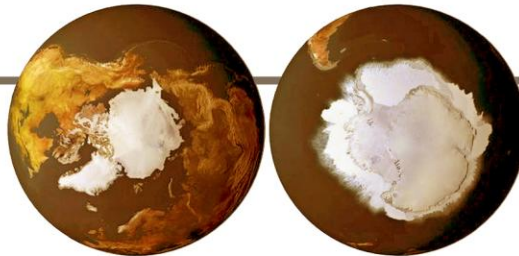


TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estructura genética poblacional  
de diversas especies de ascidias  
(Tunicata, Ascidiacea)  
en dos sistemas polares: Islas Shetland del Sur

ANTÁRTIDA y  
Kongsfjord, Spitsbergen  
ÁRTICO

Bióloga M. Milagros DEMARCHI  
2013



Cátedra de ECOLOGÍA MARINA  
Cátedra de GENÉTICA DE POBLACIONES Y EVOLUCIÓN  
Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL  
DE DIVERSAS ESPECIES DE ASCIDIAS (TUNICATA,  
ASCIDIACEA) EN DOS SISTEMAS POLARES: ISLAS  
SHETLAND DEL SUR (ANTÁRTIDA) Y  
KONGSFJORD, SPITSBERGEN (ÁRTICO).

Bióloga M. Milagros DEMARCHI

Director: Dr. Ricardo SAHADE  
Co-director: Dra. Marina B. CHIAPPERO

Cátedra de Ecología Marina  
Cátedra de Genética de Poblaciones y Evolución  
Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de Córdoba

2013



## COMISIÓN ASESORA

Dra. Beatriz García  
Dr. Esteban Hasson  
Dr. Ricardo Sahade

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha: \_\_\_\_\_

Calificación: \_\_\_\_\_

## TRIBUNAL

Firma \_\_\_\_\_ Aclaración \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_ Aclaración \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_ Aclaración \_\_\_\_\_

*A mi familia, que es mi contención y alegría.*

## Agradecimientos

**U**n especial agradecimiento a mis directores Marina y Ricardo, por su ayuda y guía constante.

A la Dra. Noemí Gardenal por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo, gracias a todo el equipo!

A las instituciones que colaboraron con la realización de esta tesis, desde el apoyo económico para mi formación profesional hasta la logística para los muestreos:

CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Doctorado en Ciencias Biológicas, AWI y Dirección Nacional del Antártico.

A la comisión asesora de tesis, la Dra. Beatriz García y el Dr. Esteban Hasson, por su seguimiento y valiosos aportes.

Al Dr. Marcos Tatián por sus mates y sus discusiones y su perfectísimo cuaderno de campo a bordo del B/O Hespérides.

A las cátedras de Ecología Marina y Genética de Poblaciones, a todos mis compañeros de trabajo y amigos, a todos con los que he compartido una charla, una PCR, una centrífuga rota, un Fernet con hielo milenario, a cada uno de ellos les debo más que esta tesis. Gracias por tantos años hermosos que transitamos juntos!

Gracias a mis amigos por brindarme su afecto desde el inicio de este viaje: a Inés, Sole, Ange, Susy, choli, July, Willy, Cristian, Naty, Luci.

A mis hermanas del alma: Teté, Vicky, Gri, por su hermosa amistad.

A mi familia: Gloria, Miguel y José por su cariño y contención.

Y en especial a Facundo, mi compañero y amor.

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

**Demarchi M, Chiappero M.B, Laudien J, Sahade R (2008).** Population genetic structure of the ascidian *Styela rustica* at Kongsfjorden, Svalbard, Arctic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 364: 29-34.

**Demarchi M, Chiappero M.B, Tatián M, Sahade R (2010).** Population genetic structure of the Antarctic ascidian *Aplidium falklandicum* from Scotia Arc and South Shetland Islands. *Polar Biology* 33: 1567-1576.

## PUBLICACIONES REALIZADAS EN EL MARCO DE LA TESIS

**Tatián M, Lager C, Demarchi M, Mattoni C. (2011).** Molecular phylogeny endorses the relationship between carnivorous and filter-feeding tunicates (Tunicata, Ascidiacea). *Zoologica Scripta*, 40(6): 603-612.



# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS  | 1  |
| ABREVIATURAS  | 6  |
| RESUMEN   | 7  |
| ABSTRACT  | 8  |
| <br>  |    |
| <b>CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN GENERAL</b>                                |    |
| 1. LOS OCÉANOS POLARES, ¿QUÉ TIENEN en COMÚN?                           | 9  |
| 2. ASCIDIAS, LOS TUNICADOS del BENTOS                                   | 11 |
| 3. LA DISPERSIÓN en el MAR, BARRERAS INVISIBLES                         | 15 |
| 4. MÉTODOS INDIRECTOS para ESTUDIAR la DISPERSIÓN                       | 17 |
| 5. HIPÓTESIS  | 18 |
| 6. OBJETIVO GENERAL   | 19 |
| <br>  |    |
| <b>CAPÍTULO II – TUNICADOS BENTÓNICOS DEL OCÉANO ÁRTICO</b>             |    |
| 1. INTRODUCCIÓN: EL SISTEMA BENTÓNICO ÁRTICO                            | 21 |
| <i>Especies modelo de estudio</i>                                       | 23 |
| 2. HIPÓTESIS  | 24 |
| 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 25 |
| 4. MATERIALES y MÉTODOS   | 25 |
| 4.1- ÁREA de ESTUDIO  | 25 |
| 4.2- OBTENCIÓN de las MUESTRAS  | 27 |
| 4.3- TÉCNICAS MOLECULARES   | 27 |
| 4.4- ANÁLISIS de DATOS  | 28 |
| 5. RESULTADOS   | 32 |
| 5.1- PATRONES de AMPLIFICACIÓN de ISSR-PCR                              | 32 |
| 5.2- VARIABILIDAD GENÉTICA  | 33 |
| 5.3- CORRELACIONES entre DIVERSIDAD GENÉTICA y<br>VARIABLES AMBIENTALES | 35 |
| 5.4- ESTRUCTURA POBLACIONAL: AMOVA                                      | 36 |
| 5.5- ESTRUCTURA POBLACIONAL:<br>MÉTODOS ESPACIALMENTE EXPLÍCITOS.       | 38 |
| -PAISAJES GENÉTICOS   | 38 |
| -ANÁLISIS de ASIGNACIÓN   | 39 |
| -ANÁLISIS ESPACIAL de COMPONENTES PRINCIPALES                           | 40 |
| 5.6- TEST de MANTEL   | 40 |
| 6. DISCUSIÓN  | 43 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>CAPÍTULO III – TUNICADOS BENTÓNICOS del OCÉANO ANTÁRTICO</b> |     |
| 1. INTRODUCCIÓN: EL SISTEMA BENTÓNICO ANTÁRTICO                 | 53  |
| <i>Especies modelo de estudio</i>                               | 56  |
| 2. HIPÓTESIS  | 57  |
| 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 58  |
| 4. MATERIALES y MÉTODOS   | 58  |
| 4.1- ÁREA de ESTUDIO  | 58  |
| 4.2- OBTENCIÓN de las MUESTRAS                                  | 59  |
| 4.3- TÉCNICAS MOLECULARES                                       | 59  |
| 4.4- ANÁLISIS de DATOS  | 61  |
| 5. RESULTADOS   | 61  |
| 5.1- PATRONES de AMPLIFICACIÓN de ISSR-PCR                      | 61  |
| 5.2- VARIABILIDAD GENÉTICA                                      | 62  |
| 5.3- CORRELACIONES: DIVERSIDAD GENÉTICA vs PROFUNDIDAD          | 63  |
| 5.4- ESTRUCTURA POBLACIONAL: AMOVA                              | 65  |
| 5.5- ESTRUCTURA POBLACIONAL.                                    |     |
| MÉTODOS ESPACIALMENTE EXPLÍCITOS                                | 67  |
| -PAISAJES GENÉTICOS   | 67  |
| -ANÁLISIS de ASIGNACIÓN   | 68  |
| - ANÁLISIS ESPACIAL de COMPONENTES PRINCIPALES                  | 69  |
| 5.6- TEST de MANTEL   | 71  |
| 6. DISCUSIÓN  | 71  |
| <br>  |     |
| <b>CAPÍTULO IV – CONCLUSIONES</b>                               | 83  |
| <br>  |     |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                               | 89  |
| <br>  |     |
| <b>ANEXO - PUBLICACIONES DERIVADAS de la TESIS</b>              | 109 |



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

**TABLA II.1:** Especies muestreadas en Kongsfjord, Svalbard. Se indica el modo reproductivo y el número de individuos de cada especie muestreado en cada sitio. \_\_\_\_\_ Pág. 27

**TABLA II.2:** Listado de los *primers* utilizados para la amplificación con ISSRs en las tres especies de ascidias árticas. Las pruebas están marcadas con “x” y los *primers* que se seleccionaron por su repetitividad y patrones claros están marcados con “√”. \_\_\_\_\_ Pág. 28

**TABLA II.3:** Secuencias de los *primers* utilizados en las reacciones de PCR-ISSR y temperaturas de hibridación que arrojaron los mejores patrones de bandas, en las tres especies de ascidias árticas. \_\_\_\_\_ Pág. 33

**TABLA II.4:** Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las cinco poblaciones de *Styela rustica*. Las letras A, B y C indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el ANOVA ( $P < 0,05$ ) según el test a posteriori SNK. \_\_\_\_\_ Pág. 34

**TABLA II.5:** Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las tres poblaciones de *Halocynthia pyriformis*. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de M según el ANOVA ( $P = 0,144$ ). \_\_\_\_\_ Pág. 34

**TABLA II.6:** Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las tres poblaciones de *Boltenia echinata*. Las letras A y B indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el ANOVA ( $P < 0,05$ ) según el test a posteriori SNK. \_\_\_\_\_ Pág. 35

**TABLA II.7:** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 5 poblaciones de *Styela rustica*. \_\_\_\_\_ Pág. 36

**TABLA II.8:**  $\Phi_{ST}$  entre pares de poblaciones de *Styela rustica*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de  $P$  por encima de la diagonal. \_\_\_\_\_ Pág. 37

**TABLA II.9:** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 3 poblaciones de *Halocynthia pyriformis*. \_\_\_\_\_ Pág. 37

- TABLA II.10:**  $\Phi_{ST}$  calculado entre pares de poblaciones de *Halocynthia pyriformis*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de  $P$  por encima de la diagonal. \_\_\_\_\_ Pág. 37
- TABLA II.11:** Resultados del análisis de la varianza molecular en las tres poblaciones de *Boltenia echinata*. \_\_\_\_\_ Pág. 38
- TABLA II.12:**  $\Phi_{ST}$  calculado entre pares de poblaciones de *Boltenia echinata*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de  $P$  por encima de la diagonal. \_\_\_\_\_ Pág. 38
- TABLA III.1:** Estaciones de muestreo y especies colectadas en la Península Antártica. \_\_\_\_\_ Pág. 59
- TABLA III.2:** Listado de los *primers* utilizados para la amplificación con ISSRs en las tres especies de ascidias antárticas. Las pruebas están marcadas con “x” y los *primers* que se seleccionaron por su repetitividad y patrones claros están marcados con “√”. \_\_\_\_\_ Pág. 61
- TABLA III.3:** Secuencias de los “*primers*” utilizados en las reacciones de PCR-ISSR y temperaturas de hibridación que arrojaron los mejores patrones de bandas, en las tres especies de ascidias antártica \_\_\_\_\_ Pág. 62
- TABLA III.4:** Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las tres poblaciones de *Aplidium falklandicum*. Las letras A y B indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el ANOVA y el test SNK ( $P < 0,05$ ). \_\_\_\_\_ Pág. 62
- TABLA III.5:** Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las tres poblaciones de *Cnemidocarpa verrucosa*. Las letras A y B indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el ANOVA y el test SNK ( $P < 0,05$ ). \_\_\_\_\_ Pág. 63
- TABLA III.6:** Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las cuatro poblaciones de *Pyura bouvetensis*. Las letras A, B y C indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el análisis de ANOVA y el test SNK ( $P < 0,05$ ). \_\_\_\_\_ Pág. 63
- TABLA III.7:** Resumen de los índices de diversidad M de las 3 especies, indicando la profundidad de muestreo. En gris los valores más altos y significativos de M. Las letras A, B y C indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el ANOVA y el test SNK ( $P < 0,05$ ). \_\_\_\_\_ Pág. 64

