm mesh size (see Table 13 for details). The sampling cruises took place from 1995 to 2010 and covered almost the entire geographic range reported for *G. sacculifer* (Fig. 20). Right after sampling, live specimens were taxonomically identified, in most cases photographed and carefully picked from the plankton, cleaned with a fine brush, and transferred individually into a DNA extraction buffer. Specimens were then stored at -20°C until further processing in the laboratory. Hydrographic vertical profiles of the water column were obtained at most stations of collection by using temperature and fluorescence sensors (Table 13).

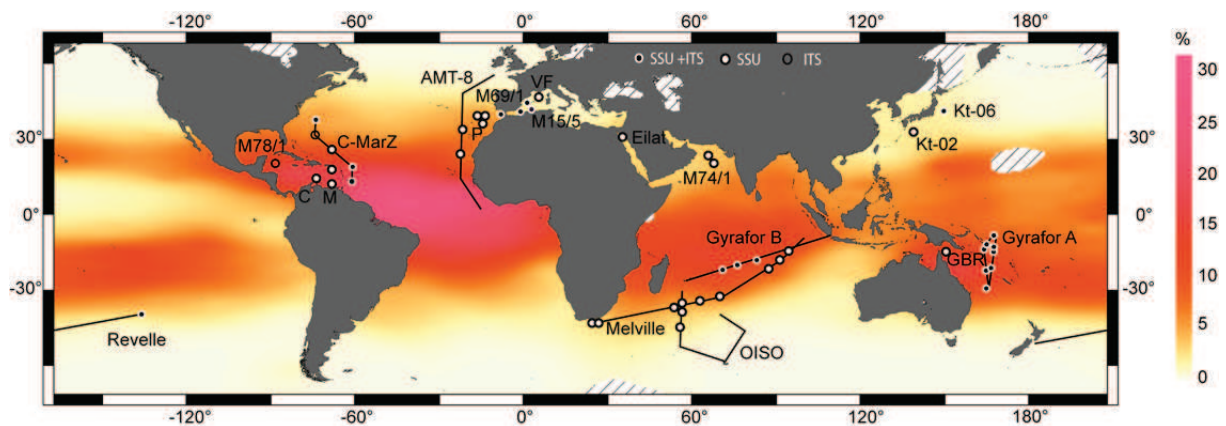


Figure 20: location of ship tracks, names of the various cruises, and sampling stations for individuals of the *Globigerinoides sacculifer* plexus. Black circles represent stations where both SSU and ITS-1 sequences have been obtained; white circles represent stations where only the SSU has been sequenced; open circles mark stations where only the ITS-1 has been sequenced. Details of all localities are given in Table 13. Colours indicate the relative abundance of the *G. sacculifer* plexus in planktonic foraminiferal assemblages from surface sediments, interpolated from data in the MARGO database (Kucera et al. 2005; MARGO Project Members 2009) and Siccha et al. (2009).

Table 13: Location of the sampling stations for *Globigerinoides sacculifer* with hydrographic data, collection and DNA extraction methods, numbers of sequenced individuals and, in the case of stations with cloned specimens or replicates, numbers of sequences (in *italic*). Data from the literature are also included. Numbers in brackets correspond to *Orbulina universa* ITS-1 sequences.

Cruise	Ocean	Station	Longitude	Latitude	Date	Gear	Mesh size	CTD	DNA Buffer	SSU		Published in	
										Sequences (n)	Sequences (n)		
AMT-S	Atlantic	10	21 W	22.55 N	June 1999	net	100 µm	yes	GUAN	3	0	this study	
	Atlantic	13	21.34 W	30.28 N	June 1999	net	100 µm	yes	GUAN	1, 3	0	this study	
C-Marz	Atlantic	1	69.2 W	33.33 N	April 2006	MOC net	64 µm	yes	GITC*	1	2 (1)	this study	
	Atlantic	3	60.3 W	24.5 N	April 2007	ring net	64 µm	yes	GITC*	0	2	this study	
	Atlantic	4	54.3 W	19.5 N	April 2008	ring net	64 µm	yes	GITC*	1	1	this study	
	Atlantic	5	54.7 W	14 N	April 2009	MOC net	64 µm	yes	GITC*	2	3	this study	
	Red Sea	N/A	34.6 E	29.3 N	May 1999	net	63-200 µm	no	GUAN	8	0	this study	
Gyrafar A	Pacific	B	162.5 E	23.02 S	June 2008	Multinet	100 µm	yes	GITC*	1	1	this study	
	Pacific	E	162.6 E	14.83 S	June 2008	Multinet	100 µm	yes	GITC*	2	2	this study	
	Pacific	G	162.51 E	9 S	June 2008	Multinet	100 µm	yes	GITC*	2, 8	1, 5	this study	
	Pacific	H	162.5 E	6.04 S	June 2008	Multinet	100 µm	yes	GITC*	1	1, 5	this study	
	Pacific	K	162.5 E	0	June 2008	Multinet	100 µm	yes	GITC*	2	2	this study	
	Pacific	N	161.11 E	4.5 S	June 2008	Multinet	100 µm	yes	GITC*	1, 3	1	this study	
	Pacific	P	160.4 E	7.4 S	June 2008	Multinet	100 µm	yes	GITC*	1	1	this study	
	Pacific	S	161.88 E	16.25 S	June 2008	Multinet	100 µm	yes	GITC*	0	1	this study	
	Pacific	T	162.66 E	17.93 S	June 2008	Multinet	100 µm	yes	GITC*	0	0 (1)	this study	
	Gyrafar B	Indian	F	80.216 E	14.213 S	June 2007	Multinet	100 µm	yes	GITC*	3	4, 6	this study
		Indian	I	73.16 E	15.57 S	June 2007	Multinet	100 µm	yes	GITC*	2	3	this study
		Indian	L	67.38 E	17.21 S	June 2007	Multinet	100 µm	yes	GITC*	8, 14	10, 18	this study
		Pacific	N/A	N/A	N/A	May 2006	ORI net	330 µm	yes	GITC*	2	4, 8	this study
	Melville	Indian	1	23.7 E	35.1 S	June 2003	plankton nets	65 - 200 µm	yes	GITC*	2	0	this study
Indian		2	24.5 E	35 S	June 2003	plankton nets	65 - 200 µm	yes	GITC*	1	0	this study	
Indian		10	52.6 E	31.8 S	June 2003	plankton nets	65 - 200 µm	yes	GITC*	2	0	this study	
Indian		11	59.8 E	29.8 S	June 2003	plankton nets	65 - 200 µm	yes	GITC*	3	0	this study	
Indian		12	59.8 E	29.8 S	June 2003	plankton nets	65 - 200 µm	yes	GITC*	4	0	this study	
Indian		16	78 E	19.7 S	June 2003	plankton nets	65 - 200 µm	yes	GITC*	3	0	this study	
Indian		17	78 E	19.7 S	June 2003	plankton nets	65 - 200 µm	yes	GITC*	1	0	this study	
Indian		18	83.7 E	17.2 S	June 2003	plankton nets	65 - 200 µm	yes	GITC*	2	0	this study	
Indian		20	89.9 E	14 S	June 2003	plankton nets	65 - 200 µm	yes	GITC*	2	0	this study	

SSU IIS-1

Cruise	Ocean	Station	Longitude	Latitude	Date	Gear	Mesh size	CTD	DNA Buffer	Sequences (n)	Sequences (n)	Published in
OISO-4	Indian	2	53.3 E	30 S	Febr 2000	net	100 µm	yes	magic GUAN	4	0	this study
	Indian	4	53.23 E	40 S	Febr 2000	net	100 µm	yes	magic GUAN	2	0	this study
	Indian	17	66.24 E	29.59 S	Febr 2000	net	100 µm	yes	magic GUAN	3	0	this study
	Pacific	6	130.98 W	32.04 S	Febr 2000	net	100 µm	yes	GITC*	1, 3	1, 5	this study
	Atlantic	N/A	5.46 W	35.58 N	August 2006	surface pump	63 µm	no	DOC	2	1, 3	this study
	Atlantic	323	5.51 W	35.58 N	August 2006	multinet	100 µm	no	DOC	1	1, 5	this study
Revelle Meteor 69/1	Atlantic	324	5.39 W	35.57 N	August 2006	multinet	100 µm	no	DOC	1	0	this study
	Atlantic	366	0.31 W	35.55 N	August 2006	multinet	100 µm	no	DOC	1	1, 3	this study
	Atlantic	N/A	2.45 E	39.6 N	August 2006	surface pump	63 µm	no	DOC	1	1, 3	this study
	Atlantic	N/A	2.44 E	39.14 N	August 2006	surface pump	63 µm	no	DOC	2	2, 6	this study
	Atlantic	395	2.31 E	38.57 N	August 2006	multinet	100 µm	no	DOC	3	1, 2	this study
	Atlantic	N/A	2.43 E	39.16 N	August 2006	surface pump	63 µm	no	DOC	2	0	this study
	Indian	955	67.6 E	19.6 N	Sept 2007	multinet	100 µm	no	DOC	1	0	this study
	Indian	957	64.4 E	20.33 N	Sept 2007	multinet	100 µm	no	DOC	1	0	this study
	Atlantic	164	83.38 W	18.30 N	March 2009	multinet	100 µm	no	DOC	1	0	this study
	Atlantic	222	64.28 W	12.1 N	March 2009	multinet	100 µm	no	DOC	3	0	this study
	Atlantic	238	60.14 W	10.56 N	March 2009	multinet	100 µm	no	DOC	3	3, 5	this study
	Mexian15/5	Atlantic	N/A	4.13 E	37.11 N	July 2010	multinet	100 µm	no	DOC	4	5, 11
Poseidon321	Atlantic	175	21.27 W	30.36 N	May 2005	multinet	100 µm	no	DOC	4	0	this study
	Atlantic	179	22.29 W	31.59 N	May 2005	multinet	100 µm	no	DOC	4	0	this study
	Atlantic	181	22 W	33 N	May 2005	multinet	100 µm	no	DOC	2	0	this study
	Atlantic	185	20.14 W	35.50 N	May 2005	multinet	100 µm	no	DOC	1	0	this study
	Atlantic	N/A	19.30 W	31.36 N	March 2006	surface pump	63 µm	no	DOC	4	0	this study
	Atlantic	67	20 W	33 N	March 2006	multinet	100 µm	no	DOC	3	0	this study
	Atlantic	N/A	20 W	34.20 N	March 2006	surface pump	63 µm	no	DOC	8	0	this study
	Atlantic	N/A	68.56 W	12.7 N	1996	net	63-200 µm	no	DOC	3	0	this study
	Curacao	Atlantic	N/A	N/A	1996	net	63-200 µm	no	tris-EDTA	1	0	Darling et al. (1996)
	Great Barrier Reef	Pacific	N/A	N/A	1996	scuba diver	-	no	tris-EDTA	1	0	Darling et al. (1997)
	Puerto Rico	Atlantic	N/A	67 W	March 1995	net	64-500 µm	no	tris-EDTA	2	0	de Vargas et al. (1997)
	Villefranche	Atlantic	N/A	7.18 E	Dec 1995	net	64-500 µm	no	tris-EDTA	1	0	de Vargas et al. (1997)
KT02-15	Pacific	Okunawa	145 E	39 N	May 2002	NORPAC net	63 µm	no	GITC*	11	0	Ujue and Lipps (2009)

2.2. DNA Extraction, Amplification, and Sequencing

DNA extractions were performed using DOC (Pawlowski 2000) and guanidinium isothiocyanate (GITC*) DNA extraction buffers (e.g., Morard et al. 2009). The GITC* method kept the calcareous shell intact after DNA extraction for further morpho-genetic comparisons. Polymerase Chain Reaction (PCR) for both SSU and ITS-1 was performed using proofreading VENT® polymerase (New England Biolabs) and *Thermus aquaticus* YT-1 polymerase with 5' flap endonuclease activity (New England Biolabs). A combination of universal and foraminifera-specific primers was used for the amplification of a fragment of the 3' end of the SSU rDNA and for the complete ITS-1 region (Table 14, Fig. 21).

Table 14: PCR primers used in this study for the amplification of the SSU and ITS-1 regions. The primers S19F_Orb and 5.8S_R1_For were used for the amplification of the ITS-1 of *Orbulina universa* (see methods).

Primer name	Pair	Target region	Amplicon length (bp)	Published by	Sequence 5' - 3'
S19f	S15rf	SSU	~700	New	CCCGTACTAGGCATTCTAG
S15rf	S19f	SSU	~700	New	GTGCATGGCCGTTCTTAGTTC
S14p	SBf	SSU	~700	Ujiié and Lipps (2009)	AAGGGCACCACAAGAGCG
SBf	S14p	SSU	~700	Ujiié and Lipps (2009)	TGATCCATCAGCAGGTTACCTAC
saccv2F	saccv2R	SSU	~540	New	ACCACAAGCGCGTGGAGCAT
saccv2R	saccv2F	SSU	~540	New	GCACGTGTGCAGCCCAGGAC
S98f	5.8S7fp	ITS-1	~1200	New	CCTCCGGAAAAAGGCTTATGCAGGCA
S96f	5.8S7fp	ITS-1	~1200	New	TGCAGGCATTTACGTATGCTCCTATA
5.8S7fp	S96f/ S98f	ITS-1	~1200	New	GTIAGTAAGGTGTTCCRCAGCC
saccITSF	saccITSR	ITS-1	~530	New	CGCCCGTCGCTCTTACCAAT
saccITSR	saccITSF	ITS-1	~530	New	ACCCGCCCATGGACCAATGT
S19F_Orb	5.8S_R1_For	ITS-1	~770	New	CTAACTAGGAATGCCTYGTACGG
5.8S_R1_For	S19F_Orb	ITS-1	~770	New	GGTAAGTAAGGTGTTCCRCAGCC

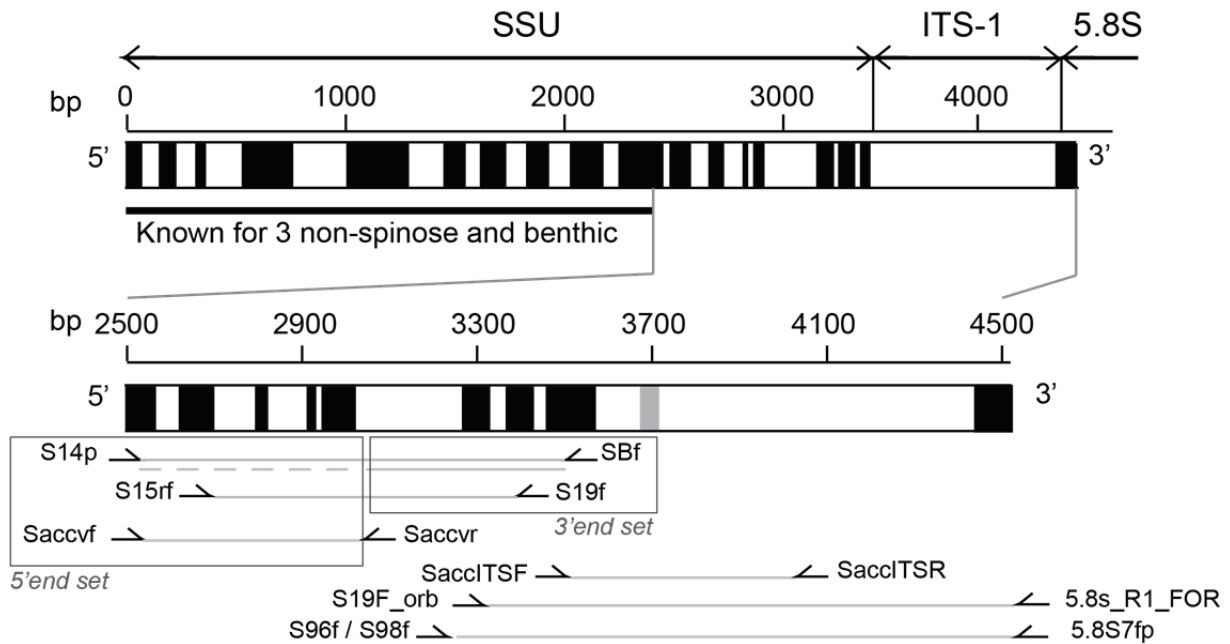


Figure 21: scheme of the SSU, ITS-1, and 5.8S regions of the planktonic foraminiferal rRNA genes showing the positions of the amplified regions with appropriate primer pairs (gray lines) for *Globigerinoides sacculifer*. Variable and conserved regions are shown in white and black, respectively. The gray region shows the position of the insert found in specimens of *G. sacculifer* s.l. from the Atlantic Ocean. *Neogloboquadrina dutertrei* (NCBI EU199449) is taken as reference for SSU 5' end length (in pair base). SSU 3' end, ITS-1, and 5.8S lengths are based on sequences of *G. sacculifer*.

The use of multiple primer pairs that were developed in the course of the project helped us to improve the amplification success rates (e.g., from 44% to 70% for the SSU). The reason for obtaining sequences of the ITS-1 region was the observation from species of non-spinose planktonic foraminifera in which this region showed higher rate of substitution and thus allowed finer differentiation (de Vargas et al. 2001; Morard et al. 2011). The ITS-1 sequences obtained here are the first from a species of spinose planktonic foraminifera. Therefore, in order to verify their attribution to the analyzed species, we have also generated ITS-1 sequences from two mature specimens of *Orbulina universa* (Table 13; NCBI accession numbers JQ004254 and JQ004255), which is consistently placed in SSU rDNA phylogenies as the sister species to *Globigerinoides sacculifer* (Aurahs et al. 2009b). These two specimens from the NE Atlantic and SE Pacific Oceans were identified as the Mediterranean genotype (de Vargas et al. 1999) on the basis of RFLP analyses. Their ITS-1 sequences were obtained using two new specific primer pairs shown in Table 14. For *G. sacculifer*, after preliminary analysis of the first ITS sequences, we created a primer set for a short fragment within the ITS, covering the region where we had located the positions with the highest variability (Table 14). These shorter fragments were cloned using the blunt end TOPO® PCR cloning kit

(Invitrogen) and sequenced with the M13F/M13R standard primers. In addition to the SSU and ITS-1 PCR products that were sequenced directly with the primers used for amplification, we cloned the whole ITS-1 from seven individuals and the partial SSU from two individuals from the Indian and Pacific Ocean. All original sequence chromatograms were checked by eye for ambiguous reads and sections of low quality of resolution. Our detailed information about the sequence coverage and length for each specimen can be drawn from the online supplement (Supplementary Table 1). Additionally, sequences of 16 specimens were compiled from the literature for comparison (Table 13).

2.3. Phylogenetic and Phylogeographic Analyse

In a first manual alignment of the SSU and ITS sequences, we noticed that direct sequences of both regions contained a few ambiguous reads or unique base changes, which were not present in sequences obtained by cloning. The overall incidence of the ambiguous reads and unique base changes is extremely low and close to the level that is expected from the proofreading efficiency of the polymerases. We have nevertheless kept this variability for all subsequent phylogenetic analyses (Supplementary Table 1).

Both SSU and ITS-1 sequences were aligned using MUSCLE v. 3.7 (Edgar 2004) and ClustalW v. 2 (Larkin et al. 2007). The Modeltest 0.1.1 software (Posada and Crandall 1998) was used to select the best-fit nucleotide substitution model for each alignment according to the Akaike Information Criterion (AIC) (Akaike 1974). Phylogenetic trees were computed using PhyML, version 3.0 (Guindon and Gascuel 2003) and a Median-Joining network (Bandelt et al. 1999) was obtained using Splitstree v. 4.11.3 (Huson and Bryant 2006). Matrices of patristic distances for the ITS-1 region (sum of tree-branch lengths on a path between a pair of sequences) were then generated with R, version 2.12.2 (R Development Core Team 2008) using the APE package (Paradis et al. 2004) and expressed as percent of nucleotide differences.

2.4. CHRONOS Database

We searched the NEPTUNE Database (www.Chronos.org, search generated by R.A. using Chronos XML on 18 October 2011) for reports of fossil individuals of *Globigerinoides sacculifer*, *G. trilobus*, *G. immaturus*, and *G. quadrilobatus* from global marine sediments. The resulting table listed all original taxonomic assignments, which comprise a combination of various binomial and trinomial species names (e.g., *G. quadrilobatus immaturus*, *G. quadrilobatus* s.l., *G. trilobus sacculifera*). Therefore, as far as possible, we filtered the names according to the taxonomic concept followed in this study.

3. Results

Altogether, we obtained DNA sequences from 148 specimens of the *Globigerinoides sacculifer* plexus from 54 stations (Supplementary Table 1). Of the specimens that were taxonomically unambiguously assigned upon collection, we obtained SSU rDNA and ITS-1 sequences corresponding to all four common morphospecies of the plexus: *G. sacculifer* ($n = 37$), *G. trilobus* ($n = 29$), *G. immaturus* ($n = 9$), and *G. quadrilobatus* ($n = 11$) (Fig. 19, Supplementary Table 1). These new sequences are deposited in Genbank with accession numbers JQ004100 to JQ004175 and JQ995373 to JQ995390 for the SSU region, and JQ004176 to JQ004253 and JQ973709 to JQ973734 for the ITS-1 region.

Within the plexus, the new and previously published SSU rDNA sequences (Supplementary Table 1) were virtually identical. Given that multiple primer pairs were used for PCR amplifications and sequencing (Table 14), three partly overlapping subsets of sequences were considered within our alignment (Fig. 21). The longest subset covers the whole fragment (Fig. 21) and consists of 107 sequences, 49 of which being completely identical. The second subset covers the front part of the fragment and is made of 138 sequences, 70 of which are identical to the base. Finally, the third subset covers the rear end of the fragment and is made of 129 sequences, 105 of which are identical to the base. In total, 65 sequences differed by up to 19 nucleotide changes from the consensus. In all cases except one, the observed small differences showed no reproducible patterns. For five randomly selected individuals that exhibited such differences, three independent PCR and sequencing replicates were carried out. These confirmed the absence of reproducible nucleotide changes within the replicated sequences (NCBI JQ995381 to JQ995390) and indicated that these changes, all located close to the 5' or 3' end of the sequences, represent amplification or direct sequencing artifacts. The only repeatable pattern was found in one specimen from the Caribbean Sea (NCBI JQ004126), which showed a substitution pattern (4 bp) in the SSU region identical to a sequence from the same region published by de Vargas et al. (1997). However, this individual carried an ITS-1 sequence identical to those found throughout the world oceans, and the significance of the substitution pattern in the SSU region thus remains unclear.

The 107 ITS-1 sequences obtained from 71 different individuals showed a higher degree of differentiation than the virtually identical SSU sequences. In contrast to the genetic homogeneity of the SSU rDNA, the ITS sequences revealed an interesting geographical signal

and confirmed the presence of intra-individual variability in the analyzed gene complex. The clones of eight individuals assigned upon collection to *G. sacculifer* and *G. trilobus* from the Atlantic Ocean showed a unique substitution pattern in the ITS-1 (Fig. 22). This exclusively Atlantic haplotype was associated with clones from the same specimens that yielded the dominant globally distributed ITS haplotype, suggesting intra-individual variability in these specimens. In the direct sequences and clones of the “global” ITS-1 haplotype, only small variation at nine positions has been found (Fig. 23). In these sequences, the variable sites are located at the same positions, but show various permutations of character states. These permutations, also found among clones of the same individuals, are consequently consistent with the existence of intra-individual variability.

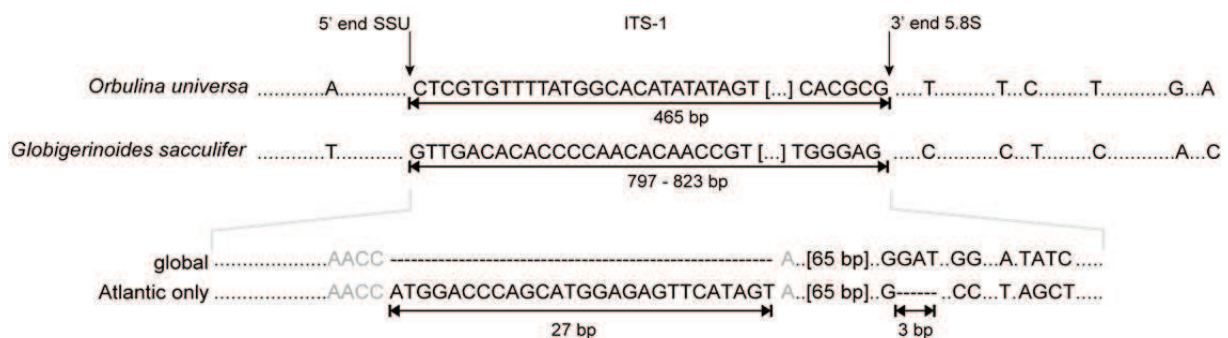


Figure 22: comparison of the degree of divergence in the SSU, 5.8S, and ITS-1 sequences between the two sister species *Globigerinoides sacculifer* (NCBI JQ004220) and *Orbulina universa* (NCBI JQ004254). Dots mark identical bases in aligned regions; also shown are the lengths of the ITS-1 in base pairs (bp). The ITS-1 of *O. universa* and *G. sacculifer* are so divergent from one another that they cannot be aligned. The inset below shows the difference in the sequence motive of the ITS-1 between the dominant global haplotype and the Atlantic haplotype; dashes mark nucleotides that are missing in the other sequence.

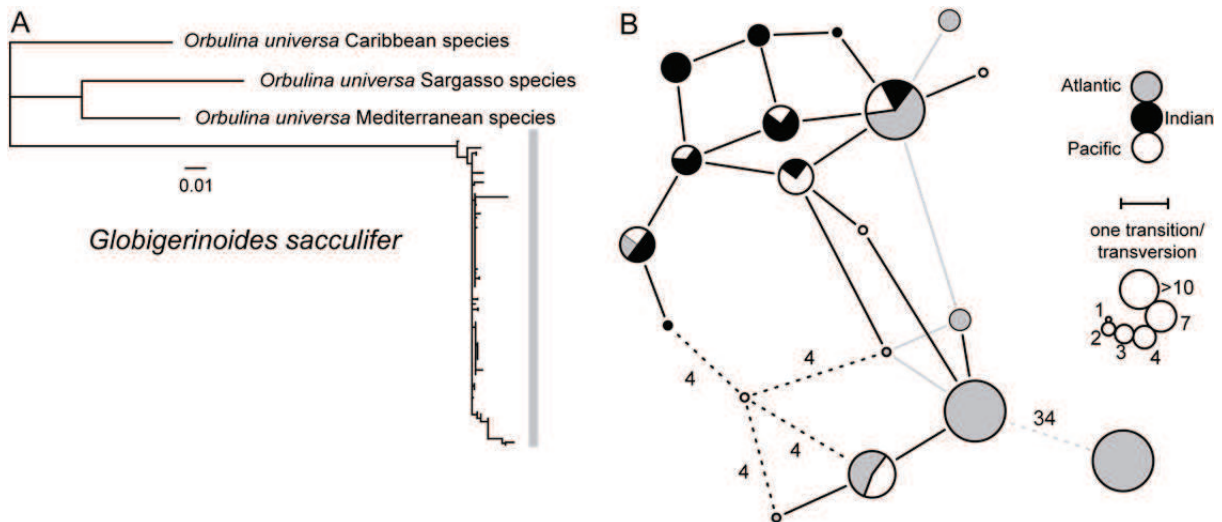


Figure 23: A, SSU-based phylogenetic tree for all available sequences (Supplementary Table 1) of the *Globigerinoides sacculifer* plexus using the three genotypes of *Orbulina universa* as outgroup. For details see material and methods. B, Median-joining network based on a manual alignment of 594 bp in the ITS-1 region of 78 sequences of the *G. sacculifer* plexus. Calculation of this haplotype network excludes all parsimony-uninformative sites. The original output was manually modified for legibility. Lines represent substitutions between haplotypes; gray lines connect haplotypes that may be encountered in the same individual; dotted lines, not to scale, indicate more than three substitutions (number given above the lines). Size of the circles is proportionate to the number of sequences per haplotype. The largest haplotype difference (34 substitutions) is a result of two inserts and one deletion, as shown in Figure 22.

None of the observed small differences in the SSU and in the ITS-1 are linked with morphological differentiation between individuals that were attributed to one of the *Globigerinoides trilobus*, *G. quadrilobatus*, *G. immaturus* or *G. sacculifer* s.s. morphotypes (Fig. 24). An ANOSIM nonparametric test (Clarke 1993) indicates that there is no correlation between genetic distance and morphology ($R = -0.010$; $p_{(R=0)} = 0.565$ [10,000 permutations]).

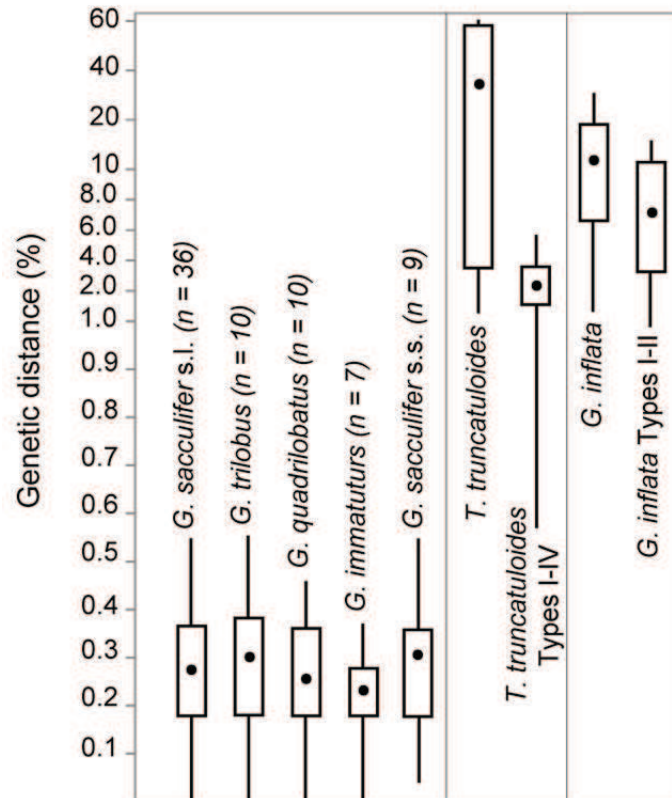


Figure 24: MUSCLE alignments-based ITS genetic diversity within the *Globigerinoides sacculifer* plexus and within the morphospecies *Truncorotalia truncatulinoides* and *Globoconella inflata* (data from de Vargas et al. 2001 and Morard et al. 2011, respectively). Box plots give the mean (black circles), 1st through 3rd quartiles (open rectangles), and 95% confidence interval (lines) patristic distance values expressed as percent of nucleotide changes within the entire plexus (*G. sacculifer* s.l.) and within each of the four morphotypes of the plexus. For *T. truncatulinoides* and *G. inflata*, the patristic genetic distances within genotypes (Types I to IV of *T. truncatulinoides*, Types I and II of *G. inflata*) are also given. Note the changes in the left-hand scale of patristic distances.

4. Discussion

4.1. Genetic Diversity in *Globigerinoides sacculifer*

The results of our survey of the *G. sacculifer* plexus are in stark contrast with the expectation based on other species of planktonic foraminifera. All extensively genetically studied morphospecies of modern planktonic foraminifera have so far revealed the presence of more than one distinct genetic type (see review in Darling and Wade 2008). The absence of genetic variability in the SSU rDNA region within the global population of the plexus contrasts with the large differences among genetic types in all other intensively studied spinose planktonic foraminiferal species (Göker et al. 2010). However, this alone cannot be taken as unambiguous evidence for the absence of genetic types. In the non-spinose planktonic foraminiferal species *Truncorotalia truncatulinoides* (de Vargas et al. 2001) and *Globoconella inflata* (Morard et al. 2011), inter-genotype variability consistently appears at the level of the faster-evolving ITS-1 region.

To exclude the possibility that genetic differentiation in the *Globigerinoides sacculifer* plexus is also first manifested in this region, we have supplemented the SSU rDNA survey with a large data set of partial and complete ITS-1 sequences. These ITS-1 sequences show a higher degree of variability than the SSU data, which appears in two different ways. First, one consistent sequence pattern (haplotype) was found only in the Atlantic, and second, a number of minor variations (SNPs) were found throughout the world ocean (Fig. 23). This degree of variation is consistent with a population-level signal, and the number of substitutions separating individuals is more than 15 times lower than among ITS-1 genotypes of both *Truncorotalia truncatulinoides* and *Globoconella inflata* (Fig. 24 and Table 15), which constitute the only reference points for this rDNA array. The available ITS-1 data on the *G. sacculifer* plexus thus do not indicate the presence of distinct genetic types and the observed variability is not correlated with morphological taxonomy within the plexus.

Table 15: patristic genetic distances (in percent) among morphospecies (and among cryptic species for *Truncorotalia truncatulinoides* and *Globoconella inflata*) derived from Muscle and Clustal W automatic alignments. Clustalw + G-block represents Clustal alignments cured using the G-block software. Regular and bold characters for mean and maximum distances, respectively. Distances above 100 % are underlined.

ITS	MUSCLE	Clustal W	Clustal W + G-block
<i>Globigerinoides sacculifer</i>	0.77 / 4.93	0.77 / 4.34	1.10 / 3.49
<i>Truncorotalia truncatulinoides</i>	34.1 / 63.6	61.5 / <u>126</u>	41.8 / 82.7
Type I	1.53 / 2.20	1.54 / 2.10	1.20 / 1.92
Type II	2.58 / 6.36	2.32 / 5.40	1.82 / 4.35
Type III	2.86 / 5.96	2.77 / 6.85	1.85 / 4.35
Type IV	1.65 / 2.35	1.46 / 2.10	0.92 / 1.65
<i>Globoconella inflata</i>	11.8 / 37.3	44.3 / <u>167</u>	18.8 / 87.2
Type I	6.62 / 25.3	8.53 / 36.8	4.20 / 16.7
Type II	7.6 / 23.4	43.1 / <u>149</u>	16.90 / 81.5

4.2. Morphological Taxonomy versus Genetic Divergence

Similar lack of rDNA diversity has been documented in several deep-sea benthic foraminifera (e.g., Tsuchiya et al. 2009; Majewski and Pawlowski 2010), but until now, all detailed morphogenetic comparisons in planktonic foraminifera indicated a higher degree of genetic differentiation than that suggested by morphological taxonomy (Huber et al. 1997; Darling et al. 2006; Morard et al. 2009, 2011; Aurahs et al. 2011; Quillévéré et al. 2012). This would suggest that morphological taxonomy consistently underestimates the biological diversity in planktonic foraminifera, a pattern reported from many other groups of organisms (e.g., Bickford et al. 2007). If this pattern could be extrapolated into the fossil record and if the relationship between morphological taxonomy and genetic divergence remained similar, then the fossil record of planktonic foraminifera could indeed be used to infer processes at the level of biological species. Our results challenge this assumption by showing that at least in one case in the modern planktonic foraminifera, the degree of genetic differentiation is lower than that suggested by morphological taxonomy. The existence of at least four morphological species (Fig. 19), of which at least two have been extensively used for modern members of the *Globigerinoides sacculifer* plexus (i.e., *G. sacculifer* [s.s] and *G. trilobus*), contrasts with the lack of genetic differentiation in the studied gene regions. This implies that the

morphological variability within the plexus has been, so far uniquely among planktonic foraminifera, taxonomically over-interpreted.

To underline the anomalous lack of genetic differentiation within the *Globigerinoides sacculifer* plexus, we have compiled data on the number of genetic types, number of synonyms, ages, and abundances of seven morphospecies of modern spinose planktonic foraminifera for which extensive genetic data are available (Fig. 25). Whereas there does not appear to be any relationship between the number of genetic types and abundance (expressed as mean number of CHRONOS reports of the species per million years), we observe positive correlation between the number of genetic types and age of the morphospecies and the number of synonyms that exist for the morphospecies. In both cases, *G. sacculifer* deviates from the general relationship. Interestingly, next to *G. sacculifer*, the largest deviation from the relationship is shown by *Orbulina universa*, the sister species to *G. sacculifer*. When both species are removed, the coefficients of determination increase from 0.09 to 0.73 for species age and from 0.27 to 0.87 for the number of synonyms (Fig. 25). We note that the estimate of the number of synonyms for each of the analyzed species is fraught with a considerable level of subjectivity. For example, when only synonyms that appear in the CHRONOS database are used, the deviation of *O. universa* and *G. sacculifer* from the rest of the test group remains, but the correlation within the rest of the test group is much weaker.