**TABLA III.8:** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 3 poblaciones de *Aplidium falklandicum*. \_\_\_\_\_ Pág. 65

**TABLA III.9:**  $\Phi_{ST}$  calculado entre pares de poblaciones de *Aplidium falklandicum*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de  $P$  por encima de la diagonal. \_\_\_\_\_ Pág. 65

**TABLA III.10:** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 3 poblaciones de *Cnemidocarpa verrucosa*. \_\_\_\_\_ Pág. 66

**TABLA III.11:**  $\Phi_{ST}$  calculado entre pares de poblaciones de *Cnemidocarpa verrucosa*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de  $P$  por encima de la diagonal. \_\_\_\_\_ Pág. 66

**TABLA III.12:** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 4 poblaciones de *Pyura bouvetensis*. \_\_\_\_\_ Pág. 66

**TABLA III.13:**  $\Phi_{ST}$  calculado entre pares de poblaciones de *Pyura bouvetensis*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de  $P$  por encima de la diagonal. \_\_\_\_\_ Pág. 67

**TABLA III.14:** Test de Mantel de correlación entre distancia genética y geográfica entre poblaciones en tres especies de ascidias \_\_\_\_\_ Pág. 71

## FIGURAS

**FIGURA I.1.** Esquema de los océanos Ártico y Antártico, indicando los principales océanos y continentes limítrofes. En flechas se indican las principales corrientes oceánicas. Modificado de <http://www.gebco.net>. \_\_\_\_\_ Pág. 10

**FIGURA I.2.** Diversidad de Ascidias. A-E especies antárticas, A y B: *Cnemidocarpa verrucosa* (naranja) y *Molgula pedunculata* (transparente), C: *Molgula pedunculata*; D: *Pyura setosa*; E: *Aplidium radiatum*. F-H: especies tropicales, F: *Polycarpa aurata*, G y H: *Rhopalaea sp.* \_\_\_\_\_ Pág. 13

**FIGURA I.3.** Esquema de la anatomía interna de una ascidia adulta (A) y de una larva (B). Modificado de Raven *et al.*, 2011. \_\_\_\_\_ Pág. 14

**FIGURA II.1:** Ascidias muestreadas en Kongsfjorden, A) *Styela rustica*, B) *Halocynthia pyriformis*, C) *Boltenia echinata*. © Susanna Strömberg y Erling Svens. \_\_\_\_\_ Pág. 24

**FIGURA II.2:** Sitios de muestreo en Kongsfjord, Svalbard, Océano Ártico, indicando los puntos de muestreo y las corrientes Oeste de Spitsbergen relativamente cálida (en rojo) y las aguas árticas más frías (en azul). Se indican en

letras azules los principales glaciares que aportan agua de deshielos al fiordo. Tomado de Svendsen et al 2002. Estaciones muestreadas: 1) Hansneset, 2) London, 3) Prins Heinrichøya, 4) Puerto, en Ny-Ålesund, 5) Kongsfjordneset. \_\_\_\_\_ Pág. 26

**FIGURA II.3:** Patrones de amplificación de A) *Styela rustica*, B) *Halocynthia pyriformis* y C) *Boltenia echinata*, con los primers de ISSR (AC)<sub>10</sub>AA, (AC)<sub>8</sub>C y (AC)<sub>10</sub>AA. \_\_\_\_\_ Pág. 33

**FIGURA II.4:** Correlación entre M y distancia a los glaciares A) Bloomstrandbreen, B) Conwaybreen y C) Kronebreen. \_\_\_\_\_ Pág. 35

**FIGURA II.5:** Correlación entre diversidad genética M y A) tasa de sedimentación de materiales inorgánicos (g.m<sup>-2</sup>.año<sup>-1</sup>), B) % de carbono orgánico particulado (POC) del año 1998, C) del año 2006 y D) profundidad (m). \_\_\_\_\_ Pág. 36

**FIGURA II.6:** Mapas del paisaje genético de las tres especies A) *Styela rustica*, B) *Halocynthia pyriformis* y C) *Boltenia echinata*, en donde los picos positivos representan diferenciación genética y los picos negativos similitudes genéticas. Interpolación construida con AIS, a partir de distancias genéticas y geográficas interindividuales. \_\_\_\_\_ Pág. 39

**FIGURA II.7:** Resultados del análisis del programa STRUCTURE. Se muestra la media ± error estándar de Ln P(D), para las tres especies de ascidias árticas, basado en 5 réplicas para cada valor de K, usando el modelo LOCPRIOR \_\_\_\_\_ Pág. 40

**FIGURA II.8:** Gráfico de la estructura global de las poblaciones de las tres ascidias árticas, mediante el análisis sPCA. Los cuadrados representan los scores o vectores de cada genotipo individual, según el primer autovector positivo (recuadro izquierda abajo), y están posicionadas aproximadamente según sus coordenadas espaciales. Los individuos están representados por un cuadrado de tamaño proporcional al valor del vector, siendo la máxima diferenciación entre los cuadrados grandes negros y los grandes blancos. \_\_\_\_\_ Pág. 41

**FIGURA III.1:** Ascidias muestreadas en la península Antártica. A) *Aplidium falklandicum*, B) *Cnemidocarpa verrucosa* y C) *Pyura bouvetensis*. Fotografías Ricardo Sahade y Cristian Lagger. \_\_\_\_\_ Pág. 56

**FIGURA III.2:** Área de muestreo en la Península Antártica, en azul la Corriente Circumpolar Antártica. Se indican las estaciones de muestreo de Low en amarillo y Decepción en celeste. \_\_\_\_\_ Pág. 60

**FIGURA III.3:** Análisis de correlación entre la diversidad genética y la profundidad en las 3 especies antárticas. Coeficiente de correlación de Pearson  $r=0,79$ ;  $P=0,006$ . \_\_\_\_\_ Pág. 64

**FIGURA III.4:** Mapas del paisaje genético de las tres especies Antárticas A) *Aplidium falklandicum*, B) *Cnemidocarpa verrucosa* y C) *Pyura bouvetensis*, en donde los picos positivos representan diferenciación genética y los picos negativos similitudes genéticas. Interpolación construida con AIS, a partir de distancias genéticas y geográficas interindividuales \_\_\_\_\_ Pág. 67

**FIGURA III.5:** Resultados del análisis del programa STRUCTURE. Se muestra la media  $\pm$  error estándar de  $\ln P(D)$ , para las tres especies de ascidias antárticas, basado en 5 réplicas para cada valor de K, usando el modelo LOCPRIOR. \_\_\_\_ Pág. 68

**FIGURA III.6:** Esquema de los resultados de la prueba de asignación bayesiana de individuos a dos grupos genéticos de: A) *Aplidium falklandicum* y B) *Pyura bouvetensis* con  $K=2$  y el modelo LOCPRIOR. Cada individuo está representado por una columna particionada en dos segmentos de colores. El largo de cada segmento indica la probabilidad a posteriori de pertenencia de ese individuo a cada grupo genético. También se indica la localidad de muestreo. \_\_\_\_\_ Pág. 69

**FIGURA III.7:** Gráfico de la estructura global de las poblaciones de las tres especies de ascidias antárticas, mediante el análisis sPCA. Los cuadrados representan los scores o vectores de cada genotipo individual, según el primer autovector positivo (recuadro derecho abajo), y están posicionadas aproximadamente según sus coordenadas espaciales. Los individuos están representados por un cuadrado de tamaño proporcional al valor del vector, siendo la máxima diferenciación entre los cuadrados grandes negros y los blancos grandes. \_\_\_\_\_ Pág. 70

## ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**AIS:** Alleles in Space  
**AMOVA:** Análisis de la varianza molecular  
**ANOVA:** Análisis de la varianza  
**CCA:** Corriente Circumpolar Antártica  
**Dec:** Población Decepción – Isla Decepción  
**FP:** Frente Polar  
**HN:** Población Hansneset  
**IBD:** Isolation by distance- Aislamiento por distancia.  
**ISSR:** secuencias entre repeticiones simples (*Inter Simple Sequence Repeats*)  
**KN:** Población Kongsfjordneset  
**Lo:** Población London  
**Low:** Población Low – Isla Low  
**MA:** Millones de años  
**MCMC:** Método de Montecarlo de Cadenas de Markov  
**n:** tamaño de la muestra  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)  
**PH:** Población Prins Heinrichøya  
**POC:** Carbono orgánico particulado  
**Pu:** Población Puerto  
**SNK:** Procedimiento de comparaciones múltiples Studen-Newman-Keuls  
**sPCA:** Análisis espacial de componentes principales  
**UTM:** Universal Transverse Mercator

## RESUMEN

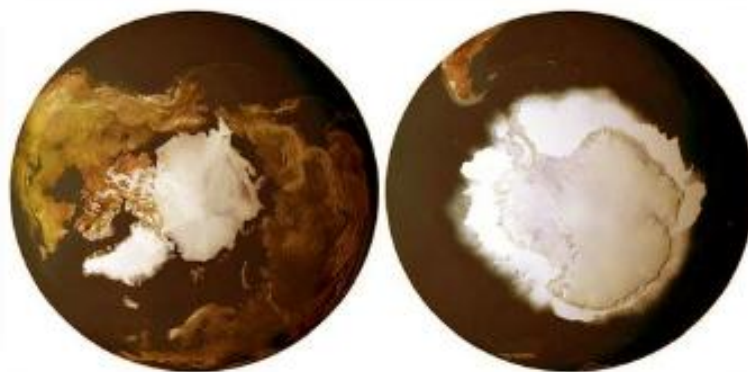
Las regiones polares poseen características comunes como temperaturas muy bajas, la presencia de hielo, y largos periodos de luz y de oscuridad. Pero aparte de estas características, determinadas por la situación polar, los océanos Antártico (o Sur) y Ártico son muy diferentes. El Océano Ártico está rodeado por continentes y presenta plataformas poco profundas, mientras que el Océano Antártico es un océano anular que rodea a un continente con plataformas inusualmente profundas. Las comunidades bentónicas árticas tienen conexión con los océanos Atlántico y Pacífico mientras que las antárticas están aisladas del resto de las plataformas por profundidades abisales y por el Frente Polar, una barrera oceanográfica y biogeográfica muy eficiente. Las faunas modernas de ambos océanos son el resultado de diferentes historias geológicas y de glaciaciones, y difieren en edad, niveles de endemismos y composición taxonómica. En este trabajo se utilizaron ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats) para analizar la estructura genética poblacional y los patrones de diversidad genética en tres especies de ascidias árticas y tres antárticas (Urochordata, Tunicata) con diferentes estrategias reproductivas (fecundación interna e incubación vs. fecundación externa) y por lo tanto diferente potencial de dispersión de sus larvas. Los muestreos se realizaron en Kongsfjord, Svalbard (un archipiélago Noruego del Océano Ártico), y en el Estrecho de Bransfield, en el oeste de la Península Antártica. Se emplearon diferentes análisis para determinar los patrones de estructuración genética: AMOVA, agrupamiento bayesiano, genética del paisaje y análisis espacialmente explícitos. Se identificaron discontinuidades en las distribuciones espaciales de la diversidad genética, concordantes con las condiciones oceanográficas, la proximidad a los frentes de glaciares, la profundidad y la erosión de los témpanos. La estructura genética en las poblaciones de las especies árticas no estuvo siempre determinada por el tiempo de vida larval y el modo reproductivo, pero sí con otras características de la historia de vida como por ejemplo la estacionalidad en la reproducción. Los patrones encontrados fueron los esperados para un sistema relativamente joven como las plataformas árticas, que tienen una historia reciente de glaciaciones y en donde las especies que estarían llegando serían colonizadores eficientes o r-estrategas. En las especies antárticas la diversidad genética estuvo correlacionada con la profundidad, y la intensidad de la estructuración genética fue consistente con el tiempo de vida de las larvas y gametas pelágicas, como se espera para un sistema en el cual el aislamiento y el tiempo conformaron comunidades bentónicas únicas y complejas, caracterizadas por interacciones k-estrategas.

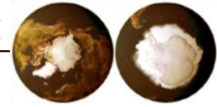


## ABSTRACT

Polar regions have common features as low temperatures and the seasonal trend in irradiance and ice cover. Besides these characteristics, determined by their polar position, the Arctic and Antarctic Oceans are strictly different. The Arctic Ocean is characterized by shallow shelf seas surrounded by land whereas the Antarctic Ocean is a ring-shaped ocean surrounding a continent with a very deep continental shelf. Whereas the arctic benthos has open connections with the Pacific and the Atlantic oceans, the Antarctic benthic communities are isolated due to the effective oceanographic and biogeographic barrier of the Polar Front and the abyssal depths surrounding the continent. The modern polar faunas are the result of different geological and glaciological histories, and differ in age, levels of endemism and taxonomic composition. In this work, ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats) were utilized to analyze the population genetic structure and genetic diversity patterns in three Arctic and three Antarctic ascidians (Urochordata, Tunicata) with different reproductive strategies (brooders versus free-spawners) and hence potentially different dispersal capabilities of their larvae. Sampling was performed in Kongsfjord, Svalbard (a Norwegian archipelago in the Arctic Ocean), and in Bransfield Strait in the West side of the Antarctic Peninsula. Different approaches, from AMOVA to Bayesian clustering, landscape genetics and spatially explicit analyses, were used to determine the pattern of genetic structure. Genetic breaks were identified in the spatial distribution of genetic diversity, which were concordant with oceanographic conditions, proximity to glacial fronts, depth and iceberg scouring. Genetic structure in arctic populations was not always determined by larval duration and reproductive mode, but by other life traits such as seasonality in reproduction. These patterns were expected in a relatively young system as the Arctic shelves, having a recent history of glaciations, and where new arriving species are expected to be r-strategist efficient colonizers. In Antarctic species, genetic diversity was correlated with depth. The strength of the genetic structure was concordant with the time spent in the plankton of larvae and gametes, as was expected in a system where isolation and time had shaped unique and complex biologically accommodated benthic assemblages of k-strategy interactions.

CAPÍTULO I  
INTRODUCCIÓN GENERAL



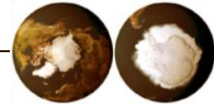


## 1. LOS OCÉANOS POLARES. ¿QUÉ TIENEN en COMÚN?

Las regiones polares son consideradas desiertos congelados, en donde las características predominantes son temperaturas muy bajas, la presencia de hielo, y largos períodos de luz y de oscuridad. Los océanos que se encuentran en estas latitudes, Antártico (o Sur) y Ártico, presentan en la actualidad condiciones físicas similares. Su situación polar determina una irradiación solar marcadamente estacional, lo cual origina bajas temperaturas en sus aguas y trae como consecuencia el congelamiento de grandes superficies, en algunas zonas en forma permanente, y pulsos de productividad primaria restringidos al verano (Dayton, 1990; Arrigo y Thomas, 2004; Thomas *et al.*, 2008).

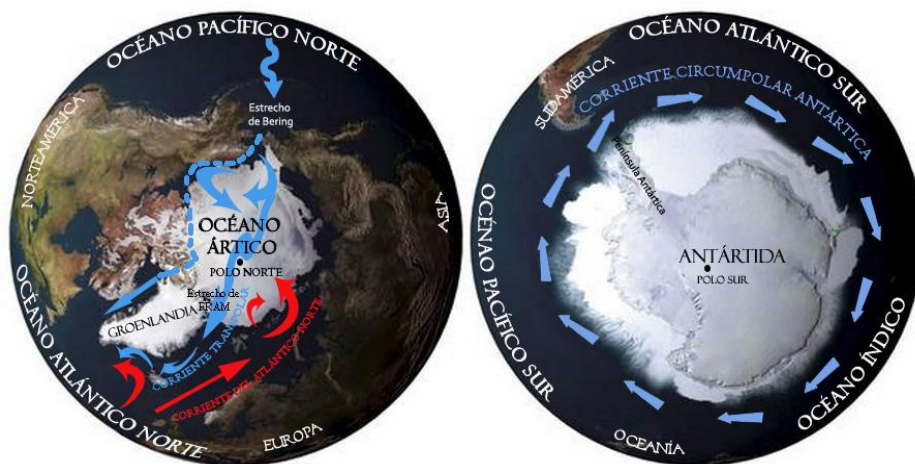
Sin embargo, a pesar de compartir algunas características físicas y biológicas, estos dos océanos son muy diferentes. El Océano Ártico está rodeado por continentes (FIGURA I.1). Este carácter de océano mediterráneo determina un aporte de agua dulce muy importante por parte de los mayores sistemas fluviales de América del Norte y Siberia (Curtis, 1975; Dayton, 1990; Piepenburg, 2005). Antes del Período Cuaternario estuvo libre de hielo y mantuvo comunicación abierta con los Océanos Pacífico y Atlántico a través del Estrecho de Bering y el Estrecho de Fram respectivamente. El descenso de la temperatura se intensificó durante el Pleistoceno; época caracterizada por una alternancia periódica de condiciones climáticas frías (glaciales) y cálidas (inter-glaciales), lo que resultó en el establecimiento definitivo de una capa de hielo permanente (Bleil y Thiede, 1990; Lambeck *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2008).

Por el contrario, el Océano Antártico es un sistema de anillos concéntricos de agua (FIGURA I.1), que rodea a un continente cubierto casi por completo de una capa de hielo de 2-4 km de espesor, y que sufrió un proceso de enfriamiento que

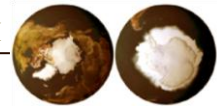


comenzó hace 40 millones de años, en el límite Eoceno/Oligoceno (Lawyer *et al.*, 1992; Crame, 1999). Allí no existe el aporte de sistemas hídricos continentales. Mientras el Océano Ártico está en comunicación con los océanos vecinos, el Antártico permanece aislado del Pacífico, Atlántico e Índico por el Frente Polar (FP) o Convergencia Antártica, que conforma una verdadera barrera oceanográfica permanente (Dayton *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 2008).

**FIGURA I.1.**  
Esquema de los océanos Ártico y Antártico, indicando los principales océanos y continentes limítrofes. En flechas se indican las principales corrientes oceánicas.  
Modificado de <http://www.gebco.net>



Las diferencias en la historia geológica y de glaciaciones de los dos océanos polares se ven reflejada en los patrones de endemismos y de distribución de las biotas árticas y antárticas, especialmente en las comunidades bentónicas de plataforma (Dunton, 1992, Dayton *et al.*, 1994; Clarke y Crame, 2010). La distribución de los organismos bentónicos sésiles está determinada por varios factores: la capacidad de dispersión de sus larvas, la hidrografía, el tipo de sustrato, la competencia, predación y la historia evolutiva del sistema de plataformas. Por ejemplo, la ascidiofauna antártica tiene más riqueza de especies de lo que se esperaría en un ambiente donde las condiciones de salinidad, disponibilidad de alimento y la erosión mecánica de los témpanos fluctúan según la época del año. El número de especies de ascidias en las plataformas antárticas es casi el triple que en las plataformas árticas y más del 50% son endemismos antárticos, mientras que las especies árticas tienen origen Atlántico o Pacífico. (Primo y Vázquez, 2007; 2009; Shenkar y Swalla, 2011). A diferencia de las ascidias árticas, la mayoría de las especies antárticas tienen un rango de distribución amplio, en área y profundidad: son circumpolares y euribáticas (Kott, 1969). La región antártica ha estado aislada durante un período de tiempo muy largo, esto se refleja en su fauna, que tiene un

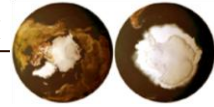


importante componente relictual de una ascidiofauna más antigua que sobrevivió a los períodos de máxima expansión glacial, gracias a su habilidad para tolerar un gran rango batimétrico, mientras que las especies que no fueron capaces de vivir a mayor Profundidad fueron aisladas progresivamente hacia el norte, estableciéndose como especies Subantárticas (Brey *et al.*, 1996; Raupach *et al.*, 2009; Thatje, 2012).

## 2. ASCIDIAS, LOS TUNICADOS del BENTOS

Las ascidias o “papas de mar”, son suspensívoros sésiles bentónicos que pertenecen a un grupo numeroso y diverso, del cual existen aproximadamente 2.800-3.000 especies descritas, lo que las convierte en la clase más diversa del subphylum Tunicata (FIGURA I.2) (Lambert, 2005; Petersen, 2007; Shenkar y Swalla, 2011). En la Clase Ascidiacea (Phylum Chordata) se encuentran exclusivamente organismos marinos, bentónicos y sésiles (adheridos al sustrato, sin motilidad). Poseen una amplia distribución en todos los océanos del mundo y en todas las profundidades (Millar, 1971; Abbott, 1975; Monniot y Monniot, 1983; Turon, 1990). Se encuentran fijados en casi todos los tipos de sustrato, y especialmente en los fondos rocosos duros, aunque algunas especies prefieren exclusivamente los fondos blandos (Tatián *et al.*, 2005). El tamaño de los individuos varía desde 1mm hasta 60 cm., y algunas colonias miden varios metros. La pared del cuerpo está recubierta por una túnica, de allí el nombre del grupo, que está formada por una matriz acelular de una sustancia llamada tunicina, de estructura similar a la celulosa (Millar, 1971).

Son organismos suspensívoros, el modo de alimentación es a través del bombeo activo de agua que pasa a través de una red de mucus que se produce continuamente, en donde quedan atrapadas las partículas que están en suspensión en el agua (seston). El agua ingresa a través de un sifón incurrente u oral (anterior) rodeados de cilios, cuyo batimiento origina el movimiento del agua. Desde allí atraviesa el saco branquial, el cual tiene una función doble: secuestrar el alimento en una red mucosa y realizar el intercambio gaseoso, y luego pasa al atrio o cámara cloacal, y es expedida por el sifón excurrente o atrial (antero dorsal) (FIGURA I.3). Si bien es un grupo que posee mecanismos de autolimpieza de sus estructuras de filtrado mediante contracciones del manto, cuando hay sobrecarga de material inorgánico en suspensión, esta actividad les demanda una inversión de energía muy alta, energía que no queda disponible para desarrollar otras actividades fisiológicas, como por ejemplo reproducirse (Goodbody, 1974; Armsworthy *et al.*, 2001). La carga de sedimentos de la columna de agua produce un efecto de dilución del material orgánico en suspensión -alimento-, y dependiendo de su concentración puede llegar a ocasionar en estos organismos largos períodos de inanición, y en última instancia la muerte (Armsworthy *et al.*, 2001).

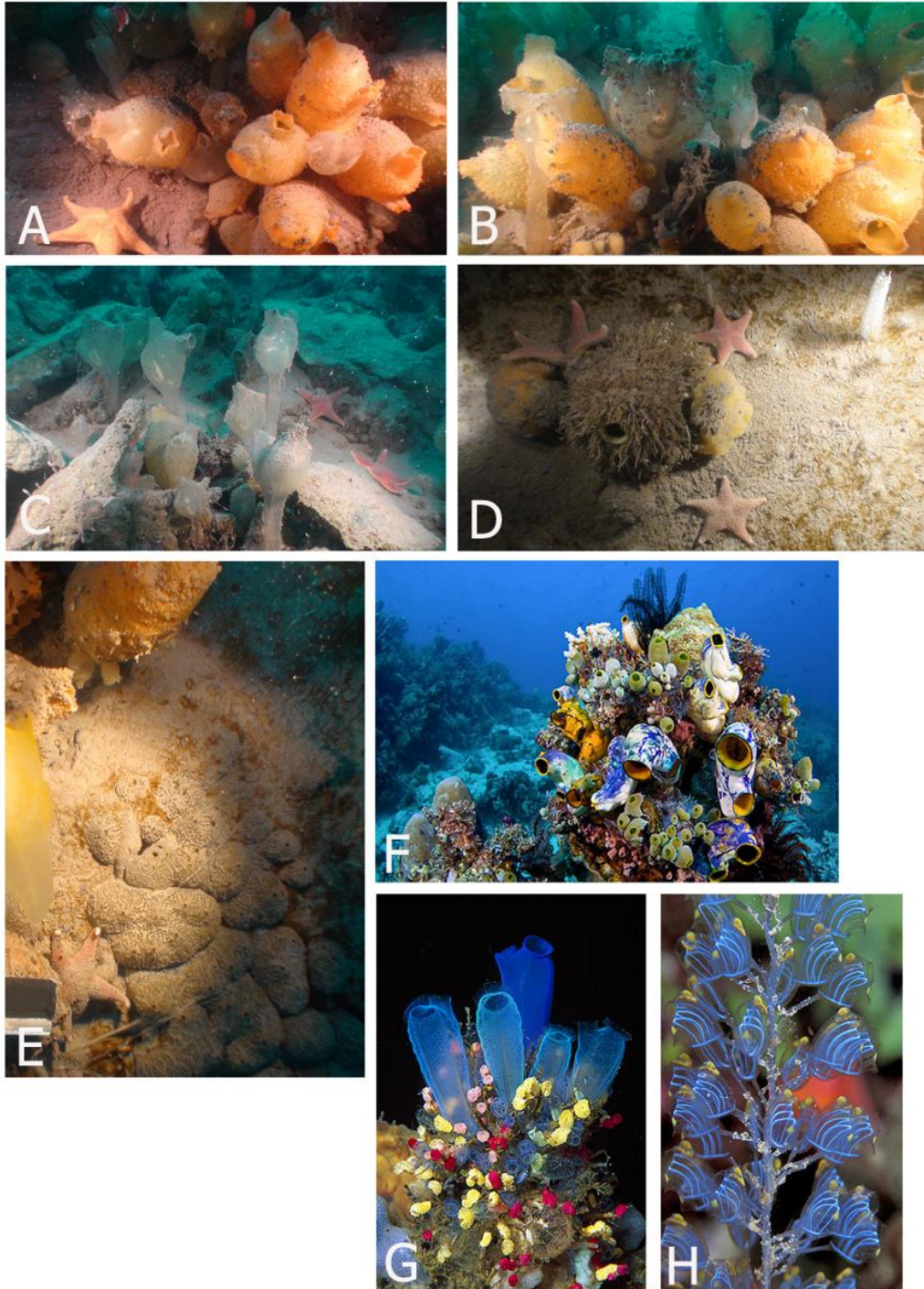
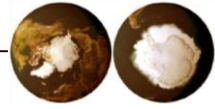