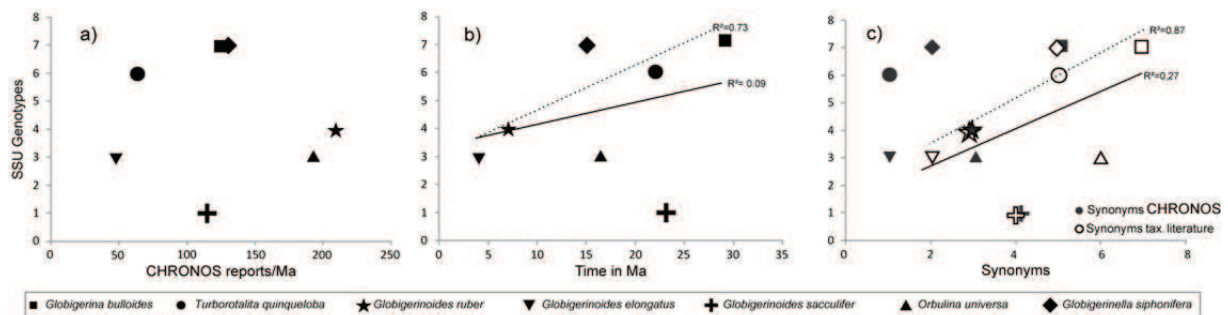


Figure 25: relationships between the number of reported SSU rDNA genotypes in the seven extensively studied spinose planktonic foraminiferal morphospecies and the average number of the morphospecies reports per million years from the CHRONOS database (A), the age of the morphospecies (after Kucera and Schönfeld 2007; Aurahs et al. 2011) (B), and the number of junior synonyms for the morphospecies collated from the literature (open symbols: Saito et al. 1981; Kennett and Srinivasan 1983) and from the CHRONOS database (black symbols) (C). Dotted lines in B and C indicate linear regressions for all species (in C for literature synonyms); solid lines indicate linear regressions without *G. sacculifer* and *O. universa* (see text). Coefficients of determination for regression without those two species are significant at the 5% level (t -test for $r = 0$), but we note that the sample size in this case is too small for a robust statistical assessment.

Although observations are not phylogenetically independent, and although the sample size is small for a robust statistical analysis, these results suggest that the number of genetic types in planktonic foraminiferal morphospecies is generally proportionate to the age of the morphospecies (thus opportunity for speciation) and the number of synonyms (thus indication for morphological divergence), but that this relationship does not apply (or is offset) for the members of the *Orbulina universa*–*Globigerinoides sacculifer* clade. Either some types of morphological variability in planktonic foraminifera are more prone to taxonomic treatment or there exists an objective difference in the rate of biological speciation among clades of planktonic foraminifera. Either way, the fact that the relationship between morphological and genetic diversity in planktonic foraminifera is not consistently scaled implies that the fossil record of this group does not necessarily reflect species-level processes, contrary to the assumption of many paleobiological studies.

4.3. Significance of Morphological Variation in the Globigerinoides sacculifer Plexus

The lack of correlation between morphological features of the shell used in taxonomic concepts within the *G. sacculifer* plexus and actual genetic differentiation requires an alternative explanation for the observed morphological variability. One clue to the meaning of the morphological variation within the plexus could potentially come from the fossil record. To this end, we have compiled data on the occurrence of the four main members of the plexus (Fig. 19) from the CHRONOS database of species occurrence records in deep-sea sediments (Fig. 26). We realize that these data reflect a combination of objective morphological observations and subjective usage of the four taxonomic concepts. Seen from this perspective, the data indicate that the four taxonomic concepts have been applied to fossil specimens throughout the stratigraphic range of the plexus, beginning almost immediately after the oldest records of the plexus. The most commonly used labels for members of the plexus have been *G. trilobus* and *G. sacculifer*, with *G. immaturus* consistently being rarely used and *G. quadrilobatus* being used preferentially in the Miocene. The latter two names have apparently never been used in the Atlantic Ocean (Fig. 26). If the taxonomic concepts of the four members of the plexus were used consistently by the workers whose biostratigraphic data are compiled in the CHRONOS database, then one could conclude that the morphological

variability encompassed in these four taxonomic concepts (Fig. 19) has been a persistent feature of the plexus throughout its existence. Combined with the observed lack of correlation between morphology and genetic distinction, the fossil data thus appear to support the conclusion that the morphological traits used to define the four main taxonomic concepts within the plexus are not evolutionarily relevant.

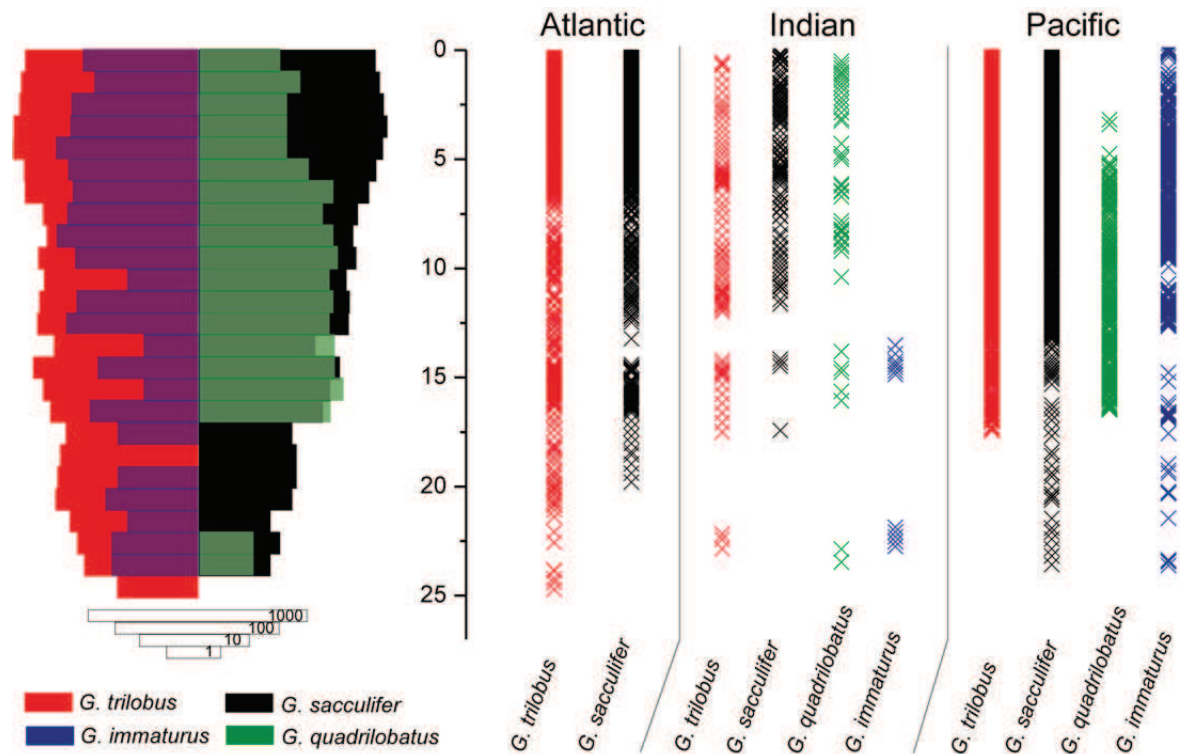


Figure 26: analysis of stratigraphic occurrences of the four main members of the *Globigerinoides sacculifer* plexus as recorded in the CHRONOS database (see methods). The left-hand diagram shows total occurrences averaged per 1-million-year intervals on a logarithmic scale. The right-hand diagram plots the actual dated record separately for the three main ocean basins.

Instead, the morphological variability could reflect marked differences in morphology during the individual growth, which becomes differentially expressed in individuals of different sizes. This argument is supported by the apparent differences in shell size among the species holotypes, where the honeycomb wall structure in relation to shell size is considerably less prominent in *Globigerinoides sacculifer* and *G. quadrilobatus* than in the other two species. This difference is also reflected in the individuals from our collection displayed in Figure 19. The specimens in our collection that we identified as *G. trilobus* and *G. immaturus* were significantly smaller in size than the *G. quadrilobatus* and *G. sacculifer* specimens. Indeed, culturing experiments and observations in the plankton from the Red Sea have been interpreted by Hemleben et al. (1987) as evidence that the sac-like terminal chamber that

characterizes the morphotype *G. sacculifer* s.s. is an ontogenetic feature, not developed on all individuals that reach reproductive maturity.

Alternatively, the morphological variability within the plexus could represent an ecophenotypic signal, with different morphologies being expressed under different environmental conditions. The ecophenotypic plasticity is a typical feature of species of planktonic foraminifera (e.g., Kennett 1976). For the *Globigerinoides sacculifer* plexus, Hecht (1974) studied the distribution of specimens with the sac-like final chamber as well as the morphology of specimens without the sac-like chamber. He concluded that the abundance of the sac-like chambers within the plexus increased toward the tropics. This observation is clearly supported by an analysis of the MARGO North Atlantic data set of core-top abundances (Fig. 27). Specimens with and without the final sac-like chamber occur within the same range of temperatures, but the abundance of the *G. sacculifer* s.s. morphotype increases with temperature. It is therefore likely that the manifestation of some or all of the morphological types within the plexus reflects a combination of the existence of different ontogenetic growth stages, which are differentially reached under different environmental conditions. As a consequence, our results imply that all modern representatives of the plexus should be treated as members of a single biological species. Of the four main members of the plexus, *G. sacculifer* is the only one whose original description (Brady 1877) refers to it as occurring in the modern plankton; all other names referring exclusively to fossil material. By the principle of priority, the name *G. quadrilobatus* (d'Orbigny 1846) should be considered the senior synonym for the plexus. However, because we cannot entirely exclude the possibility that the fossil representatives of the plexus with different morphologies could represent different species, we propose that the name *G. sacculifer* be used for all modern specimens of the plexus. The use of “with sac” or “without sac” (i.e., presence or absence of a sac-like final chamber) should be used solely as the description of morphotypes within this species.

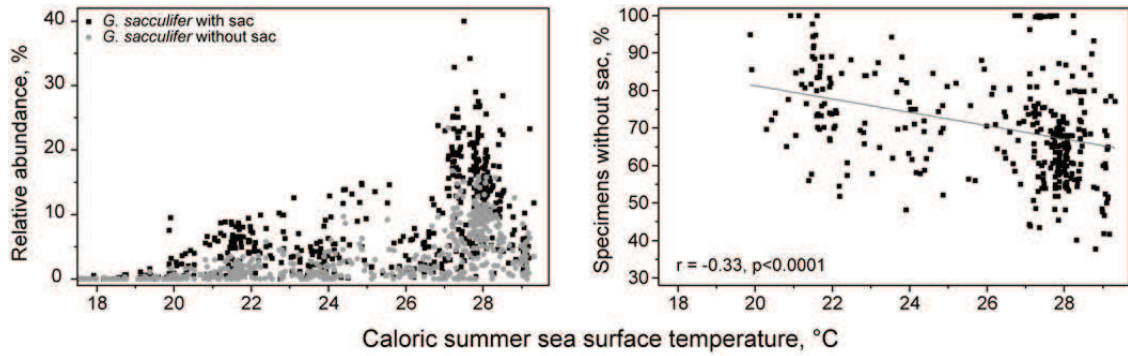


Figure 27: left, abundance of *Globigerinoides sacculifer* with and without the sac-like terminal chamber in surface sediments of the North Atlantic plotted against caloric summer SST at 10 m depth (abundance and SST data from Kucera et al. 2005). Right, proportion of specimens without the sac-like chamber in all samples where the abundance of both forms together was higher than 5% in the assemblages; the line shows linear regression; its statistical significance is shown in the figure.

4.4. Global Dispersal and Gene Flow in *Globigerinoides sacculifer*

The fact that same haplotypes on the SSU and ITS-1 sequences in *G. sacculifer* are found globally, throughout the subtropical and tropical habitat of the species, implies either ongoing and effective gene flows or an extremely reduced substitution rate (see also Darling et al. 1999). The latter hypothesis is not consistent with the observed existence of insertion and deletion and polymorphic sites in the ITS-1 region in the species (Fig. 23), which indicates ongoing intra-population differentiation. In addition, *G. sacculifer* and *Orbulina universa* consistently cluster as sister species in SSU rDNA phylogenies (Darling et al. 1997; de Vargas and Pawlowski 1998; Aurahs et al. 2009b), but their ITS-1 sequences are so derived that they cannot be aligned (Fig. 23). As a consequence, we conclude that the lack of geographic differentiation in *G. sacculifer* probably does not result from a slowdown in evolutionary rate. Instead, the data appear more consistent with the existence of an ongoing (or very recent) effective gene flow among the partly disjunct warm-water populations of the species between the Indo-Pacific and the Atlantic. Because planktonic foraminifera are passively dispersed by surface currents, this conjecture implies that the transport of specimens or propagules of this species by the Agulhas Current and Agulhas Rings from the Indian Ocean into the South Atlantic is effective enough to saturate the Atlantic population with specimens carrying Indo-Pacific haplotypes.

Indeed, Peeters et al. (2004) report large standing stocks of *Globigerinoides sacculifer* from plankton nets samples retrieved in isolated Agulhas Rings in the Southern Atlantic. The passive transport of this species into the Atlantic is clearly visible in the pattern of its

abundance in surface sediment samples (Fig. 28). Considering the pattern of surface current flow between the two oceans (Beal et al. 2011), the advection of *G. sacculifer* between the Indo-Pacific and the Atlantic is at present mainly unidirectional. In fact, the transport is likely to have remained unidirectional since the closure of the Panama Isthmus in the Pliocene (Groeneveld et al. 2006).

The unidirectionality of the gene flow in *Globigerinoides sacculifer* from the Indo-Pacific into the Atlantic is consistent with the occurrence of an exclusively Atlantic ITS-1 haplotype (Fig. 23). We hypothesize that this haplotype originated in allopatry, during an intermittent isolation of the Atlantic Ocean, but its evolution was not associated with the development of intrinsic reproductive isolation mechanisms, such that inbreeding was not prevented upon secondary contact with the Indo-Pacific population. This is evidenced by the fact that the Atlantic haplotype occurs together with the dominant global haplotype in the same specimens. Considering that it is only found in the faster-evolving ITS-1 and does not correspond to a differentiation signal in the SSU, and that there is no evidence for genetic recombination between the haplotypes, we conclude that its occurrence reflects a recent isolation event. The most recent opportunity for isolation between the Indo-Pacific and the Atlantic (sub)tropical water masses occurred during the last glacial maximum, when the circum-Antarctic currents were displaced toward the north and constricted the Agulhas exchange (Flores et al. 1999; Peeters et al. 2004; Bard and Rickaby 2009; Beal et al. 2011). The chance for westward advection of individuals of *G. sacculifer* around the Cape was thus considerably reduced, as the environment that had to be crossed to reach the Atlantic became too cold (Fig. 28), close to the temperature tolerance of the taxon (14-32 °C [Bijma et al. 1990]). The resulting restriction of the passive transport of *G. sacculifer* around the Cape is reflected in the abundance of this species in deep-sea sediments from the region that have been dated to the last glacial maximum (Fig. 28).

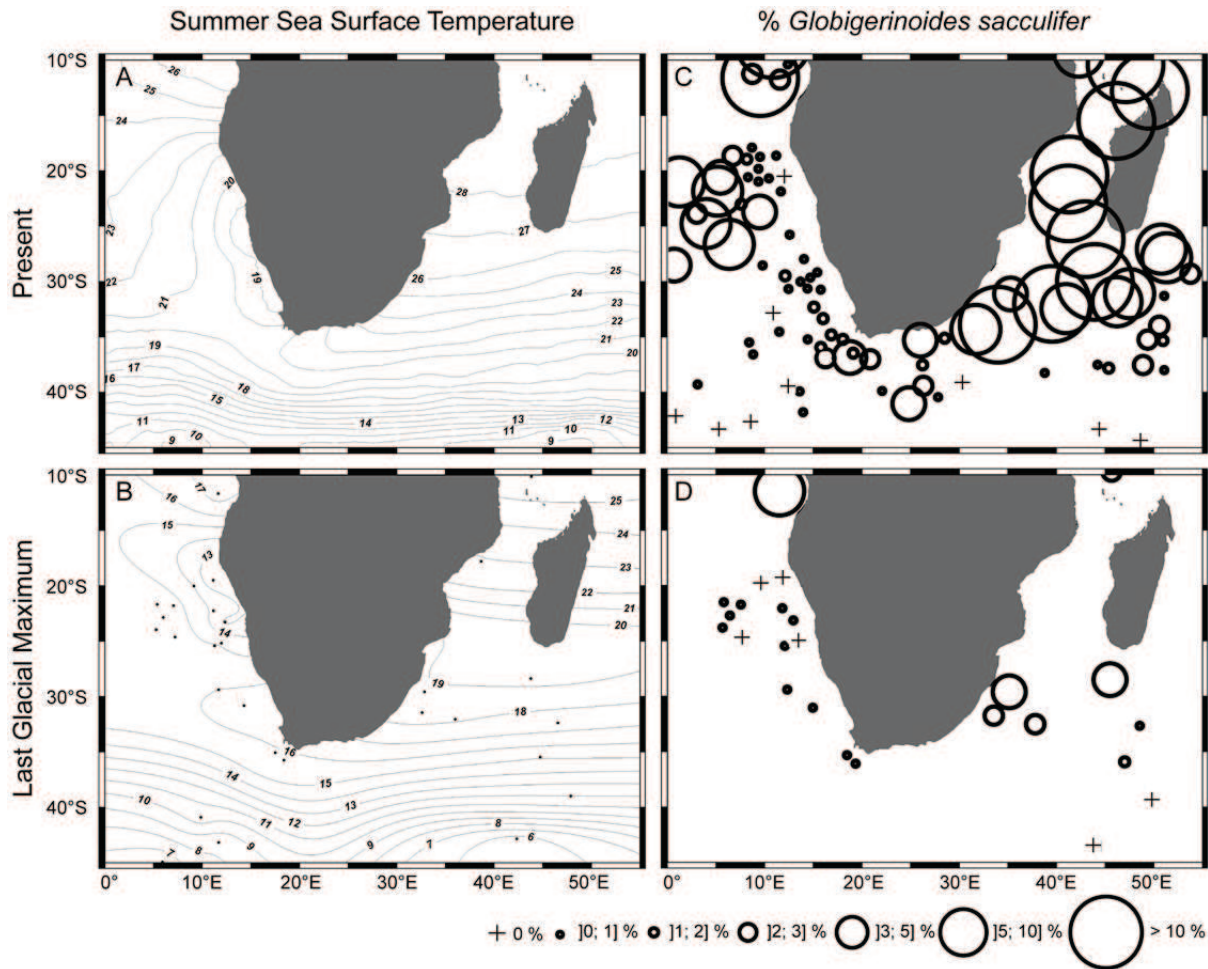


Figure 28: modern (A) and last glacial maximum (B) summer sea-surface temperatures (data from the MARGO Project Members [2009]) in the Atlantic and Indian Oceans around southern Africa. The right-hand maps show relative abundances of the *Globigerinoides sacculifer* plexus (i.e., including specimens with and without sac-like final chamber) in planktonic foraminiferal assemblages from surface sediments (C) and last glacial maximum sediments (D). Each symbol represents one locality. The abundance data are from Kucera et al. (2005) and Barrows and Juggins (2005).

In this model, the intermittent restriction of the gene flow between Indo-Pacific and Atlantic populations of *Globigerinoides sacculifer* on glacial/interglacial time scales would have been too short to result in the evolution of distinct SSU genetic lineages. If the propensity of *G. sacculifer* to maintain an effective gene flow between the two basins during interglacials has been a persistent attribute of the species throughout its existence, then these two mechanisms combined could explain why only a single global SSU genetic type is found today within the *G. sacculifer* plexus. The only other plausible explanation for the lack of genetic differentiation would be the existence of a recent population bottleneck. Here, any genetic variability that had developed over time in the *G. sacculifer* plexus would have been reset by an extinction event, sparing only a small, genetically homogeneous population from

which all the modern representatives would have descended. Low levels of genetic diversity have been shown in planktonic foraminifera thought to have undergone such recent bottlenecks (e.g., Aurahs et al. 2009a). However, the fossil distribution of the *G. sacculifer* plexus does not indicate any evidence for a population bottleneck (Figs. 26, 28). To our knowledge, in the literature, such an event has never been reported for *G. sacculifer* at any time throughout the existence of the species.

5. Conclusions

Our survey of the genetic variability in the modern representatives of the *Globigerinoides sacculifer* plexus reveals the existence of a single genetic type. The lack of cryptic genetic diversity is in stark contrast to the morphological variability and the usage of multiple taxonomic concepts for members of this plexus. Our results imply that at least in the modern plankton, the morphospecies *G. sacculifer*, *G. immaturus*, *G. trilobus*, and *G. quadrilobatus* all correspond to a single biological species with a cosmopolitan distribution. In paleoceanographic reconstructions based on morphological and/or chemical signals in the fossil shells of planktonic foraminifera, the assumption is indirectly made that each morphospecies corresponds to a biological species adapted to a unique habitat and possessing unique biomineralization physiology. Over the last decade, this assumption has been called into question by extensive genetic surveys, which revealed the existence of multiple distinct and differentially adapted genetic types within individual morphospecies (de Vargas et al. 1999, 2002; Darling and Wade 2008; Morard et al. 2009; Quillévéré et al. 2012). In the case of *G. sacculifer*, the assumption of the congruence between morphological and biological species is violated in the opposite direction: multiple morphotypes correspond to a single species. This observation is significant because it shows not only that the morphological taxonomy does not reflect genetic differentiation, but also that the scaling between the two may be inconsistent.

The lack of geographic structuring among the surveyed specimens is interpreted as evidence for an effective gene flow from the Indo-Pacific into the Atlantic tropical and subtropical habitats of the species. The existence of an exclusively Atlantic ITS-1 haplotype indicates that this gene flow can be intermittently reduced, most likely during glacial intervals, but the latest disruption apparently has not been sufficient to result in speciation. If the propensity for “genetic homogenization” following short periods of isolation was a persistent feature in the evolutionary history of the species, then the fossil record of the *G. sacculifer* plexus could be interpreted as the occurrence of a long-ranging single, ecologically successful, morphologically variable lineage.

Acknowledgments

We thank L. Konecny, M. Bayer, W. Rönnfeld, N. Buchet, Y. Gally, and L. Licari for technical assistance and G. W. Grimm for comments on the manuscript. Y. Ujié is also warmly thanked. We acknowledge the assistance of the Master and the crew of the cruises during which the presented material has been collected: Pos321 and 334, M69, 72 and 74, MSM 8 and 15, AMT-8, Revelle, OISO, C-MarZ, Kt-02 and Kt-06, Melville, Gyrafor A and B. Special thanks are given to the Institut Polaire Français Paul Emile Victor (IPEV). This work was supported by grants from the IFR41 of Université Lyon1 (F.Q.), from the Institut National des Sciences de l'Univers (INSU) INTERRVIE program (F.Q.), from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-JCJC-0142-01 PALEO-CTD, T.d.G.T.; ANR 09-BLAN-0348 POSEIDON, C.d.V. and R.M.). A.W., R.A., and M.K. were financed by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG projects KU 2259/2-2 and KU 2259/19-1).

References

- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *Institute of Electrical and Electronics Engineers Transactions on Automatic Control*, 19: 716-723.
- Aurahs, R., Göker, M., Grimm, G., Hemleben, V., Hemleben, C., Schiebel, R. and Kucera, M., 2009. Using the multiple analysis approach to reconstruct phylogenetic relationships among planktonic foraminifera from highly divergent and length-polymorphic SSU rDNA sequences. *Bioinformatics and Biology Insights*, 3: 155-177.
- Aurahs, R., Grimm, G., Hemleben, V., Hemleben, C. and Kucera, M., 2009. Geographical distribution of cryptic genetic types in the planktonic foraminifer *Globigerinoides ruber*. *Molecular Ecology*, 18: 1692-1706.
- Aurahs, R., Treis, Y., Darling, K. and Kucera, M., 2011. A revised taxonomic and phylogenetic concept for the planktonic foraminifer species *Globigerinoides ruber* based on molecular and morphometric evidence. *Marine Micropaleontology*, 79: 1-14.
- Aze, T., Ezard, T., Purvis, T., Coxall, H., Stewart, D., Wade, B. and Pearson, P., 2011. A phylogeny of Cenozoic macroperforate planktonic foraminifera from fossil data. *Biological Reviews* 86: 900-927.
- Bandelt, H.J., Forster, P. and Röhl, A., 1999. Median Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48
- Banner, F.T. and Blow, W.H., 1960. Some primary types of species belonging to the superfamily Globigerinaceae. *Contributions from the Cushman Foundation for Foraminiferal Research*, 11: 1-45.
- Bard, E. and Rickaby, R.E.M., 2009. Migration of the subtropical front as a modulator of glacial climate. *Nature*, 560: 380-384.
- Bé, A.W., 1980. Gametogenetic calcification in a spinose planktonic foraminifer, *Globigerinoides sacculifer* (Brady). *Marine Micropaleontology*, 5: 283-310.
- Bé, A.W., Anderson, O.R., Faber, W.W. and Caron, D.A., 1983. Sequence of morphological and cytoplasmic changes during gametogenesis in the planktonic foraminifer *Globigerinoides sacculifer* (Brady). *Micropaleontology*, 29: 319-325.
- Beal, L.M., de Ruijter, W.P., Biastoch, A., Zahn, R. and SCOR/WCRP/IAPSO Working Group 136, 2011. On the role of the Agulhas system in ocean circulation and climate. *Nature*, 472: 429-436.
- Berggren, W.A., Kent, D.V., Swisher, C.C. and Aubry, M-P., 1995. A revised Cenozoic geochronology and chronostratigraphy. *Geochronology, time scales and global stratigraphic correlation*, SEPM (Society for Sedimentary Geology), Tulsa (Oklahoma).
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K. and Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22:148-155.
- Bijma, J., Erez, J. and Hemleben, C., 1990. Lunar and semi-lunar reproductive cycles in some spinose planktonic foraminifers. *Journal of Foraminiferal Research*, 20:117-127.

- Bijma, J., Hemleben, C., Oberhänsli, H. and Spindler, M., 1992. The effects of increased water fertility on tropical spinose planktonic foraminifers in laboratory cultures. *Journal of Foraminiferal Research*, 22:242–256.
- Brady, H.B., 1877. Supplementary note on the foraminifera of the chalk (?) of the New Britain group. *Geological Magazine London*, 4: 534–536.
- Budillon, F., Lirer, F., Iorio, M., Macri, P., Sagnotti, L., Vallefucio, M., Ferraro, L., Garziglia, S., Innangi, S., Sahabi, M. and Tonielli, R., 2009. Integrated stratigraphic reconstruction for the last 80 kyr in deep sector of the Sardinia Channel (Western Mediterranean). *Deep Sea Research Part II, Topical Studies in Oceanography*, 56: 725–737.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18:117–143.
- Darling, K.F., Kroon, D., Wade, C.M. and Leigh Brown, A.J., 1996. Molecular phylogeny of the planktic foraminifera. *Journal of Foraminiferal Research*, 26: 324-330.
- Darling, K.F., Wade, C.M., Kroon, D. and Brown, A.J., 1997. Planktic foraminiferal molecular evolution and their polyphyletic origins from benthic taxa. *Marine Micropaleontology*, 30: 251–266.
- Darling, K.F., Wade, C.M., Kroon, D., Brown, A.J.L. and Bijma, J., 1999. The diversity and distribution of modern planktic foraminiferal small subunit ribosomal RNA genotypes and their potential as tracers of present and past circulation. *Paleoceanography*, 14: 3-12.
- Darling, K.F., Kucera, M., Kroon, D. and Wade, C.M., 2006. A resolution for the coiling direction paradox in *Neoglobobulimina pachyderma*. *Paleoceanography*, 21: 1-14.
- Darling, K.F. and Wade, C.M., 2008. The genetic diversity of planktic foraminifera and the global distribution of ribosomal RNA genotypes. *Marine Micropaleontology*, 67: 216-238.
- d'Orbigny, A., 1846. Foraminifères fossiles du bassin tertiaire de Vienne (Autriche). Gide et Comp, Paris.
- de Vargas, C., Zaninetti, L., Hilbrecht, H. and Pawlowski, J., 1997. Phylogeny and rates of molecular evolution of planktonic foraminifera: SSU rDNA sequences compared to the fossil record. *Journal of Molecular Evolution*, 45: 285-294.
- de Vargas, C., and Pawlowski, J., 1998. Molecular versus taxonomic rates of evolution in planktonic foraminifera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9:463–469.
- de Vargas, C., Norris, R.D., Zaninetti, L., Gibb, S.W. and Pawlowski, J., 1999. Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 2864-2868.
- de Vargas, C., Renaud, S., Hilbrecht, H. and Pawlowski, J., 2001. Pleistocene adaptive radiation in *Globobulimina truncatulinoides*: genetic, morphologic, and environmental evidence. *Paleobiology*, 27: 104-125.
- de Vargas, C., Bonzon, M., Rees, N.W., Pawlowski, J. and Zaninetti, L., 2002. A molecular approach to biodiversity and biogeography in the planktonic foraminifer *Globobulimina siphonifera* (d'Orbigny). *Marine Micropaleontology*, 45: 101-116.

- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797.
- Flores, J.-A., Gersonde, R. and Sierro, F., 1999. Pleistocene fluctuations in the Agulhas Current Retroflexion based on the calcareous plankton record. *Marine Micropaleontology*, 37:1–22.
- Görker, M., Grimm, G.W., Auch, A.F., Aurahs, R. and Kucera, M., 2010. A clustering optimization strategy for molecular taxonomy applied to planktonic foraminifera SSU rDNA. *Evolutionary Bioinformatics*, 6: 97-112.
- Groeneveld, J., Steph, S., Tiedemann, R., Garbe-Schonberg, D., Nurnberg, D. and Sturm, A., 2006. Pliocene mixed layer oceanography for site 1241 using combined Mg/Ca and $\delta^{18}\text{O}$ analyses of *Globigerinoides sacculifer*. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, 202:1–27.
- Guindon, S. and Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52:696-704.
- Hecht, A.D., 1974. Intraspecific variation in recent populations of *Globigerinoides ruber* and *Globigerinoides trilobus* and their application to paleoenvironmental analysis. *Journal of Paleontology*, 48:1217–1234.
- Hemleben, C., Spindler, M., Breiting, I. and Ott, R., 1987. Morphological and physiological responses of *Globigerinoides sacculifer* (Brady) under varying laboratory conditions. *Marine Micropaleontology*, 12: 305–324.
- Hofker, J., 1959. On the splitting of *Globigerina*. *Contributions from the Cushman Foundation for Foraminiferal Research*, 10:1–9.
- Huber, B.T., Bijma, J. and Darling, K.F., 1997. Cryptic speciation in the living planktonic foraminifer *Globigerinella siphonifera* (d'Orbigny). *Paleobiology*, 23: 33-62.
- Huson, D.H., and Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 254–267.
- Kennett, J.P., 1976. Phenotypic variation in some recent and late Cenozoic planktonic foraminifera. *Foraminifera*, Academic Press, New York.
- Kennett, J.P. and Srinivasan, M.S., 1983. Neogene Planktonic Foraminifera: a Phylogenetic Atlas. Hutchinson Ross, Stroudsburg (Pennsylvania).
- Kooistra, W., Sarno, D., Balzano, S., Gu, H., Andersen, R.A. and Zingone, A., 2008. Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (Bacillariophyta). *Protist*, 159: 177–193.
- Kucera, M., Weinelt, M., Kiefer, T., Pflaumann, U., Hayes, A., Weinelt, M., Chen, M., Mix, A.C., Barrows, T.T., Cortijo, E., Duprat, J., Juggins, S. and Waelbroeck, C., 2005. Reconstruction of sea-surface temperatures from assemblages of planktonic foraminifera: multi-technique approach based on geographically constrained calibration data sets and its application to glacial Atlantic and Pacific Oceans. *Quaternary Science Reviews*, 24: 951–998.
- Kucera, M., and Schönfeld, J., 2007. The origin of modern oceanic foraminiferal faunas and Neogene climate change. *Micropalaeontological Society Special Publication*, 2: 409–426.

- Larkin, M.A., Blackshields, G., Chenna, N.P., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X, Version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947–2948.
- Leroy, L.W., 1939. Some small Foraminifera, Ostracoda and otoliths from the Neogene (“Miocene”) of the Rokan-Tapanoeli area, central Sumatra. [*Natuurkundig Tijdschrift Voor Nederlandsch Indië*](#), 99: 215-296.
- Lim, D.I., Kang, S., Yoo, H.S., Jung, H.S., Choi, J.Y., Kim, H.N. and Shin, I.H., 2006. Late Quaternary sediments on the outer shelf of the Korea Strait and their paleoceanographic implications. *Geo-Marine Letters*, 26: 287–296.
- Logares, R., Rengefors, K., Kremp, A., Shalchian-Tabrizi, K., Boltovskoy, A., Tengs, T., Shurtleff, A. and Klaveness, D., 2007. Phenotypically different microalgal morphospecies with identical ribosomal DNA: a case of rapid adaptative evolution? *Microbial Ecology*, 53: 549-561.
- Majewski, W., and Pawlowski, J., 2010. Morphologic and molecular diversity of the foraminiferal genus *Globocassidulina* in Admiralty Bay, King George Island. *Antarctic Science*, 22:271–281.
- MARGO project members, 2009. Constraints on the magnitude and patterns of ocean cooling at the last glacial maximum. *Nature Geoscience*, 2: 127-132.
- Morard, R., Quillévéré, F., Escarguel, G., Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T. Norris, R.D. and de Vargas, C., 2009. Morphological recognition of cryptic species in the planktonic foraminifer *Orbulina universa*. *Marine Micropaleontology*, 71: 148-165.
- Morard, R., Quillévéré, F., Douady, C.J., de Vargas, C., de Garidel-Thoron, T. and Escarguel, G., 2011. Worldwide Genotyping in the Planktonic Foraminifer *Globoconella inflata*: Implications for Life History and Paleoceanography. *Public Library of Science One*, 6: e26665.
- Paradis, E., Claude, J. and Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20: 289-290.
- Pawlowski, J., Bolivar, I., Fahrni, J., de Vargas, C., Gouy, M. and Zaninetti, L., 1997. Extreme differences in rates of molecular evolution of foraminifera revealed by comparison of ribosomal DNA sequences and the fossil record. *Molecular Biology and Evolution*, 14:498-505.
- Pawlowski, J., 2000. Introduction to the molecular systematics of foraminifera. *Micropaleontology*, 46: 1-12.
- Peeters, F., Acheson, R., Brummer, G.J., de Ruijter, W., Schneider, R., Ganssen, G., Ufkes, E. and Kroon, D., 2004. Vigorous exchange between the Indian and Atlantic oceans at the end of the past five glacial periods. *Nature* 430: 661–665.
- Posada, D. and Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Quillévéré, F., Morard, R., Escarguel, G., Douady, C.J., Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T. and de Vargas, C., in press. Global scale same-specimen morpho-genetic analysis of *Truncorotalia truncatulinoidea*: A perspective on the morphological species concept in planktonic foraminifera. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*.
- R Development Core Team, 2004. R: a language and environment for statistical computing.

- Reuss, A.E., 1850. Neue Foraminiferen aus den Schichten des österreichischen Tertiärbeckens. Denkschriften der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe 1: 365–390.
- Saez, A.G., Probert, I., Geisen, M., Quinn, P., Young, J.R. and Medlin, L.K., 2003. Pseudocryptic speciation in coccolithophores. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100: 7163–7168.
- Saito, T., Thomson, P.R. and Berger, D., 1981. Systematic index of Recent and Pleistocene planktonic foraminifera. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406–425.
- Siani, G., Paterne, M., and Colin, C., 2010. Late glacial to Holocene planktic foraminifera bioevents and climatic record in the South Adriatic Sea. Journal of Quaternary Science, 25: 808–821.
- Siccha, M., Trommer, G., Schulz, H., Hemleben, C. and Kucera, M., 2009. Factors controlling the distribution of planktonic foraminifera in the Red Sea and implications for the development of transfer functions. Marine Micropaleontology, 72:146–156.
- Spooner, M. I., Barrows, T.T., De Deckker, P. and Paterne, M., 2005. Palaeoceanography of the Banda Sea, and Late Pleistocene initiation of the northwest monsoon. Global and Planetary Change, 49: 28–46.
- Tolderlund, D.S. and Bé, A.W.H., 1971. Seasonal distribution of planktonic foraminifera in the western North Atlantic. Micropaleontology, 17: 297–329.
- Tsuchiya, M., Grimm, G.W., Heinz, P., Stögerer, K., Ertan, K., Collen, J., Brüchert, V., Hemleben, C., Hemleben, V. and Kitazato, H., 2009. Ribosomal DNA shows extremely low genetic divergence in a worldwide distributed, but disjunct and highly adapted marine protozoan (*Virgulinema fragilis*, Foraminiferida). Marine Micropaleontology, 70: 8–19
- Ujiie, Y. and Lipps, J.H., 2009. Cryptic diversity in planktic foraminifera in the northwest Pacific Ocean. Journal of Foraminiferal Research, 39: 145–154.
- Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T., Watanabe, S., Wiebe, P. and de Vargas, C., 2010. Coiling dimorphism within a genetic type of the planktonic foraminifer *Globorotalia truncatulinoides*. Marine Micropaleontology, 77: 145–153.
- Wade, C., Darling, K., Kroon, D. and Brown, A., 1996. Early evolutionary origin of the planktonic foraminifera inferred from SSU rDNA sequences comparison. Journal of Molecular Evolution, 43: 672–677.
- Williams, M., Schmidt, D.N., Wilkinson, I.P., Miller, C.G. and Taylor, P.D., 2006. The type material of the Miocene to Recent species *Globigerinoides sacculifer* (Brady) revisited. Journal of Micropaleontology, 25:153–156.
- Wilson, B., 2012. Biogeography and ecostratigraphy of Late Quaternary planktonic foraminiferal taphocoenoses in the Leeward Islands, Lesser Antilles, NE Caribbean Sea. Marine Micropaleontology, 86:1–10.

Chapitre 2 : un cas particulier, *Neogloboquadrina pachyderma*, morpho-espèce présentant une diversité morphologique d'origine écophénotypique

Ce deuxième chapitre s'intéresse au cas particulier des types génétiques de *Neogloboquadrina pachyderma*, au sens de Darling et al. (2006), c'est-à-dire n'incluant que les morphotypes sénestres, présents dans l'hémisphère sud. Cette morpho-espèce est fondamentale pour les reconstructions de l'océan austral, une région clef dans la régulation du climat global. Cette étude confirme que les trois types génétiques (II, III, IV) récoltés au niveau de l'océan austral présentent des distributions biogéographiques corrélées à la température mais aussi à la productivité primaire, ce qui ouvrirait la voie à l'amélioration des reconstructions paléocéanographiques de l'océan austral. Les Types III et IV de *N. pachyderma* présentent une forte diversité morphologique mais, contrairement à ce qui a été montré chez d'autres foraminifères planctoniques, les variations morphologiques ne reflètent pas la variabilité génétique au sein de cette morpho-espèce. Les Types III et IV de *N. pachyderma*, qui correspondent à des espèces distinctes (Partie I, chapitre 1) particulièrement divergentes (Partie I, chapitre 2), constituent donc le premier cas avéré de véritables espèces cryptiques chez les foraminifères planctoniques. L'origine des variations morphologiques (taille, contour, nombre de loges sur le dernier tour, taille de la dernière loge) est, chez ces types génétiques, d'origine écophénotypique.

Mots-clefs : *Neogloboquadrina pachyderma*, océan austral, biogéographie, morphométrie, éco-phénotypes

Fiches-méthodes : I, II, III, IV, V, VI

Ce manuscrit est en cours de préparation

Ont participé à ce chapitre : Aurore ANDRE (récolte, analyses, interprétations, rédaction), Frédéric QUILLVERE (interprétations, rédaction), Elisabeth MICHEL (récolte), Christophe DOUADY (conseils pour les analyses moléculaires)

Cryptic diversity and ecophenotypy in *Neogloboquadrina pachyderma* (planktonic foraminifera): molecular, morphological and environmental evidences from the Austral Ocean

Abstract

The Austral Ocean plays a key role in climate dynamics but because the use of most of the classical paleothermometers is limited in (sub)polar waters, obtaining robust estimates of Quaternary sea surface temperatures (SST) in this region remains challenging. In particular, planktonic foraminiferal assemblages there are not sufficiently diversified for the application of environmental transfer functions. (Sub)polar planktonic foraminifera are strongly dominated by the morpho-species *Neogloboquadrina pachyderma* and the resulting near-monospecific assemblages contain too little information to assign precise SST estimates. Recent morpho-genetic studies in several morpho-species of planktonic foraminifera have however shown that there is morphological and environmental differentiation among genetic types of these organisms, and that such additional information can be used to increase the resolving power of the transfer functions. Here, we present single-specimen combined molecular and morphological analyses performed on living *N. pachyderma* collected from plankton nets across a latitudinal environmental transect in the south Indian Ocean. Based on the development of a new RFLP protocol, we discriminate three genetic types of *N. pachyderma* (Types II, III and IV) in our samples. Our data confirm previous investigations from the South Atlantic. The distribution pattern of these (sub)polar genetic types is primarily controlled by SST and primary productivity variations observed across the oceanic fronts of the Austral Ocean. Finally, our data show that contrary to other morpho-species of planktonic foraminifera, there is no correlation between morphological and molecular differentiation in austral *N. pachyderma*. Rather, the important observed shell shape and size variations are ecophenotypic; they occur within each genetic type along latitudinal gradients. The austral genetic types of *N. pachyderma* therefore constitute a first demonstrated case for true cryptic diversity within modern morpho-species of planktonic foraminifera.

Keywords: *Neogloboquadrina pachyderma*, Austral Ocean, biogeography, morphometrics, eco-phenotype

1. Introduction

Fossil shells of planktonic foraminifera preserved in marine sediments constitute a major proxy for reconstructing Quaternary climate changes (e.g. Pflaumann et al., 1996; Kucera, 2007). Many of these reconstructions rely on quantitative empirical calibrations between extant environmental parameters of the surface oceans and the relative abundance of current morpho-species in surface sediments (CLIMAP, 1981; MARGO, 2009). Assuming that each of the counted morpho-species of planktonic foraminifera has a specific, stable through time relationship to water mass properties, these so call environmental transfer functions require a precise assessment of the ecology of modern species. Because the use of such species specific paleoproxy also requires an accurate level of taxonomic consistency, the morphological definition of these species has been set very broadly and morphological variations below the level of the morpho-species have been mostly regarded as ecophenotypy (e.g. Ericson, 1959; Banner and Blow, 1960).

Molecular study techniques applied to planktonic foraminifera have revealed a high level of genetic diversity within these organisms and challenge the ecological significance of the broadly defined morpho-species (e.g. Huber et al., 1997; de Vargas et al., 1999; de Vargas et al., 2001; Darling et al., 2007; Morard et al., 2011; Weiner et al., 2012; Ujiié et al., 2012). Phylogenetic analyses of ribosomal DNA of material sampled from plankton tows in the world oceans allowed to show that most of the morpho-species are made of several genetic types that are at least partially separated environmentally and geographically (see Darling and Wade, 2008 and André et al., in prep for reviews). Such environmental separation, associated with the large divergence values occurring among genetic types and the high degree of genetic similarity occurring within each type, strongly suggests that they correspond to genuine biological species (André et al., in prep.).

It has been shown in addition that morphological variations within certain morpho-species, for a long time treated as ecophenotypic variants, represent characters distinguishing among genetic types adapted to different water mass properties (Huber et al., 1997; de Vargas et al., 1999; 2001; Darling et al., 2006; Morard et al., 2009; 2011; Aurahs et al., 2011; Quillévéré et al., 2013). Such morphological characteristics, together with the presence of additional environmental information resulting from narrower ecological preferences of the genetic types, are clearly beneficial for paleoceanographers. They allow increasing the resolving power of the paleoceanographic reconstructions based on foraminiferal counts

(Kucera and Darling, 2002; Morard et al., 2013) and open up the research potential to transfer the information acquired through genetic analysis to the fossil record.

The Southern Ocean plays a key role in Quaternary climate dynamics. It constitutes the most important junction of the oceanic circulation, then controlling heat exchanges in the world ocean, and plays a major role in ocean chemistry (Broecker, 1982; Keir, 1988; Beckey and Gersonde, 2003). Furthermore, the circum-Antarctic current promoted the formation of Antarctica ice sheets which triggered global cooling of climates from the Oligocene (Zachos et al., 2001). Consequently, reconstructing past oceanic conditions in the Austral regions of the oceans is mandatory for our understanding of Quaternary climates. Unfortunately, at high latitudes of the south hemisphere, planktonic foraminiferal assemblages are strongly dominated by the single morpho-species *Neogloboquadrina pachyderma*, which accounts for ~75% to 100% of the assemblages (MARGO project members, 2009; Fig. 29). Since the prerequisite for the application of transfer functions is the presence of multiple species in the analyzed assemblages, surface sediments there contain too little information for their application. The use of other proxies of sea surface temperature reconstructions is also limited in (sub)polar waters. For example, $\delta^{18}\text{O}$ of polar waters, Mg/Ca ratios of planktonic foraminifera or alkenone saturation ratios of phytoplankton are often conflicting when estimating high latitude temperatures (Barker et al., 2005). Furthermore, proxies involving calcite shells analysis may be impacted either by carbonate dissolution or by salinity variations due to ice formation (Katz et al., 2010) and the high latitude alkenone producers remain uncertain (de Vernal et al., 2006). Considering the importance of obtaining estimates of water mass properties in Austral regions, studying morpho-genetic diversity and ecology in *N. pachyderma* may offer the opportunity to develop more accurate estimates. Indeed, Morard et al. (2013) showed that temperatures estimated through transfer functions were significantly more accurate when the 11 genetic types of 4 low to mid latitude morpho-species were included in the calibration datasets. Consequently, investigating *N. pachyderma* genetic diversity is a condition for applying this approach to Austral Ocean reconstructions.

Darling et al. (2006) evidenced that right and left coiling morphotypes of *N. pachyderma* are clearly distinct species that diverged during the Late Miocene. Consequently, in this paper, we refer to left coiling morphotypes as *N. pachyderma* and right coiling morphotypes as *Neogloboquadrina incompta* (Cifelli, 1961). *Neogloboquadrina pachyderma* is a non-spinose macroperforate species (Hemleben et al., 1989; Aze et al., 2011) which is abundant in sub-polar to polar waters of both hemispheres (Margo project members, 2009)

where it can over-winter in sea-ice (Dieckmann et al., 1991). This morpho-species is highly diverse morphologically. The number of chambers on the last whorl varies from 4 to 5 (Kennett and Srinivasan, 1983), the aperture ranges from a narrow slit to a high arched opening (Bandy, 1972; Kennett and Srinivasan, 1983) and the terminal chamber is often of reduced size (“kummerform” chamber, Olsson, 1973).

Sequencing of a ~1000 base pair (bp) fragment located at the 3' end of the small sub-unit region of the ribosomal genes (SSU rDNA) showed that *N. pachyderma* is a cluster of 7 genetic types (Darling et al., 2004; 2007). The Types I and VII are restricted to the polar waters of the North Atlantic and North Pacific, respectively, whereas the Types V and VI have been found isolated in the Benguela upwelling system only (Darling et al., 2007). South Atlantic representatives of *N. pachyderma* form a cluster of three genetic types, termed Types II, III and IV (Darling et al., 2004).

This paper focuses on the genetic types of *N. pachyderma* in the Southern Ocean. As Darling et al. (2004) suggested that the distribution of these types may be linked to the position of sub-polar and polar oceanic fronts, investigating morpho-genetic diversity in austral *N. pachyderma* paves the way for the development of new paleoceanographic markers for more precise reconstructions. Consequently, our first aim is to test if the latitudinal distribution of the genetic types observed in the South Atlantic Ocean (Darling et al., 2004) may be generalized to the whole Austral Ocean. For this, we describe and compare latitudinal distributions of the Types II, III and IV along a South Indian Ocean collecting transect that occurred during the years 2011 and 2012. Using genetic types of *N. pachyderma* as paleoceanographic markers would require their morphological identification in the fossil record. Previous studies (Eynaud et al., 2009; Moller et al., 2013) based on northern hemisphere *N. pachyderma* (Type I) suggested high eco-phenotypic variability within *N. pachyderma* while, for other morpho-species, genetic types are distinguishable through morphological features (Huber et al., 1997; de Vargas et al., 1999; 2001; Darling et al., 2006; Morard et al., 2009; 2011; Aurahs et al., 2011; Quillévéré et al., 2013). Thus, our second aim is to determine how morphological variations, genetic diversity and environmental conditions are linked within southern genetic types of *N. pachyderma*.

2. Material and Methods

2.1. Samples collection

The studied specimens of *Neogloboquadrina pachyderma* were collected onboard the *Marion-Dufresne* during the cruises OISO-19 and OISO-21 in the south Indian Ocean (Metzl, 2000), along a 30° latitudinal transect from subtropical to subpolar waters (Fig.29). The cruises took place during the austral summer and were separated by an interval of one year plus ten days (January 16th to January 30th 2011 for OISO-19 and January 28th to February 9th for OISO-21), and sampling sites were identical (Table 16). Living specimens were collected using a Multinet plankton tow with a 100 µm mesh size, between 500 m depth and the sea surface (Table 16). Right after sampling, live specimens were picked and carefully cleaned with a fine brush. During the cruise OISO-19, specimens were individually transferred into the GITC* DNA extraction buffer (Morard et al., 2009) and then stored at -20°C until further analysis in the laboratory. During the cruise OISO-21, specimens were dried during 24h at fridge temperature and stored at -20°C, before being individually transferred into the GITC* buffer solution in the laboratory and stored at -20°C until DNA extraction.

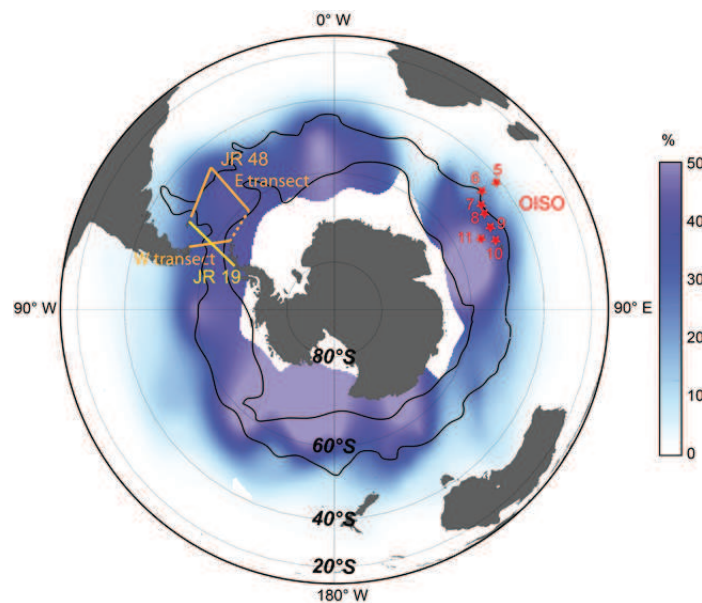


Figure 29: location of OISO stations (red stars) and JR cruises tracks (Darling et al., 2004). Blue shading indicates the relative abundance of *Neogloboquadrina pachyderma* in planktonic foraminiferal assemblages from surface sediments, interpolated from the MARGO database (Kucera et al. 2005; MARGO Project Members 2009) and the Brown University Foraminiferal Database (Prell et al., 1999). Black solid lines correspond to the northern and southern limits of the Antarctic circumpolar current (Carter et al., 2008).

Cruise	Station	latitude	longitude	date	net	<i>N. pachyderma</i>				
OISO-19	5	42.5°S	52.48°E	21/01/2011	0-20 m	0				
					20-40 m	13				
					40-60 m	14				
					60-80 m	1				
					80-100 m	1				
					200-300 m	0				
					300-400 m	2				
	7	47.7°S	58°E	23/01/2011	400-500 m	0				
					0-20 m	27				
					20-40 m	10				
					40-60 m	79				
					60-80 m	76				
					80-100 m	1				
					0-100 m	175				
					100-200 m	2				
					200-300 m	1				
					300-400 m	6				
					400-500 m	1				
	9	48.5°S	65°E	26/01/2011	0-20 m	74				
					20-40 m	8				
					40-60 m	34				
					60-80 m	71				
					80-100 m	14				
					0-100 m	295				
					100-200 m	11				
					300-400 m	11				
					400-500 m	5				
					10	50.67°S	68.42°E	30/01/2011	0-20 m	74
									20-40 m	22
	40-60 m	40								
	60-80 m	31								
	80-100 m	22								
	0-100 m	409								
	100-200 m	19								
	200-300 m	8								
300-400 m	19									
400-500 m	8									
11	56.5°S	63°E	28/01/2011	0-20 m					56	
				20-40 m	71					
				40-60 m	97					
				60-80 m	92					
				80-100 m	17					
				0-100 m	263					
				100-200 m	18					
				200-300 m	21					
				300-400 m	7					
				400-500 m	7					
				OISO-21	6	45°S	52,1°E	31/01/2012	0-100 m	54
7	47.4°S	57.6°E	02/02/2012		0-100 m	38				
8	48°S	60°E	02/02/2012		0-100 m	125				
9	48.3°S	65°E	06/02/2012		0-100 m	140				
					300-500 m	6				
10	50.4°S	68.25°E	09/02/2012		0-100 m	324				
11	56.3°S	63°E	07/02/2012		0-100 m	189				

Table 16: sampling strategies used during the OISO-19 and OISO-21 cruises. The number of *Neogloboquadrina pachyderma* for each depth range collection is reported for each sampling station.

2.2. Hydrographic data

During the cruises OISO-19 and OISO-21, temperature, salinity and chlorophyll-a fluorescence vertical profiles were obtained at same stations using a Conductivity Temperature and Depth (CTD) probe. In order to compare our observed distributions of genetic types of *N. pachyderma* in the south Indian Ocean to those evidenced at similar latitudes in the south Atlantic (Darling et al., 2004), we further extracted the temperature data recorded during these cruises JR19 and JR48 from the World Atlas Database. We built the temperature and fluorescence profiles for the Atlantic and Indian Oceans using Ocean Data View 4 (Schlitzer, 2011).

2.3. Sequencing and genotyping

2.2.1. DNA extraction, amplification and sequencing

DNA extractions of 531 specimens from the cruise OISO-19 and of 367 specimens from the cruise OISO-21 were performed using the GITC* protocol, which allows preserving the calcareous shells of the planktonic foraminifera for further morpho-genetic comparisons (Morard et al., 2009; 2011; Quillévéré et al., 2013). Samples were gently shaken and heated at 72°C for one hour; afterward they underwent propanol-ethanol purification. DNA was stored in 40µl of pure water and stored at -20°C.

We designed new *N. pachyderma*-specific primers termed NP1fb (5'-CCGGACACACTGAGGATTGACAGGCAATATC-3') and NP5r (5'-CTGTTGGGCTCTGAAAGCAACGAACGTG-3'), which, after a standard PCR protocol (Initial denaturation: 95°C/10 min; 94°C/30s-54°C/30s-72°C/30s repeated 44 times; Final extension: 72°C:10min), allow PCR-amplification of the DNA extraction products using a *Thermus aquaticus* YT-1 polymerase with 5' flap endonuclease activity (New England Biolabs). We amplified a 300 to 350 bp fragment localized at the 3' end of the SSU corresponding to the foraminiferal specific variable regions F1 and F2 (Fig. 30) as evidenced by Darling et al. (1997). This fragment is short but sufficient for distinguishing between the different genetic types of *N. pachyderma*. PCR products were sequenced directly using the primers used for PCR amplification on an ABI prism 3730XL sequencer (Applied Biosystems) from Biofidal (Vaulx-en-Velin, France) service provider.

2.2.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis

An alternative method, based on two steps, was developed for faster identification of the genetic types of *N. pachyderma* (Fig. 30). After amplification by the primers NP1fb/NP5r and migration of the PCR products on 3% agarose gel and ethidium bromide coloration, we found that the Type IV of *N. pachyderma* matches 300 bp fragments while the Types II and III match 350 bp fragments. In this first step, specimens of the Type IV were thus directly characterized. The second step, allowing discrimination between the Types II and III of *N. pachyderma*, was achieved based on a RFLP protocol. PCR products were digested using the endonuclease Taq α 1 (New England Biolabs), which cuts at sequence 5' TGCA 3'. We mixed 5 μ l of each PCR product with a solution containing 3.4 μ l of distilled water, 1 μ l of the buffer supplied by the manufacturer, 0.1 μ l of BSA and 0.5 μ l of enzyme and then incubated two hours at 65°C. After migration on 3 % agarose gel and ethidium bromide coloration, the Type II displayed a two-band pattern (one of the two bands being characteristically located at ~250 pb) and the Type III displayed a four-band pattern (one of the four bands being characteristically located at ~180 pb; Fig. 30).

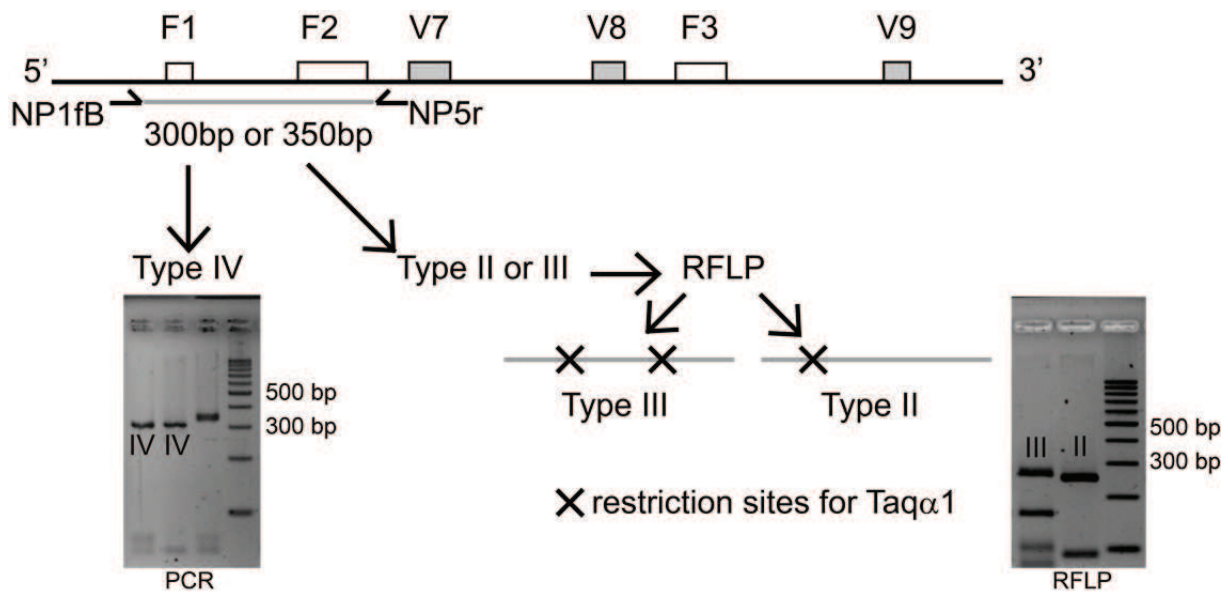


Figure 30: genotyping method for austral genetic types of *Neogloboquadrina pachyderma*. The region of rDNA corresponds to the last ~1000 bases of *N. pachyderma* SSU, V correspond to eukaryotic variables regions, F are foraminifer specific variable regions (Darling et al., 1997).

2.4. Morphological analyses

Shells of the genotyped or sequenced specimens were first observed under the dissecting microscope. The number of chambers on the last whorl and the relative size of the last chamber were reported. The number of kummerform specimens (i.e., specimens for which the size of the last chamber is equally or less developed than the penultimate chamber [Berger, 1969]), contra the number of normalform specimens was noted as well. A total of 65 shells, selected in order to maximize the morphological variability at each OISO-19 station, were further SEM pictured.

59 perfectly preserved shells were retained for further morphometric analyses. The remaining specimens were excluded from our analyses because of aberrant right-coiling direction or partly broken last chamber in one and five specimens, respectively. Sizes of the specimens were estimated using two measurements: the maximum diameter (Dmax) and the distance between the sutures of the first and third chamber on the last whorl (Dc1-c3) (Fig. 31). The Dmax gives the best overall estimation of the foraminifer size but is clearly influenced by the size of the last chamber. The Dc1-c3 is not impacted by the size of the last chamber and is homologous between individuals. We tested whether the genetic types display different sizes by comparing sizes of the Types III and IV across the entire OISO-19 transect using R v. 2.14.1 (R development core Team, 2004). In order to minimize environmental impact, we also ran the comparison tests for the station 11 alone, which is a particularly well-sampled station. Likewise, we compared the sizes of the Type III across latitude to detect putative environmental control over the size of the genetic types of *N. pachyderma*.

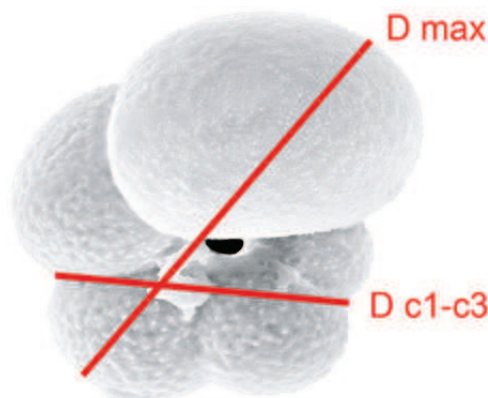


Figure 31: distances used for estimation of the shell size of analyzed *Neogloboquadrina pachyderma*.

Following Healy-Williams (1984), shape variation among specimens was appraised using two-dimensional shell outline analyses in umbilical views. The standard taxonomic edge view was not analyzed because this position was highly instable in the case of *N. pachyderma*, preventing any homologous positioning of the specimens. Each specimen was SEM photomicrographed and the ChainCoder program of SHAPE v. 1.3 (Iwata and Ukai, 2002) was used to extract shell outlines and to record them as a chain code. The size of the specimens was standardized thanks to the SEM picture scales.

Shell outlines were analyzed using the elliptical Fourier analysis (Kuhl and Giardina, 1982), which has successfully been applied to many studies of planktonic foraminiferal within morphospecies shape variations (e.g., de Vargas et al., 2001; Quillévéré et al., 2002; 2013; Renaud and Schmidt, 2003). In such analysis, any outline is described as a sum of trigonometric functions of decreasing wave-length, the harmonics (Healy-Williams, 1984; Foote, 1989), which allow constituting a data set of normalized Fourier descriptors suitable for statistical comparisons (Kuhl and Giardina, 1982). The Chc2Nef program of SHAPE calculated the elliptical Fourier descriptors using the chain code. We ran the analysis using two different normalizations: according to the first harmonic and according to the longest radius after defining a starting point located at the acute margin of the last chamber. Using the Princomp program of SHAPE, we appraised the extent of shape differentiation among genetic types of *Neogloboquadrina pachyderma* by applying a principal component analysis (PCA) to the Fourier descriptors data set. Such analysis is based on the variance-covariance matrix of the descriptors and allows reduction of the inter-individual shape variability to a few principal components (PCs) that best summarize the overall morphological variation within the dataset. Using PAST v.2.12 (Hammer et al., 2001), we calculated one-way multivariate analyses of variance (MANOVA) and associated pairwise tests of significance on the PC in order to test whether the differences observed between the PCA clusters are statistically significant. In order to test for correlations between size and morphology, we compared the sizes of the *N. pachyderma* among the PCA delineated clusters using R v. 2.14.1 (R development core Team, 2004).

3. Results

3.1. Identification of genetic types

A total number of 257 and 411 specimens of *Neogloboquadrina pachyderma* were successfully genotyped or sequenced from the OISO-19 and OISO-21 cruises material, respectively (Table 17). These specimens correspond to the genetic Types II (n = 17), III (n = 533), and IV (n = 101), previously defined by Darling et al. (2004) from a similar latitudinal transect in the South Atlantic. For 17 individuals recorded as Type II or III, PCR output was too low to undergo RFLP analysis or sequencing and discriminate between the Type II and the Type III. PCR success rate was low (~40 %) for the OISO-19 specimens whereas it was high (~90%) for the OISO-21 specimens (Table 17). Furthermore, the amount of DNA amplified from specimens collected during the cruise OISO-19 was in some cases not sufficient to apply our RFLP protocol.

Cruise	station	sampled	extracted	Genotyped			Sequenced			tot id	PCR success	
				II or III	II	III	IV	II	III			IV
OISO-19	5	30	26	5	0	0	0	2	1	2	10	38%
	7	378	80	12	0	0	2	1	17	0	32	40%
	9	523	89	0	0	22	1	0	29	0	52	58%
	10	652	131	0	0	9	1	0	10	3	23	18%
	11	649	206	0	0	29	36	0	41	34	140	68%
OISO-21	6	54	53	0	1	17	0	1	10	0	29	55%
	7	38	38	0	5	16	0	4	3	0	28	74%
	8	125	62	0	3	41	0	0	0	0	44	71%
	9	146	113	0	0	105	0	0	0	0	105	93%
	10	324	113	0	0	109	0	0	2	0	111	98%
	11	189	103	0	0	71	17	0	1	5	94	93%

Table 17: number of genetic-typed and sequenced *Neogloboquadrina pachyderma*. Sampled= number of specimens in GITC* buffer. II or III: individuals whose DNA PCR amplification was not sufficient to use the RFLP protocol, consequently types II and III are undistinguishable (Fig. 30). Tot id: number of *N. pachyderma* with genetic type identification.

3.2. Hydrography and geographic distribution of genetic types

Since both OISO-19 and OISO-21 collecting transects and stations were identical and occurred at the same period of the year, our dataset allowed us to compare conditions of the surface Ocean and related distributions of genetic types of *N. pachyderma* between the years 2011 and 2012. The Sub-Tropical (STF), Sub-Antarctic (SAF) and Polar (PF) Fronts (Ikeda et al., 1989) were localized along the OISO-19 and OISO-21 transects based on temperature (0-1000m) vertical profiles (Fig. 32). In the austral summer of 2011 and 2012, temperature conditions were almost similar with water masses well distributed according to latitude. As expected, polar waters south of the PF do not show any thermal stratification. Temperature vertical gradients, however, are visible between surface and deeper waters north of the PF but at the scale of the photic zone (upper 100m), this thermal stratification remains very weak throughout the latitudinal transect. We note that at similar period of the year, upper Ocean temperatures north of the STF and south of the SAF were significantly warmer in 2012 than in 2011 (Fig. 33). Positive thermal anomalies recorded in 2012 may have impacted surface water primary productivity, which appears significantly lower in 2012 (Fig. 32). Indeed, based on chlorophyll-a fluorescence vertical profiles recorded in 2012, we find that north of the SAF, the transition between oligotrophic and mesotrophic surface waters is particularly sharp, while it is far patchier in 2011, as a result of probable plankton blooms (diatoms were extremely abundant at sampling stations).

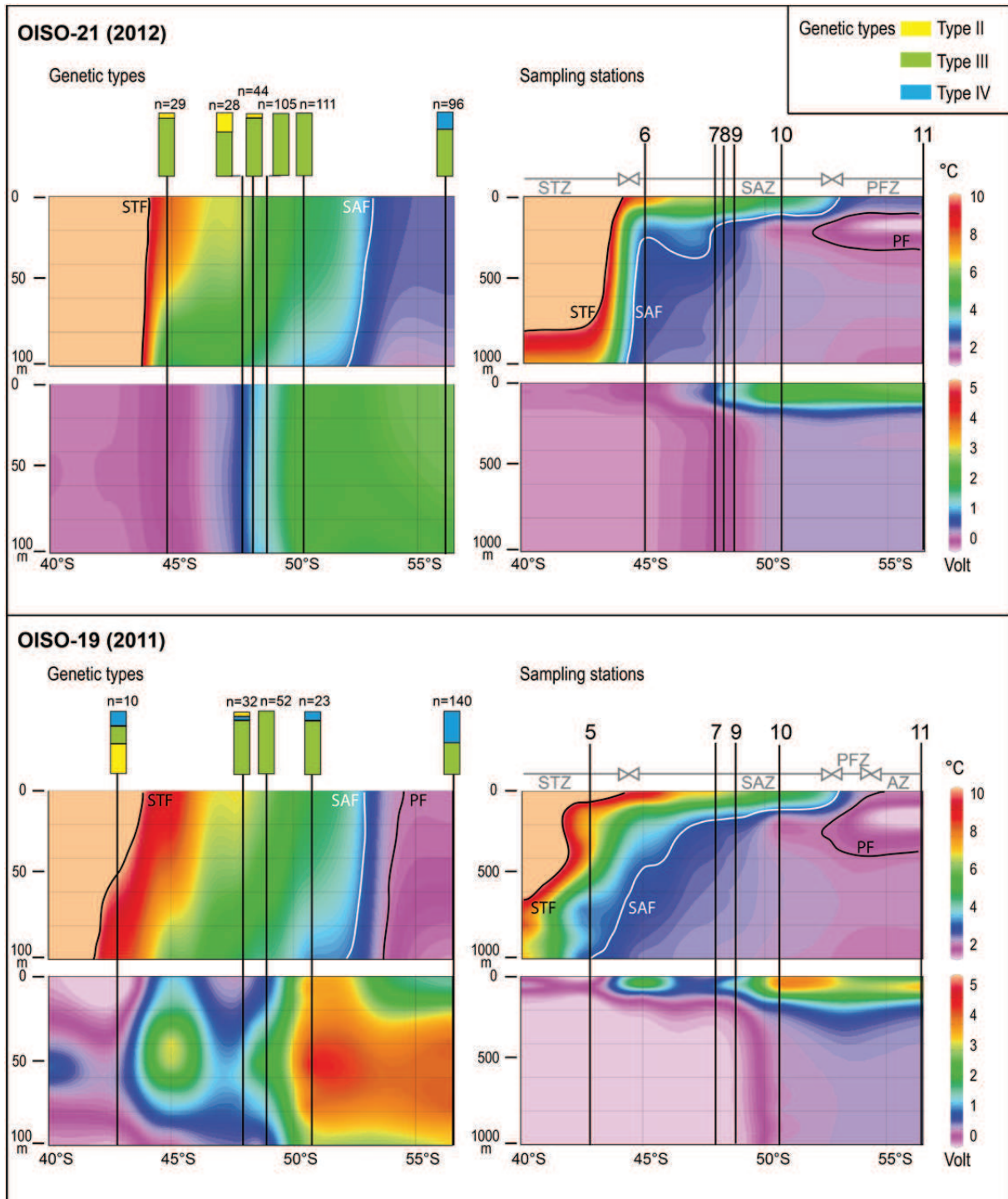


Figure 32: latitudinal distribution of genetic types of *Neogloboquadrina pachyderma* along temperature (°C) and fluorescence (Volt) profiles (0-100 m and 0-1000 m depths) crossed during the cruises OISO-19 (2011) and OISO-21 (2012). The number of genetic typed individuals and the relative abundances of genetic types are given for each station. STZ: Sub-Tropical Zone; SAZ: Sub-Antarctic Zone; PFZ: Polar Frontal Zone; AZ: Antarctic Zone; STF: Sub-Tropical Front; SAF: Sub-Antarctic Front; PF: Polar Front.

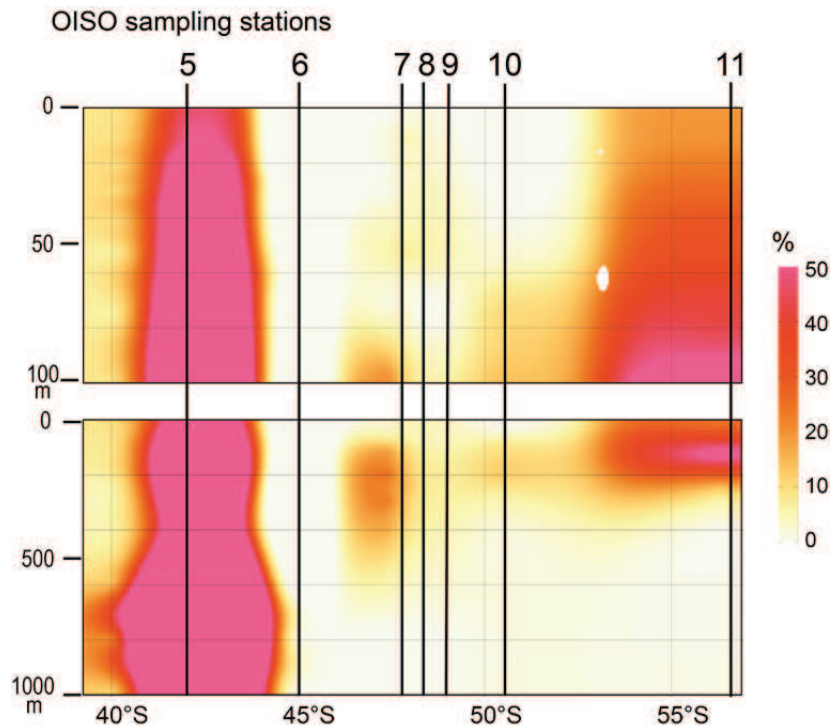


Figure 33: temperature anomalies (TAs) along the OISO-19 and OISO-21 transects (0-100 m and 0-1000 m depths). TAs are expressed as $TA (\%) = 100 \times (T_{OISO-21} - T_{OISO-19}) / T_{OISO-21}$. Positive anomalies correspond to higher temperatures measured during the cruise OISO-21 (2012) than during the cruise OISO-19 (2011). OISO-19 and OISO-21 sampling stations are positioned along the transect.