Presentan todas las características de un cordado típico en su estadio larval o de vida libre: hendiduras branquiales, notocorda dorsal, cordón nervioso dorsal y una cola post-anal muscular (FIGURA 1.3). Todas estas características se pierden durante la metamorfosis de la larva a adulto, excepto las hendiduras branquiales, y durante este proceso se modifica tanto la estructura del cuerpo, que sería imposible reconocerlos como cordados (Svane y Young, 1989; Barnes, 1996; Brusca y Brusca, 2003).

Todas las ascidias son hermafroditas, normalmente poseen estrategias para evitar la autofecundación como por ejemplo la maduración secuencial de las gónadas y la auto-incompatibilidad dada por proteínas de superficie de las gametas (Morgan, 1944; Marino *et al.*, 1998; Sawada *et al.*, 2004). Aunque también existen casos en que la auto-fecundación es posible y es una estrategia en condiciones de aislamiento, la fecundación cruzada es lo más común dentro del grupo (Jiang y Smith, 2005). Las formas solitarias y coloniales están asociadas a estrategias reproductivas distintas. Las colonias presentan reproducción sexual que origina a la larva fundadora que luego por gemación o reproducción asexual genera a los zooides de la colonia, por lo que son clones que comparten un sistema excretor y circulatorio (Stoner y Weissman, 1996), mientras que las especies solitarias son individuos independientes que se generaron a partir de reproducción sexual exclusivamente. Las especies solitarias liberan las gametas a la columna de agua (ovulíparas), en donde ocurre la fecundación (desarrollo indirecto de la larva), mientras que las coloniales presentan mayormente fecundación interna e incuban la larva hasta su desarrollo completo (ovovivíparas), lo que reduce potencialmente el tiempo de vida libre y la capacidad de dispersión de esta fase del ciclo de vida. Las larvas, en ambos casos, son lecitotróficas, tienen el ano y la boca cerrados y no se alimentan en este estadio, por lo que dependen de sus reservas vitelogénicas. Una vez que se agotan las reservas del huevo, deben metamorfosearse a adultos, por lo que esta fase del desarrollo suele ser muy corta en comparación con otros organismos de desarrollo larval planctotrófico (Svane y Young, 1989).

La estacionalidad reproductiva en las ascidias está asociada principalmente a cambios en la temperatura del agua si se trata de zonas tropicales o subtropicales. Sin embargo, en ambientes polares en donde la temperatura es estable durante todo el año, los ciclos reproductivos están desacoplados de esta variable (Millar, 1971; Goodbody, 2004). Debido a que las larvas lecitotróficas no tienen necesidades energéticas más allá de sus reservas de vitelo, y su supervivencia no depende de la disponibilidad de alimento durante el verano, existe una gran variación en los ciclos biológicos de las ascidias, acoplados o desacoplados a los pulsos de productividad primaria (Pearse *et al.*, 1991; Stanwell-Smith y Peck, 1998; Sahade *et al.*, 2004).



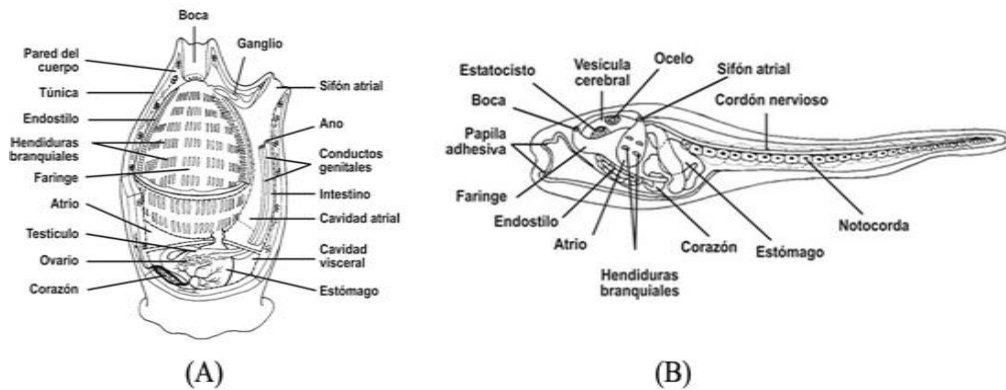


**FIGURA I.2.** Diversidad de Ascidas. A-E especies antárticas, A y B: *Cnemidocarpa verrucosa* (naranja) y *Molgula pedunculata* (transparente), C: *Molgula pedunculata*; D: *Pyura setosa*; E: *Aplidium radiatum*. F-H: especies tropicales, F: *Polycarpa aurata*, G y H: *Rhopalaea* sp).



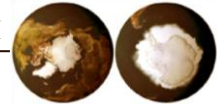


**FIGURA I.3.**  
Esquema de la anatomía interna de una ascidia adulta (A) y de una larva (B). Modificado de Raven *et al.*, 2011.



En general, las ascidias son miembros importantes de la fauna bentónica de las plataformas árticas y antárticas, y en algunas zonas de aguas someras llegan a ser uno de los grupos dominantes en las comunidades macrobentónicas de suspensívoros. En zonas densamente pobladas por comunidades de suspensívoros sésiles, se observa un aumento en la estabilidad del sustrato, a través de la retención y consolidación del sedimento, generando así un hábitat favorable para el asentamiento de otras especies (Sahade *et al.*, 1998; Gutt, 2000; Teixidó *et al.*, 2002).

Las suspensivoría es una estrategia trófica y un nicho ecológico singular, compartido con esponjas, briozoos, moluscos, anélidos y corales. La formación de estructuras tridimensionales complejas de suspensívoros sésiles es inexistente en los ecosistemas terrestres, y muy importante en los ambientes marinos en donde este grupo trófico llega a representar más del 50% de la biomasa de las comunidades bentónicas (Gili *et al.*, 2001). En los ambientes marinos polares se producen los niveles máximos de producción planctónica en primavera y verano, como consecuencia del aporte de nutrientes provenientes del deshielo y el incremento de la intensidad lumínica. A estas floraciones de productores primarios le suceden las de los consumidores primarios: el zooplancton. Estos no alcanzan a agotar la producción primaria generada en tan poco tiempo y a gran escala, y la fracción no aprovechada sedimenta hacia el fondo. Este flujo vertical del plancton se denomina acoplamiento bento-pelágico y constituye la principal fuente de alimento para las comunidades bentónicas; incluye también los restos esqueléticos del zooplancton, los pellets fecales y bacterias. Durante el invierno esto no ocurre, y la fuente de energía la constituye el flujo horizontal del plancton heterótrofo (bacterias, flagelados y ciliados) que abunda en los fondos, y por corrientes de advección es resuspendido quedando a disposición de los suspensívoros bentónicos. Debido a las bajas temperaturas y a la baja actividad bacteriana, los restos orgánicos no consumidos durante el verano se almacenan formando una reserva de alimento



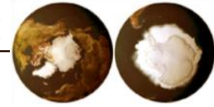
que se descompone muy despacio y constituye una fuente de alimento duradera. En las zonas donde las comunidades de suspensívoros abundan se observan niveles altos de nitritos, reflejo de la actividad descomponedora de la materia orgánica, y estos nutrientes orgánicos son resuspendidos por corrientes de fondo y transportados hacia la superficie, fertilizando así las aguas superficiales (Gutt y Schickan, 1998; Gili *et al.*, 2001; Honso, 2004; Smith *et al.*, 2006; Rossi y Gili, 2009).

### 3. LA DISPERSIÓN en el MAR, BARRERAS INVISIBLES

La dispersión determina la escala a la cual las especies interactúan con el ambiente, responden a las perturbaciones, y evolucionan. La escala y el patrón de dispersión pueden tener consecuencias importantes para la dinámica poblacional, las interacciones entre especies, patrones de distribución espaciales y temporales, estructura genética poblacional, macroevolución y en la biogeografía (Kinlan y Gaines, 2003).

Para los organismos bentónicos sésiles, la fase de dispersión está asociada con los estadios tempranos de su fase de vida, ya sean larvas o gametas sin fecundar. Entender los mecanismos que impulsan la dispersión larval es un problema biofísico: biológico en el sentido que incluye procesos que determinan la producción, crecimiento, desarrollo y supervivencia de las larvas; físicos por las propiedades de advección y difusión que tiene las masas de agua; y biofísicos por las interacciones entre ciertas características comportamentales de las larvas y las propiedades físicas del ambiente (Cowen *et al.*, 2000; Cowen y Sponaugle, 2009).

El **transporte** de las larvas se define como la traslocación horizontal de las larvas en un sentido espacial, por ejemplo paralelo a la costa. Sin embargo esta definición ignora el movimiento vertical y esta dimensión es crítica ya que las larvas pueden modificar su distribución horizontal nadando verticalmente hacia arriba o hacia abajo, y encontrar diferentes corrientes que la transporten a diferentes lugares (Crisp, 1976; Pineda *et al.*, 2007). El abanico tan amplio de comportamientos larvales y mecanismos físicos del ambiente marino hace que el transporte de larvas sea difícil de medir. Contrariamente, la **dispersión** de las larvas es la propagación desde un centro de origen hasta un sitio de establecimiento. El transporte es un componente importante de la dispersión larval, y una dispersión amplia requiere de un transporte significativo. Una dispersión restringida, sin embargo, no implica poco transporte, ya que puede incluir movimientos cíclicos en donde las larvas regresan a su punto de origen. Los procesos y los factores asociados con el fin del transporte (el asentamiento o reclutamiento) también inciden en la dispersión: el comportamiento durante el asentamiento, distribución de sitios favorables para fijarse, etc. Así también, como el desove es el momento inicial de la dispersión, tiene mucha importancia la ubicación inicial, la sincronización de la reproducción con ciertas épocas del

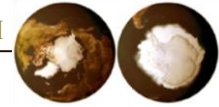


año, edad y estado de los progenitores, y éxito reproductivo (Berkeley *et al.*, 2004; McCormick, 2006). La dispersión incluye una probabilidad de supervivencia, y por lo tanto la predación o la disponibilidad de alimentos (en las especies planctográficas) son importantes, ya que es el momento más vulnerable de las larvas y es cuando ocurre la mayor tasa de mortalidad en las poblaciones marinas. Si los reclutas mueren sin reproducirse en el nuevo lugar, la dispersión tiene una importancia cuestionable para la población, y se puede diferenciar entre “conectividad poblacional” (medida al momento del reclutamiento) y “conectividad reproductiva poblacional” (el intercambio de individuos que eventualmente se reproducen en la nueva población) (Hunt y Scheibling, 1997; Doherty *et al.*, 2004) llamado también **flujo génico** (Slatkin, 1985b).