The distribution pattern of the genetic Types II, III and IV of *N. pachyderma* is shown in Fig. 32 and Table 17. Genetic types are not clearly segregated with latitude and multiple genetic types co-occur in 8 out of the 11 collected stations. Our data show that the Type III has been collected at all stations, where it is apparently dominant whatever the latitude. While the material collected during the cruise OISO-21 shows that the Type IV was restricted to the polar frontal zone, this genetic type was distributed in a different way during the cruise OISO-19, with specimens collected as far north as the STF. Finally, all specimens of the genetic Type II were collected north of the SAF. As shown on the basis of vertical distributions estimated during the cruise OISO-19 (abundances with depths were not counted during the cruise OISO-21), 80% to 99% of the collected *Neogloboquadrina pachyderma* were found in the first 100 m of the water column, with a maximum abundance corresponding to the chlorophyll-a maximum depth (Fig. 34), as expected for a diatom eater (Bergami et al., 2009). This suggests that we recorded the complete *N. pachyderma* genetic type assemblages for each of the collecting stations (Table 17).

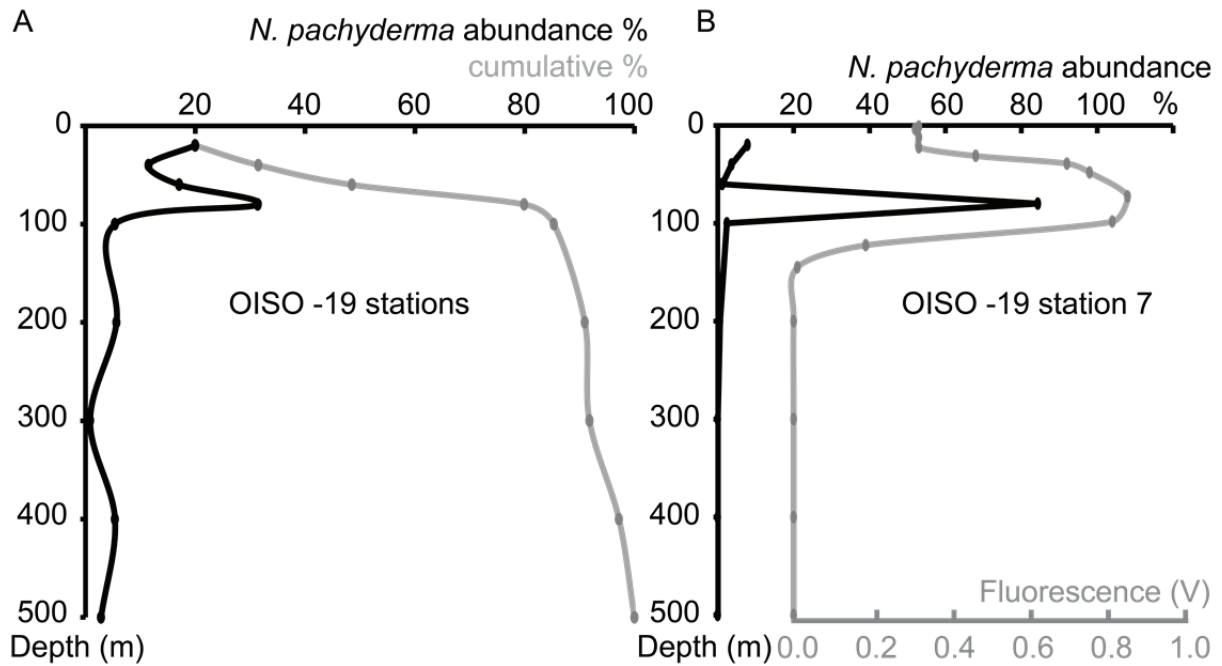


Figure 34: depth distribution of *Neogloboquadrina pachyderma* in the Southern Indian Ocean (0-500 m). A: black line: distribution of *N. pachyderma* for all OISO-19 stations; grey line: cumulative % of *N. pachyderma*. B: black line: depth distribution of *N. pachyderma* for station 7 (cruise OISO-19); grey line: fluorescence profile, corresponding to Chlorophyll-a, proxy of primary productivity, for the same station.

Unfortunately, due to the low PCR success rate obtained from the OISO-19 material and the lack of stratified sampling during the cruise OISO-21, depth distributions of the genetic types remain undetermined except at station 11 from OISO-19 (Fig. 29 and Table 18). For this station, we notice that the Type III of *N. pachyderma* is more abundant than the Type IV in surface waters (0-40 m) whereas in deeper samples (40-80 m), the Type IV significantly dominates the assemblages (p-value = 0.0018).

Cruise	Station	net	<i>N. pachyderma</i>				
			II	III or II	III	IV	
OISO - 19	5	20-40 m	2	1	2	0	
		40-60 m	0	2	0	2	
		300-400 m	0	1	0	0	
		7	0-100 m	1	12	17	2
	9	60-80 m	0	0	2	0	
		0-100 m	0	0	40	1	
		100-200 m	0	0	4	0	
		400-500 m	0	0	5	0	
	10	0-100 m	0	0	14	1	
		200-300 m	0	0	2	1	
		300-400 m	0	0	0	2	
		400-500 m	0	0	3	0	
	11	0-20 m	0	0	10	2	
		20-40 m	0	0	9	2	
		40-60 m	0	0	40	53	
		60-80 m	0	0	11	11	
		0-100 m	0	0	0	2	

Table 18: depth distribution of sequenced or genotyped *N. pachyderma*

3.3. Morphological analysis

Dissecting microscope observations (number of chamber on the last whorl and size of the last chamber) are summarized in Tables 19 and 20. We did not find any striking morphological differences among individuals of different genetic types. Likewise, no obvious relationship between genetic type and morphology could be observed on the basis of qualitative SEM observations and the morphological diversity within genetic types appeared remarkable (Figs. 35 and 36; Table 21). Shell porosity patterns of *N. pachyderma* were difficult to observe because of the small size of the pores ($\sim 1 \mu\text{m}$) and because they are often filled up by calcite. Yet, no difference in shell porosity between genetic types was observed (Fig. 36). Finally, there is no significant size differentiation between the Types III and IV (Table 22). We note however that shell size in the Type III increases with latitude between stations 7 and 10 and then decreases notably at higher latitudes (station 11; Fig. 37 and Table 23).

cruise	station	Kummerforms				Normalforms			
		total	type II	type III	type IV	total	type II	type III	type IV
OISO-19	5	1	0	1	0	6	1	4	1
OISO-19	7	1	0	1	0	19	1	16	2
OISO-19	9	4	0	3	1	44	0	44	0
OISO-19	10	5	0	4	1	17	0	14	3
OISO-19	11	9	0	7	2	114	0	53	61
OISO-21	6	4	1	3	0	19	1	18	0
OISO-21	7	5	3	2	0	21	6	15	0
OISO-21	8	6	0	6	0	30	2	28	0
OISO-21	9	14	0	14	0	74	0	74	0
OISO-21	10	13	0	13	0	86	0	86	0
OISO-21	11	8	0	7	1	75	0	56	19

Table 19: size of the last chamber and *Neogloboquadrina pachyderma* genetic types

cruise	station	4 to 4.5-chambers				4.5 to 5-chambers			
		total	type II	type III	type IV	total	type II	type III	type IV
OISO-19	5	4	0	2	2	3	1	2	0
OISO-19	7	5	1	4	0	15	0	13	2
OISO-19	9	21	0	19	2	17	0	15	2
OISO-19	10	14	0	11	3	5	0	4	1
OISO-19	11	77	0	37	40	11	0	7	4
OISO-21	6	5	0	5	0	6	2	4	0
OISO-21	7	9	4	5	0	7	3	4	0
OISO-21	8	16	0	16	0	9	1	8	0
OISO-21	9	18	0	18	0	36	0	36	0
OISO-21	10	34	0	34	0	23	0	23	0
OISO-21	11	35	0	24	11	9	0	7	2

Table 20: number of chambers on the last whorl and *Neogloboquadrina pachyderma* genetic types

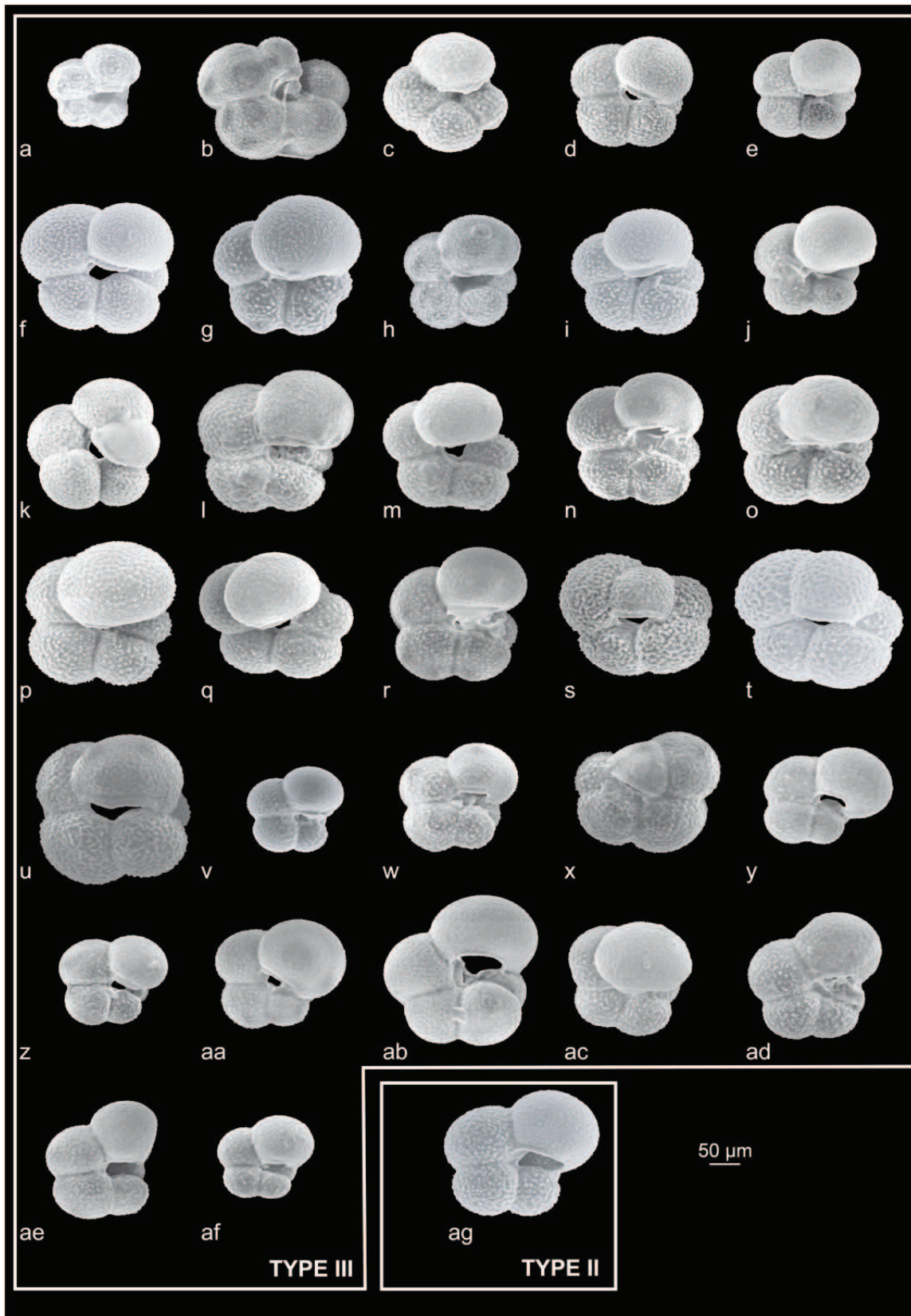


Figure 35: scanning electronic microscope (SEM) pictures of representatives of the Types II and III of *Neogloboquadrina pachyderma* collected during the OISO-19 cruise. Genetic types and sampling locations are summarized in Table 21.

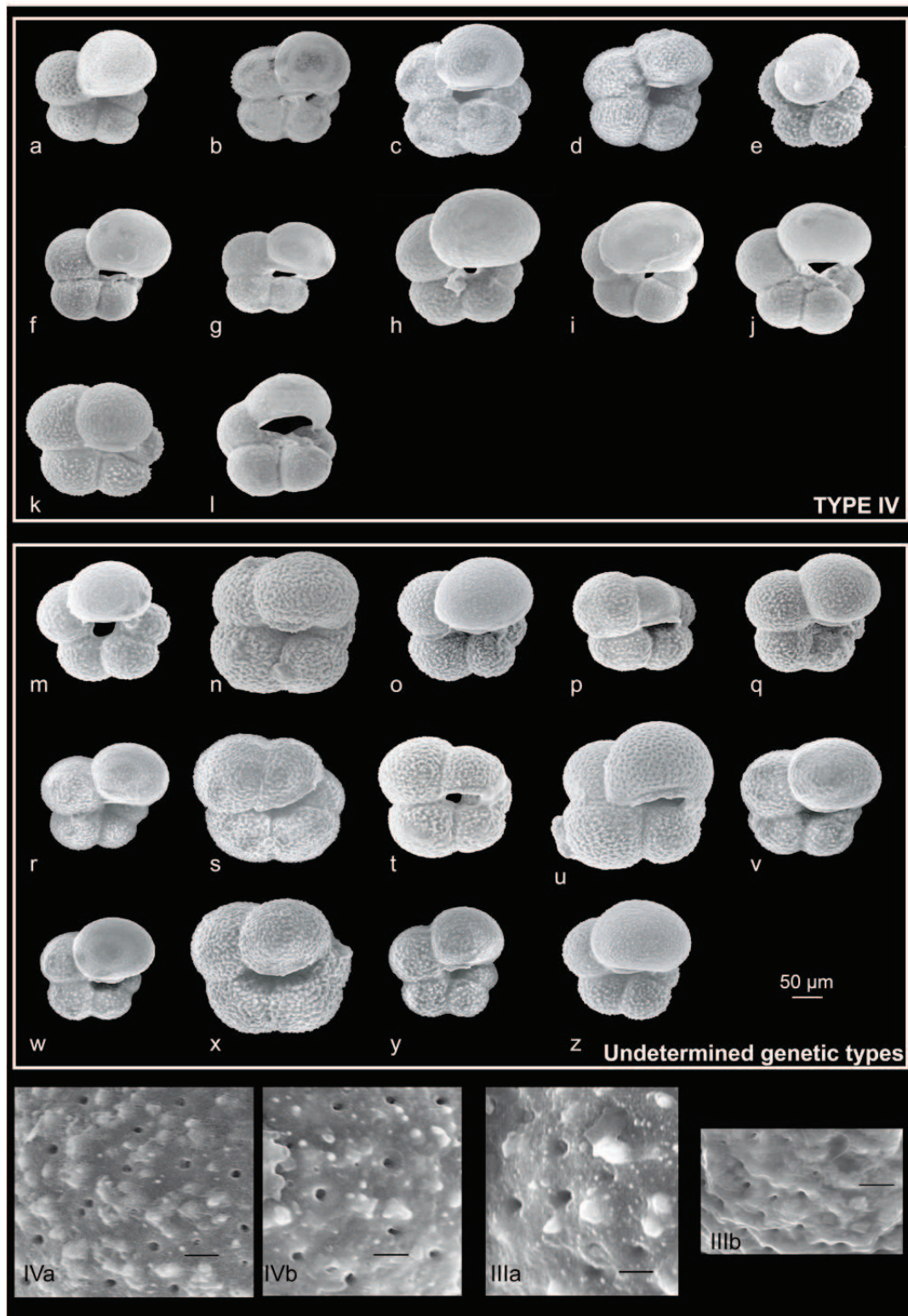


Figure 36: scanning electron microscope pictures of representatives of the Types IV of *Neogloboquadrina pachyderma* and non-genotyped/sequenced specimens collected during the cruise OISO-19 (a-z). Genetic types and sampling locations are summarized in Table 21. IVa and b: photomicrographs of the shell surface of the Type IV of *N. pachyderma*. III a and b: photomicrographs of the shell surface of the Type III of *N. pachyderma*. Scale bar = 5 µm.

Figure	individual	station	Type	PCA h	PCA r	Dmax (μm)	Dc1-c3 (μm)
35	a	5	III	3	3	165	107.4
	b	7	III	2	2	255	181.07
	c	7	III	2	3	211.25	179.94
	d	7	III	1	1	217.5	166.10
	e	7	III	1	1	197.5	148.51
	f	7	III	2	1	268.75	143.22
	g	7	III	3	1	232.5	147.52
	h	7	III	3	1	210.62	116.58
	i	7	III	2	2	228.12	153.10
	j	9	III	3	3	216.25	142.37
	k	9	III	2	2	229.37	130.22
	l	9	III	3	3	271.87	164.40
	m	9	III	2	2	233.75	165.53
	n	9	III	1	1	223.75	146.89
	o	9	III	1	1	241.25	169.77
	p	9	III	1	1	273.75	172.31
	q	9	III	2	2	256.25	170.62
	r	10	III	3	3	237.5	158.75
	s	10	III	2	2	255	197.74
	t	10	III	2	2	277.5	190.67
	u	10	III	2	2	273.12	217.79
	v	11	III	1	3	158.75	126.6
	w	11	III	1	3	210	137.00
	x	11	III	-	-	238.12	157.06
	y	11	III	1	ind	214.37	107.34
	z	11	III	1	1	182.5	114.10
	aa	11	III	1	2	216.25	131.93
	ab	11	III	3	3	255.62	172.84
	ac	11	III	1	1	208.75	135.14
ad	11	III	3	3	235	141.24	
ae	11	III	3	3	214.37	122.52	
af	11	III	1	1	170	99.75	
ag	5	II	-	-	252.5	185.02	
36	a	5	IV	3	1	217.5	144.30
	b	5	IV	3	1	211.87	123.26
	c	7	IV	1	2	233.75	155.36
	d	7	IV	1	1	223.75	147.02
	e	9	IV	2	2	199.37	109.40
	f	10	IV	3	3	215	131.07
	g	11	IV	1	3	193.12	119.05
	h	11	IV	3	3	241.25	144.35
	i	11	IV	3	3	207.55	141.80
	j	11	IV	1	3	233.12	139.83
	k	11	IV	2	2	233.12	167.51
	l	11	IV	3	3	221.87	166.10
	m	9	ind	2	2	213.7	151.48
	n	10	ind	1	1	253.7	204.23
	o	10	ind	1	1	233.7	167.23
	p	10	ind	2	2	213.12	159.40
	q	10	ind	1	1	226.87	143.31
	r	10	ind	1	3	218.12	120.29
	s	10	ind	2	2	258.12	200.56

t	10	ind	2	2	235	176.23
u	10	ind	3	1	280	202.25
v	10	ind	1	3	238.12	154.95
w	10	ind	1	1	197.5	118.80
x	10	ind	2	2	265	212.66
y	10	ind	3	1	198.75	133.41
z	10	ind	1	1	218.75	141.08

Table 21: genetic type and characteristics of the *Neogloboquadrina pachyderma* illustrated on Figures 31 and 32. Ind= non genetic typed. Station: sampling location (OISO-19 cruise); PCA: classification of the *N. pachyderma* according to the principal component analysis of the outline, the numbers (1, 2 and 3) correspond to the clusters as defined in figure 39 (PCAh: normalization according to the first harmonic; PCAr: normalization to the longest radius). Dmax: maximum size; Dc1-c3: distance between the 1st chamber and the 3rd chamber of the last whorl.

Data	Size	test	p-value
all stations	Dmax	Welch t-test	p = 0,278
	Dc1-c3	Welch t-test	p = 0,105
station 11	Dmax	Student t-test	p = 0,276
	Dc1-c3	Student t-test	p = 0,080

Table 22: tests for size differences between *N. pachyderma* Types III and IV

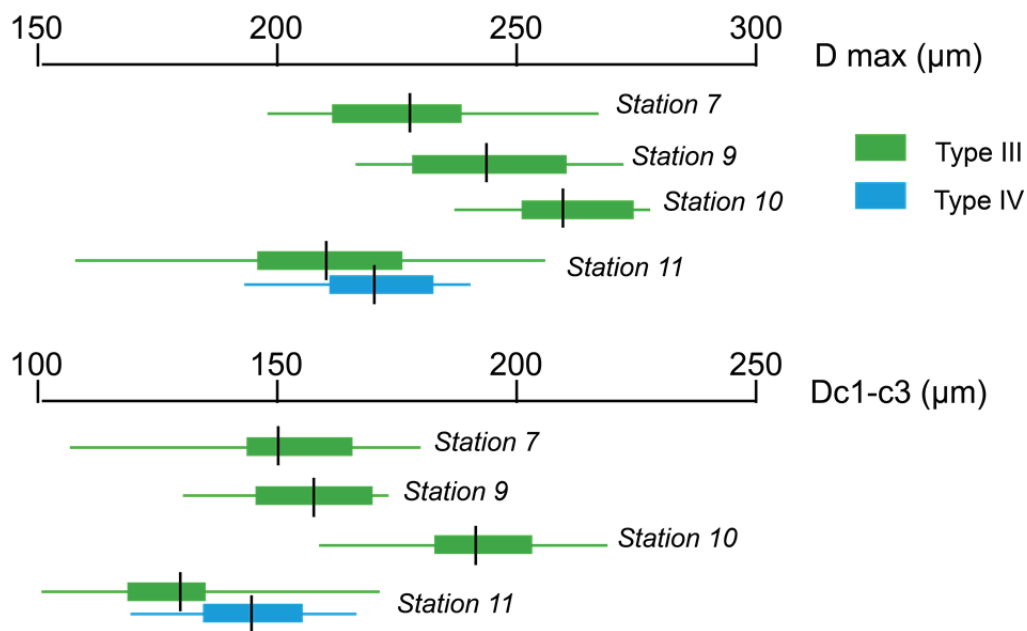


Figure 37: latitudinal distribution of size of *N. pachyderma* Type III (Dmax and Dc1-c3 measurements), and sizes of Type IV at station 11 during OISO-19 cruise. Box plots give the mean (black bar), 1st through 3rd quartiles and total distribution of sizes.

station	7	9	10	11
7		0.1940	<i>0.0367</i>	0.1677
9	0.7321		0.1993	<i>0.0137</i>
10	<i>0.0224</i>	<i>0.0157</i>		0.0064
11	<i>0.0315</i>	0.0087	0.0004	

station 11 vs. stations (9-10-11), Dmax : **p = 0.0037**

station 11 vs. stations (9-10-11), Dc1-c3: **p = 0.0009**

Table 23: Student t-tests for size differences within Type III *N. pachyderma* between the OISO-19 stations. The upper part of the matrix corresponds to p values for Dmax size measurement and the lower part to p values for Dc1-c3 size measurement. Highly significant differences are in bold. Significant differences are in italic.

Results of the PCAs applied to the normalized Fourier descriptors confirm that there is no correlation between genetic and shell shape differentiations in the Types III and IV of *N. pachyderma* (Fig. 38). According to the normalizations based on the first Fourier harmonic and the radius, most of the shape variations observed in umbilical view are described by the first three principal components, which respectively account for 70.5% (PC1= 38%; PC2= 21%; PC3=11.5%) and 91 % (PC1= 77%; PC2= 10%; PC3=4%) of the total morphological variance.

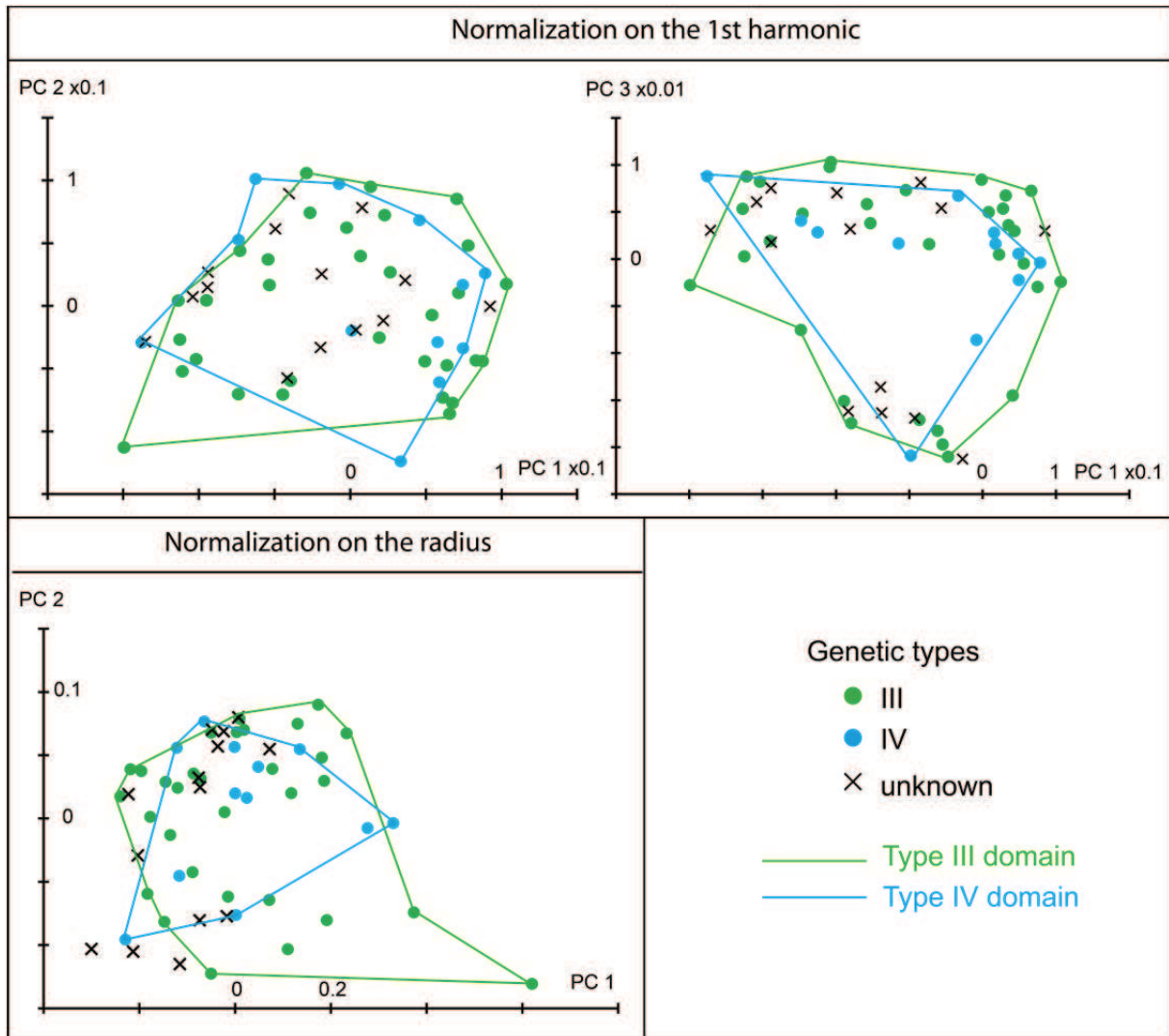


Figure 38: Principal Component Analysis performed on the normalized Fourier descriptors data set extracted from the umbilical view of the Types III and IV of *Neogloboquadrina pachyderma* (Table 2). PC= principal components. Normalization using the first harmonic: PC1= 38% of the variance, PC2= 21%, PC3= 11.5%, PC1+2+3 = 70.5%. Normalization using the radius: PC1= 77% of the variance, PC2= 10%, PC3= 4%, PC1+2+3= 91%. Clusters correspond to *N. pachyderma* genetic types.

MANOVAs performed on the PC coordinates indicate that there are no statistically significant differences between the Types III and IV of *N. pachyderma* PCA clusters for both normalizations (Table 24), confirming previous qualitative observations. The PCAs delineate three morphological groups mixing the Types III and IV of *N. pachyderma* (Fig. 39; Table 21). PCA performed on the first harmonic normalization discriminates between (i) normalform individuals with 4 chambers in the last whorl, (ii) normalform individuals with 4.5 to 5 chambers in the last whorl, (iii) and kummerform individuals (Fig. 39). PCA performed on the radius normalization discriminates similar groupings, including (i)

normalform quadrate to pentagonal individuals with 4 to 4.5 chambers in the last whorl, (ii) normalform individuals with 4 to 4.5 chambers in the last whorl, exhibiting a very globular and inflated last chamber and (iii) kummerform individuals. There is apparently a continuum between the two normalform groupings, because of continuous variations in the size of the individual last chambers (Fig. 39). Nevertheless, MANOVAs indicate statistically significant differentiations among the PCA-delineated morphological groups (Tables 25 and 26). A student tests indicates that for both normalization methods, the overall size of *N. pachyderma* from clusters 2 (i.e. kummerform individuals) tend to be higher than the overall size of individuals from clusters 1 and 2, which display no significant size differences (Table 27, Fig. 40).

p cor. \ p uncor.	Normalization 1 st harmonic			Normalization on the radius		
	III	IV	non id.	III	IV	non id.
III		0,823	0,354		0,862	0,189
IV	1		0,364	1		0,196
non id.	1	1		0,566	0,589	

overall (normalization 1st harmonic): Wilks's $\lambda = 0,914$; $df_1 = 6$; $df_2 = 106$; $F = 0,813$; $p = 0,562$
 overall (normalisation on the radius): Wilks's $\lambda = 0,880$; $df_1 = 6$; $df_2 = 104$; $F = 1,14$; $p = 0,345$

Table 24: MANOVA results, testing for overall and pairwise differences among genetic Types III and IV PCA clusters. The lower part of the matrixes correspond to Bonferroni-corrected Hotelling's pairwise comparisons p values and the upper part to uncorrected Hotelling's pairwise comparisons p values. Non id: non genotyped *N. pachyderma*.

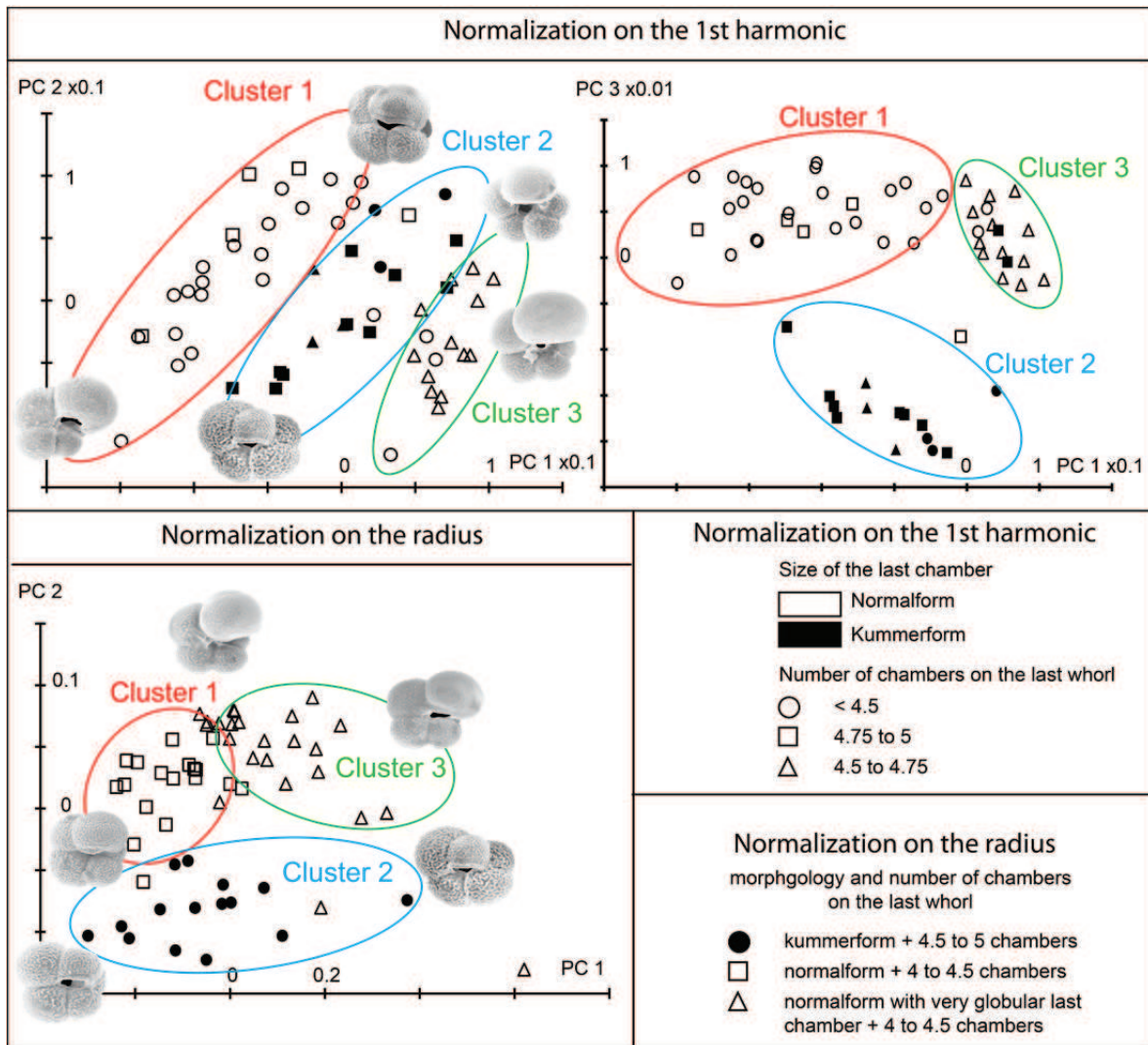


Figure 39: Principal Component Analysis performed on the normalized Fourier descriptors data set extracted from the umbilical view of the Types III and IV of *Neogloboquadrina pachyderma* (Table 21) with normalization using the first harmonic and normalization using the radius. PC= principal components. Clusters correspond to PCA clusters and are linked to *N. pachyderma* morphological characteristics.

p cor. \ p uncor.	Kumm	Nor n<4,5	Nor 4,5< n< 4,75	Nor n> 4,75
Kumm		3,68E-14	4,05E-09	1,06E-05
Nor n<4,5	2,21E-13		5,11E-09	0,149052
Nor 4,5< n< 4,75	2,43E-08	3,07E-08		1,05E-04
Nor n> 4,75	6,36E-05	0,894312	6,33E-04	
overall: Wilks's $\lambda = 0,084$; $df1 = 9$; $df2 = 129,1$; $F = 25,43$; p = 1,15E-24				

Table 25: MANOVA results, testing for overall and pairwise differences between PCA clusters, normalization on the 1st harmonic. The lower part of the matrixes corresponds to Bonferroni-corrected Hotelling's pairwise comparison p values and the upper part to uncorrected Hotelling's pairwise comparison p values. Significant values are in bold. Kumm: kummerforms; Nor: normalforms; n=number of chambers on the last whorl

p cor. \ p uncor.	nor	kumm	nor+globular
nor		1,77E-06	2,98E-07
kumm	3,53E-06		8,57E-13
nor+globular	8,93E-07	2,57E-12	

overall: Wilks's $\lambda = 0,185$; dfl = 6 ; df 2 = 106 ; F = 23,41 ; p = **1,891E-17**

Table 26: MANOVA results, testing for overall and pairwise differences between PCA clusters, normalization on the radius. The lower part of the matrixes corresponds to Bonferroni-corrected Hotelling's pairwise comparison p values and the upper part to uncorrected Hotelling's pairwise comparison p values. Significant values are in bold. Kumm: kummerforms; nor: normalforms; +globular: very globular last chamber.

cluster	Normalization on the 1st harmonic			Normalization on the radius		
	1	2	3	1	2	3
1		0,003874	0,2303		0,06139	0,7871
2	0,001372		0,1046	<i>0,02146</i>		<i>0,03512</i>
3	0,5236	<i>0,01162</i>		0,8111	0,008977	

Table 27: Student t-tests for size differences between PCA morphological clusters. Upper part of the matrixes correspond to p values for Dmax size measurement and lower part to p values for Dc1-c3 size measurement. Highly significant values are in bold. Significant values are in italic.

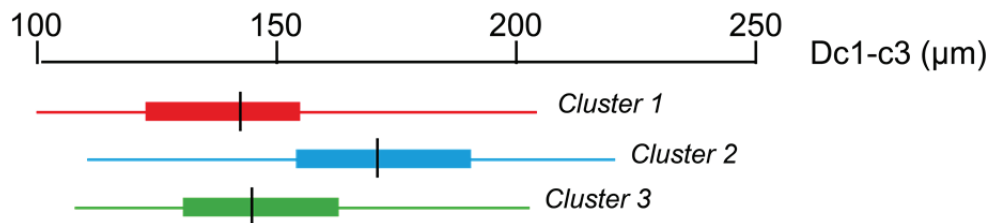


Figure 40: sizes (Dc1-c3 measurement) of the *N. pachyderma* included in the PCA-delineated morphological clusters (Fig. 39). Box plots give the mean (black bar), 1st through 3rd quartiles and total distribution of sizes. Dmax size measurement gives a similar result.

4. Discussion

4.1. Collection methods

Most of recent studies focusing on morpho-genetic diversity in planktonic foraminifera relied on a DNA sampling protocol which required individual sorting and careful cleaning for on-board isolation in extraction buffer-filled PCR vials (Morard et al., 2009; 2011; 2013; Ujiié and Lipps, 2009; Ujiié et al., 2010; 2012; Aurahs et al., 2011; Quillévéré et al., 2013). In the case of *Neogloboquadrina pachyderma*, this protocol is apparently not well adapted for individual DNA conservation since we obtained very low (~40%) PCR success rates when applied to the material collected during the cruise OISO-19, compared to success rates obtained from other species of planktonic foraminifera (77 % for *Orbulina universa*, 70 % for *Globigerinoides sacculifer*, ~80 % for *Globoconella inflata* and *Truncorotalia truncatulinoides*, R. Morard pers. comm.; André et al. [2013]). During the cruise OISO-21, specimens were dried at fridge temperature right after collection and the PCR success rate reached ~90% (Table 17). In this protocol, successfully used by Weiner et al. (2012), foraminifers are quickly taken out of seawater which contains DNAses, while in the case of the classical sampling protocol, it takes a longer time to put each single foraminifer in individual buffer vials. Even using blue ice, it is difficult to avoid any increase in sample seawater temperature when collecting in (sub)polar waters. We believe that these temperature variations may have triggered DNA degradation reactions, thus explaining why PCR success rates were so low when using this collection method. The “drying” protocol has the additional advantages to reduce the collection time and to make easier any potential shipping, since the samples are not stored within liquids.

4.2. Environmental controls on the distribution of genetic types of *Neogloboquadrina pachyderma* in the Southern Ocean

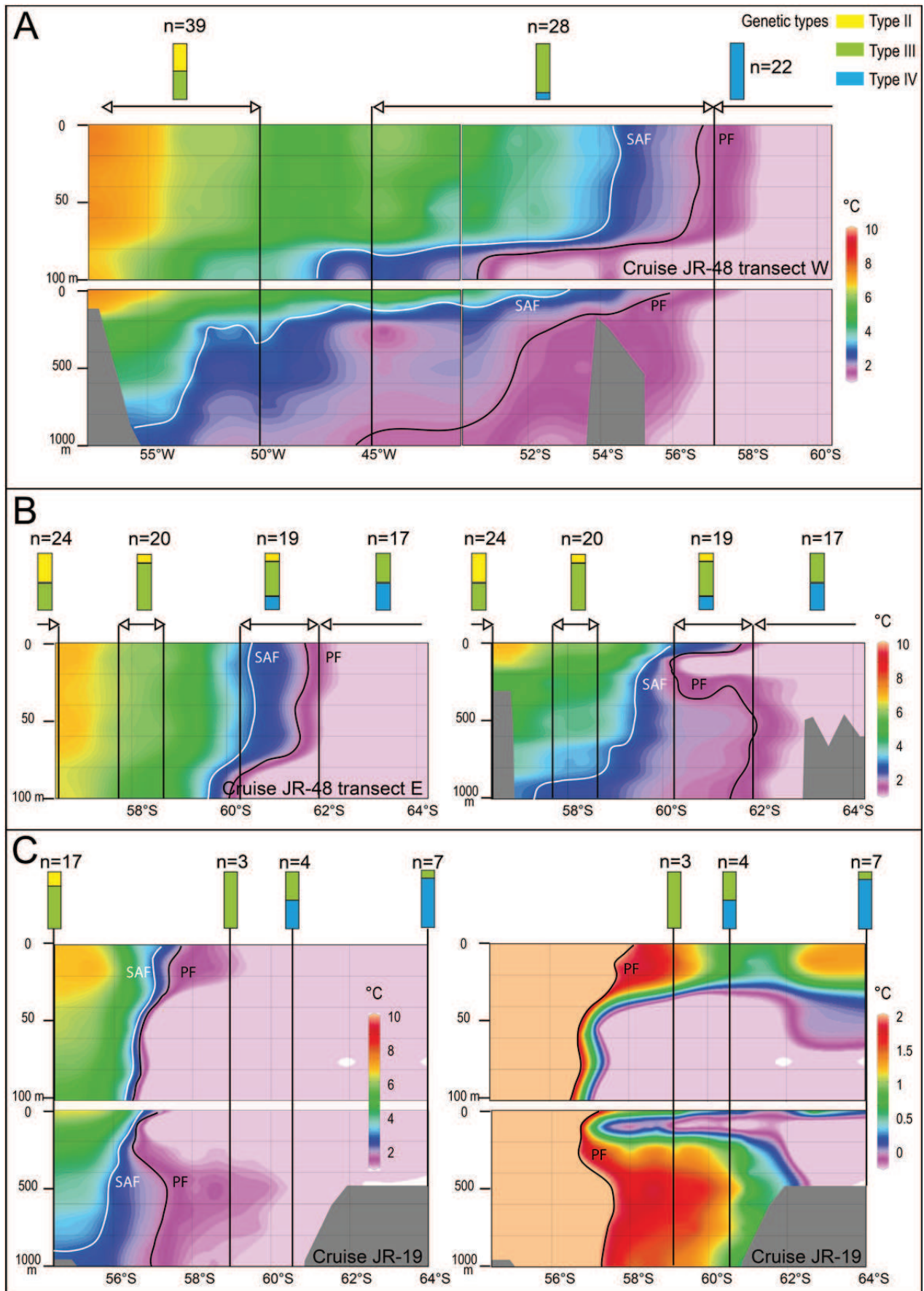
Along the cruise transects OISO-19 and OISO-21, the Type II of *N. pachyderma* was found north of the SAF, the Type IV represents 50% or more of the assemblages south of the PF and the Type III was found to be cosmopolitan from temperate to polar waters (Fig. 32). Comparison between years 2011 and 2012 shows that the distribution of these genetic types is apparently influenced by the warming event that occurred in 2012, with in particular the Type IV being less abundant and following the southward migration of the PF. The Type II was

apparently rarer in 2011 than in 2012 while there was virtually no temperature difference in sub-polar sampled stations between the two years (Fig. 33). Consequently, temperature may not be the sole environmental parameter controlling the distribution of the Type II. Primary productivity may be involved as it was remarkably different between 2011 and 2012. During the cruise OISO-19, the Type II was scarce while productivity was high, whereas during the cruise OISO-21, this genetic type was four times more abundant and primary productivity was lower. Furthermore, along the OISO-21 transect, we notice that the Type II was present at stations 7 and 8 and not at station 9. Although 0-100 m depth temperatures were virtually the same at these stations (Fig. 33), stations 7 and 8 correspond to low-productivity waters whereas station 9 matches higher productivity values (Fig. 32). These observations, albeit they would require confirmation through a further sampling of the Type II, suggest that this genetic type inhabits warmer, lower-productivity waters than the Types III and IV. Likewise, temperatures for station 10 were very similar in 2011 and 2012 and primary productivity was higher during the cruise OISO 19; we found 4 specimens of the Type IV out of the 23 genotyped *N. pachyderma* in 2011 and none in 2012 although we genotyped 111 individuals. Consequently, we hypothesize that the Type IV favors cold and productive austral waters.

Due to the Antarctic Circumpolar Current, the distribution of the genetic types of *N. pachyderma* was expected to be similar in the south Indian and south Atlantic Oceans (Darling et al., 2004). As shown in Figure 41, sampling stations in the south Atlantic along the Cruises JR-19 (March 1997) and JR-48 transects (April 2000) follow similar temperature gradients from sub-polar to polar waters, and in both cases, vertical temperature stratification is weak in the first 100 m of the water column. Although the distribution of genetic types appears globally similar along OISO and JR transects, some differences occur with, in the south Atlantic, a higher relative abundance of the Type II and a restriction of the Type IV to the Polar Frontal Zone (Figs. 32 and 41). Three hypotheses may explain these differences. First, we note that JR sampling occurred in the austral autumn; as pointed by Norris (2000), cryptic species may shift in the timing of reproduction and, as a consequence, may show differences of population density with seasonality. This phenomenon was evidenced in the case of *Globigerinoides ruber* (Aurahs et al., 2009) and *Globigerina bulloides* (Darling et al., 2003). Consequently, the Type II of *N. pachyderma* may reproduce later than the Type III. Second, in the South Atlantic, Darling et al. (2004) almost exclusively collected their material in surface waters whereas in the South Indian Ocean, we collected material within the entire

depth range (0-100 m, Fig. 34) of *N. pachyderma*. Stratified sampling at station 11 of OISO-19 shows that the Type III is more abundant in shallower waters than the Type IV. Consequently, abundances of the Type III in polar waters of the South Atlantic may have been overestimated. Unfortunately, our data are not sufficient to test whether the Type II is indeed more abundant in warmer and low productivity surface waters than in deeper waters. Third, these differences may result from differences in primary productivity occurring in the studied regions. According to the distribution patterns observed in the south Indian Ocean, the Type II favors decreasing primary productivity values. Although fluorescence profiles were not recorded during the cruises JR, we speculate that higher abundances of the Type II in the South Atlantic may reflect less eutrophic conditions during sampling period.

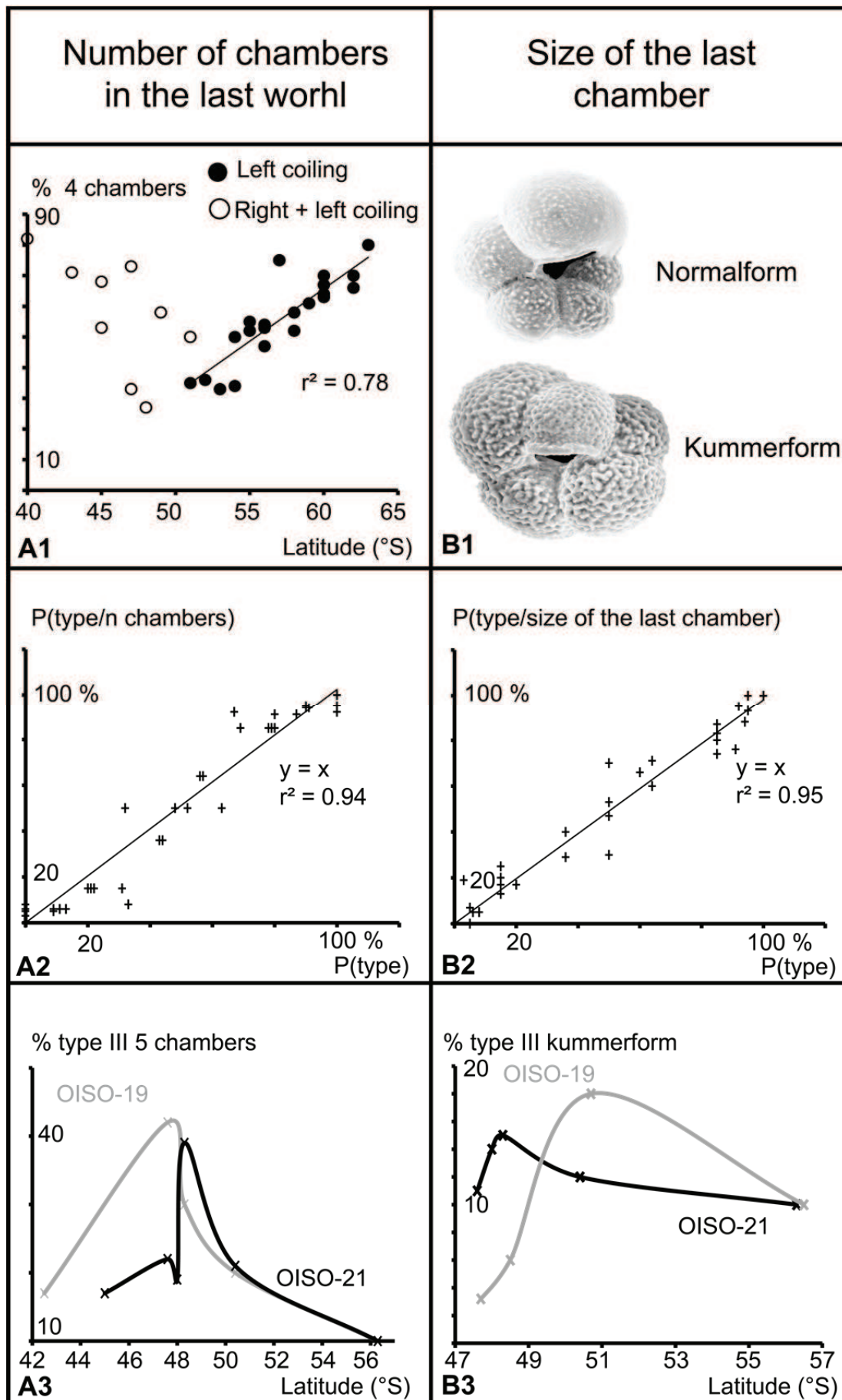
Figure 41: distribution of the Types II, III and IV of *Neogloboquadrina pachyderma* along temperature profiles (0-100 m and 0-1000 m) crossed during the JR cruises in the southern Atlantic Ocean reconstructed from Darling et al. (2004) and the World Ocean Database Atlas. n= number of sequenced *N. pachyderma* (Darling et al., 2004), SAF: sub-Antarctic front; PF: polar front. A: western transect of JR-48 cruise (Fig. 29). B: Eastern transect of JR-48 cruise (Fig. 29). C: JR-19 transect (Fig. 29), with detail of the Antarctic zone.



4.3. A case for true cryptic species in *Neogloboquadrina pachyderma*

Due to the reduced number of Type II specimens collected from the OISO transects, we were only able to produce morpho-genetic comparisons within the Types III and IV of *Neogloboquadrina pachyderma*. Dissecting microscope and SEM observations show no obvious morphological differences between the Types III and IV but evidenced variations in the number of chambers on the last whorl and on the size of the last chamber. Similar variations were reported from core-tops samples in the Southern Ocean (Kennett [1968] in the South Pacific and Williams et al. [1988] in the Southern Indian Ocean). Kennett (1968) reported latitudinal zonation in the number of chambers on the last whorl of *N. pachyderma* (then including the now renamed *Neogloboquadrina incompta*), from subtropical to polar waters of the Southern Pacific (Fig. 42), a region, according to our study, that should harbor the same species as the South Indian and Atlantic Oceans. For the core-tops containing almost exclusively *N. pachyderma* (i.e. left coiling individuals), we observed a strong correlation between latitude and the % of individuals with 4 chambers on the last whorl (Fig. 42). Moller et al. (2013) suggested that this trend might be due to mutual replacement of the Types II, III and IV. On the contrary, our data show that the genetic types and the number of chambers on the last whorl are independent (Fig. 42). Consequently, this morphological feature does not mirror genetic differentiation.

Figure 42: morphological characteristics of *Neogloboquadrina pachyderma*: genetic type and environmental conditions. A1: % of *N. pachyderma* s.l. (i.e. left coiling + right coiling = *N. incompta*) with 4 chambers on the last whorl in core tops along a South Pacific latitudinal transect, data from Kennett 1968. A2: % of Type II, III and IV among individuals with 4 and 5 chambers on the last whorl vs. total % of Type II, III and IV for each station of OISO-19 and OISO-21 cruises. Individuals are considered 4-chambered if they include 4 to 4.5 chambers on the last whorl and 5 chambered if they include more than 4.5 chambers on the last whorl. A strictly proportional relationship indicates that the number of chambers on the last whorl and genetic types are independent. A3: % of individuals with 5 chambers on the last whorl among Type III *N. pachyderma* along latitudinal transects. B1: examples of normalform and kummerform *N. pachyderma* from OISO-19 cruise. B2: % of Type II, III and IV among kummerforms and normalforms vs. % of Type II, III and IV for each station of OISO-19 and OISO-21 cruises. A strictly proportional relationship indicates that the size of the last chamber and genetic types are independent. B3: % of kummerforms among Type III *N. pachyderma* along latitudinal transects.



Along the OISO transects, we collected fewer kummerform specimens of the Type IV than of the Type III (Table 19). The Type III being apparently more prone to diminutive last chambers than the Type IV, we tested whether this morphological feature could reflect genetic differentiation. Our data show that there is no correlation between the size of the last chamber and genetic identity (Fig. 42). This conclusion is strengthened by the fact that in southernmost Antarctic core-tops, a region only inhabited by the Type IV (Darling et al. 2004), kummerform *N. pachyderma* are common place (Norris et al., 1998).

Different genetic types of *Globigerinella siphonifera* and *Orbulina universa* were distinguished thanks to significant differences in shell porosity (Huber et al., 1997; Morard et al., 2009). Our observations suggest that it is not the case for the Types III and IV of *N. pachyderma*. In *N. pachyderma* from the Ross Sea, a polar region inhabited only by the Type IV, Bergami et al. (2009) showed that pore sizes and shell surface encrustation varies greatly through calcification processes. Ultrastructural features are thus not putative criteria for distinguishing the genetic types of *N. pachyderma* as they are difficult to observe and probably vary greatly between ontogenetic stages.

Based on shell outline analyses performed on *N. pachyderma* and *N. incompta* collected in core-top samples, Healy-Williams (1984) evidenced the occurrence of multiple morphotypes in the South Indian Ocean. The distribution patterns of some of these morphotypes may be correlated with salinity and/or sea surface temperatures but these correlations are subject to caution since the author, in her analysis, considered *N. pachyderma* and *N. incompta* as a single species. She sampled a latitudinal transect from 38°S to 65°S, which includes the latitudes of our OISO transects, and consequently analyzed altogether specimens of *N. incompta* and of the Types II, III and IV of *N. pachyderma*. Williams et al. (1988) suggested that these morphotypes may constitute distinct species or sub-species. Our PCA analysis performed on shell outlines delimits clusters (Fig. 39) similar to those defined by Healy-Williams; our clusters 1, 2 and 3 corresponding to the morphotypes “Harmonic4”, “Harmonic 5&6” and “Harmonic 3”, respectively. Our PCA shows that these morphological variations do not match genetic differences as shell outlines of the Type III and Type IV are not differentiated (Fig. 38).

It appears that the Types III and IV of *N. pachyderma* cannot be identified through the set of morphological features investigated here and thus constitute true cryptic species. This result was unexpected since genetic divergence between these genetic types is important and their status as separate species unchallenged (André et al., in prep for reviews). Indeed, recent morpho-genetic comparisons in planktonic foraminifera demonstrated that the most divergent genetic types within a morphospecies exhibit significant differences in shell morphology, which can be recognized based on population-scale morphometric analyses (de Vargas et al., 2001; Morard et al., 2009; 2011; Aurahs et al., 2011; Quillévéré et al., 2013). As a consequence, it seemed feasible to transfer the biological information acquired through genetic analysis to paleoceanography, in peculiar by improving the resolving power of the transfer functions that allow reconstructing past sea surface temperatures (Morard et al., 2013). In the case of the (sub)polar Types III and IV of *N. pachyderma*, such transfer appears to be unrealistic and their contrasted environmental affinities are of no use for improving reconstructions in the Southern Ocean.

4.4. Ecophenotypic variations in genetic types of Neogloboquadrina pachyderma

PCA sorting of individuals is linked to the size of the last chamber and the number of chambers on the last whorl (Fig. 39). In particular, individuals were sorted according to the size of the last chamber (normalforms vs. kummerforms) and, among normalforms, the PCA set apart individuals according to the number of chambers on the last whorl. As a conclusion, shell shapes of southern Ocean *N. pachyderma* are highly variable and mainly controlled by the size of the last chamber and the number of chambers on the last whorl. Since this PCA sorting does not correspond to genetic type clusters, these morphological features are not linked with genetic diversity and thus possibly correspond to eco-phenotypic variations.

For the Type III of *N. pachyderma*, our study benefits a large number of collected specimens along an extended latitudinal transect, then allowing us to analyze morphological changes associated with environmental parameters within this genetic type. Mean shell size varies with latitude (Fig. 37, Table 23) and reaches a maximum in the southernmost sub-polar waters of our transects, at locations where this genetic type is most abundant (OISO-19, stations 9 and 10). These locations thus probably correspond to the ecological optimum (Ricklef, 1976; Begon et al., 1986) of the Type III. We notice that at polar station 11, shell sizes of the Type

III and IV are reduced and not significantly different. This observation reinforces the hypothesis that the Types III and IV of *N. pachyderma* reach their ecological optima further north and further south of the station, respectively. A similar phenomenon was evidenced by Moller et al. (2013) in the case of the Type I of *N. pachyderma* in the Atlantic Ocean. Consequently, the size of *N. pachyderma* is an eco-phenotypic feature, with, for each genetic type, larger shells corresponding to their ecological optimum. Therefore, the concept of Hecht (1976) that planktonic foraminiferal morpho-species achieve largest sizes at their ecological optima may also apply at the genetic type level.

Our data show that the % of 5-chambered specimens of the Type III follow a bell-shaped curve with highest values reached at sub-polar latitudes (Fig. 42) within the ecological optimum of this genetic type. Although we acknowledge that the number of collected specimens of the Types II and IV remains still limited, shell size distributions of these genetic types apparently follow the same pattern. Indeed, the % of 5-chambered specimens of temperate to sub-polar Type II decreases southwards whereas that of the polar Type IV increases (Table 20). In the Southern Ocean, there is likely an ecophenotypic variation in the number of chambers on the last whorl in *N. pachyderma*, with increasing values at ecological optima. This observation may be generalized to the other genetic types of *N. pachyderma* elsewhere in the world Oceans. In the North West Pacific, where only the Type VII apparently occurs (Darling et al., 2007), Khan (1981) evidenced a relationship between the preferred depth of *N. pachyderma* and the abundance of 5-chambered specimens.

The size of the last chamber exhibits similar patterns of variation with environmental data. In the Type III, the % of kummerform specimens follows a bell shaped curve with highest values reached at sub-polar latitudes within the ecological optimum of the genetic type (Fig. 42). Similarly, abundance of kummerform specimens of the Type II apparently decreases with latitude in temperate to sub-polar waters when that of the Type IV apparently increases in polar waters (Table 19), then suggesting that the pattern evidenced in the Type III may be generalized to the other genetic types of *N. pachyderma*. In cryptic species of *N. pachyderma* from the Southern Ocean, the size of the last chamber is consequently an ecophenotypic feature with maximum abundances of kummerform specimens reached at ecological optima. A reduced final chamber is unlikely to reflect environmental stress as suggested by Hecht and Savin (1970) but rather an indication of maximal growth achievement as advocated by Olsson (1973). Such ecophenotypic variation may explain why fewer Type IV kummerforms specimens were sampled in the South Indian Ocean than in the South

Atlantic (Table 19; Fig. 39). During the OISO collecting transects, the ecological optimum of the polar Type IV, which is probably located further south in extreme Antarctic waters (Darling et al., 2004) where kummerform *N. pachyderma* are particularly abundant (Norris et al., 1998), was not sampled. We conclude that shell morphology variations (size, number of chambers on the last whorl and size of the last chamber) in the Types III and IV of *N. pachyderma* are eco-phenotypic. These genetic types show that the assumption that morphological variations reflect genetic diversity with planktonic foraminifera (Huber et al., 1997; de Vargas et al., 2001; Morard et al., 2009; 2011; Aurahs et al., 2011; Quillévéré et al., 2013) is not a general rule. Generalization was indeed hasty as, until now, precise morphological variations of genetic types were studied for only a 5 out of the 13 morpho-species for which cryptic diversity have been evidenced (André et al., in prep for reviews; Huber et al., 1997; de Vargas et al., 2001; Morard et al., 2009; 2011; Aurahs et al., 2011; Quillévéré et al., 2013). Furthermore, the case of *Globigerinoides sacculifer* showed that morphological plasticity within a single genetic type can be significant. Consequently, morpho-genetic analyses may reveal other exceptions than the genetic types of *N. pachyderma*.

5. Conclusions

In the south Indian Ocean, distributions of cryptic species of *Neogloboquadrina pachyderma* are similar to those previously observed in the South Atlantic (Darling et al., 2004). These distributions are apparently correlated to the latitudinal sea surface temperature gradient but primary productivity also plays a key role, particularly for the distribution of the Type II. At sub-polar to polar latitudes, the Type III is sympatric with the Types II or IV. As cryptic species rarely share the same environmental niche (Zhang et al., 2004), this may imply different depth habitats and/or diets or differences in reproduction timing (Norris et al., 2000). Neither precise feeding behaviors nor seasonality of genetic types of *N. pachyderma* could be investigated, but, even if our data on depth stratification is still largely insufficient to conclude, we evidence possible depth partitioning of the Types III and IV linked to primary productivity. Differences in depth habitats between the Types II, III and IV are thus likely and may explain the slight distribution differences between our results and those obtained by Darling et al. (2004) in the South Atlantic.

Unexpectedly, the extensive morphological variability in *N. pachyderma* does not reflect its genetic diversity. The Types III and IV of *N. pachyderma* are the first demonstrated cases of true cryptic species in planktonic foraminifera. Morphological characteristics of these genetic types are clearly eco-phenotypic. In particular, whenever individuals are at their genetic type ecological optimum, they tend to be larger, to have 5 chambers on the last whorl and to exhibit a reduced final chamber (kummerform). The study of Eynaud et al. (2009) on the arctic genetic Type I of *N. pachyderma* also evidenced a high morphological variability, suggesting that shell morphology may be principally controlled by the environmental conditions within the entire morphospecies. This was unexpected as true cryptic species are considered as rare in the pelagic domain (Knowlton, 1993) and as, so far, previously defined planktonic foraminifera eco-phenotypes turned out to be distinct genetic types (de Vargas et al., 2001; Morard et al., 2009; 2011; Aurahs et al., 2011; Quillévéré et al., 2013). This study reminds that speciation is not always accompanied by morphological changes (e.g. Elmer et al., 2007). Indeed, for planktonic foraminifera, morphological recognition plays no role in same species individuals or gametes recognition. Mate-choice systems may rely on non-morphological characteristics such as chemical signals that are difficult to establish for rarely cultivated organisms (Knowlton, 1993; Bickford et al., 2006).

Acknowledgements

We thank L. Konecny, L. Rossignol, M-H. Castera and G. Isguder for technical assistance. We acknowledge the assistance of the Master and the crew of the OISO cruises during which the presented material has been collected. Special thanks are given to the Institut Polaire Français Paul Emile Victor (IPEV). This work was supported by grants from the Institut National des Sciences de l'Univers (INSU) INTERRVIE program (F.Q.).

Supplementary file

Principal component (PC) values. Fig_ind: figure_individual, name of the sample on the corresponding figures (Figs 35 and 36, Table 21). The cluster numbers refers to figure 39.

References

- André, A., Weiner, A., Quillévéré, F., Aurahs, R., Morard, R., Douady, C., de Garidel-Thoron, T., Escarguel, G., de Vargas, C. and Kucera, M., 2013. The cryptic and the apparent reversed: lack of genetic differentiation within the morphologically diverse plexus of the planktonic foraminifer *Globigerinoides sacculifer*. *Paleobiology*, 39: 21-39.
- André, A., Quillévéré, F., Morard, R., de Vargas, C., Ujiié, Y., and Douady, C., in prep. SSU rDNA divergence in planktonic foraminifera: molecular taxonomy and biogeographic implications.
- Aurahs, R., Grimm, G., Hemleben, V., Hemleben, C. and Kucera, M., 2009. Geographical distribution of cryptic genetic types in the planktonic foraminifer *Globigerinoides ruber*. *Molecular Ecology*, 18: 1692-1706.
- Aurahs, R., Treis, Y., Darling, K. and Kucera, M., 2011. A revised taxonomic and phylogenetic concept for the planktonic foraminifer species *Globigerinoides ruber* based on molecular and morphometric evidence. *Marine Micropaleontology*, 79: 1-14.
- Aze, T., Ezard, T., Purvis, T., Coxall, H., Stewart, D., Wade, B. and Pearson, P., 2011. A phylogeny of Cenozoic macroperforate planktonic foraminifera from fossil data. *Biological Reviews* 86: 900-927.
- Bandy, O.L., 1972. Origin and development of *Globorotalia (Turborotalia) pachyderma* (Ehrenberg). *Micropaleontology*, 18: 294-318.
- Banner, F.T. and Blow, W.H., 1960. Some primary types of species belonging to the superfamily Globigerinaceae. *Contributions from the Cushman Foundation for Foraminiferal Research*, 11: 1-45.
- Barker, S., Cacho, I., Benway, H. and Takachikawa, K., 2005. Planktonic foraminiferal Mg/Ca as a proxy for past oceanic temperatures: a methodological overview and data compilation for the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews*, 24: 821-834.
- Becquey, S. and Gersonde, R., 2003. A 0.55-Ma paleotemperature record from the subantarctic zone: implications for Antarctic Circumpolar Current development. *Paleoceanography*, 18: 1014-1028.
- Begon, M., Harper, J.L. and Townsend, J.R., 1986. *Ecology : individuals, populations and communities*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Bergami, C., Capotondi, L., Langone, L., Giglio, F. and Ravaioli, M., 2009. Distribution of living planktonic foraminifera in the Ross Sea and the Pacific sector of the Southern Ocean (Antarctica). *Marine Micropaleontology*, 73: 37-48.
- Berger, W.H., 1969. Planktonic foraminifera: basic morphology and ecologic implications. *Journal of paleontology*, 43: 1369-1383.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K. and Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22:148-155.

- Broecker, W.S., 1982. Ocean chemistry during glacial time. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 46: 1689-1705.
- Carter, L., McCave, I.N., Williams, M.J.M., Fabio, F. and Martin, S., 2008. Chapter 4 circulation and water masses of the Southern Ocean: a review. *Developments in Earth and Environmental Sciences*, Elsevier, Amsterdam.
- Cifelli, R., 1961. *Globigerina incompta*, a new species of pelagic foraminifera from the North Atlantic Ocean. *Contributions of the Cushman Foundation for Foraminiferal Research*, 12: 83-86.
- CLIMAP, 1981. Seasonal reconstructions of the Earth's surface at the last glacial maximum. *Geological Society of American Map and Chart Series*, MC-36.
- Darling, K.F., Wade, C.M., Kroon, D. and Brown, A.J., 1997. Planktic foraminiferal molecular evolution and their polyphyletic origins from benthic taxa. *Marine Micropaleontology*, 30: 251–266.
- Darling, K.F., Kucera, M., Wade, C.M., Langen, P.V. and Pak, D., 2003. Seasonal distribution of genetic types of planktonic foraminifer morphospecies in the Santa Barbara Channel and its paleoceanographic implications. *Paleoceanography*, 18: 1032-1042.
- Darling, K.F., Kucera, M., Pudsey, C.J. and Wade, C.M., 2004. Molecular evidence links cryptic diversification in polar planktonic protists to Quaternary climate dynamics. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 101: 7657-7662.
- Darling, K.F., Kucera, M., Kroon, D. and Wade, C.M., 2006. A resolution for the coiling direction paradox in *Neogloboquadrina pachyderma*. *Paleoceanography*, 21: 1-14.
- Darling, K.F., Kucera, M. and Wade, C.M., 2007. Global molecular phylogeography reveals persistent arctic circumpolar isolation in a marine planktonic protist. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104: 5002-5007.
- Darling, K.F. and Wade, C.M., 2008. The genetic diversity of planktic foraminifera and the global distribution of ribosomal RNA genotypes. *Marine Micropaleontology*, 67: 216-238.
- de Vargas, C., Norris, R.D., Zaninetti, L., Gibb, S.W. and Pawlowski, J., 1999. Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 2864-2868.
- de Vargas, C., Renaud, S., Hilbrecht, H. and Pawlowski, J., 2001. Pleistocene adaptive radiation in *Globorotalia truncatulinoides*: genetic, morphologic, and environmental evidence. *Paleobiology*, 27: 104-125.
- de Vernal, A. and Hillaire-Marcel, C., 2006. Provincialism in trends and high frequency change in the northwest North Atlantic during the Holocene. *Global Planetary Change*, 54: 263-290.
- Dieckmann, G.S., Spindler, M., Mange, M.A., Ackley, S.F. and Eicken, H., 1991. Antarctic sea ice: a habitat for the foraminifer *Neogloboquadrina pachyderma*. *Journal of Foraminiferal Research*, 21: 183-189.

- Elmer, K., Davila, J. and Lougheed, S., 2007. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BioMed Central Evolutionary Biology*, 7: 247.
- Ericson, D.B., 1959. Coiling direction of *Globigerina pachyderma* as a climatic index: *Science*, 130: 219–220.
- Eynaud, F., Cronin, T.M., Smith, S.A., Zaragosi, S., Mavel, J., Mary, Y., Mas, V. and Pujol, C., 2009. Morphological variability of the planktonic foraminifer *Neogloboquadrina pachyderma* from ACEX cores: implications for the Late Pleistocene circulation of the Arctic Ocean. *Micropaleontology*, 55: 101-116.
- Foote, M., 1989. Perimeter-based Fourier analysis: A new morphometric method applied to the trilobite cranidium. *Journal of Paleontology*, 63: 880-885.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. and Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 9.
- Healy-Williams, N., 1984. Quantitative image analysis: application to planktonic foraminiferal paleoecology and evolution. *Geobios*, 17: 425-432.
- Hecht, A.D. and Savin, S.M., 1970. Oxygen-18 studies on recent planktonic foraminifera: comparison of phenotypes and test parts. *Science*, 170: 69.
- Hecht, A.D., 1976. An ecologic model for test size variation in recent planktonic foraminifera: applications to the fossil record. *Journal of Foraminiferal Research*, 6: 295-311.
- Hemleben, C., Spindler, M. and Anderson, O.R., 1989. *Modern Planktonic Foraminifera*. Springer, New York.
- Huber, B.T., Bijma, J. and Darling, K.F., 1997. Cryptic speciation in the living planktonic foraminifer *Globigerinella siphonifera* (d'Orbigny). *Paleobiology*, 23: 33-62.
- Ikeda, Y., Siedler, G. and Zwierz, M., 1989. On the variability of the Southern Ocean Front locations between Southern Brazil and the Antarctic Peninsula. *Journal of Geophysical Research*, 94: 4757-4762.
- Iwata, H. and Ukai, Y., 2002. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity*, 93: 384-385.
- Kahn, M.I., 1981. Ecological and paleoecological implications of the phenotypic variation in three species of living planktonic foraminifera from the northeastern Pacific Ocean (50°N, 145°W). *Journal of Foraminiferal Research*, 11: 203-211.
- Katz, M.E., Crammer, B.S., Franzese, A., Barbel, H., Miller, K.G., Rosenthal, Y. and Wright, J.D., 2010. Traditional and merging geochemical proxies in foraminifera. *Journal of Foraminiferal Research*, 40: 165-192.
- Keir, R.S., 1988. On the Late Pleistocene ocean geochemistry and circulation. *Paleoceanography*, 3: 413-445.
- Kennett, J.P., 1968. Latitudinal variation in *Globigerina pachyderma* (Ehrenberg) in surface sediments of the Southwest Pacific Ocean. *Micropaleontology*, 14: 305-318.