El **flujo génico** tiene numerosas consecuencias sobre las poblaciones: disminuye la probabilidad de extinción en poblaciones locales, y al introducir nuevas variantes de genes, aumenta la diversidad genética y reduce la diferenciación genética entre las poblaciones. En ausencia de flujo génico las poblaciones se transforman en unidades evolutivas independientes, y dado el suficiente tiempo de aislamiento puede conducir a un proceso de especiación. El flujo génico, junto con la deriva genética (que es la fuerza opuesta, ya que tiende a diferenciar a las subpoblaciones), las mutaciones y la selección natural, son los responsables de distribuir la variación genética entre y dentro de las poblaciones, conformando así su estructura genética (Slatkin, 1985b; 1987; Roderick, 1996).

Durante muchos años se sostuvo la hipótesis que las especies marinas se caracterizan por presentar una gran dispersión (Levin, 2006). Esto se debe a la supuesta homogeneidad de los océanos y a la prevalencia de estadios larvales pelágicos en muchas taxa, con gran capacidad de dispersión. Las larvas y los huevos pelágicos son arrastrados por las corrientes marinas, favoreciendo la dispersión pasiva durante semanas o meses a lo largo de grandes distancias. En este contexto se esperaría una relación directa entre tiempo de permanencia en el plancton y estructura genética. Sin embargo existen razones para no interpretar el potencial de dispersión en términos de flujo génico. Por ejemplo, la física de un océano líquido en un planeta que gira sobre su eje y se traslada, calentado diferencialmente en los polos y en el ecuador, asegura un complejo patrón de corrientes y frentes oceánicos, haciendo que aún el océano abierto sea un hábitat fragmentado (Palumbi, 1994). Así también, las barreras químicas (como aquellas secretadas por algunos organismos para evitar que se establezcan nuevos migrantes en la población) y las barreras físicas (como la temperatura o la salinidad) pueden aumentar la mortalidad de las larvas (Cowen *et al.*, 2000) al igual que las barreras biológicas, como el fracaso de los migrantes en reproducirse (sistemas de apareamiento según fenotipo similar), o la desincronización en el desove.

Son muchos los factores para tener en cuenta a la hora de generalizar, y a pesar que estas barreras estarían generando una buena oportunidad para la divergencia genética, no son límites fijos para todas las especies y en todo

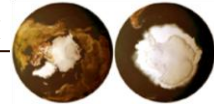


momento. Debido a que las estimaciones de la dispersión en poblaciones marinas utilizan aproximaciones contradictorias y están realizadas en escalas espaciales diferentes, distan mucho de representar un patrón global de dispersión y de conectividad (Levin, 2006; Bradbury *et al.*, 2008).

#### 4. MÉTODOS INDIRECTOS para ESTUDIAR la DISPERSIÓN

La observación directa de la dispersión en las especies marinas, suele ser una tarea muy dificultosa, mas aun tratándose de organismos sedentarios que dependen de sus estadios larvales de vida libre para dispersarse. Los métodos indirectos se basan en la estimación de la estructura genética poblacional a través del conocimiento de la distribución espacial de alelos o frecuencias génicas. La inferencia más común de flujo génico se basa en la varianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones, estimada a través de los estadísticos  $F$  de Wright y sus derivados como  $G_{st}$  de Nei (Nei, 1986) y el  $\theta_{st}$  de Weir y Cockerham (Weir y Cockerham, 1984), entre otros. Estos modelos tienen una serie de supuestos que rara vez se cumplen en su totalidad en poblaciones naturales, como por ejemplo: tamaño poblacional constante, un número infinito de poblaciones, tasa de migración constante; por ello deben ser interpretados con cautela (Slatkin, 1985a, b, 1987; Grosberg y Cunningham, 2001; Wilson *et al.*, 2005; Sotka y Palumbi, 2006). Es fundamental a la hora de estudiar la estructura genética poblacional en organismos marinos, tener un conocimiento abarcativo sobre la biología de la especie, las condiciones oceanográficas y la biogeografía histórica, ya que los niveles y patrones de migración están modulados por diversos factores oceanográficos, climáticos y de la biología reproductiva de las especies, los cuales determinan la tasa y patrón de dispersión de gametas, larvas y adultos (Grosberg y Cunningham, 2001).

Existe una gran variedad de marcadores moleculares para estudiar la variabilidad, como alozimas, RAPDs, microsátélites, ADN mitocondrial, etc. La elección de la técnica dependerá de los niveles de variabilidad revelados, la repetibilidad de los resultados y la simpleza en su utilización, como así también en el costo económico. La técnica basada en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias entre repeticiones simples (ISSR: Inter Simple Sequence Repeats) constituye un marcador molecular nuclear no codificante que evoluciona a una tasa mayor y está menos sujeto a selección que las regiones codificantes. Esta técnica permite estimar los niveles de variación genética presentes entre dos regiones microsátélites. Los microsátélites son secuencias simples repetidas (SSR) de di, tri, tetra o penta-nucleótidos del genoma nuclear de organismos eucariotas (Pradeep *et al.*, 2002). Los cebadores o *primers* de ISSR son secuencias repetidas en tándem, que se unen en sitios homólogos de los microsátélites, por lo que la amplificación se reduce sólo a aquellos fragmentos comprendidos entre dos microsátélites invertidos. Cuando dos secuencias repetidas se presentan dentro de una

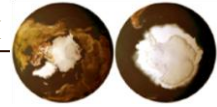


distancia amplificable y con una orientación invertida, el *primer* complementario a ellas induce la amplificación del segmento de ADN intermedio. La molécula generada, con un tamaño molecular particular se considera un *locus*, que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. Normalmente los ISSRs amplifican de 25 a 50 *loci* en una sola reacción. Los *primers* generalmente son anclados, es decir que tienen un nucleótido o dos de más al final de la repetición en tándem, para restringir las posibilidades de apareamientos erróneos (Abbot, 2001; Bornet y Branchard, 2001). Los *loci* o bandas amplificadas se analizan como marcadores dominantes, lo cual significa que cada banda corresponde a un *locus* y su presencia representa los genotipos homocigota dominante y heterocigota, mientras que la ausencia de la banda representa el genotipo homocigota recesivo. La ausencia de amplificación de una banda puede deberse a varios factores: ausencia de un sitio de unión del primer al ADN molde debido a una mutación, rearrreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis, inserciones o deleciones lo suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda lo que dificulta identificarlas como un locus separado.

Esta técnica no necesita de un conocimiento a priori de la secuencia a amplificar, requiere de muy poca cantidad de ADN molde y revela altos niveles de polimorfismo (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet y Branchard, 2001). A diferencia de la técnica de RAPDs, los patrones que se obtienen son altamente repetibles, ya que es posible trabajar a mayores temperaturas de unión del cebador al ADN molde ("*annealing*"), lo que restringe las amplificaciones inespecíficas. Este tipo de marcadores presenta algunas desventajas: no se puede determinar con seguridad si las bandas del mismo tamaño molecular presentes en varios individuos son homólogas, y no permiten detectar a los individuos heterocigotas por su naturaleza dominante. Este marcador se comenzó a utilizar en 1994 (Zietkiewicz *et al.*, 1994), y su uso fue cada vez más frecuente en los últimos años en organismos marinos (Hou *et al.*, 2006; Maltagliati *et al.*, 2006; Casu *et al.*, 2007; Lewallen *et al.*, 2007; Varela *et al.*, 2007; de Aranzamendi *et al.*, 2008; Demarchi *et al.*, 2008; 2010).

## 5. HIPÓTESIS

Los patrones de estructura genética poblacional y de diversidad genética son diferentes en las ascidias árticas y antárticas. A su vez, hay diferencias en los patrones de estructura genética según el modo reproductivo y el potencial de dispersión de cada especie.



## 6. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es contribuir al conocimiento de la historia evolutiva y los procesos de conformación de las biotas de los océanos Ártico y Antártico a través del estudio de los patrones de dispersión y de la estructura genética poblacional a nivel microgeográfico, de diferentes especies de ascidias con diferentes modos reproductivos y potenciales de dispersión.

En la última década, el número de estudios sobre estructura genética poblacional de especies marinas bentónicas de ambientes polares ha ido en aumento (Darling *et al.*, 2000; de Aranzamendi *et al.*, 2008; Hunter y Halanych, 2008; 2010; Kuklinski y Barnes, 2010). Aunque abundan los ejemplos de estudios de genética poblacional de ascidias en mares tropicales y templados (Yund y O'Neil, 2000; Ben-Shlomo *et al.*, 2001; Bourque *et al.*, 2007; Dupont *et al.*, 2006; López-Legentil *et al.*, 2006; Muniz Dias *et al.*, 2006; Paz *et al.*, 2003; Stoner *et al.*, 2002; Tarjuelo *et al.*, 2004) no hay ningún estudio realizado en los ambientes polares, y tampoco existen estudios comparativos que abarquen los dos sistemas polares ártico y antártico. Si bien se registran muchos trabajos que comparan la estructura genética de especies con diferente modo reproductivo (Ayre *et al.*, 1997; Ayre y Huges, 2000; Goldson *et al.*, 2001; Bay *et al.*, 2006; Johnson y Black, 2006; Watts y Thorpe, 2006; Richards *et al.*, 2007; Miller y Ayre, 2008; Sherman *et al.*, 2008; Hyuk y Boulding, 2009; Pannacciulli *et al.*, 2009), la mayoría se concentró en aguas tropicales o templadas, únicamente Hoffman *et al.* (2010) compararon los patrones de estructura genética en especies bentónicas con modos reproductivos diferentes en la Antártida. El desarrollo de trabajos en ambientes marinos polares es importante ya que son los sectores del planeta más vulnerables al calentamiento global, y existe una necesidad cada vez mayor de focalizar el estudio en factores tales como modos de vida, aislamiento geográfico, y barreras oceanográficas al flujo génico y cómo interactúan para determinar la estructura genética poblacional de los organismos marinos.

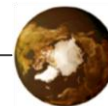
Las ventajas en utilizar a las ascidias como modelo se deben a la diversidad del grupo en estrategias reproductivas. Dentro de los organismos sésiles bentónicos son los que poseen los tiempos de vida más cortos de su fase de vida libre, por tener larvas lecitotróficas. La falta de diferencias comportamentales entre machos y hembras (por tratarse de especies hermafroditas) y su abundancia en las comunidades de plataformas continentales árticas y antárticas, hace de este grupo un excelente modelo para inferir patrones de dispersión y colonización del bentos. Las ascidias, como parte importante de las comunidades suspensívoras sésiles del bentos tienen una importancia significativa en el acoplamiento bento-pelágico, ya que, el secuestro de fitoplancton y material orgánico particulado de la columna de agua, seguido de la biodeposición de heces y pseudoheces es una de las principales rutas tróficas y de flujo de energía en los ecosistemas marinos.



CAPÍTULO II  
TUNICADOS BENTÓNICOS  
del OCÉANO ÁRTICO



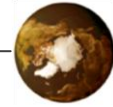




## 1. INTRODUCCIÓN: EL SISTEMA BENTÓNICO ÁRTICO

**E**n las plataformas de aguas someras del Océano Ártico existen comunidades marinas relativamente jóvenes cuya historia se remonta a apenas unos 15.000 años atrás, a partir del fin de la última glaciación del Cuaternario. Durante este Período, que comenzó hace 3,6 MA, se sucedieron períodos de enfriamiento y máxima expansión glaciaria y períodos de calentamiento y retracción glaciaria, a intervalos de 10-20.000 años. La última y más importante expansión de los hielos, la glaciación de Wisconsin durante el Pleistoceno, alcanzó su pico máximo de expansión hace 18.000 años. Los efectos de las glaciaciones del Cuaternario fueron devastadores para los ecosistemas bentónicos, ya que provocaron una destrucción masiva de la fauna marina de plataforma durante las máximas glaciarias y la subsiguiente re-colonización desde poblaciones relictuales, por lo que es esperable que estos eventos hayan tenido un impacto importante en la diversidad de las comunidades (Dayton, 1990; Dayton *et al.*, 1994; Piepenburg, 2005).

Durante el último máximo glaciario del Pleistoceno, la transferencia de agua hacia casquetes de hielos continentales provocó un descenso en el nivel del mar, que en menos de 2.000 años descendió entre 30-40 m hasta un máximo de 130 m (Lambeck *et al.*, 2002). Durante el descenso del nivel del mar, las costas se retrajeron mar adentro unos cientos de kilómetros, dejando al descubierto extensas áreas de plataformas previamente habitadas por comunidades bentónicas. La cubierta de hielo que impedía la penetración de los rayos solares produjo una reducción de la actividad biológica y la fauna bentónica fue erradicada casi en su totalidad, ya sea por la falta de alimento o por la ausencia de sustrato libre de hielo donde asentarse (Dunton, 1992; Piepenburg, 2005; Thomas y Briner, 2009).