- Kennett, J.P. and Srinivasan, M.S., 1983. Neogene Planktonic Foraminifera: a Phylogenetic Atlas. Hutchinson Ross, Stroudsburg (Pennsylvania).
- Knowlton, N., 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 189-216.
- Kucera, M. and Darling, K.F., 2002. Cryptic species of planktonic foraminifera: their effect on palaeoceanographic reconstructions. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London*, 360: 695-718.
- Kucera, M., 2007. Planktonic foraminifera as tracers of past oceanic environments. *Proxies in Late Cenozoic Paleoclimatology*, Elsevier, Amsterdam.
- Kuhl, F.P. and Giardina, C.R., 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing*, 18: 236-258.
- MARGO project members, 2009. Constraints on the magnitude and patterns of ocean cooling at the last glacial maximum. *Nature Geoscience*, 2: 127-132.
- Metzl, N., 2000. Le programme OISO, Service d'Observation de l'Océan Indien / The OISO program: Observations in the Indian Ocean. *Lettre Internationale Géosphère Biosphère Programme*, 10: 76-83.
- Moller, T., Schulz, H. and Kucera, M., in press. The effect of sea surface properties on shell morphology and size of the planktonic foraminifer *Neogloboquadrina pachyderma* in the North Atlantic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*.
- Morard, R., Quillévéré, F., Escarguel, G., Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T. Norris, R.D. and de Vargas, C., 2009. Morphological recognition of cryptic species in the planktonic foraminifer *Orbulina universa*. *Marine Micropaleontology*, 71: 148-165.
- Morard, R., Quillévéré, F., Douady, C.J., de Vargas, C., de Garidel-Thoron, T. and Escarguel, G., 2011. Worldwide Genotyping in the Planktonic Foraminifer *Globoconella inflata*: Implications for Life History and Paleoclimatology. *Public Library of Science One*, 6: e26665.
- Morard, R., Quillevere, F., Escarguel, G., de Garidel-Thoron, T., de Vargas, C. and Kucera, M., 2013. Ecological modeling of the temperature dependence of cryptic species of planktonic foraminifera in the Southern Hemisphere. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.palaeo.2013.05.011>
- Norris, R., Kim, D., Park, B.-K., Kang, S.-H. and Khim, B.-K., 1998. Stable isotope and ecological habitat of planktonic foraminifera adjacent to the ice edge in the western Weddell Sea. *Geosciences Journal*, 2: 88-98.
- Norris, R.D., 2000. Pelagic species diversity, biogeography and evolution. *Paleobiology*, 26: 236-258.
- Olsson, R.K., 1973. What is a kummerform planktonic foraminifer? *Journal of Paleontology*, 47: 327-329.
- Pflaumann, U., Duprat, J., Pujol, C. and Labeyrie, L., 1996. SIMMAX: A modern analog technique to deduce Atlantic sea surface temperatures from planktonic foraminifera in deep-sea sediments. *Paleoceanography*, 11: 15-36.
- Prell, W.L., Martin, A., Cullen, J.L. and Trend, M., 1999. The Brown University Foraminiferal Data Base (BFD).

- Quillévéré, F., Debat, V. and Auffray, J.-C., 2002. Ontogenetic and evolutionary patterns of shape differentiation during the initial diversification of Paleocene acarininids (planktonic foraminifera). *Paleobiology*, 28: 435-448.
- Quillévéré, F., Morard, R., Escarguel, G., Douady, C.J., Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T. and de Vargas, C., in press. Global scale same-specimen morpho-genetic analysis of *Truncorotalia truncatulinoides*: A perspective on the morphological species concept in planktonic foraminifera. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*.
- R Development Core Team, 2004. R: a language and environment for statistical computing.
- Renaud, S. and Schmidt, D.N., 2003. Habitat tracking as a response of the planktic foraminifer *Globorotalia truncatulinoides* to environmental fluctuations during the last 140 kyr. *Marine Micropaleontology*, 49: 97-122.
- Ricklefs, R., 1976. *The economy of nature: a textbook in basic ecology*. Chiron, Portland.
- Schlitzer, R., 2011. Ocean Data View. <http://odv.awi.de>
- Ujiie, Y. and Lipps, J.H., 2009. Cryptic diversity in planktic foraminifera in the northwest Pacific Ocean. *Journal of Foraminiferal Research*, 39: 145-154.
- Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T., Watanabe, S., Wiebe, P. and de Vargas, C., 2010. Coiling dimorphism within a genetic type of the planktonic foraminifer *Globorotalia truncatulinoides*. *Marine Micropaleontology*, 77: 145-153.
- Ujiie, Y., Asami, T., de Garidel-Thoron, T., Liu, H., Ishitani, Y. and de Vargas, C., 2012. Longitudinal differentiation among pelagic populations in a planktic foraminifer. *Ecology and Evolution*, 2: 1725-1737.
- Weiner, A., Aurahs, R., Kurasawa, A., Kitazato, H. and Kucera, M., 2012. Vertical niche partitioning between cryptic sibling species of a cosmopolitan marine planktonic protist. *Molecular Ecology*, 21: 4063-4073.
- Williams, D.F., Ehrlich, R., Spero, H.J., Healy-Williams, N. and Gary, A.C., 1988. Shape and isotopic differences between conspecific foraminiferal morphotypes and resolution of paleoceanographic events. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 64: 153-162.
- World Ocean Atlas 2009 (WOA09), http://www.nodc.noaa.gov/OC5/WOA09/pr_woa09.html
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E. and Billups, K., 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292: 686-693.
- Zhang, D.-Y., Lin, K. and Hanski, I., 2004. Coexistence of cryptic species. *Ecology Letters*, 7: 165-169.

CONCLUSIONS GENERALES

Délimitation objective des types génétiques chez les foraminifères planctoniques

L'identification des espèces pseudo-cryptiques chez les foraminifères planctoniques est une opportunité d'améliorer les reconstructions paléocéanographiques au Quaternaire (Morard et al., 2013). De nombreux types génétiques ont été identifiés grâce au séquençage de la fin de la SSU (Darling et Wade, 2008) mais la question de leur rang taxonomique reste souvent problématique. Ce travail a permis de mettre en évidence un manque d'homogénéité taxonomique des types génétiques définis dans la littérature, certains ne correspondant pas à des espèces cryptiques authentiques (Tableau 28). Une nouvelle taxonomie moléculaire des foraminifères planctoniques (Tableau 28) a pu être établie, à l'aide des méthodes ABGD (Puillandre et al., 2012) et GMYC (Pons et al., 2006), proposant un découpage objectif des unités taxonomiques. Ces méthodes permettent d'obtenir des résultats largement congruents (Tableau 28) et doivent être utilisées de façon complémentaire.

morpho-espèce	lit.	types	congruence	approche intégrative
<i>T. quinqueloba</i>	6	2	n.d.	oui
<i>G. bulloides</i>	11	9	n.d.	oui
<i>B. digitata</i>	n.d.	1	oui	non
<i>S. dehiscens</i>	n.d.	1	oui	non
<i>G. siphonifera</i>	3	3	oui	oui
<i>G. ruber</i>	8	5	oui	oui
<i>G. conglobatus</i>	n.d.	1	oui	non
<i>G. sacculifer</i>	1	1	oui	oui
<i>O. universa</i>	3	3	oui	oui
<i>H. pelagica</i>	3	3	n.d.	oui
<i>T. truncatulinoides</i>	5	3 ou 4	non	oui
<i>H. hirsuta</i>	n.d.	1	oui	non
<i>G. conglomerata</i>	n.d.	1	oui	non
<i>M. menardii</i>	n.d.	1	oui	non
<i>G. ungulata</i>	n.d.	1	oui	non
<i>G. tumida</i>	n.d.	1	oui	non
<i>N. pachyderma</i>	7	7 ou 4	non	oui
<i>N. incompta</i>	2	2	oui	oui
<i>N. dutertrei</i>	n.d.	1	oui	non
<i>G. inflata</i>	2	2	n.d.	oui
<i>P. obliquiloculata</i>	3	1 ou 2	non	oui
<i>G. uvula</i>	n.d.	2	n.d.	non
<i>G. glutinata</i>	n.d.	4	n.d.	non
<i>C. nitida</i>	n.d.	1	n.d.	non

Tableau 28 : nombre de types génétiques au sein des morpho-espèces de foraminifères planctoniques. Lit. : nombre de types définis dans la littérature, n.d. : pas de type défini. Types : nombre de types génétiques pouvant correspondre à des espèces. Congruence : comparaison entre les découpages proposés par les différentes méthodes de délimitation des espèces, « n.d. » si le découpage est issu d'une seule méthode. Approche intégrative : mise en relation entre types génétiques et distribution biogéographique et/ou morphologie. La connaissance de la diversité génétique des espèces en grisé est très limitée.

Ce nouveau référentiel taxonomique reste toutefois un instantané de notre connaissance actuelle de la diversité des foraminifères planctoniques et devra être complété, en particulier par le séquençage de spécimens issus de régions encore non échantillonnées. La diversité génétique de certaines morpho-espèces peu abondantes (par exemple, *Globoquadrina conglomerata*) et/ou de petite taille (par exemple, *Globigerinita uvula*) reste en effet mal connue. Chez les 10 morpho-espèces correspondant à un seul type génétique (Tableau 28), seul l'échantillonnage de *Globigerinoides sacculifer* est suffisant pour conclure à une absence de diversité cryptique (Partie II chapitre 1). Il est donc possible que des types génétiques restent à découvrir chez les 9 autres morpho-espèces, d'autant plus que certaines

d'entre elles, comme *Sphaerodinella dehiscens*, tolèrent de larges gammes de conditions environnementales et sont donc susceptibles de regrouper plusieurs éco-génotypes. L'effort d'échantillonnage et de séquençage à venir doit donc inclure ces morpho-espèces afin d'aboutir à une vision globale de la diversité cryptique chez les foraminifères planctoniques.

L'utilisation de méthodes objectives s'est heurtée au caractère hétérogène (taille et localisation) des séquences disponibles pour la fin de la SSU, et, parfois, à un manque de données. Ainsi, le statut taxonomique de certains types génétiques n'a pu être testé qu'à l'aide d'une seule méthode (Tableau 28). Un effort de séquençage doit donc être entrepris afin de s'assurer de la robustesse de la délimitation des types génétiques chez ces morpho-espèces. Un nombre plus important de séquences homologues, correspondant à la région choisie dans cette étude pour l'application de la méthode ABGD, est par conséquent requis dans les cas de *Turborotalia quinqueloba*, *Globigerina bulloides*, *Globigerinoides ruber* (Types Ib et IIb), *Orbulina universa* (Type II), *Neogloboquadrina pachyderma*, *Neogloboquadrina dutertrei*, *Truncorotalia truncatulinoides* (Types I, III et IV) et *Globoconella inflata* (Type II). De même, un effort de clonage doit être entrepris pour tous les types génétiques. En effet, ce travail a montré que la répartition au sein des unités taxonomiques des clones d'un même individu permet d'identifier les cas où ABGD ou GMYC subdivisent exagérément les morpho-espèces et donc d'établir des délimitations plus robustes des types génétiques.

La comparaison des taxonomies obtenues par les méthodes ABGD et GMYC a permis de mettre en évidence trois cas de non congruence. Ces cas ne résultent pas uniquement de la mauvaise qualité du jeu de données mais, au contraire, peuvent suggérer une forte influence des méthodes de reconstruction phylogénétique sur la topologie des embranchements (*N. pachyderma*) ou des événements de spéciation récents au sein d'une morpho-espèce (*T. truncatulinoides*). Seul le cas de *Pulleniatina obliquiloculata* reste véritablement irrésolu. Au vu de la forte diversité intra-génomique observée chez ce taxon, pouvant masquer le signal phylogénétique, il serait judicieux de séquencer un marqueur génétique mono-copie et évoluant plus lentement, comme le gène de l'actine de type 2 (Falkowski et al., 2005 chez *Globigerinella siphonifera*) ou de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II (Longet et Pawlowski, 2007, chez *Globigerinella siphonifera* et *Globigerinita glutinata*), afin de déterminer le nombre de types génétiques présents au sein de cette morpho-espèce.

La mise en place d'un référentiel taxonomique chez les foraminifères planctoniques est un pré-requis pour l'interprétation des jeux de données issus du séquençage environnemental. Le développement de ces jeux de données sera une opportunité de mieux connaître la biogéographie et les variations saisonnières des espèces cryptiques. Ces données ouvrent donc la voie à une véritable et fructueuse approche intégrative de la taxonomie des foraminifères planctoniques. De plus, elles devraient permettre de mieux appréhender les mécanismes à l'origine de la spéciation sympatrique chez ces organismes. Il sera ainsi plus aisé de mettre en évidence des différences entre les saisons de reproduction et/ou entre les périodes d'abondances maximales des types génétiques occupant les mêmes régions. De même, une connaissance plus fine de la biogéographie des types génétiques permettra d'estimer les flux génétiques entre différentes populations, y compris entre populations apparemment isolées comme c'est le cas par exemple pour les types génétiques bipolaires. Une meilleure connaissance des variations saisonnières d'abondance des différents types génétiques permettra de plus d'établir des relations entre abondances et température des eaux de surface qui reflètent les abondances annuelles observées dans les sédiments de surface, utilisés dans la calibration des fonctions de transfert. Enfin, connaître les variations d'abondance et la biogéographie des types génétiques permettra de mieux cibler les régions et les périodes à échantillonner en vue d'analyses morphologiques et/ou géochimiques.

Apport des séquences complètes de la SSU

Jusqu'à présent les rares séquences complètes de la SSU ont été obtenues afin d'améliorer les reconstructions phylogénétiques entre les principaux clades de foraminifères (Schweizer et al., 2008 ; Sears, 2011). Cette étude montre que les séquences complètes ont leur intérêt également pour les phylogénies à l'échelle de la morpho-espèce. Comme ces séquences restent difficiles à obtenir, elles ne peuvent cependant venir qu'en complément des séquences partielles de la SSU utilisées classiquement chez les foraminifères planctoniques. L'exemple de *N. pachyderma* (Fig. 43) montre que l'obtention de séquences complètes de la SSU est prometteuse pour résoudre la phylogénie et le découpage taxonomique de cette morpho-espèce alors que des séquences partielles de la SSU ne permettent pas de répondre à ces questions de façon satisfaisante. Notamment, les séquences complètes obtenues au cours de ce travail montrent que le scénario phylogéographique proposé par Darling et al. (2007) doit être révisé et cette révision entraîne une modification de l'interprétation des liens entre

histoires climatique et biologique. Néanmoins, cette étude doit être complétée : les séquences complètes de la SSU des Types VII, VI et V, plus rarement échantillonnés, sont encore inconnues. Il faudrait aussi séquencer plusieurs individus par type génétique afin d'estimer la diversité intra-type génétique et séquencer plusieurs clones d'un même individu afin d'avoir accès à la variabilité intra-génomique, ce qui est un prérequis pour une délimitation objective des espèces cryptiques (Partie I, Chapitre 1). Il serait judicieux de réaliser le séquençage complet de la SSU pour les morpho-espèces dont la délimitation des types génétiques pose problème (Partie I, chapitre 1). Par exemple, les Types I et II de *Truncorotalia truncatulinoides* sont très peu divergents au niveau de la fin de la SSU (de Vargas et al., 2001) ce qui rend leur statut taxonomique ambigu (Partie I, chapitre 1). L'exemple de *N. pachyderma* suggère que le début de la SSU inclut plus de régions variables que la fin (Fig. 43), donc, si cette caractéristique est un trait commun aux foraminifères, le statut taxonomique des Types I et II de *T. truncatulinoides* pourrait être résolu à l'aide de séquences complètes de la SSU.

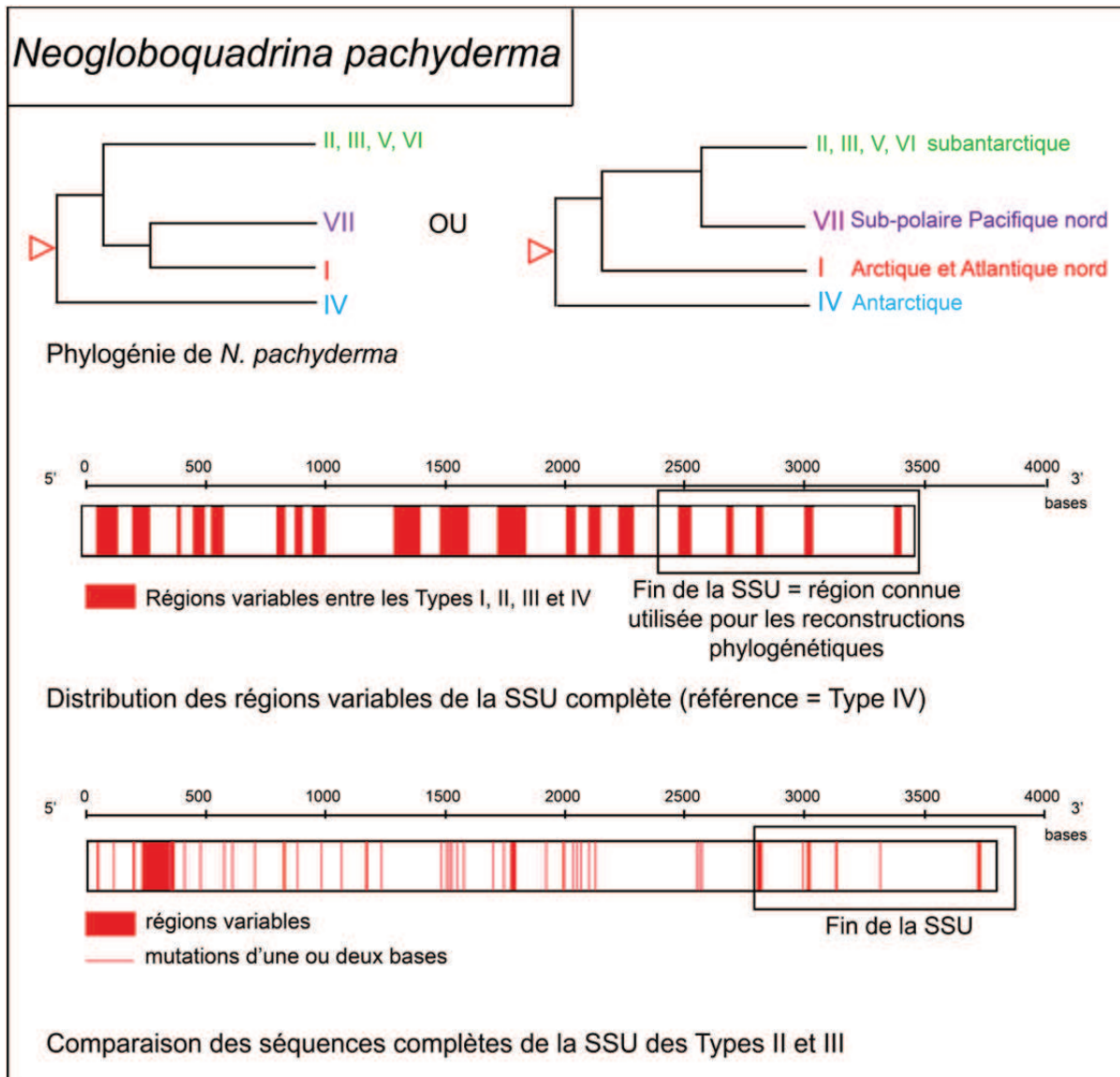


Figure 43 : bilan de l'étude des séquences complètes et partielles de la SSU de *Neogloboquadrina pachyderma*.

D'après le nouveau référentiel taxonomique, 6 types génétiques de foraminifères planctoniques (*Globigerina bulloides* Types IIa et IIb-d-f, *Turborotalia quinqueloba* Type I, *T. truncatulinoides* Type II, *Neogloboquadrina incompta* Type I et *Globoconella inflata* Type I) présentent une distribution bipolaire : la distribution de ces types génétiques inclut les hautes et/ou moyennes latitudes des deux hémisphères séparées par les régions (sub)tropicales. Une telle distribution pose la question du maintien d'un flux génétique suffisant entre les deux hémisphères ou, dans le cas contraire, de l'âge de l'isolement des populations australes et boréales. Darling et al. (2000) a conclu que, au moins dans les cas des Types IIa et IIb-d-f de *Globigerina bulloides*, du Type I de *Turborotalia quinqueloba* et du Type I de *Neogloboquadrina incompta*, un flux génétique suffisant se maintenait entre les deux hémisphères, probablement grâce à un transit via les upwellings. Ce flux génétique a pu

se maintenir au cours du temps et même s'intensifier lors des périodes glaciaires (Darling et al., 2000). La comparaison des séquences complètes obtenues pour le type génétique bipolaire (Type I) de *Neogloboquadrina incompta* au cours de cette étude (hémisphère sud) et par Seears (2011, hémisphère nord) vient tempérer, voire remettre en cause, cette hypothèse. En effet, ces séquences présentent des différences jusque-là insoupçonnées pouvant résulter d'une diminution du flux génétique trans-équatorial. Ces différences doivent toutefois être confirmées par l'obtention d'un nombre plus important de séquences. Il serait donc pertinent de réaliser le séquençage complet de la SSU pour les types génétiques bipolaires afin de déterminer s'il existe de véritables haplotypes bipolaires.

Taxonomies moléculaire et morphologique : les cas exceptionnels de *Globigerinoides sacculifer* et *Neogloboquadrina pachyderma*

La diversité cryptique semble être la règle dans le domaine pélagique (Knowlton, 1993) et les foraminifères ne font pas exception. En effet, jusqu'à présent, chacune des morpho-espèces dont l'échantillonnage en vue d'analyses génétiques a été particulièrement poussé, s'est révélée être le regroupement de plusieurs types génétiques (Darling et al., 2008). Le premier chapitre de cette thèse a conclu qu'une partie de ces types génétiques correspondait très certainement à des espèces différentes. *Globigerinoides sacculifer* fait exception à cette règle puisque cette morpho-espèce, pourtant ancienne (~19 Ma, Kennett et Srinivasan, 1983 ; Berggren et al., 1995), présente une très faible diversité génétique correspondant à de la diversité intra-spécifique (Partie I, chapitre 1 et Partie II, chapitre 1). Néanmoins, nous avons montré dans ce travail qu'il reste encore possible de mettre en évidence une absence de diversité cryptique parmi les espèces moins abondantes encore peu étudiées. Avec l'augmentation des données disponibles, de plus en plus de cas d'absence de diversité cryptique, chez des taxons allant du requin pèlerin (Hoelzel et al., 2006) aux dinoflagellés (Logares et al., 2007 ; Montresor et al., 2003), montrent que si la diversité cryptique est courante chez les organismes pélagiques, elle n'est cependant pas systématique.

Le cas de *G. sacculifer* pose la question de l'âge de l'espèce biologique : s'agit-il bien de la même espèce depuis 19 Ma ou bien d'autres espèces de *G. sacculifer* aujourd'hui disparues, de morphologie similaire, l'ont-elle précédée ? Et surtout, si ces espèces ont effectivement existé, avaient-elles les mêmes affinités écologiques que l'espèce actuelle ? Si ce n'est pas le cas, alors l'utilisation de *G. sacculifer* comme proxy paléoclimatique dans les séries les plus anciennes peut être remise en cause. De façon plus générale, le problème de

l'âge et de la stabilité des affinités écologiques se pose pour tous les types génétiques. De plus, du fait des variations importantes du taux d'évolution de la SSU chez les foraminifères planctoniques, l'utilisation d'horloges moléculaires reste très délicate (de Vargas et al., 1997 ; de Vargas et Pawlowski, 1998) et seule la mise au point de méthodes de reconnaissance des types génétiques dans le registre fossile pourrait permettre de répondre à cette question.

Les types génétiques définis chez les foraminifères planctoniques présentent des affinités écologiques et/ou des distributions géographiques restreintes par rapport à celle de leur morpho-espèce correspondante (Tableau 29, Darling et al., 2008 et Partie I Chapitre 1). Ils constituent de ce fait des éco-génotypes. Les types génétiques de *N. pachyderma* présents dans l'océan austral (Types II, III et IV) suivent cette règle puisque leurs distributions reflètent les conditions de température et de productivité primaire des eaux de surface (Fig. 44). Ce n'est pas le cas de *G. sacculifer* qui correspond à une unique espèce, distribuée à l'échelle mondiale et tolérant une assez large gamme de températures (14-32°C, Bijma et al., 1990). La découverte des espèces cryptiques avait induit le passage d'une conception des espèces pélagiques comme relativement généralistes et cosmopolites à celle d'organismes beaucoup plus spécialisés (Norris, 2000). L'exemple de *G. sacculifer* montre que cette vision doit toutefois être tempérée.

morpho-espèce	types	morphologie	écologie
<i>G. siphonifera</i>	3	porosité	productivité
<i>G. ruber</i>	5	taille, forme de la dernière loge, couleur	température
<i>O. universa</i>	3	porosité	productivité
<i>T. truncatulinoïdes</i>	3 ou 4	forme du contour	température
<i>G. inflata</i>	2	taille de l'ouverture	température

Tableau 29 : morpho-espèces dont la morphologie des types génétiques a été étudiée. Types : nombre de types génétiques ; morphologie : différences morphologiques observées entre les types ; écologie : paramètre principal contrôlant la distribution des types. Références : Huber et al., 1997 ; Aurahs et al., 2009, 2011 ; Morard et al., 2009, 2012 ; de Vargas et al., 2001 ; Quillévéré et al., 2013.

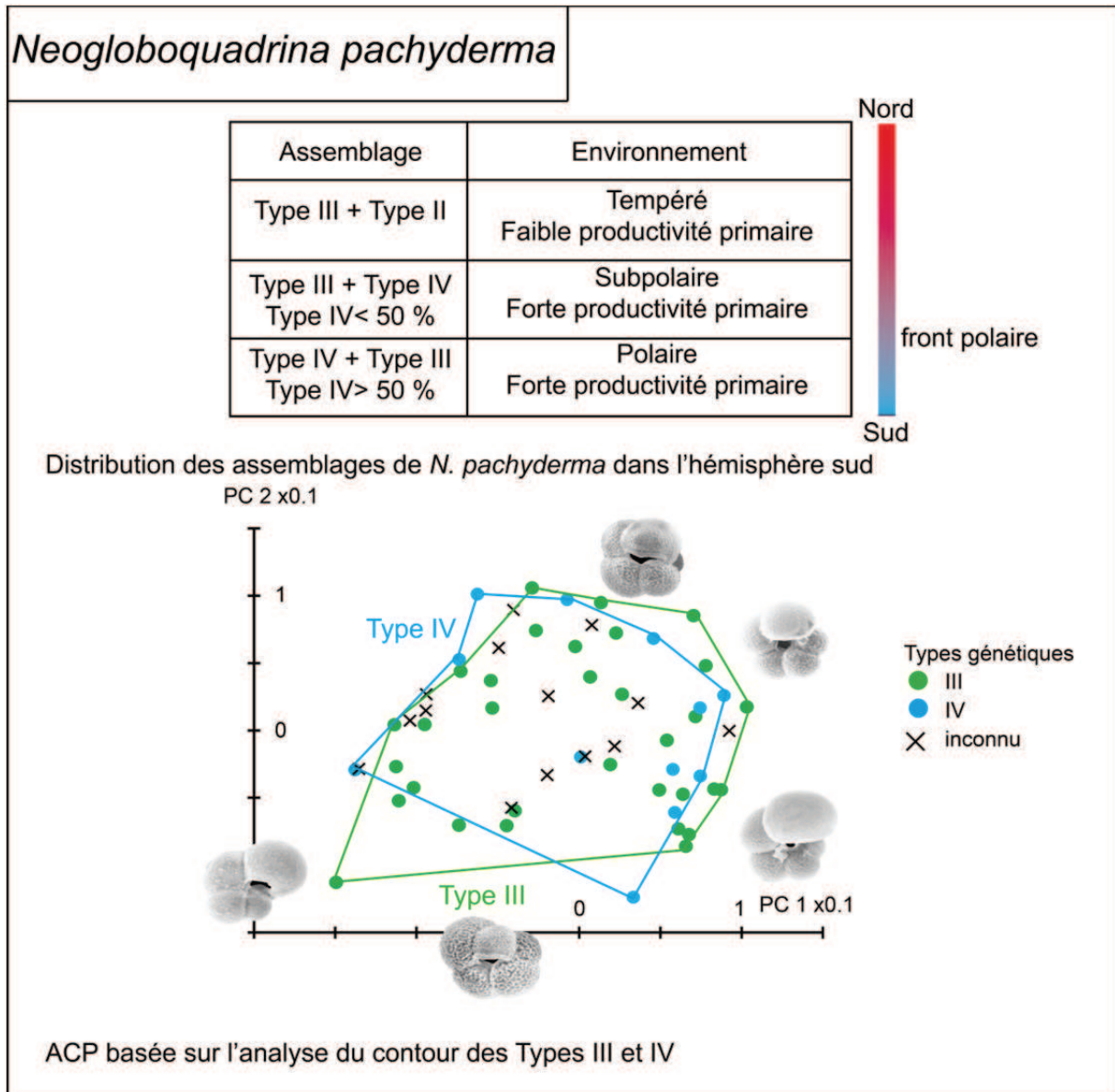


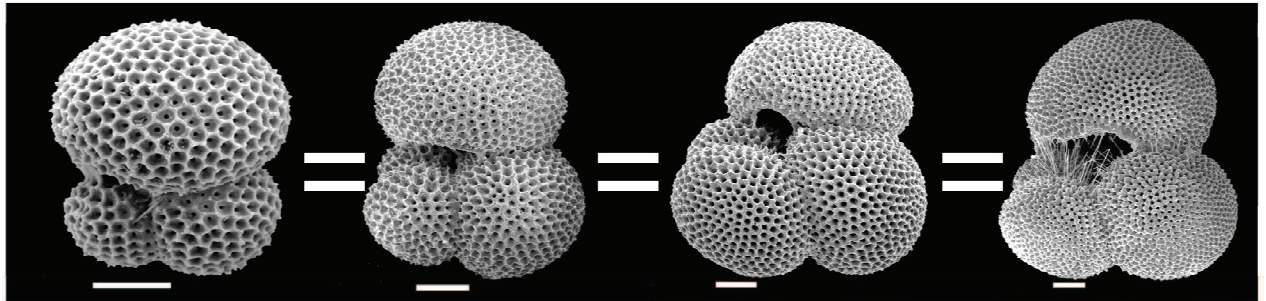
Figure 44 : bilan de l'étude morphogénétique et biogéographique de *Neogloboquadrina pachyderma*

Des investigations plus poussées chez quelques morpho-espèces ont mis en évidence des différences morphologiques ténues mais significatives entre les différents types génétiques, alors qualifiés de pseudo-cryptiques (Tableau 29). Ces études ont donc conclu que l'influence de l'environnement sur la forme des foraminifères planctoniques avait été surestimée et que leurs caractéristiques morphologiques reflètent principalement leur type génétique. Les cas de *G. sacculifer* et *N. pachyderma* montrent que cette généralisation doit être également modérée. Ainsi, chez *G. sacculifer*, les distances génétiques entre individus de morphotypes différents sont similaires à celles calculées entre individus de même morphotype. Ce résultat est d'autant plus inattendu qu'il s'agit de morphotypes très dissemblables (Fig. 45). De même, chez *N. pachyderma*, les principales caractéristiques des

coquilles (nombre de loges sur le dernier tour, taille de la dernière loge) ainsi que leur forme (Fig. 44) ne sont pas corrélables aux types génétiques mais sont bien d'origine éco-phénotypique.

La découverte des espèces pseudo-cryptiques suggère une possible réconciliation entre morpho-taxonomie et taxonomie moléculaire (Huber et al., 1997 ; Aurahs et al., 2009, 2011 ; Morard et al., 2009, 2011 ; de Vargas et al., 2001 ; Quillévéré et al., 2013). Cette réconciliation est possible chez *G. sacculifer* à condition d'abolir la distinction entre les divers morphotypes et notamment la distinction « avec sac » et « sans sac » encore utilisée (par exemple, Prell, 1999). Par contre cette réconciliation reste impossible pour les types génétiques austraux de *N. pachyderma*. Or, cette morpho-espèce représente la presque totalité des assemblages de hautes latitudes australes et boréales sont largement dominés chacun par un unique type génétique de *N. pachyderma* (Type I dans l'Atlantique nord, Type VII dans le Pacifique nord, Darling et al., 2007). Par conséquent, l'intégration des espèces cryptiques des foraminifères planctoniques dans les fonctions de transfert en vue d'améliorer la précision des reconstructions paléocéanographiques est compromise pour ces environnements.

Globigerinoides sacculifer



Morphotypes de *G. sacculifer*

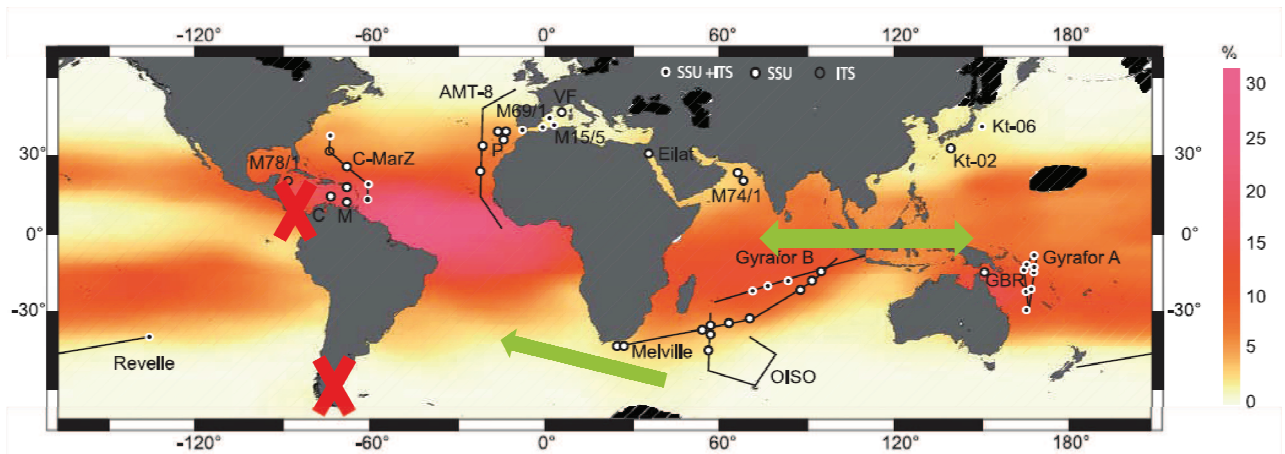
a : *G. immaturus*

b : *G. trilobus*

c : *G. quadrilobatus*

d : *G. sacculifer avec sac*

barre d'échelle = 0,05 mm



Abondance dans les sédiments de surface (MARGO)



Flux génétique impossible (cf conditions environnementales)



Flux génétique

Figure 45 : bilan de l'étude morphogénétique et biogéographique de *Globigerinoides sacculifer*

Les liens entre diversité génétique et morphologique chez les foraminifères semblent au final variables d'une morpho-espèce à l'autre et il est difficile de prévoir quel critère morphologique peut être mis en relation avec la diversité génétique d'un taxon. Ainsi, chez *G. sacculifer* et *N. pachyderma*, l'aspect de la dernière loge n'a pas de valeur taxonomique (Partie II) alors que ce même critère permet de différencier les Types I et II de

Globogerinoides ruber. La difficulté de réconcilier taxonomies morphologique et moléculaire est attendue car les taux d'évolution de la SSU et les taux d'évolution morphologique ne sont pas directement liés. Chez les foraminifères, il est probable que les différences entre espèces cryptiques soient d'ordre plus métabolique que morphologique: différences de régime alimentaire et/ou différences dans les modes de reproduction par exemple. Une trace de ces différences métaboliques peut toutefois être conservée après la mort du foraminifère car un métabolisme différent peut se traduire par un fractionnement isotopique et élémentaire différent, l'«effet vital», qui peut atteindre, par exemple, 1.5‰ pour le $\delta^{18}\text{O}$ chez les foraminifères planctoniques (Katz et al., 2010). L'analyse géochimique des coquilles des types génétiques de *N. pachyderma* pourrait donc permettre :

1) d'établir des équations de paléotempérature calibrées à l'échelle de l'espèce cryptique. Ces équations pourraient être alors utilisées dans le registre fossile pour les régions n'abritant qu'une seule espèce cryptique (Atlantique nord, Pacifique nord et environnements polaires extrêmes de l'Antarctique).

2) de différencier des espèces cryptiques au sein d'un assemblage et donc de les inclure dans la calibration des fonctions de transfert.

Néanmoins, la mise en évidence d'effets vitaux différents implique de pouvoir s'affranchir des variations issues de l'environnement, donc de travailler soit à partir de pools d'individus de même type génétique, de même stade ontogénétique et de même provenance, soit de travailler à l'échelle de l'individu. Une analyse individuelle a été tentée chez les Types II, III et IV de *N. pachyderma* au cours de ce travail, mais la quantité de CaCO_3 présente dans ces coquilles, n'ayant pas atteint le stade gamétogénétique, s'est révélée trop faible pour pouvoir être détectée par le spectromètre de masse. Une utilisation de routine des signatures isotopiques des types génétiques de *N. pachyderma* n'est donc pas encore envisageable.

Pour conclure, les cas de *G. sacculifer* et *N. pachyderma* montrent que spéciation, diversification morphologique et exigences écologiques ne suivent pas de règle chez les foraminifères planctoniques contrairement à ce que suggéraient les études précédentes. L'interprétation des jeux de données issus du séquençage environnemental, rendue possible par la mise au point d'un référentiel taxonomique adéquat, permettra très probablement de mettre au jour d'autres exceptions, et finalement de mieux comprendre la dynamique des écosystèmes pélagiques.