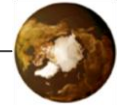


La última retracción glaciaria comenzó hace 6.000-14.000 años (Zenkevitch, 1963). Durante este proceso el ingreso de sedimentos terrestres por corrientes de deshielo también afectó a las comunidades bentónicas que habrían sobrevivido en zonas menos afectadas por los glaciares, sobre todo a aquellas compuestas por organismos filtradores sésiles. El aporte excesivo de material inorgánico particulado genera turbidez en el agua, disminuyendo la penetración de la luz solar y por lo tanto afectando directamente la productividad primaria, teniendo gran implicancia en el acoplamiento bento-pelágico. El efecto de dilución causado por los sedimentos inorgánicos en suspensión reduce la cantidad de carbono orgánico disponible para los organismos que se alimentan filtrando las partículas de la columna de agua (seston), y en casos extremos de sedimentación puede producirse el taponamiento u oclusión total de los sistemas de filtración de las especies suspensívoras, produciéndoles la muerte (Dunton, 1992; Dayton *et al.*, 1994; Hop *et al.*, 2002; Kendall *et al.*, 2003; Wlodarska-Kowalczyk y Pearson, 2004).

Sin embargo, este proceso de retracción de los glaciares fue dejando plataformas de aguas someras libres de hielo, que los organismos bentónicos comenzaron a colonizar desde los océanos circundantes, proceso que fue muy lento y aún en la actualidad sigue ocurriendo (Dayton *et al.*, 1994; Weider y Hobaek, 2000). Debido a ello, la biota ártica actual muestra mucha afinidad con las biotas del Pacífico y del Atlántico, y se caracteriza por presentar pocos endemismos y una biodiversidad más baja que los ecosistemas marinos templados, tropicales e inclusive los antárticos (Dayton, 1990; Dunton, 1992; Gray, 2001).

Los efectos de las glaciaciones también se ven reflejados en la diversidad genética y en la estructura genética poblacional de las especies que habitan las costas árticas y del Atlántico Norte (Hewitt, 2000, 2004; Coyer *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 2003; Marko, 2004; Ben-Shlomo *et al.*, 2006; Maggs *et al.*, 2008). El aislamiento en los refugios glaciares, durante las máximas glaciares, redujo los rangos geográficos de las poblaciones, resultando en una característica genética distintiva: alta diversidad genética en los refugios y gran diferenciación entre poblaciones de distintos refugios (Hewitt, 1996; 2004; Comès y Kadereit, 1998). La posterior dispersión asimétrica desde los refugios habría provocado cuellos de botella genéticos y las áreas recientemente libres de hielo, al ser recolonizadas tendrían menor diversidad genética (unos pocos genotipos serían dominantes y habría una alta frecuencia de alelos idénticos por descendencia, provenientes de las poblaciones fundadoras (Hewitt, 1996; 1999; 2004; Ibrahim *et al.*, 1996; Bernatchez y Wilson, 1998).

A pesar que este es un buen punto de partida para hipotetizar sobre los patrones de estructura genética y dispersión en altas latitudes, puede resultar una sobre simplificación. Por ejemplo: en las regiones situadas más al norte del límite de la máxima expansión glaciaria, pero que no fueron afectadas por las glaciaciones, si las poblaciones hubieran mantenido un tamaño efectivo



pequeño, habrían sufrido cuellos de botella por el aislamiento genético con otras poblaciones, y la baja diversidad genética actual imitaría al efecto fundador de una zona recién colonizada. Así también, una zona de contacto secundario, podría mostrar un aumento en la diversidad ya que colonizadores desde distintos refugios llegan al mismo lugar, siendo difícil de diferenciarla de un refugio original (Brochmann *et al.*, 2003; Maggs *et al.*, 2008). Por ejemplo, existen especies con mucha vagilidad que tienen patrones de estructura genética contrapuestos: la anguila europea (*Anguilla anguilla*) tiene una estructura panmíctica (Dannewitz *et al.*, 2005) y el bivalvo *Arctica islandica* muestra una estructura genética y una clina latitudinal inversa en la diversidad genética, siendo ésta máxima en Islandia y decreciendo hacia el sur por ambas costas del Atlántico Norte (Dahlgren *et al.*, 2000). Por lo tanto, la distribución actual y la estructura genética no se deberían solamente a los eventos históricos, ya que estarían actuando procesos contemporáneos inducidos por la adaptación local y características de la historia de vida de cada especie (requerimientos de salinidad, modos de dispersión, época del año) creando barreras o corredores para el flujo génico (Olsen *et al.*, 2010).

En este capítulo se propone estudiar la estructura genética poblacional y los patrones de dispersión de tres especies de ascidias del Océano Ártico, con diferentes características en su ciclo reproductivo y diferente tiempo de vida de su fase dispersiva (gametas y larvas). Se estudiaron las especies: *Styela rustica* y *Halocynthia pyriformis* (solitarias, ovulíparas) y *Boltenia echinata* (solitaria, ovovivípara).

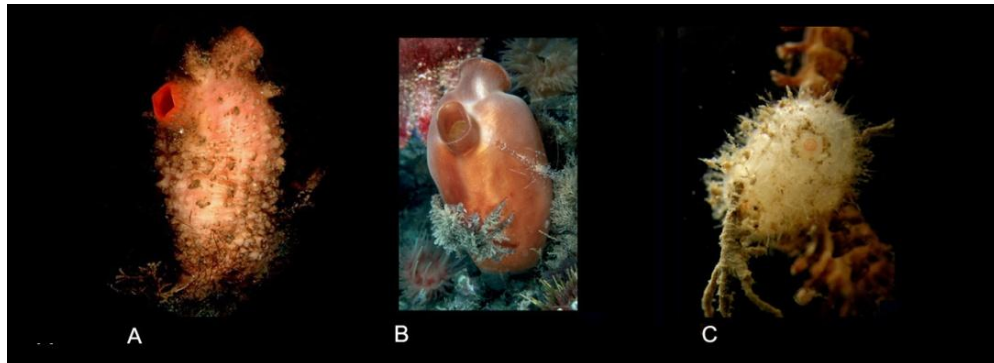
### **ESPECIES MODELO DE ESTUDIO**

***Styela rustica*** (Linnaeus, 1767): (FIGURA II.1-A) Pertenece al Orden Stolidobranchia, Familia Styelidae. Posee una túnica color marrón oscuro, y un cuerpo redondeado en forma de papa, su talla máxima alcanza los 10 cm. Es una especie abundante en el norte de la Península de Alaska, en el Mar de Bering y en el Mar de Chukchi. Es más abundante desde el sublitoral hasta los 100 metros de profundidad. Es una especie solitaria, con fecundación externa, libera las gametas a la columna de agua, y una vez ocurrida la fecundación, las larvas nadan hasta que ocurre su metamorfosis y fijación al sustrato. El desove ocurre durante una o dos semanas en septiembre, a comienzos del otoño boreal (Khalaman, 2001; Khalaman *et al.*, 2008; Yakovis *et al.*, 2008).

***Halocynthia pyriformis*** (Rathke, 1806): (FIGURA II.1-B) Es una especie del Orden Stolidobranchia, Familia Pyuridae, abundante desde las costas del norte de EE.UU. hasta el Océano Ártico, y en las costas de Europa en el norte de Noruega y Mar de Barents. Se la encuentra en profundidades de hasta 200 m. Tiene un color anaranjado y una túnica áspera, de allí el nombre vulgar de



**FIGURA II.1:**  
 Ascidas  
 muestreadas en  
 Kongsfjord, A)  
*Styela rustica*, B)  
*Halocynthia*  
*pyriformis*, C)  
*Boltenia echinata*.  
 © Susanna  
 Strömberg y Erling  
 Svensen.

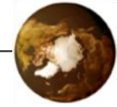


“durazno de mar”. Alcanza una talla máxima de 13 cm de alto y un diámetro de 8 cm. Es una especie solitaria, y presenta fecundación externa, liberando las gametas durante el verano boreal (Armsworthy *et al.*, 2001; Mercier y Hamel, 2010).

***Boltenia echinata*** (Linnaeus, 1767): (FIGURA II.1-C) Especie del Orden Stolidobranchia, Familia Pyuridae. Ampliamente distribuida en las regiones árticas, en las costas del Pacífico Norte, común en el Mar de Bering. Se la encuentra generalmente en sitios lodosos y protegidos. Es una ascidia solitaria, de forma esférica y cubierta de ramificaciones de la túnica en forma de pelos, rasgo característico de esta especie. De color marrón, usualmente cubierta de sedimentos que quedan atrapados en los pelos. Los sifones son cortos y remarcados de color rojo, de 10 mm de diámetro. Esta especie se reproduce durante todo el año en la costa este del Atlántico Norte (probablemente favorecido por las aguas cálidas de la Corriente del Golfo) y durante el invierno en la costa oeste. Se observó un mayor éxito en el asentamiento de las larvas durante noviembre y diciembre, en el invierno boreal (Svane y Lundälv, 1982). Es una excepción a las especies solitarias ya que es ovovivípara: retiene los huevos fecundados en la cavidad del atrio hasta que las larvas están listas para eclosionar, lo que hace considerablemente más corta su fase de vida planctónica (Svane, 1983; Young, 1989).

## 2. HIPÓTESIS

Las especies de ascidias árticas tienen ninguna ó muy baja estructuración genética de sus poblaciones y bajos niveles de diversidad genética. A su vez, las especies con fecundación externa están menos estructuradas genéticamente en sus poblaciones, que las especies con fecundación interna e incubación de las larvas.



### *Predicciones*

Cabría esperar que en las plataformas del Océano Ártico, por tratarse de un sistema relativamente joven y encontrarse en las etapas tempranas de colonización de su fauna bentónica, exista una baja estructuración genética en las poblaciones de ascidias y niveles bajos de diversidad genética en sus poblaciones, debido a un efecto fundador. A pesar que las ascidias tienen un bajo potencial de dispersión debido al tiempo de vida muy corto de sus larvas, podrían actuar como especies oportunistas o "r" estrategias, si tuvieran una alta tasa reproductiva, alta tasa de reclutamiento y una alta plasticidad en los requerimientos de hábitat.

El tiempo de vida de la larva, al ser más corto en las especies ovovivíparas o incubadoras que en las ovulíparas, sería un rasgo de la historia de vida importante en determinar el potencial de dispersión, por lo tanto se esperaría encontrar mayores niveles de estructuración genética en las especies ovovivíparas que en las especies ovulíparas.

### **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar la estructura genética poblacional en tres especies de ascidias árticas: *Styela rustica*, *Boltenia echinata* y *Halocynthia pyriformis*, utilizando PCR-ISSRs como marcadores moleculares.
- Determinar los niveles de diversidad genética en las subpoblaciones de dichas especies.
- Inferir las posibles relaciones de la diversidad genética con factores ambientales y oceanográficos de cada sitio.
- Comparar la estructura genética poblacional de especies que difieren en sus modos de reproducción (fecundación interna versus reproducción externa) y posiblemente en sus capacidades de dispersión.