REFERENCES

- Adl, S., Simpson, A., Farmer, M., Andersen, R., Anderson, O., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James, T., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C., Lewis, L., Lodge, J., Lynn, D., Mann, D., McCourt, R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S., Nerad, T., Shearer, C., Smirnov, A., Spiegel, F. and Taylor, M., 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52: 399-451.
- Anand, P. and Elderfield, H., 2003. Calibration of Mg/Ca thermometry in planktonic foraminifera from a sediment trap time series. *Paleoceanography*, 18: 1050-1064.
- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *Institute of Electrical and Electronics Engineers Transactions on Automatic Control*, 19: 716-723.
- Andersson, J.O., 2005. Lateral gene transfert in eucaryotes. *Cellular and Molecular Life Science*, 62: 1182-1197.
- André, A., Weiner, A., Quillévére, F., Aurahs, R., Morard, R., Douady, C., de Garidel-Thoron, T., Escarguel, G., de Vargas, C. and Kucera, M., 2013. The cryptic and the apparent reversed: lack of genetic differentiation within the morphologically diverse plexus of the planktonic foraminifer *Globigerinoides sacculifer*. *Paleobiology*, 39: 21-39.
- André, A., Quillévére, F., Morard, R., de Vargas, C., Ujiie, Y., and Douady, C., in prep. A. SSU rDNA divergence in planktonic foraminifera: molecular taxonomy and biogeographic implications.
- André, A., Quillévére, F., Escarguel, G., Michel, E. and Douady, C., in prep. B. A case of true cryptic species within planktonic foraminifera: eco-phenotypic morphological variations of Southern Ocean *Neoglobobquadrina pachyderma* genetic types.
- Aurahs, R., Göker, M., Grimm, G., Hemleben, V., Hemleben, C., Schiebel, R. and Kucera, M., 2009. Using the multiple analysis approach to reconstruct phylogenetic relationships among planktonic foraminifera from highly divergent and length-polymorphic SSU rDNA sequences. *Bioinformatics and Biology Insights*, 3: 155-177.
- Aurahs, R., Grimm, G., Hemleben, V., Hemleben, C. and Kucera, M., 2009. Geographical distribution of cryptic genetic types in the planktonic foraminifer *Globigerinoides ruber*. *Molecular Ecology*, 18: 1692-1706.
- Aurahs, R., Treis, Y., Darling, K. and Kucera, M., 2011. A revised taxonomic and phylogenetic concept for the planktonic foraminifer species *Globigerinoides ruber* based on molecular and morphometric evidence. *Marine Micropaleontology*, 79: 1-14.
- Aze, T., Ezard, T., Purvis, T., Coxall, H., Stewart, D., Wade, B. and Pearson, P., 2011. A phylogeny of Cenozoic macroperforate planktonic foraminifera from fossil data. *Biological Reviews*, 86: 900-927.

- Bachy, C., Dolan, J., Lopez-Garcia, P., Deschamps, P. and Moreira, D., 2013. Accuracy of protist diversity assessments: morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rDNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 00: 1-12.
- Bandelt, H.J., Forster, P. and Röhl, A., 1999. Median Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48
- Bandy, O.L., 1972. Origin and development of *Globorotalia (Turborotalia) pachyderma* (Ehrenberg). *Micropaleontology*, 18: 294-318.
- Banner, F.T. and Blow, W.H., 1960. Some primary types of species belonging to the superfamily Globigerinaceae. *Contributions from the Cushman Foundation for Foraminiferal Research*, 11: 1–45.
- Bard, E. and Rickaby, R.E.M., 2009. Migration of the subtropical front as a modulator of glacial climate. *Nature*, 560: 380–384.
- Barker, S., Cacho, I., Benway, H. and Takachikawa, K., 2005. Planktonic foraminiferal Mg/Ca as a proxy for past oceanic temperatures: a methodological overview and data compilation for the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews*, 24: 821-834.
- Barrows, T.T. and Juggins, S., 2005. Sea-surface temperatures around the Australian margin and Indian Ocean during the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Review*, 24: 1017–1047.
- Bartoli, G., Sarnthien, M., Weinelt, M., Erlenkeuser, H., Garbe-Schonberg, D. and Lea, D., 2005. Final closure of Panama and the onset of northern hemisphere glaciation. *Earth and Planetary Science letters*, 237: 33-44.
- Bé, A.W., 1959. Ecology of recent planktonic foraminifera: Part I –Areal distribution in the western North Atlantic. *Micropaleontology*, 5: 77-100.
- Bé, A.W., 1960. Some observations on arctic planktonic foraminifera. *Contributions of the Cushman Foundation for Foraminiferal Research*, 11: 64-68.
- Bé, A.W. and Hemleben, C., 1970. Calcification in a living planktonic foraminifer, *Globigerinoides sacculifer* (Brady). *Neue Jahrbuch für Geologie und Paläontologie abhandlungen*, 134: 221-234.
- Bé, A.W.H. and Tolderlund, D.S., 1971. *Distribution and ecology of planktonic foraminifera. The micropaleontology of oceans*, Cambridge University Press, London.
- Bé, A.W., 1980. Gametogenetic calcification in a spinose planktonic foraminifer, *Globigerinoides sacculifer* (Brady). *Marine Micropaleontology*, 5: 283–310.
- Bé, A.W., Anderson, O.R., Faber, W.W. and Caron, D.A., 1983. Sequence of morphological and cytoplasmic changes during gametogenesis in the planktonic foraminifer *Globigerinoides sacculifer* (Brady). *Micropaleontology*, 29: 319–325.
- Beal, L.M., de Ruijter, W.P., Biastoch, A., Zahn, R. and SCOR/WCRP/IAPSO Working Group 136, 2011. On the role of the Agulhas system in ocean circulation and climate. *Nature*, 472: 429–436.

- Becquey, S. and Gersonde, R., 2003. A 0.55-Ma paleotemperature record from the subantarctic zone: implications for Antarctic Circumpolar Current development. *Paleoceanography*, 18: 1014-1028.
- Begon, M., Harper, J.L. and Townsend, J.R., 1986. *Ecology : individuals, populations and communities*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Bergami, C., Capotondi, L., Langone, L., Giglio, F. and Ravaoli, M., 2009. Distribution of living planktonic foraminifera in the Ross Sea and the Pacific sector of the Southern Ocean (Antarctica). *Marine Micropaleontology*, 73: 37-48.
- Berger, W.H., 1969. Planktonic foraminifera: basic morphology and ecologic implications. *Journal of paleontology*, 43: 1369-1383.
- Berggren, W.A., Kent, D.V., Swisher, C.C. and Aubry, M-P., 1995. A revised Cenozoic geochronology and chronostratigraphy. *Geochronology, time scales and global stratigraphic correlation*, SEPM (Society for Sedimentary Geology), Tulsa (Oklahoma).
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K. and Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22:148–155.
- Bijma, J., Erez, J. and Hemleben, C., 1990. Lunar and semi-lunar reproductive cycles in some spinose planktonic foraminifers. *Journal of Foraminiferal Research*, 20:117–127.
- Bijma, J., Faber, W.W. and Hemleben, C., 1990. Temperature and salinity limits for growth and survival of some planktonic foraminifers in laboratory cultures. *Journal of Foraminiferal Research*, 20: 95-116.
- Bijma, J., Hemleben, C., Oberhänsli, H. and Spindler, M., 1992. The effects of increased water fertility on tropical spinose planktonic foraminifers in laboratory cultures. *Journal of Foraminiferal Research*, 22:242–256.
- Bijma, J., Hemleben, C., Huber, B.T., Erlenkeuser, H. and Kroon, D., 1998. Experimental determination of the ontogenetic stable isotope variability in two morphotypes of *Globigerinella siphonifera* (d'Orbigny). *Marine Micropaleontology*, 35: 141-160.
- Bolli, H. and Saunders, J., 1985. *Oligocene to Holocene low latitude planktic foraminifera. Plankton stratigraphy*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Boltovskoy, D., Correa, N. and Boltovskoy, A., 2003. Marine zooplanktonic diversity: a view from the South Atlantic. *Oceanologica Acta*, 25: 271-278.
- Brady, H.B., 1877. Supplementary note on the foraminifera of the chalk (?) of the New Britain group. *Geological Magazine London*, 4: 534–536.
- Briggs, J.C., 1994. Species diversity: land and sea compared. *Systematic Biology*, 43: 130-135.
- Broecker, W.S., 1982. Ocean chemistry during glacial time. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 46: 1689-1705.

- Budillon, F., Lirer, F., Iorio, M., Macri, P., Sagnotti, L., Vallefucio, M., Ferraro, L., Garziglia, S., Innangi, S., Sahabi, M. and Tonielli, R., 2009. Integrated stratigraphic reconstruction for the last 80 kyr in deep sector of the Sardinia Channel (Western Mediterranean). *Deep Sea Research Part II, Topical Studies in Oceanography*, 56: 725–737.
- Caron, D.A. and Bé, A.W.H., 1984. Predicted and observed feeding rates of the spinose planktonic foraminifer *Globigerinoides sacculifer*. *Bulletin of Marine Science*, 35: 1-10.
- Carter, L., McCave, I.N., Williams, M.J.M., Fabio, F. and Martin, S., 2008. Chapter 4 circulation and water masses of the Southern Ocean: a review. *Developments in Earth and Environmental Sciences*, Elsevier, Amsterdam.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 540-552.
- Cavalier-Smith, T. and Chao, E.E.Y., 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist*, 154: 341-358.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18: 117–143.
- Cifelli, R., 1961. *Globigerina incompta*, a new species of pelagic foraminifera from the North Atlantic Ocean. *Contributions of the Cushman Foundation for Foraminiferal Research*, 12: 83-86.
- CLIMAP, 1981. Seasonal reconstructions of the Earth's surface at the last glacial maximum. *Geological Society of American Map and Chart Series*, MC-36.
- Coleman, A.W., 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 19: 370-375.
- Coleman, A.W., 2009. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50: 197-203.
- Collen, J.D. and Vella, P., 1973. Pliocene planktonic foraminifera, southern North Island, New Zealand. *The Journal of Foraminiferal Research*, 3: 13-29.
- Coyne, J. and Orr, H., 2004. *Speciation chapter 1. Speciation*, Sinauser, Sunderland (Massachusetts).
- Darling, K.F., Kroon, D., Wade, C.M. and Leigh Brown, A.J., 1996. Molecular phylogeny of the planktic foraminifera. *Journal of Foraminiferal Research*, 26: 324-330.
- Darling, K.F., Wade, C.M., Kroon, D. and Brown, A.J., 1997. Planktic foraminiferal molecular evolution and their polyphyletic origins from benthic taxa. *Marine Micropaleontology*, 30: 251–266.
- Darling, K.F., Wade, C.M., Kroon, D., Brown, A.J.L. and Bijma, J., 1999. The diversity and distribution of modern planktic foraminiferal small subunit ribosomal RNA genotypes and their potential as tracers of present and past circulation. *Paleoceanography*, 14: 3-12.

- Darling, K.F., Wade, C.M., Stewart, I.A., Kroon, D., Dingle R. and Brown, A.J., 2000. Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. *Nature*, 405: 43-47.
- Darling, K.F., Kucera, M., Wade, C.M., Langen, P.V. and Pak, D., 2003. Seasonal distribution of genetic types of planktonic foraminifer morphospecies in the Santa Barbara Channel and its paleoceanographic implications. *Paleoceanography*, 18: 1032-1042.
- Darling, K.F., Kucera, M., Pudsey, C.J. and Wade, C.M., 2004. Molecular evidence links cryptic diversification in polar planktonic protists to Quaternary climate dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 7657-7662.
- Darling, K.F., Kucera, M., Kroon, D. and Wade, C.M., 2006. A resolution for the coiling direction paradox in *Neogloboquadrina pachyderma*. *Paleoceanography*, 21: 1-14.
- Darling, K.F., Kucera, M. and Wade, C.M., 2007. Global molecular phylogeography reveals persistent arctic circumpolar isolation in a marine planktonic protist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 5002-5007.
- Darling, K.F. and Wade, C.M., 2008. The genetic diversity of planktic foraminifera and the global distribution of ribosomal RNA genotypes. *Marine Micropaleontology*, 67: 216-238.
- Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 407-415.
- De Aguiar, M.A.M., Baranger, M., Baptestini, E.M., Kaufman, L. and Bar-Yam, Y., 2009. Global patterns of speciation and diversity. *Nature* 460: 384-387.
- de Queiroz, K., 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 6600-6607.
- de Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56: 879-886.
- de Vargas, C., Zaninetti, L., Hilbrecht, H. and Pawlowski, J., 1997. Phylogeny and rates of molecular evolution of planktonic foraminifera: SSU rDNA sequences compared to the fossil record. *Journal of Molecular Evolution*, 45: 285-294.
- de Vargas, C., and Pawlowski, J., 1998. Molecular versus taxonomic rates of evolution in planktonic foraminifera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9:463-469.
- de Vargas, C., Norris, R.D., Zaninetti, L., Gibb, S.W. and Pawlowski, J., 1999. Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 2864-2868.
- de Vargas, C., Renaud, S., Hilbrecht, H. and Pawlowski, J., 2001. Pleistocene adaptive radiation in *Globorotalia truncatulinoides*: genetic, morphologic, and environmental evidence. *Paleobiology*, 27: 104-125.

- de Vargas, C., Bonzon, M., Rees, N.W., Pawlowski, J. and Zaninetti, L., 2002. A molecular approach to biodiversity and biogeography in the planktonic foraminifer *Globigerinella siphonifera* (d'Orbigny). *Marine Micropaleontology*, 45: 101-116.
- de Vernal, A. and Hillaire-Marcel, C., 2006. Provincialism in trends and high frequency change in the northwest North Atlantic during the Holocene. *Global Planetary Change*, 54: 263-290.
- Dieckmann, G.S., Spindler, M., Mange, M.A., Ackley, S.F. and Eicken, H., 1991. Antarctic sea ice: a habitat for the foraminifer *Neogloboquadrina pachyderma*. *Journal of Foraminiferal Research*, 21: 183-189.
- d'Orbigny, A., 1846. Foraminifères fossiles du bassin tertiaire de Vienne (Autriche). Gide et Comp, Paris.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. and Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 8:1969-1973.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797.
- Elmer, K., Davila, J. and Lougheed, S., 2007. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BioMed Central Evolutionary Biology*, 7: 247.
- Emery, W.J. and Meincke, J., 1986. Global water masses: summary and review. *Oceanologica Acta*, 9: 383-391.
- Erez, J. and Luz, B., 1983. Experimental paleotemperature equation for planktonic foraminifera. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 47: 1025-1031.
- Ericson, D.B., 1959. Coiling direction of *Globigerina pachyderma* as a climatic index. *Science*, 130: 219-220.
- Ertan, K.T., Hemleben, V. and Hemleben, C., 2004. Molecular evolution of some selected benthic foraminifera as inferred from sequences of the small subunit ribosomal DNA. *Marine Micropaleontology*, 53: 367-388.
- Eynaud, F., Cronin, T.M., Smith, S.A., Zaragosi, S., Mavel, J., Mary, Y, Mas, V. and Pujol, C., 2009. Morphological variability of the planktonic foraminifer *Neogloboquadrina pachyderma* from ACEX cores: implications for the Late Pleistocene circulation of the Arctic Ocean. *Micropaleontology*, 55: 101-116.
- Ezard, T., Fujisawa, T. and Barraclough, T., 2009. Splits: SPecies' Limits by Threshold Statistics. R package version 1.0-11/r29.
- Fairbanks, R.G. and Weibe, P., 1980. Foraminifera and chlorophyll maximum: vertical distribution, seasonal succession, and paleoceanographic significance. *Science*, 209: 1524-1526.
- Fenchel, T., 2005. Cosmopolitan microbes and their cryptic species. *Aquatic Microbial Ecology*, 41: 49-54.

- Finlay, B.J., 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, 296: 1061-1063.
- Flakowski, J., Bolivar, I., Fahrni, J. and Pawlowski, J., 2005. Actin phylogeny of foraminifera. *Journal of Foraminiferal Research*, 35: 93-102.
- Flores, J.-A., Gersonde, R. and Sierro, F., 1999. Pleistocene fluctuations in the Agulhas Current Retroflection based on the calcareous plankton record. *Marine Micropaleontology*, 37:1–22.
- Fontaneto, D., Herniou, E.A., Boschetti, C., Caprioli, M., Melone, G., Ricci, C. and Barraclough, T.G., 2007. Independently evolving species in asexual Bdelloid rotifers. *Public Library of Science Biology*, 5: e87.
- Foote, M., 1989. Perimeter-based Fourier analysis: A new morphometric method applied to the trilobite cranium. *Journal of Paleontology*, 63: 880-885.
- Gascuel, O., 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 685-695.
- Gast, R.J. and Caron, D.A., 1996. Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates from planktonic foraminifera and radiolaria. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 1192–1197.
- Görker, M., Grimm, G.W., Auch, A.F., Aurahs, R. and Kucera, M., 2010. A clustering optimization strategy for molecular taxonomy applied to planktonic foraminifera SSU rDNA. *Evolutionary Bioinformatics*, 6: 97-112.
- Grimm, G.W., Stogerer, K., Ertan, K., Kitazato, H., Kucera, M., Hemleben, V. and Hemleben, C., 2007. Diversity of rDNA in *Chilostomella*: molecular differentiation patterns and putative hermit types. *Marine Micropaleontology*, 62: 75-90.
- Groeneveld, J., Steph, S., Tiedemann, R., Garbe-Schonberg, D., Nurnberg, D. and Sturm, A., 2006. Pliocene mixed layer oceanography for site 1241 using combined Mg/Ca and $\delta^{18}\text{O}$ analyses of *Globigerinoides sacculifer*. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, 202:1–27.
- Gouy, M., Guindon, S.P. and Gascuel, O., 2010. SeaView Version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 221-224.
- Guindon, S. and Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52:696-704.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. and Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 9.
- Hart, M.B., Hylton, M.D., Oxford, M.J., Hudson, W. and Smart, C.W., 2003. The search for the origin of the planktic Foraminifera. *Journal of the Geological Society*, 160: 341-343.
- Healy-Williams, N., 1984. Quantitative image analysis: application to planktonic foraminiferal paleoecology and evolution. *Geobios*, 17: 425-432.

- Hecht, A.D. and Savin, S.M., 1970. Oxygen-18 studies on recent planktonic foraminifera: comparison of phenotypes and test parts. *Science*, 170: 69.
- Hecht, A.D., 1974. Intraspecific variation in recent populations of *Globigerinoides ruber* and *Globigerinoides trilobus* and their application to paleoenvironmental analysis. *Journal of Paleontology*, 48:1217–1234.
- Hecht, A.D., 1976. An ecologic model for test size variation in recent planktonic foraminifera: applications to the fossil record. *Journal of Foraminiferal Research*, 6: 295-311.
- Hemleben, C., Spindler, M., Breiting, I. and Ott, R., 1987. Morphological and physiological responses of *Globigerinoides sacculifer* (Brady) under varying laboratory conditions. *Marine Micropaleontology*, 12: 305–324.
- Hemleben, C., Spindler, M. and Anderson, O.R., 1989. *Modern Planktonic Foraminifera*. Springer, New York.
- Hess, W.R., 2004. Genome analysis of marine photosynthetic microbes and their global role. *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 191-198.
- Hilbrecht, H., 1997. Morphologic gradation and ecology in *Neogloboquadrina pachyderma* and *N. dutertrei* (planktic foraminifera) from core top sediments. *Marine Micropaleontology*, 31: 31-43.
- Hilbrecht, H., 1996. *Extant planktic foraminifera and the physical environment in the Atlantic and Indian Oceans*. Technische Hochschule und der Universität Zürich, Neue Folge, Zürich.
- Hoef-Emden, K., 2012. Pitfalls of establishing DNA barcoding systems in protists: the Chrysophyceae as a test case. *Public Library of Science One*, 7: e45632.
- Hoelzel, A., Mahmood, S., Magnussen, J. and Francis, M.P., 2006. Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). *Biology Letters*, 2: 639-642.
- Holzmann, M. and Pawlowski, J., 1996. Preservation of foraminifera for DNA extraction and PCR amplification. *The Journal of Foraminiferal Research*, 26: 264-267.
- Hofker, J., 1959. On the splitting of *Globigerina*. *Contributions from the Cushman Foundation for Foraminiferal Research*, 10:1–9.
- Huber, B.T. and Leckie, R.M., 2011. Planktonic foraminiferal species turnover across deep-sea Aptian/Albian boundary sections. *Journal of Foraminiferal Research*, 41: 53-95.
- Huber, B.T., Bijma, J. and Darling, K.F., 1997. Cryptic speciation in the living planktonic foraminifer *Globigerinella siphonifera* (d'Orbigny). *Paleobiology*, 23: 33-62.
- Huber, R., Meggers, H., Baumann, K.-H., Raymo, M.E. and Henrich, R., 2000. Shell size variation of the planktonic foraminifer *Neogloboquadrina pachyderma* sin. in the Norwegian-Greenland Sea during the last 1.3 Myrs: implications for paleoceanographic reconstructions. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 160: 193-212.

- Huson, D.H., and Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 254–267.
- Ikeda, Y., Siedler, G. and Zwierz, M., 1989. On the variability of the Southern Ocean Front locations between Southern Brazil and the Antarctic Peninsula. *Journal of Geophysical Research*, 94: 4757-4762.
- Iwata, H. and Ukai, Y., 2002. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity*, 93: 384-385.
- Kahn, M.I., 1981. Ecological and paleoecological implications of the phenotypic variation in three species of living planktonic foraminifera from the northeastern Pacific Ocean (50°N, 145°W). *Journal of Foraminiferal Research*, 11: 203-211.
- Katoh, K. and Toh, H., 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 276-285.
- Katz, M.E., Crammer, B.S., Franzese, A., Barbel, H., Miller, K.G., Rosenthal, Y. and Wright, J.D., 2010. Traditional and merging geochemical proxies in foraminifera. *Journal of Foraminiferal Research*, 40: 165-192.
- Keir, R.S., 1988. On the Late Pleistocene ocean geochemistry and circulation. *Paleoceanography*, 3: 413-445.
- Kennett, J.P., 1968. Latitudinal variation in *Globigerina pachyderma* (Ehrenberg) in surface sediments of the Southwest Pacific Ocean. *Micropaleontology*, 14: 305-318.
- Kennett, J.P., 1976. Phenotypic variation in some recent and late Cenozoic planktonic foraminifera. *Foraminifera*, Academic Press, New York.
- Kennett, J.P. and Srinivasan, M.S., 1983. Neogene Planktonic foraminifera: a phylogenetic atlas. Hutchinson Ross, Stroudsburg (Pennsylvania).
- Kimoto, K. and Tsuchiya, M., unpublished. Coiling direction changes in different generations of *Neogloboquadrina pachyderma*: importance on paleoceanographic reconstruction from the evidence of laboratory cultivation and molecular phylogenetic analysis.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 11-20.
- Knowlton, N., 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 189-216.
- Kooistra, W., Sarno, D., Balzano, S., Gu, H., Andersen, R.A. and Zingone, A., 2008. Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (Bacillariophyta). *Protist*, 159: 177–193.
- Kucera, M. and Darling, K.F., 2002. Cryptic species of planktonic foraminifera: their effect on palaeoceanographic reconstructions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 360: 695-718.

- Kucera, M. and Kennett, J.P., 2002. Causes and consequences of a middle Pleistocene origin of the modern planktonic foraminifer *Neogloboquadrina pachyderma* sinistral. *Geology*, 30: 539-542.
- Kucera, M., Rosell-Melé, A., Schneider, R., Waelbroeck, C. and Weinelt, M., 2005. Multiproxy approach for the reconstruction of the glacial ocean surface (MARGO). *Quaternary Science Reviews*, 24: 813-819.
- Kucera, M., Weinelt, M., Kiefer, T., Pflaumann, U., Hayes, A., Weinelt, M., Chen, M., Mix, A.C., Barrows, T.T., Cortijo, E., Duprat, J., Juggins, S. and Waelbroeck, C., 2005. Reconstruction of sea-surface temperatures from assemblages of planktonic foraminifera: multi-technique approach based on geographically constrained calibration data sets and its application to glacial Atlantic and Pacific Oceans. *Quaternary Science Reviews*, 24: 951-998.
- Kucera, M., 2007. Planktonic foraminifera as tracers of past oceanic environments. *Proxies in Late Cenozoic Paleooceanography*, Elsevier, Amsterdam.
- Kucera, M., and Schönfeld, J., 2007. The origin of modern oceanic foraminiferal faunas and Neogene climate change. *Micropalaeontological Society Special Publication*, 2:409-426.
- Kuhl, F.P. and Giardina, C.R., 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing*, 18: 236-258.
- Kurasawa, A., Tsuchiya, M., Toyofuku, T., Kitazato, H. and Nishi, H., unpublished. Genetic variability of *Globigerina bulloides* in the Eastern North Pacific subtropical region and the bipolarity of planktic foraminiferal genotypes.
- Kuroyanagi, A., Tsuchiya, M., Kawahata, H. and Kitazato, H., 2008. The occurrence of two genotypes of the planktonic foraminifer *Globigerinoides ruber* (white) and paleo-environmental implications. *Marine Micropaleontology*, 68: 236-243.
- Laakmann, S., Kochzius, M. and Auel, H., 2009. Ecological niches of Arctic deep-sea copepods: vertical partitioning dietary preferences and different trophic levels minimize inter-specific competition. *Deep-Sea Research*, 1: 741-756.
- Laetsch, D., Heitlinger, E., Taraschewski, H., Nadler, S. and Blaxter, M., 2012. The phylogenetics of Anguillicolidae (Nematoda: Anguillicoloidea), swimbladder parasites of eels. *BioMed Central Evolutionary Biology*, 12: 60.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Chenna, N.P., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X, Version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Lee, J. J. and Anderson, O. R., 1991. *Biology of Foraminifera*. Academic Press, London.
- Lefébure, T., Douady, C.J., Gouy, M. and Gibert, J., 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 435-447.

- Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J.J. and Suchard, M.A., 2010. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 1877-1885.
- Leroy, L.W., 1939. Some small Foraminifera, Ostracoda and otoliths from the Neogene ("Miocene") of the Rokan-Tapanoeli area, central Sumatra. *Natuurkundig Tijdschrift Voor Nederlandsch Indië*, 99: 215-296.
- Levine, J. and Hill Ris Lambers, J., 2009. The importance of niches for the maintenance of species diversity. *Nature*, 461:130-254.
- Lim, D.I., Kang, S., Yoo, H.S., Jung, H.S., Choi, J.Y., Kim, H.N. and Shin, I.H., 2006. Late Quaternary sediments on the outer shelf of the Korea Strait and their paleoceanographic implications. *Geo-Marine Letters*, 26: 287–296.
- Lipps, J.H., 1972. Plankton biostratigraphy and paleoecology of the Eastern North Pacific Ocean: introduction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 12: 3-14.
- Logares, R., Rengefors, K., Kremp, A., Shalchian-Tabrizi, K., Boltovskoy, A., Tengs, T., Shurtleff, A. and Klaveness, D., 2007. Phenotypically different microalgal morphospecies with identical ribosomal DNA: a case of rapid adaptative evolution? *Microbial Ecology*, 53: 549-561.
- Longet, D. and Pawlowski, J., 2007. Higher-level phylogeny of Foraminifera inferred from the RNA polymerase II (RPB1) gene. *European Journal of Protistology*, 43: 171-177.
- Loubere, P. and Moss, K., 1986. Pliocene climatic change and the onset of the Northern Hemisphere glaciation as recorded in the northeast Atlantic Ocean. *Geological Society of America Bulletin*, 97: 818-828.
- Maddison, W.P. and Knowles, L.L., 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, 55: 21-30.
- Majewski, W., and Pawlowski, J., 2010. Morphologic and molecular diversity of the foraminiferal genus *Globocassidulina* in Admiralty Bay, King George Island. *Antarctic Science*, 22:271–281.
- Malmgren, B.A., Kucera, M., Nyberg, J. and Waelbroeck, C., 2001. Comparison of statistical and artificial neural networks techniques for estimating past sea-surface temperature from planktonic foraminifera census data. *Paleoceanography*, 16: 520-530.
- MARGO project members, 2009. Constraints on the magnitude and patterns of ocean cooling at the last glacial maximum. *Nature Geoscience*, 2: 127-132.
- Miralles, M. and Vence, A., 2013. New metrics for comparison of taxonomies reveal striking discrepancies among species delimitation methods in *Madascincus* lizards. *Public Library of Science One*, 8: e68242.
- Merle, C., Moullade, M., Lima, O. and Perasso, R., 1994. Essai de caractérisation phylogénétique de Foraminifères planctoniques à partir de séquences partielles d'ADNr28S. Elsevier, Amsterdam.

- Metzl, N., 2000. Le programme OISO, Service d'Observation de l'Océan Indien / The OISO program: Observations in the Indian Ocean. *Lettre International Geosphere Biosphere Program/France*, 10: 76-83.
- Miya, M. and Nishida, M., 1997. Speciation in the open ocean. *Nature*, 389: 803-804.
- Moore, L.R., Rocap, G. and Chisholm, S.W., 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature*, 393: 464-467.
- Montresor, M., Lovejoy, C., Orsini, L., Procaccini, G. and Roy, S., 2003. Bipolar distribution of the cyst-forming dinoflagellate *Polarella glacialis*. *Polar Biology*, 26: 186-194.
- Moller, T., Schulz, H. and Kucera, M., in press. The effect of sea surface properties on shell morphology and size of the planktonic foraminifer *Neogloboquadrina pachyderma* in the North Atlantic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*.
- Morard, R., Quillévéré, F., Escarguel, G., Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T. Norris, R.D. and de Vargas, C., 2009. Morphological recognition of cryptic species in the planktonic foraminifer *Orbulina universa*. *Marine Micropaleontology*, 71: 148-165.
- Morard, R., Quillévéré, F., Douady, C.J., de Vargas, C., de Garidel-Thoron, T. and Escarguel, G., 2011. Worldwide Genotyping in the Planktonic Foraminifer *Globoconella inflata*: Implications for Life History and Paleoceanography. *Public Library of Science One*, 6: e26665.
- Morard, R., Quillevere, F., Escarguel, G., de Garidel-Thoron, T., de Vargas, C. and Kucera, M., 2013. Ecological modeling of the temperature dependence of cryptic species of planktonic foraminifera in the Southern Hemisphere. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.palaeo.2013.05.011>
- Mudelsee, M. and Schulz, M., 1997. The Mid-Pleistocene climate transition: onset of 100 ka cycle lags ice volume build-up by 280 ka. *Earth and Planetary Science Letters*, 151: 117-123.
- Norris, R., Kim, D., Park, B.-K., Kang, S.-H. and Khim, B.-K., 1998. Stable isotope and ecological habitat of planktonic foraminifera adjacent to the ice edge in the western Weddell Sea. *Geosciences Journal*, 2: 88-98.
- Norris, R.D., 2000. Pelagic species diversity, biogeography and evolution. *Paleobiology*, 26: 236-258.
- Norris, R.D. and de Vargas, C., 2000. Evolution all at sea. *Nature*, 405: 23-24.
- Nuernberg, D., 1995. Magnesium in tests of *Neogloboquadrina pachyderma* sinistral from high northern and southern latitudes. *Journal of Foraminiferal Research*, 25: 350-368.
- Olsson, R.K., 1973. What is a kummerform planktonic foraminifer? *Journal of Paleontology*, 47: 327-329.
- Pace, N.R., Olsen, G.J. and Woese, C.R., 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*, 45: 325-326.
- Paradis, E., Claude, J. and Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20: 289-290.

- Parker, F.L., 1962. Planktonic foraminiferal species in Pacific sediments. *Micropaleontology*, 8: 219-254.
- Parker, F.L. and Berger, W.H., 1971. Faunal and dissolution patterns of planktonic foraminifera in surface sediments of the South Pacific. *Deep Sea Research*, 18: 73-107.
- Patterson, M.O. and Ishman, S.E., 2012. Neogene benthic foraminiferal assemblages and paleoenvironmental record for McMurdo Sound, Antarctica. *Geosphere*, 8: 1331-1341.
- Pawlowski, J., Bolivar, I., Fahrni, J.F., Cavalier-Smith, T. and Gouy, M., 1996. Early origin of foraminifera suggested by SSU rRNA gene sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 445-450.
- Pawlowski, J., Bolivar, I., Fahrni, J., de Vargas, C., Gouy, M. and Zaninetti, L., 1997. Extreme differences in rates of molecular evolution of foraminifera revealed by comparison of ribosomal DNA sequences and the fossil record. *Molecular Biology and Evolution*, 14:498-505.
- Pawlowski, J., 2000. Introduction to the molecular systematics of foraminifera. *Micropaleontology*, 46: 1-12.
- Peeters, F., Acheson, R., Brummer, G.J., de Ruijter, W., Schneider, R., Ganssen, G., Ufkes, E. and Kroon, D., 2004. Vigorous exchange between the Indian and Atlantic oceans at the end of the past five glacial periods. *Nature* 430: 661–665.
- Pflaumann, U., Duprat, J., Pujol, C. and Labeyrie, L., 1996. SIMMAX: A modern analog technique to deduce Atlantic sea surface temperatures from planktonic foraminifera in deep-sea sediments. *Paleoceanography*, 11: 15-36.
- Platt, T. and Sathyendranath, S., 1999. Spatial structure of pelagic ecosystem processes in the global ocean. *Ecosystems*, 2: 384–394.
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D. and Vogler, A.P., 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55: 595-609.
- Posada, D. and Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Prell, W.L., Martin, A., Cullen, J.L. and Trend, M., 1999. The Brown University Foraminiferal Data Base (BFD).
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. and Achaz, G., 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21: 1864-1877.
- Puillandre, N., Modica, M.V., Zhang, Y., Sirovich, L., Boisselier, M.-C., Cruaud, C., Holford, M. and Samadi, S., 2012. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology*, 21: 2671-2691.
- Quillévéré, F., Debat, V. and Auffray, J.-C., 2002. Ontogenetic and evolutionary patterns of shape differentiation during the initial diversification of Paleocene acariniids (planktonic foraminifera). *Paleobiology*, 28: 435-448.

- Quillévéré, F., Morard, R., Escarguel, G., Douady, C.J., Ujiie, Y., de Garidel-Thoron, T. and de Vargas, C., in press. Global scale same-specimen morpho-genetic analysis of *Truncorotalia truncatulinoides*: A perspective on the morphological species concept in planktonic foraminifera. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*.
- R Development Core Team, 2004. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna.
- Reuss, A.E., 1850. Neue Foraminiferen aus den Schichten des österreichischen Tertiärbeckens. *Denkschriften der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe 1*: 365–390.
- Renaud, S. and Schmidt, D.N., 2003. Habitat tracking as a response of the planktic foraminifer *Globorotalia truncatulinoides* to environmental fluctuations during the last 140 kyr. *Marine Micropaleontology*, 49: 97-122.
- Ricklefs, R., 1976. *The economy of nature: a textbook in basic ecology*. Chiron, Portland.
- Rohling, E.J. and Gieskes, W.W.C., 1989. Late Quaternary changes in Mediterranean intermediate water density and formation rate. *Paleoceanography*, 4: 531-545.
- Rutherford, S., D'Hont, S. and Prell, W., 1999. Environmental controls on the geographic distribution of zooplankton diversity. *Nature*, 400: 749-753.
- Saez, A.G., Probert, I., Geisen, M., Quinn, P., Young, J.R. and Medlin, L.K., 2003. Pseudocryptic speciation in coccolithophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 7163–7168.
- Saez, A.G. and Lozano, E., 2005. Body doubles. *Nature*, 433: 111.
- Saito, T., Thomson, P.R. and Berger, D., 1981. *Systematic index of Recent and Pleistocene planktonic foraminifera*. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Schiebel, R. and Hemleben, C., 2005. Modern planktic foraminifera. *Paläontologische Zeitschrift*, 79: 135-148.
- Schiebel, R. and Hemleben C., 2000. Interannual variability of planktic foraminiferal populations, and test flux in the eastern North Atlantic Ocean. *Deep Sea Research Part II*, 47: 1809-1852.
- Schiebel, R., 2002. Planktonic foraminiferal sedimentation and the marine calcite budget. *Global Biogeochemical Cycles*, 16: 13-34.
- Schlitzer, R., 2011. Ocean Data View. <http://odv.awi.de>
- Schweizer, M., Pawlowski, J., Kouwenhoven, T.J., Guiard, J. and van der Zwaan, B., 2008. Molecular phylogeny of Rotaliida (Foraminifera) based on complete small subunit rDNA sequences. *Marine Micropaleontology*, 66: 233-246.

- Siani, G., Paterne, M., and Colin, C., 2010. Late glacial to Holocene planktic foraminifera bioevents and climatic record in the South Adriatic Sea. *Journal of Quaternary Science*, 25: 808–821.
- Siccha, M., Trommer, G., Schulz, H., Hemleben, C. and Kucera, M., 2009. Factors controlling the distribution of planktonic foraminifera in the Red Sea and implications for the development of transfer functions. *Marine Micropaleontology*, 72:146–156.
- Seears, H., 2011. Biogeography and phylogenetics of the planktonic foraminifera. PhD Thesis. University of Nottingham.
- Smith, L.M., Sanders, J., Kaiser, R., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C., Heiner, C., Kent, S. and Hood, L., 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321: 674-679.
- Spiegler, D. and Jansen, E., 1989. Planktonic foraminifer biostratigraphy of Norwegian Sea sediments: ODP LEG 104. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, 104: 681-696.
- Spindler, M., Hemleben, C., Salomons, J.B. and Smit, L.P., 1984. Feeding-behavior of some planktonic foraminifers in laboratory cultures. *Journal of Foraminiferal Research*, 14: 1–3.
- Spooner, M. I., Barrows, T.T., De Deckker, P. and Paterne, M., 2005. Palaeoceanography of the Banda Sea, and Late Pleistocene initiation of the northwest monsoon. *Global and Planetary Change*, 49: 28–46.
- Stewart, I.A., Darling, K.F., Kroon, D., Wade, C.M. and Troelstra, S.R., 2001. Genotypic variability in subarctic Atlantic planktic foraminifera. *Marine Micropaleontology*, 43: 143-153.
- Studier, J.A. and Keppler, K.J., 1988. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Molecular Biology and Evolution*, 5: 729-731.
- Tolderlund, D.S. and Bé, A.W.H., 1971. Seasonal distribution of planktonic foraminifera in the western North Atlantic. *Micropaleontology*, 17: 297–329.
- Tsuchiya, M., Grimm, G.W., Heinz, P., Stögerer, K., Ertan, K., Collen, J., Brüchert, V., Hemleben, C., Hemleben, V. and Kitazato, H., 2009. Ribosomal DNA shows extremely low genetic divergence in a worldwide distributed, but disjunct and highly adapted marine protozoan (*Virgulinema fragilis*, Foraminiferida). *Marine Micropaleontology*, 70: 8–19
- Tuckey, J.W., 1977. *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley, Boston.
- Ufkes, E., Jansen, J.H.F. and Schneider, R.R., 2000. Anomalous occurrences of *Neogloboquadrina pachyderma* (left) in a 420-ky upwelling record from Walvis Ridge (SE Atlantic). *Marine Micropaleontology*, 40: 23-42.
- Ujiie, Y. and Lipps, J.H., 2009. Cryptic diversity in planktic foraminifera in the northwest Pacific Ocean. *Journal of Foraminiferal Research*, 39: 145-154.

- Ujiié, Y., de Garidel-Thoron, T., Watanabe, S., Wiebe, P. and de Vargas, C., 2010. Coiling dimorphism within a genetic type of the planktonic foraminifer *Globorotalia truncatulinoides*. *Marine Micropaleontology*, 77: 145-153.
- Ujiié, Y., Asami, T., de Garidel-Thoron, T., Liu, H., Ishitani, Y. and de Vargas, C., 2012. Longitudinal differentiation among pelagic populations in a planktic foraminifer. *Ecology and Evolution*, 2: 1725-1737.
- Wade, C., Darling, K., Kroon, D. and Brown, A., 1996. Early evolutionary origin of the planktonic foraminifera inferred from SSU rDNA sequences comparison. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 672–677.
- Weiner, A., Aurahs, R., Kurasawa, A., Kitazato, H. and Kucera, M., 2012. Vertical niche partitioning between cryptic sibling species of a cosmopolitan marine planktonic protist. *Molecular Ecology*, 21: 4063-4073.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York.
- Williams, D.F., Ehrlich, R., Spero, H.J., Healy-Williams, N. and Gary, A.C., 1988. Shape and isotopic differences between conspecific foraminiferal morphotypes and resolution of paleoceanographic events. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 64: 153-162.
- Williams, M., Schmidt, D.N., Wilkinson, I.P., Miller, C.G. and Taylor, P.D., 2006. The type material of the Miocene to Recent species *Globigerinoides sacculifer* (Brady) revisited. *Journal of Micropaleontology*, 25:153–156.
- Wilson, B., 2012. Biogeography and ecostratigraphy of Late Quaternary planktonic foraminiferal taphocoenoses in the Leeward Islands, Lesser Antilles, NE Caribbean Sea. *Marine Micropaleontology*, 86:1–10.
- World Ocean Atlas 2009 (WOA09), http://www.nodc.noaa.gov/OC5/WOA09/pr_woa09.html
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E. and Billups, K., 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292: 686-693.
- Zhang, D.-Y., Lin, K. and Hanski, I., 2004. Coexistence of cryptic species. *Ecology Letters*, 7: 165-169.

ANNEXE

Méthodes d'étude de la diversité génétique des foraminifères planctoniques

Ces fiches et leur texte d'accompagnement présentent les méthodes employées lors de la récolte et des analyses génétiques des foraminifères planctoniques. Ces analyses ont pour particularité d'être effectuées à l'échelle de l'individu, c'est-à-dire, dans le cas des foraminifères planctoniques, à l'échelle de la cellule. Les protocoles sont donc adaptés pour faire face au problème d'une faible quantité d'ADN associée à de nombreux contaminants : ADN d'autres organismes (tels que les proies et les symbiontes), protéines et ARN.

1. Récolte et conditionnement des foraminifères planctoniques

Afin de réaliser l'étude morpho-génétique de foraminifères planctoniques, il faut les récolter vivants et pouvoir conserver à la fois l'ADN et la coquille. Deux protocoles de récolte ont été utilisés. La **fiche I**, correspondant à la méthode de conditionnement direct, a été employée lors de la campagne OISO-19 au sein d'une équipe ayant déjà eu une expérience de cette méthode. La **fiche II**, correspondant à la méthode de conservation par séchage, a été testée avec succès lors de la campagne OISO-21. L'équipe responsable de cette récolte a travaillé en autonomie et n'avait aucune connaissance préalable sur cette méthode.

Etapas communes aux deux méthodes de récolte : pêche et tri

La récolte des foraminifères se fait grâce à un filet à plancton. Les filets stratifiés type « Multinet » permettent d'échantillonner de façon stratifiée la colonne d'eau et donc de pouvoir analyser la distribution des morpho-espèces et espèces cryptiques en fonction de la profondeur.

Le plancton est trié sous la loupe binoculaire, les différentes morpho-espèces de foraminifères planctoniques sont identifiées et les individus sélectionnés en vue des analyses morphogénétiques.

Protocole par conditionnement direct (fiche I)

Il s'agit du protocole le plus utilisé (par exemple, Morard et al., 2009, Morard et al., 2012, Ujiié et al., 2012, André et al., 2013). Il est très efficace pour la plupart des espèces de foraminifères planctoniques et a été employé avec succès dans le cas de *Globigerinoides sacculifer* (André et al., 2013). Cependant, ce protocole s'est révélé peu efficace dans le cas de *Neogloboquadrina pachyderma* et n'est potentiellement pas adapté aux espèces d'eaux froides dont l'ADN se dégrade très vite après récolte (André et al., in prep).

Chaque foraminifère est placé dans un tube contenant le tampon d'extraction GITC* (50 µl) (Morard et al., 2009). Ce tampon d'extraction ne contient pas d'EDTA, chélateur du calcium, ce qui permet de conserver l'ADN et la coquille de chaque foraminifère et donc de

réaliser des analyses morphogénétiques ainsi que des analyses géochimiques sur des foraminifères dont le type génétique est connu.

Les tubes sont conservés au congélateur, de -20 à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Ils ne doivent pas décongeler durant le transport.

Protocole de conservation par séchage (fiche II)

Cette méthode alternative est utilisée depuis peu (Weiner et al., 2012 ; André et al., in prep). Elle semble particulièrement adaptée aux espèces difficiles à conserver comme *N. pachyderma* (André et al., in prep.). Le traitement est aussi plus rapide, le transport plus facile (volume moindre) et le matériel à embarquer réduit.

Les foraminifères sont sortis de l'eau, placés dans des cellules de micropaléontologie en carton et laissés à sécher. Une fois secs, ils sont conservés au congélateur. Ils ne doivent pas décongeler durant le transport. Les foraminifères sont placés dans le tampon d'extraction de retour au laboratoire (voir **fiche III**).

2. Extraction de l'ADN

Préparation du tampon (fiche III)

Le tampon d'extraction est identique à celui de conservation : GITC*

Extraction (fiche IV)

L'extraction de l'ADN comporte une première étape de chauffage. Cette étape permet de dénaturer les membranes et donc de faire passer l'ADN de la cellule dans le tampon. Le tampon est ensuite prélevé à l'aide d'une micropipette laissant la coquille intacte dans le tube pour les analyses morphologiques et géochimiques. L'ADN est purifié grâce à une extraction isopropanol-éthanol. Ce type de purification est moins poussé que d'autres telle l'extraction phénol/chloroforme, par exemple, mais induit moins de pertes d'ADN. La **fiche IV** présente deux variantes pour l'extraction : une pour *G. sacculifer*, espèce dont l'ADN est facile à amplifier et une pour *N. pachyderma*, espèce dont l'amplification de l'ADN est plus difficile (André et al., in prep).

3. Amplification de l'ADN

Les mix PCR utilisés sont adaptés de celui proposé pour la Taq polymérase New England Biolab (**fiche V**). Pour réussir à amplifier suffisamment d'ADN il faut mettre 2 fois plus de BSA (bovine serum albumine). Le BSA permet de réduire les interactions avec les protéases résiduelles qui sont encore nombreuses à cause de la purification peu poussée des échantillons et qui peuvent inhiber la réaction de PCR. Dans le cas de *N. pachyderma*, espèce particulièrement dont l'ADN est difficile à amplifier, augmenter la concentration en primer s'est révélé empiriquement efficace. Pour amplifier des séquences longues (>1000 pb), le programme de PCR comporte une étape d'extension plus longue pour permettre à la Taq-polymérase de répliquer tout le fragment d'intérêt avant la fin du cycle.

4. Génotypage

Un protocole (**fiche VI**) a été mis au point pour identifier les différents types génétiques de *N. pachyderma* présents dans l'océan austral (Types II, III, IV ; Darling et al., 2004). Le fragment obtenu par PCR grâce aux primers NP1fB et NP5r a une taille significativement différente entre les individus du clade II/III et le type génétique IV : 30 bases de moins pour le Type IV soit près de 10% de la longueur totale du fragment. Cette différence est visualisable lors de la migration des produits de PCR sur gel d'agarose concentré. Il est ainsi possible de discriminer les individus de Type IV et ceux appartenant au clade III/II sans passer par l'étape de séquençage. Cette méthode de reconnaissance a été testée en aveugle sur les individus séquencés, le taux d'attribution correcte est de 100%.

Pour les individus appartenant au clade III/II il faut réaliser un séquençage ou une digestion enzymatique (RFLP) afin de déterminer le type génétique. L'enzyme choisie est la Taq1 (New England Biolabs), enzyme utilisée de façon courante qui reconnaît et clive le motif 5' TGCA 3'. Ce motif existe dans toutes les séquences de *N. pachyderma*, qui sont donc coupées au moins une fois, ce qui permet de vérifier que la digestion a bien eu lieu. Le Type III possède 2 sites de restriction pour cette enzyme et le Type II seulement un ce qui entraîne des patterns de RFLP aisément distinguables.

5. Clonage

Le clonage a permis d'évaluer la diversité intra-génomique chez *G. sacculifer* (André et al., 2013). La méthode utilisée est présentée dans la **fiche VII**.

Remerciements

Ces fiches ont pu être réalisées grâce à l'aide précieuse de Ralph Aurahs (Fiche II), Noëlle Buchet (Fiche I), Christophe Douady (Fiche VIII), Lara Konecny (Fiches V et VII), Elisabeth Michel (Fiche II), Raphaël Morard (Fiches IV, V et VII) et Yurika Ujiié (Fiches I et III).

FICHE I : Récolte de foraminifères pour analyses génétiques

Considérations générales :

Ne jamais mettre les foraminifères dans de l'eau douce, toujours **travailler avec de l'eau de mer filtrée**. Pour conserver l'ADN il faut travailler et conserver à **basse température**. Les boîtes de tubes doivent être conservées à -20°C (ou moins), les récoltes au réfrigérateur (le plus froid possible tant que l'eau ne gèle pas). Lors du travail sous la binoculaire, l'idéal est de se munir de blocs froids et de les renouveler souvent pour maintenir foraminifères et récolte au frais et de travailler par petites quantités.

Le tampon GITC* contenu dans les tubes de 0.5 ml (50 µl) doit être **exposé le moins possible à la lumière** car il peut alors se dégrader (ne pas laisser les boîtes ouvertes). Ce produit n'est pas très toxique mais il faut néanmoins porter des gants lorsqu'on manipule les tubes (ce qui permet de plus de ne pas contaminer avec son propre ADN) et se laver les mains en cas de contact. L'odeur qui se dégage est désagréable, ce qui est normal. Un tampon peu odorant est le signe d'une dégradation.

Lors de la collecte :

Verser le contenu du collecteur dans la bassine, le laver avec de l'eau de mer filtrée pour bien récupérer tout le plancton.

Mettre le contenu de la bassine dans une boîte Tupperware étiquetée (plusieurs boîtes s'il y a trop de liquide, on peut parfois rajouter de l'eau de mer filtrée car il vaut mieux que **le plancton ne soit pas trop concentré** pour ne pas pourrir trop vite). Rincer la bassine à l'eau de mer filtrée et récupérer le produit de rinçage dans le Tupperware.

S'il y a beaucoup de saletés/gros zooplancton, on peut utiliser un tamis à grandes mailles pour filtrer l'eau de la bassine avant de mettre dans les Tupperware.

La récolte doit être conservée au frais pour ralentir la dégradation du plancton.

Tri sous la binoculaire :

Placer la boîte Tupperware sur des blocs froids (ou dans une glacière), la température de l'eau doit rester la plus basse possible pour ne pas dégrader l'ADN.

Avec une pipette pasteur faire un vortex dans la boîte, le plancton va se concentrer au milieu du fond de la boîte. Pipeter dans cette zone, placer le liquide pipeté dans une demi boîte (fond ou couvercle) de pétri sous la binoculaire.

Repérer les foraminifères les plus frais i.e. dont la coquille est remplie de cytoplasme, voire présence de pseudopodes. Les attraper avec le pinceau et les placer dans une boîte de pétri remplie d'eau de mer filtrée posée sur un bloc froid. Les foraminifères doivent être dans suffisamment d'eau, s'ils sont trop concentrés ils pourrissent plus vite.

Quand il y a un certain nombre de foraminifères sélectionnés, placer la boîte de pétri sous la binoculaire et nettoyer les individus avec le pinceau. Il s'agit d'enlever le plus gros des saletés qui entourent le foraminifère sans l'abimer. Lors de cette étape on peut enlever un peu d'eau pour faciliter le travail.

Quand les foraminifères sont suffisamment propres, mettre des gants. Pour chaque foraminifère, bien rincer le pinceau dans l'eau de mer filtrée, l'attraper avec la pointe du pinceau et le mettre dans un tube (un tube par individu, en essayant de mettre le moins d'eau de mer possible avec). Reporter le numéro du tube, l'espèce, la station et le filet sur la fiche.

Mettre au congélateur

FICHE II : Récolte de foraminifères pour analyses génétiques

Considérations générales :

Ne jamais mettre les foraminifères dans de l'eau douce, toujours travailler avec de l'eau de mer filtrée. Pour conserver l'ADN il faut travailler et conserver à **basse température**. Les cellules une fois remplies doivent être conservées à -20°C (ou moins) et les récoltes au réfrigérateur (le plus froid possible tant que l'eau ne gèle pas). Lors du travail sous la binoculaire, l'idéal est de se munir de blocs froids et de les renouveler souvent pour maintenir foraminifères et récolte au frais et de travailler par petites quantités.

Lors de la collecte :

Verser le contenu du collecteur dans la bassine, le laver avec de l'eau de mer filtrée (pissette) pour bien récupérer tout le plancton.

Mettre le contenu de la bassine dans une boite Tupperware étiquetée (plusieurs boites s'il y a trop de liquide, on peut parfois rajouter de l'eau de mer filtrée car il vaut mieux que le **plancton ne soit pas trop concentré** pour ne pas pourrir trop vite). Rincer la bassine à l'eau de mer filtrée et récupérer le produit de rinçage dans le Tupperware.

S'il y a beaucoup de saletés/gros zooplancton, on peut utiliser un tamis à grandes mailles pour filtrer l'eau de la bassine avant de mettre dans les Tupperware.

La récolte doit être conservée au frais pour ralentir la dégradation du plancton.

Tri sous la binoculaire :

Placer la boite Tupperware sur des blocs froids (ou dans une glacière), la température de l'eau doit rester la plus basse possible pour ne pas dégrader l'ADN.

Avec une pipette pasteur faire un vortex dans la boite, le plancton va se concentrer au milieu du fond de la boite. Pipeter dans cette zone, placer le liquide pipeté dans une demi boite (fond ou couvercle) de pétri sous la binoculaire.

Repérer les foraminifères les plus frais i.e. dont la coquille est remplie de cytoplasme, voire présence de pseudopodes dans le meilleur des cas. Les attraper avec le pinceau et les placer dans une boite de pétri remplie d'eau de mer filtrée posée sur un bloc froid. Les foraminifères doivent être dans suffisamment d'eau, s'ils sont trop concentrés ils pourrissent plus vite.

Quand il y a un certain nombre de foraminifères sélectionnés, placer la boite de pétri sous la binoculaire et nettoyer les individus avec le pinceau. Il s'agit d'enlever le plus gros des saletés qui entourent le foraminifère sans l'abimer. Lors de cette étape on peut enlever un peu d'eau pour faciliter le travail.

Quand les foraminifères sont suffisamment propres, les déposer dans une cellule (type cellule de micropaléontologie en carton) ouverte avec les références du filet notées. Laisser sécher à température ambiante pendant 12 à 24h puis fermer la cellule avec sa vitre. Pour une conservation optimale on peut faire le séchage dans une chambre froide si celle-ci dispose d'un système de refroidissement à froid brassé.

Emballer dans du papier aluminium et un sachet en plastique et conserver à -20°C.

Transport :

Mettre les cellules bien emballées dans une glacière avec le maximum de blocs froids possible ou dans une boite en polystyrène avec de la carboglace.

FICHE III : Fabrication du GITC*

Attention, le GITC* est **sensible à la lumière et à la chaleur** qui le dégradent, il faut le maintenir le plus possible à l'obscurité et au frais

Préparation en avance du N-Lauroyl-sarcosine 20%

Mélanger **10g** de **N-Lauroyl-sarcosine** dans **40 ml** d'**eau distillée**. Le mélange mousse très fort. Laisser reposer plusieurs heures au réfrigérateur dans un récipient fermé pour obtenir une solution limpide utilisable.

Préparation en avance du Tris (pH7.6) à 1 M

Mélanger **2.4 g** de **Tris** (poudre), **16 ml** d'**eau distillée** et **1.2 ml** d'**HCl concentré** (37.2%, 12.1M). Mettre l'acide en dernier. **Ajuster le volume à 20 ml** avec de l'eau distillée. Vérifier le pH. Du papier pH est suffisant, d'autant plus que certaines sondes pH-métriques ne sont pas adaptées aux mesures dans du Tris.

Préparation du tampon

Pour un volume final d'environ 220 ml (soit 4400 échantillons):

1) Mélanger **100g** de **Guanidine-isothiocyanate** et **100ml** d'**eau distillée**

Se placer sous une hotte et utiliser un agitateur magnétique jusqu'à obtenir une solution limpide (environ 6h)

Attention : l'agitateur magnétique produit de la chaleur, se placer dans une pièce froide, placer éventuellement des blocs froids contre la préparation. Pour éviter toute dégradation accidentelle par la lumière, chapeauter le dispositif sous un carton et utiliser de la verrerie fumée ou entourée de papier d'aluminium.

- 1) Ajouter **10.6 ml** de **Tris (pH7.6) à 1 M** à la préparation. Mélanger pendant 1 à 2 h
- 2) Ajouter **21.2 ml** de **N-Lauroyl-sarcosine à 20%** et **2.1 ml** de **β -mercaptoethanol**. Attention le β -mercaptoethanol pur est un produit toxique
- 3) Mélanger pendant 30 min
- 4) Conserver à 4°C dans une bouteille fumée ou entourée d'aluminium. Utiliser assez rapidement. Un tampon de bonne qualité est limpide et odorant

Conditionnements des foraminifères

Répartir **50 μ l** de **GITC*** dans des tubes de 0.5 ml. Les tubes remplis sont conservés dans des boîtes opaques à -20°C avant utilisation.

Sous la binoculaire, saisir les foraminifères avec un pinceau humide et les placer individuellement dans un tube contenant du tampon. Reporter le numéro du tube, l'espèce, la station et le filet sur une fiche. Eviter de laisser ouvertes les boîtes pendant trop longtemps à cause de la lumière. Pour maintenir les foraminifères à basse température, les cellules de micropaléontologie ou les boîtes de pétri sont placées sur un bloc froid. Les tubes remplis sont conservés (jusqu'à plusieurs années) au congélateur, de -20 à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

FICHE IV : Extraction de l'ADN

Les échantillons sont conservés dans **50 µl de GITC*** dans des tubes de 0,5 ml, à -20°C ou moins

Décongeler les échantillons à température ambiante. On peut accélérer le processus en les prenant dans la main. Tapoter les tubes afin d'homogénéiser le buffer.

Incuber les échantillons dans un thermocycleur. Certains modèles ont une fonction "incubate", sinon écrire un programme du type T=70°C for 60 min end ou T= 70°C for ever

Extraction pour *Globigerinoides sacculifer* et *Neogloboquadrina pachyderma*

Incuber à 70°C, 15 min

Incuber 70°, 30 min

Sortir les échantillons et tapoter doucement

Sortir les échantillons et tapoter doucement

Recommencer 3 fois pour obtenir un temps d'incubation total de 1h

Incuber à 70°C, 1h

Sortir les échantillons et tapoter doucement

A l'aide d'une micropipette, récupérer le buffer dans un tube de 1,5 ml en laissant la coquille dans le tube de 0,5 ml

Ajouter **50 µl d'isopropanol**

Vortexer et vérifier qu'il n'y a qu'une seule phase

Mettre les échantillons au moins 2h (**12h**) à -80°C

Centrifuger 60 min à 15 300 tours/min, température = 4°C

Retirer tout le liquide avec une micropipette, le culot d'ADN est invisible à l'œil nu

Mettre **50 µl d'éthanol** (70°)

Centrifuger 30 min (**60 min**) à 15300 tours/min, température = 4°C

Retirer l'éthanol (le culot d'ADN est toujours invisible à l'œil nu)

Laisser sécher les tubes ouverts sous une hotte jusqu'à ce qu'ils soient complètement secs (de 4 h à une nuit selon la température de la pièce)

Ajouter **40 µl d'eau distillée stérile**

Tapoter pour solubiliser l'ADN

Conserver à -20°C

FICHE V : Amplification de l'ADN par PCR

Mélange de PCR

Pour *Globigerinoides sacculifer* et *Neogloboquadrina pachyderma*

Pour une PCR de test ou pour un génotypage, travailler sur un volume de 15 µl

Pour une PCR destinée au séquençage, travailler sur des volumes doubles (30 µl)

Pour un échantillon (V= 15µl)

- Eau distillée stérile : 12,21 µl **11,61 µl**
- Tampon X10 (Biolabs) : 1,50 µl
- Amorce (10 µM) : 0,24 µl **0,48 µl**
- Amorce (10 µM) : 0,24 µl **0,48 µl**
- BSA 100X (10mg/ml Biolabs) : 0,15 µl
- dNTP 20mM (total) : 0,13 µl
- Taq-polymérase 5U/µl (Biolabs): 0,13 µl
- ADN : 0,5 µl

Programme PCR pour l'amplification de la fin de la SSU :

Dénaturation: 10 min à 95°C

44 cycles: 95 °C, 30s puis Tm°C, 30s et 72 °C, 30s

Tm= 54°C (*N. pachyderma*), 56°C (*G. sacculifer*)

Extension finale : 10 min à 72°C

Programme amplification de l'ITS (*G. sacculifer*) : idem que pour la fin SSU en augmentant la Tm à 60°C

Programme pour séquences longues (> 1500 pb) (début de la SSU, *N. pachyderma*) :

Dénaturation: 10 min à 95°C

44 cycles: 95 °C, 30s puis 53°C, 30s et 68°C, 3 min

Extension finale : 10 min à 72°C

FICHE VI : Génotypage de *Neogloboquadrina pachyderma* Types II, III et IV

Cette méthode permet de discriminer les types génétiques de *N. pachyderma* de l'océan austral

Amplification de l'ADN par PCR

Voir fiche V, utiliser le couple NP1fB/NP5r et un volume réactionnel de 15µl

primer	sens	séquence 5'-3'
NP1fB	forward	CCGGACACACTGAGGATTGACAGGCAATATC
NP5r	reverse	CTGTTGGGCTCTGAAAGCAACGAACGTG

Migration sur gel d'agarose (identification des Types IV)

Utiliser une concentration de 3 à 5%

Vérifier que l'amplification a eu lieu

Les individus présentant une bande à ~300 pb correspondent aux Types IV

Les individus présentant une bande à ~350 pb correspondent aux Types II et III

Discrimination des Types II et III par RFLP

Réaction RFLP pour 1 échantillon

Produit PCR : 5 µl

Eau : 3.4µl

Tampon : 1µl

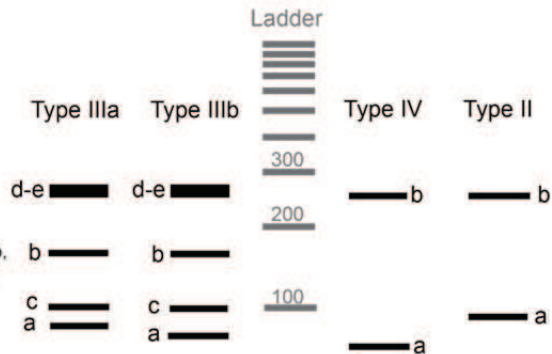
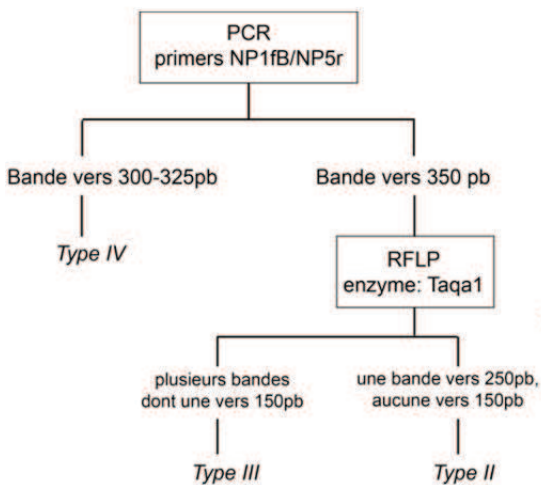
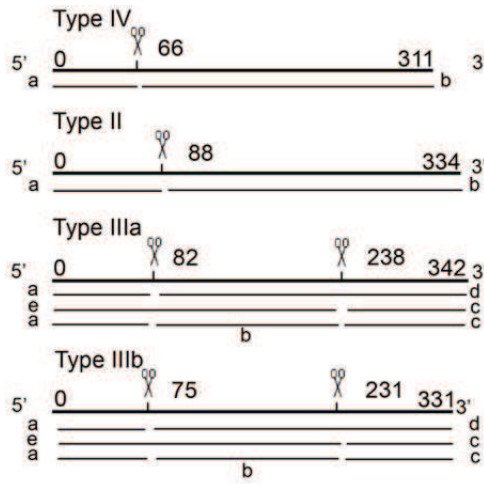
BSA : 0,1µl

Enzymz Taqa1 (New England Biolabs) : 0.5µl

Incuber 2h, 65° puis inactiver 20 min à 80°

Faire migrer sur gel d'agarose à 5% pour lire le résultat

Schéma décisionnel pour le génotypage de *N. pachyderma* et schéma des gels de RFLP



FICHE VII : Clonage de produits PCR kit TOPO TA K4510-20

Préparation des boîtes de culture (à faire la veille)

Préparation du LB-agar

Peser **3,75g** d'**agar** et **5g** de **LB**. Mettre dans une bouteille 1L. Ajouter **250ml** d'**eau** milliQ. Fermer sans visser le bouchon à fond. Mettre à l'**autoclave 40 min**.

Préparation des boîtes

Laisser refroidir un peu ($t \sim 55^{\circ}\text{C}$) puis ajouter **50 $\mu\text{g/l}$** d'**ampicilline**
Couler dans les boîtes et laisser prendre
Retourner les boîtes et les conserver à **4°C** à l'**obscurité**

PCR (voir fiche amplification par PCR)

A faire tout de suite avant la réaction, elle doit être « **fraiche** »
Avoir une étape **d'extension finale**, 72°C , 7 à 30 min. Mon programme : 20 min
Volume : 15 μl
Electrophorèse habituelle pour vérifier que la PCR a marché et **une seule bande**

Réaction de clonage

Mélange réactionnel pour un échantillon

PCR : 0.4 à 4 μl **3 μl**
Solution saline fournie : 1 μl
Eau : compléter à 5 μl (1 μl)
Vecteur : 1 μl
Volume total : 6 μl

Faire à chaque fois le mix par échantillon, le vecteur est fragile => **pipeter une fois et doucement**

Incuber **30 min**, température ambiante

Mettre au **froid** (glace, bloc froid), on peut conserver à -20°C pendant une nuit

Transformation

Réchauffer le **SOC** pour qu'il soit à **température ambiante** ou le conserver hors du congélateur

Réchauffer les **boîtes** de culture, **37°C, 30 min**

Étaler **40µl de X-gal à 40mg/ml** sur chaque boîte et conserver à **37°C** jusqu'à utilisation

Dégeler dans un bac de glace (10-15 min avant la manip) une fiole de **OneShotcells** pour une transformation

Ajouter **2 µl** de la **réaction de clonage** obtenue précédemment dans 50µl **OneShotcells** (une fiole) (pipeter le OneShotcells avec un cône épointé), mélanger doucement et pas par pipetage

Incuber dans la **glace, 30 min**

Choc thermique, 42°C, 30s, puis placer immédiatement dans la **glace**

Ajouter **250 µl** de **SOC**

Bien fermer le tube et le mettre à **37°C avec agitation horizontale (200rpm), 1 h**

Étaler 10-50 µl ou tout le contenu du tube de préparation de transformation sur la boîte

Incuber la boîte à **37°C, 12 h**. La boîte peut ensuite se garder 1 semaine au frigo.

Amplification des clones par PCR

Prélever les colonies (10 à 12 par individu) avec une pointe 10µl et les mettre dans 20µl d'eau milliQ autoclavée dans un tube 0.2 ml

Mélanger, centrifuger

Utiliser comme ADN dans une réaction de PCR normale ou avec le primer M13 (fourni) puis séquencer avec les primers utilisés pour l'amplification.

Les tubes eau+colonies peuvent être conservés par congélation.

FICHE VIII : Scripts sous R

1) Matrices de distances sous R à partir d'arbres PhyML

Si première utilisation :

Choisir le CRANmirror le plus proche

Installer package « ape » (attention temps de réponse long)

Utilisation de routine :

```
#Charger le package « ape » et se placer dans le bon répertoire
```

```
> read.tree(« nom de l'arbre »)
```

```
# Permet de vérifier que le logiciel trouve et ouvre l'arbre, les principales caractéristiques de l'arbre sont récapitulées
```

```
>t<- read.tree(« nom de l'arbre »)
```

```
# Transforme l'arbre en variable (t)
```

```
>plot(t)
```

```
# Permet de vérifier que l'arbre est le bon
```

```
>d<- cophenetic.phylo(t)
```

```
# Calcule la matrice de distances partriques, qui est stockée dans la variable d
```

```
>write.table(d , file= « matrice.xls »)
```

```
# Enregistre la matrice sous forme de tableau (à ouvrir avec EXEL)
```

2) Délimitation des espèces à partir d'un arbre ultramétrique par GMYC

```
#charger les packages ape et splits
```

```
>t<-read.tree("nom de l'arbre.dendro")
```

```
>t
```

```
# Permet de vérifier R ouvre l'arbre et que celui-ci est compatible avec une analyse GMYC (arbre avec racine et ultramétrique)
```

```
>tree <- gmyc(t, method = "single", interval = c(0, 5), quiet = FALSE)
```

```
# Délimitation des espèces par GMYC (à un seuil, si on veut tester les seuils multiples écrire method = « multiple »)
```

```
>plot(tree)
```

```
# renvoi 3 graphes, le dernier présentant le découpage en espèces proposé
```

```
>summary(tree)
```

```
# permet de tester la significativité du découpage GMYC
```


Taxonomies moléculaire et morphologique chez les foraminifères planctoniques : élaboration d'un référentiel et cas particuliers de *Globigerinoides sacculifer* (Brady) et *Neogloboquadrina pachyderma* (Ehrenberg)

Les morpho-espèces de foraminifères planctoniques sont composées d'éco-génotypes parfois différenciables sur la base de la morphologie de leur coquille. Cette découverte récente d'une diversité ainsi qualifiée de « pseudo-cryptique » ouvre des perspectives d'amélioration de la précision des reconstructions paléocéanographiques. Malheureusement, ces génotypes ont été définis de façon subjective et ne sont pas homogènes quant à leur rang taxonomique, ce qui est pourtant un pré-requis pour leur intégration dans les modèles de reconstruction. Grâce à l'application de méthodes quantitatives de délimitation d'unités taxinomiques sur les séquences partielles de la petite sous-unité ribosomale (SSU) disponibles chez l'ensemble des morpho-espèces de foraminifères planctoniques, nous montrons que 49 de ces génotypes sont suffisamment divergents pour constituer d'authentiques espèces. Deux morpho-espèces clefs de la paléocéanographie sont étudiées plus en détail. Chez *Neogloboquadrina pachyderma*, l'obtention des premières séquences complètes de la SSU et la comparaison morpho-génétique de spécimens (sub)polaires permettent de proposer un nouveau scénario évolutif et de montrer que les variations morphologiques sont ici d'origine éco-phénotypique, et donc indépendantes de la diversité génétique. Chez *Globigerinoides sacculifer*, caractérisé par une forte diversité morphologique, il existe au contraire une seule et unique espèce cosmopolite dans les eaux (sub)tropicales de l'Océan mondial. Ces deux cas particuliers montrent que, contrairement à ce que suggéraient les études précédentes, la spéciation pseudo-cryptique n'a pas valeur de règle chez les foraminifères planctoniques.

Morphological and molecular taxonomies of planktonic foraminifera : design of a taxonomic framework and special cases of *Globigerinoides sacculifer* (Brady) and *Neogloboquadrina pachyderma* (Ehrenberg)

Morphospecies of planktonic foraminifera are clusters of eco-genotypes that show small but significant shell morphological differences (pseudo-cryptic species). This discovery opens a new perspective for improving the accuracy and resolving power of paleoceanographic reconstructions. Unfortunately, current genetic type delimitations suffer subjectivity, inducing non-homogenous taxonomic status while homogenous taxonomic status is a prerequisite for including genetic types in reconstruction models. By applying quantitative and complementary methods for taxonomic units delimitation to the available dataset of partial sequences of SSU (ribosomal small sub-unit), we delimited 49 genuine (pseudo)cryptic species of planktonic foraminifera. We studied two paleoceanographic key-species. Complete sequencing of the SSU and morpho-genetic comparison within austral (sub)polar genetic types of *Neogloboquadrina pachyderma* lead to a new phylogeographic hypothesis and showed that morphological variations are the result of ecophenotypic effects and are not related with genetic types. The morphologically diverse *Globigerinoides sacculifer* is the first case of a planktonic foraminifera morphospecies corresponding to a single genetic type distributed world-wide in (sub)tropical waters. These two cases show that, contrary to previous studies conclusions, pseudo-cryptic speciation is not a rule within planktonic foraminifera.

PALEONTOLOGIE

MOTS-CLES : foraminifères planctoniques, délimitation des unités taxonomiques, ABGD, GMYC, SSUrDNA (partiel et complet), ITSrDNA, biogéographie, morphométrie, éco-phénotypes.

KEYWORDS: planktonic foraminifera, species delimitation, ABGD, GMYC, SSUrDNA (partial and complete), ITSrDNA, biogeography, morphometry, ecophenotypes.

UMR 5275 Laboratoire de Géologie de Lyon : Terre, Planètes, Environnement