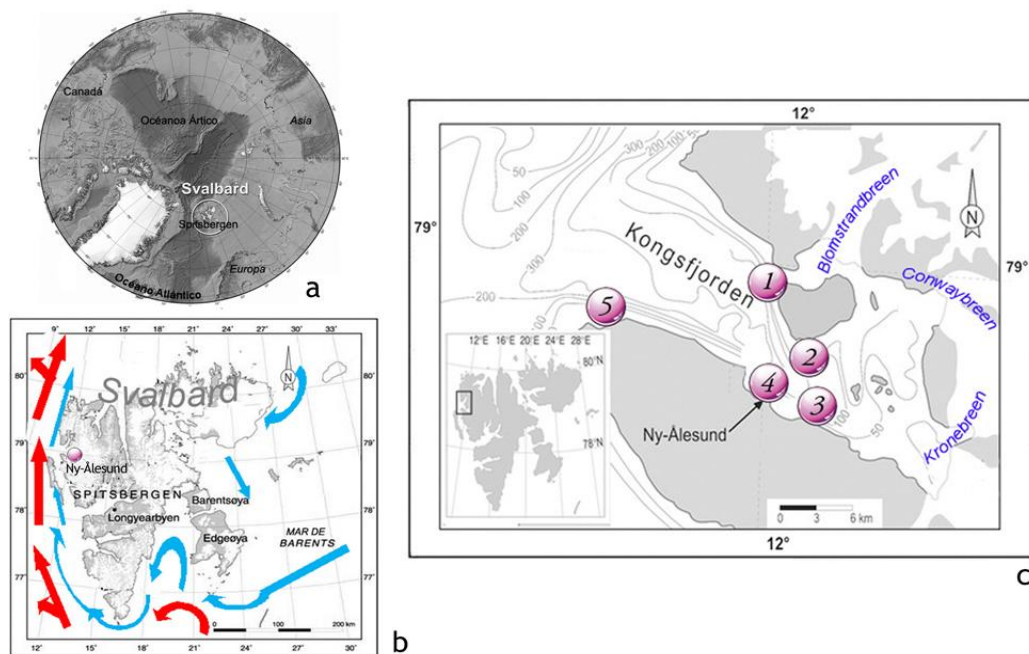
### **4. MATERIALES y MÉTODOS**

#### **4.1 – ÁREA de ESTUDIO**

El fiordo ártico de Kongsfjord se encuentra en Spitsbergen, una isla del archipiélago de Svalbard, perteneciente a Noruega, situado entre los 78° 40' y los 77° 30' N y los 11° 3' y los 13° 6' E (FIGURA II.2.a y b). El fiordo tiene 20 km de largo y entre 4 y 10 km de ancho, cubre un área de 209 km<sup>2</sup> y presenta una orientación Sudeste-Noroeste. Consiste en dos canales submarinos los cuales

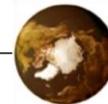


convergen en una cuenca glaciar de 350 metros de profundidad en la parte central. Está rodeado por varios glaciares que descargan dentro del fiordo, y tres de ellos (Kronebreen, Conwaybreen y Blomstrandbreen) han tenido una gran retracción desde comienzos de 1900, siendo Blomstrandbreen el más activo (Svendsen *et al.*, 2002). Debido a que es un fiordo abierto, recibe influencias de la corriente del Atlántico Norte, que lleva agua relativamente cálida y salada a través de la Corriente Oeste de Spitsbergen; esto hace que Kongsfjord tenga características de un fiordo sub-ártico más que ártico, como cabría esperar en esas latitudes. Kongsfjord representa un área borde entre las zonas biogeográficas Atlántica y Ártica, el contacto con aguas atlánticas en la boca del fiordo hace que la composición de especies tenga afinidad atlántica, mientras que la cercanía a los glaciares de la parte interna tiende a hacerlo más ártico.



**FIGURA II.2:** Sitios de muestreo en Kongsfjord, Svalbard, Océano Ártico, indicando los puntos de muestreo y las corrientes Oeste de Spitsbergen relativamente cálida (en rojo) y las aguas árticas más frías (en azul). Se indican en letras azules los principales glaciares que aportan agua de deshielos al fiordo. Tomado de Svendsen *et al.*, 2002. Estaciones muestreadas: 1) Hansneset, 2) London, 3) Prins Heinrichøya, 4) Puerto, en Ny-Ålesund, 5) Kongsfjordneset.





#### 4.2 – OBTENCIÓN de las MUESTRAS

Se muestrearon poblaciones de *Styela rustica*, *Halocynthia pyriformis* y *Boltenia echinata* mediante buceo SCUBA durante la campaña de verano 2001 y 2004 en la estación científica Koldewey (Tabla II.1). Se recolectaron entre 3 y 5 poblaciones por cada especie, con 8-25 individuos por población. Los sitios o estaciones de muestreo fueron: (1) Hansneset (HN: 78°59'01"N 11°59'79"E 15m de profundidad), (2) London (Lo: 78°57'33,35"N 12°03'16"E 25m de profundidad), (3) Prins Heinrichøya (PH: 78°55'12"N 12°05'13"E 25m de profundidad), (4) Puerto, en Ny-Ålesund (Pu: 78°55'56"N 11°55'57"E 8m de profundidad), y (5) Kongsfjordneset (KN: 70°00'10"N 11°28'01"E 25m de profundidad) (FIGURA II.2-c).

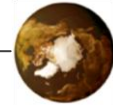
**TABLA II.1:** Especies muestreadas en Kongsfjord, Svalbard. Se indica el modo reproductivo y el número de individuos de cada especie muestreado en cada sitio.

| Especies   | Estaciones | Nº individuos | Total individuos |
|--|------------|---------------|------------------|
| <b><i>Styela rustica</i></b><br>Solitaria-ovulípara<br>Fecundación externa         | HN         | 10            | 80               |
|  | Lo         | 19            |                  |
|  | PH         | 24            |                  |
|  | Pu         | 16            |                  |
|  | KN         | 11            |                  |
| <b><i>Halocynthia pyriformis</i></b><br>Solitaria-ovulípara<br>Fecundación externa | HN         | 14            | 30               |
|  | PH         | 7             |                  |
|  | KN         | 9             |                  |
| <b><i>Boltenia echinata</i></b><br>Solitaria-ovovivípara<br>Fecundación interna    | PH         | 20            | 49               |
|  | Pu         | 18            |                  |
|  | KN         | 11            |                  |

#### 4.3 – TÉCNICAS MOLECULARES

Se tomaron muestras de tejido del manto (músculo) para la extracción de ADN. La extracción y purificación de ADN se realizó con la técnica de extracción salina de Bruford *et al.* (1992). En todos los casos se obtuvo ADN de muy buena calidad: de alto peso molecular y en gran cantidad (entre 70-1500 ng/μl). El ADN fue resuspendido en agua bidestilada estéril y congelado a -20°C. Se probaron en total 19 *primers* anclados de ISSRs en las tres especies árticas





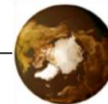
(Tabla II.2), y se seleccionaron aquellos que mostraron patrones de amplificación claros y alto polimorfismo. La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: Buffer 1X, 2,5mM de  $MgCl_2$ , 200 $\mu$ M dNTP, 100 pmoles de *primer*, 1U de TaqDNA polimerasa (Invitrogen®), 10 ng de ADN genómico y agua bidestilada hasta completar un volumen final de 10  $\mu$ l. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1,5% P/V en buffer TBE 0,5x con 0,005  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio) a un voltaje constante de 120V durante 3 horas. Los patrones se visualizaron en un transiluminador UV y se fotografiaron con cámara digital para su posterior análisis.

**TABLA II.2:** Listado de los *primers* utilizados para la amplificación con ISSRs en las tres especies de ascidias árticas. Las pruebas están marcadas con “x” y los *primers* que se seleccionaron por su repetitividad y patrones claros están marcados con “√”.

| <i>Primers</i> (5'-3')                     | <i>Styela rustica</i> | <i>Halocynthia pyriformis</i> | <i>Boltenia echinata</i> |
|--|-----------------------|-------------------------------|--------------------------|
| (AC) <sub>10</sub> AG                      | x                     | -                             | x                        |
| (AC) <sub>10</sub> AA                      | x √                   | x √                           | x√                       |
| (GT) <sub>8</sub> G                        | x                     | -                             | x                        |
| (GT) <sub>10</sub> GC                      | x                     | -                             | x                        |
| (GT) <sub>8</sub> YG                       | -                     | -                             | x                        |
| (GA) <sub>7</sub> CA                       | -                     | -                             | x                        |
| (GACA) <sub>4</sub>                        | x                     | x √                           | x                        |
| (TG) <sub>10</sub> CG                      | x                     | -                             | x                        |
| (AC) <sub>8</sub> C                        | x √                   | x                             | x√                       |
| (AG) <sub>8</sub> Y                        | x √                   | x                             | x                        |
| (CA) <sub>8</sub> RT                       | x                     | x √                           | x                        |
| (CTT) <sub>5</sub> TT                      | -                     | x                             | x                        |
| (GTG) <sub>3</sub> GC                      | -                     | -                             | x                        |
| (CCA) <sub>5</sub>                         | -                     | -                             | x                        |
| (CCA) <sub>5</sub>                         | -                     | -                             | x                        |
| <b>Combinaciones:</b>                      |                       |                               |                          |
| (GACA) <sub>4</sub> -(AC) <sub>10</sub> AA | -                     | -                             | x                        |
| (GACA) <sub>4</sub> -(AC) <sub>8</sub> G   | -                     | -                             | x                        |
| (GACA) <sub>4</sub> -(AG) <sub>8</sub> Y   | -                     | -                             | x√                       |

#### 4.4 - ANÁLISIS de DATOS

Cada banda de ISSR obtenida en el gel corresponde a una secuencia de ADN delimitada por dos microsatélites invertidos. Los ISSR son marcadores dialélicos dominantes, que se heredan de forma Mendeliana simple. Los dos posibles fenotipos que se pueden obtener son: presencia de una banda (homocigota para



el alelo dominante o el heterocigota) o ausencia de una banda (homocigota para el alelo recesivo).

En base al número y frecuencia de las bandas de ISSR, se estimó la diversidad genética dentro de cada población utilizando el índice de Diversidad del Marcador (M). Este estadístico es análogo a la diversidad genética (heterocigocis, de Nei, 1978), y es la probabilidad de tomar al azar dos bandas en un locus, promediada por todos los loci (Ceplitis, 2001; Kapralov *et al.*, 2006).

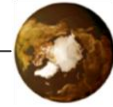
El índice M se calculó según la fórmula:

$$M = \frac{\sum \left( 1 - \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y} \right)}{B}$$

donde  $n_{xy}$  es el número de fragmentos compartidos por dos individuos x e y,  $n_x$  y  $n_y$  es el número de bandas en el individuo x e y respectivamente. Luego se promediaron todos los valores por el total de pares de individuos dentro de cada población (B). Para determinar si existen diferencias significativas en los niveles de diversidad genética entre las poblaciones, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y un test *a posteriori*, mediante el procedimiento de comparaciones múltiples Student-Newman-Keuls (SNK), con el programa Statistica 7 (StatSoft Inc.).

Se realizaron análisis de correlación entre diversidad genética (M) con las siguientes variables ambientales: distancia de las poblaciones a los tres glaciares más importantes del fiordo y profundidad de muestreo de cada población. También se hicieron correlaciones con datos tomados de Kendra *et al.* (2010) y de Svendsen *et al.* (2002): porcentaje de carbono orgánico particulado en los sedimentos superficiales (POC) en dos años distintos 1998 y 2006 (es decir alimento que llega al bentos) y tasa de sedimentación de materiales inorgánicos ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{año}^{-1}$ ).

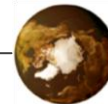
La diferenciación y estructura genética de las poblaciones se estimó utilizando la técnica de análisis de varianza molecular (AMOVA por sus siglas en inglés), la cual no requiere transformar los datos de presencia-ausencia de bandas a frecuencias alélicas (para ello sería necesario conocer si las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg, dato no disponible para las especies a estudiar). Este método calcula un índice de fijación ( $\Phi_{ST}$ ) y el porcentaje de la variabilidad genética total que se puede atribuir a diferencias dentro de poblaciones o entre poblaciones. Para los cálculos se utilizó el programa Arlequin 3.11 (Excoffier y



Schneider, 2005) y los valores de probabilidad asociados se calcularon usando 100.000 permutaciones.

Se emplearon tres métodos espacialmente explícitos para identificar la estructura genética espacial y visualizar las barreras al flujo génico. Estos métodos forman parte de un abordaje que reúne a la genética molecular poblacional y a la ecología del paisaje, para facilitar la comprensión acerca de cómo las interacciones entre variables geográficas y ambientales estructuran la variación genética, en niveles tanto poblacionales como individuales. Este abordaje se denomina **genética del paisaje**, e incorpora datos de las características del paisaje (como distancia geográfica, profundidad, circulación de las corrientes, salinidad etc.) a las técnicas de genética molecular (Manel *et al.*, 2003). Idealmente, en un enfoque como este, el individuo es la unidad operacional de estudio, sin embargo esto es extensivo a las poblaciones también. La ventaja de utilizar a los individuos como unidades operacionales radica en que se evitan potenciales sesgos al identificar poblaciones *a priori*, y se puede llevar un estudio a menor escala. Para que un método sea geográficamente explícito, debe incluir la información espacial como un componente más del ajuste del modelo, en lugar del empleo *a posteriori* de los datos geográficos con fines meramente gráficos o para realizar autocorrelaciones espaciales (Jombart *et al.*, 2008).

En primer lugar se empleó el programa AIS (*Alleles In Space*) (Miller, 2005), el cual construye “mapas de paisaje” o “paisajes genéticos” para visualizar los patrones de diversidad en un espacio geográfico. El programa construye una red de conectividad en el área muestreada, calculando valores de distancia genética entre dos puntos muestreados en cada coordenada geográfica. Luego, mediante un procedimiento de interpolación simple (*Inverse Distance Weighted*, Watson y Philips, 1985; Watson, 1992), infiere distancias genéticas en puntos distribuidos uniformemente en una grilla espacial superpuesta al paisaje muestreado. El resultado es un gráfico tridimensional, en donde los ejes x e y corresponden a la localización geográfica de los individuos, y el eje z representa distancias genéticas. La figura obtenida es una representación gráfica de los patrones de diversidad a lo largo del área muestreada, que presenta picos positivos en zonas de grandes discontinuidades genéticas, y picos negativos en zonas donde la divergencia genética es inusualmente baja. De esta forma, permite identificar gráficamente discontinuidades genéticas y posibles barreras al flujo génico. Se utilizó la distancia genética de Nei entre pares de individuos (Nei *et al.*, 1983) para generar la matriz genética, e información geográfica proyectada en UTM (*Universal Transverse Mercator*), con los siguientes parámetros:  $a=1$  (peso de la distancia; los valores interpolados están más influenciados por los valores de distancia genética más cercanos en la grilla) y grilla de 50x50.



La segunda aproximación para analizar la estructura genética se realizó utilizando un análisis de agrupamiento bayesiano con el programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003), que presenta una adaptación para marcadores dominantes. Este análisis de asignación utiliza una aproximación de máxima verosimilitud para determinar el número más probable de grupos genéticos discretos en la muestra ( $K$ ), y cuáles individuos tienen más probabilidad de pertenecer a cada grupo. El algoritmo de Pritchard *et al.* (2000) utiliza estadística Bayesiana para hacer una estimación del espacio donde el valor de los parámetros maximiza la probabilidad *a posteriori* de obtener los datos observados para un determinado valor de  $K$  [ $\Pr(X|K)$ ]. Para las estimaciones de probabilidad de ajuste de los datos realiza iteraciones con el Método de Montecarlo de Cadenas de Markov (MCMC) y proporciona el logaritmo de dicha probabilidad:  $\ln P(D)$ . La probabilidad de cada individuo de pertenecer a un grupo se estima como  $q$ , que varía entre 0 y 1, significando  $q = 1$  una asignación completa al grupo de este individuo. Se hicieron 5 corridas independientes para  $K = 1$  a 5 (según las  $n$  poblaciones definidas *a priori* para cada especie), asumiendo mezcla de individuos (*admixture*) y estableciendo el modelo de frecuencias de los alelos correlacionados (*correlated allele frequencies model*). Se realizó una fase de calentamiento (burn-in) de 500.000 iteraciones, y se realizaron 1.500.000 iteraciones adicionales para la toma de datos. El número más probable de grupos genéticos ( $K$ ) se evaluó utilizando la aproximación del valor máximo promedio de las cinco corridas de  $\ln P(D)$ . Además, el *set* de datos se analizó utilizando el modelo LOCPRIOR, que incorpora como información previa la localidad de procedencia de cada muestra (Hubisz *et al.*, 2009). Los coeficientes de pertenencia individual a grupos obtenidos en las corridas de MCMC fueron combinados con el programa CLUMPP 1.1 (Jakobsson y Rosenberg, 2007) y representados gráficamente utilizando DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

Debido a que los métodos bayesianos se basan en MCMC y por lo tanto los resultados no son soluciones reales sino sólo aproximaciones sin precisión, se implementó una tercera aproximación a la genética del paisaje: un Análisis Espacial de Componentes Principales (sPCA) que toma en cuenta no sólo la variancia entre las unidades de estudio (poblaciones o individuos) sino también su autocorrelación espacial. Es una modificación del PCA tradicional, que intenta encontrar las variables sintéticas que expliquen la mayor proporción de la variabilidad entre los individuos (o poblaciones) y su autocorrelación. El principal resultado de este análisis es un mapa que permite una valoración visual de la estructura genética espacial. Este método permite realizar dos test para probar la significancia estadística de dos tipos de patrones, que se pueden definir como estructuras globales y locales. Aunque ambos patrones revelan una cierta cantidad de variabilidad genética, las estructuras globales muestran autocorrelación espacial positiva, mientras que las estructuras locales reflejan autocorrelaciones negativas. En otras palabras, las estructuras globales pueden diferenciar dos grupos espaciales o reconocer una clina, o parches



poblacionales. Las estructuras locales pueden aparecer cuando individuos del mismo *pool* génico presentan “repulsión” con otros del mismo *pool*, y tienen más atracción por individuos de otro *pool*. Al nivel poblacional, las estructuras globales o locales pueden representar adaptaciones a variables ambientales que están espacialmente estructuradas. Un análisis de sPCA utiliza para la detección de la estructura genética el índice de Moran I (Moran, 1948; 1950), que se basa en la comparación del valor de una variable cuantitativa observada en un sitio (por ejemplo frecuencias alélicas) con los valores observados en sitios vecinos. Los sitios vecinos se establecen construyendo una red de conectividad que luego se traduce en una matriz binaria de conectividad  $M$ , donde los valores son 1 si las dos entidades consideradas están conectadas y cero si no lo están. El análisis se realizó con el programa Adegenet 1.2-3 (Jombart, 2008) del paquete estadístico R.

Para probar la hipótesis de aislamiento por distancia se realizó un análisis de correlación (Test de Mantel), tomando como distancia geográfica entre pares de poblaciones a la distancia lineal y a la menor distancia acuática a través de las corrientes marinas prevalentes, y el índice de similitud de Nei y Li (1985) entre pares de individuos se utilizó como medida de distancia genética (1-similitud). El valor de  $P$  fue calculado utilizando la distribución de las correlaciones de las matrices  $A$  (matriz de distancias genéticas) y  $B$  (matriz de distancias geográficas),  $r(AB)$ , estimada a partir de 10.000 permutaciones. Se utilizó el complemento de Microsoft Excel XLSTAT 2012.1.01 (Addinsoft).

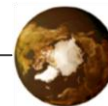
## 5. RESULTADOS

### 5.1 - PATRONES DE AMPLIFICACIÓN DE ISSR-PCR

Se seleccionaron 3 *primers* para la especie *Styela rustica*, que amplificaron un total de 42 bandas, de las cuales 38 fueron polimórficas y ninguna fue exclusiva de alguna población (TABLA II.3) (FIGURA II.3).

En la especie *Halocynthia pyriformis* se realizó un gran esfuerzo de muestreo, ya que se probaron 15 *primers* y sólo 3 generaron patrones nítidos. Estos amplificaron un total de 42 bandas de las cuales un 30% fueron monomórficas.

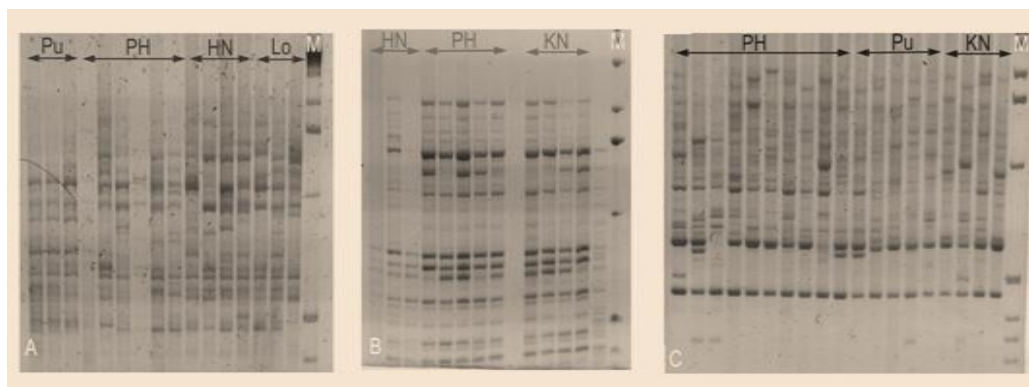
En la especie *Boltenia echinata* los 3 *primers* seleccionados amplificaron un total de 37 bandas, 4 de ellas monomórficas (TABLA II.3) (FIGURA II.3).



**TABLA II.3:** Secuencias de los *primers* utilizados en las reacciones de PCR-ISSR y temperaturas de hibridación que arrojaron los mejores patrones de bandas, en las tres especies de ascidias árticas.

| Especies                      | Primers (5'-3')       | T° hibridación | Nº de bandas polimórficas | Nº de bandas monomórficas | Total bandas amplificadas |
|-------------------------------|-----------------------|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Styela rustica</i>         | (AC) <sub>10</sub> AA | 49 °C          | 16                        | 2                         | <b>42</b>                 |
|                               | (AC) <sub>8</sub> C   | 48 °C          | 13                        | 2                         |                           |
|                               | (AG) <sub>8</sub> Y   | 50 °C          | 9                         | -                         |                           |
|                               | Total <b>38</b>       |                | Total <b>4</b>            |                           |                           |
| <i>Halocynthia pyriformis</i> | (AC) <sub>8</sub> C   | 48 °C          | 13                        | 1                         | <b>42</b>                 |
|                               | (AC) <sub>10</sub> AA | 48 °C          | 8                         | 7                         |                           |
|                               | (GACA) <sub>4</sub>   | 49 °C          | 12                        | 2                         |                           |
|                               | Total <b>32</b>       |                | Total <b>10</b>           |                           |                           |
| <i>Boltenia echinata</i>      | (CA) <sub>8</sub> RT  | 48 °C          | 11                        | 1                         | <b>37</b>                 |
|                               | (GACA) <sub>4</sub>   | 49 °C          | 16                        | -                         |                           |
|                               | (AC) <sub>10</sub> AA | 49 °C          | 6                         | 3                         |                           |
|                               | Total <b>33</b>       |                | Total <b>4</b>            |                           |                           |

**FIGURA II.3:** Patrones de amplificación de A) *Styela rustica*, B) *Halocynthia pyriformis* y C) *Boltenia echinata*, con los primers de ISSR (AC)<sub>10</sub>AA, (AC)<sub>8</sub>C y (AC)<sub>10</sub>AA.

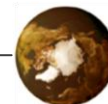


### 5.2- VARIABILIDAD GENÉTICA

#### *Styela rustica*

La diversidad genética obtenida en las poblaciones de *Styela rustica*, utilizando el índice de diversidad del marcador (M) varió entre 0,28 y 0,32. La población





HN ubicada muy próxima al glaciar Bloomstrandbreen mostró el menor valor del índice M. La máxima diversidad fue obtenida para la población Pu, que fue muestreada en la pared del puerto de Ny-Ålesund, mientras el resto de las poblaciones (PH, Lo y KN) mostraron niveles intermedios de diversidad genética.

Según el ANOVA y el test *a posteriori* Student-Newman-Keuls (SNK) las diferencias significativas se encontraron entre los grupos A): Pu; B): Lo, PH, KH y C): HN (TABLA II.4).

| Población | M     | Grupos SNK |
|-----------|-------|------------|
| Pu        | 0,32  | A          |
| Lo        | 0,309 | B          |
| PH        | 0,307 | B          |
| KN        | 0,304 | B          |
| HN        | 0,28  | C          |

**TABLA II.4:** Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las cinco poblaciones de *Styela rustica*. Las letras A, B y C indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el ANOVA ( $P < 0,05$ ) según el test *a posteriori* SNK.

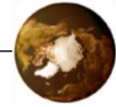
#### *Halocynthia pyriformis*

La diversidad genética en cada población de *Halocynthia pyriformis*, obtenida utilizando el índice de diversidad del marcador (M) varió entre 0,19 y 0,22. La población HN ubicada muy próxima al glaciar Bloomstrandbreen, nuevamente en esta especie mostró el menor valor del índice M. La máxima diversidad fue obtenida para la población KN ubicada en la boca del fiordo, sin embargo el test de ANOVA no reconoció diferencias significativas (TABLA II.5).

| Población | M    | Grupos SNK |
|-----------|------|------------|
| KN        | 0,22 | A          |
| PH        | 0,21 | A          |
| HN        | 0,19 | A          |

**TABLA II.5:** Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las tres poblaciones de *Halocynthia pyriformis*. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de M según el ANOVA ( $P = 0,144$ ).





*Boltenia echinata*

Los valores de diversidad genética en las poblaciones de *B. echinata*, variaron entre 0,26 y 0,34, siendo la población KN la que mostró los niveles más altos de diversidad M. Pu y PH no mostraron diferencias significativas en sus valores y pertenecen al mismo grupo según el test SNK (TABLA II.6).

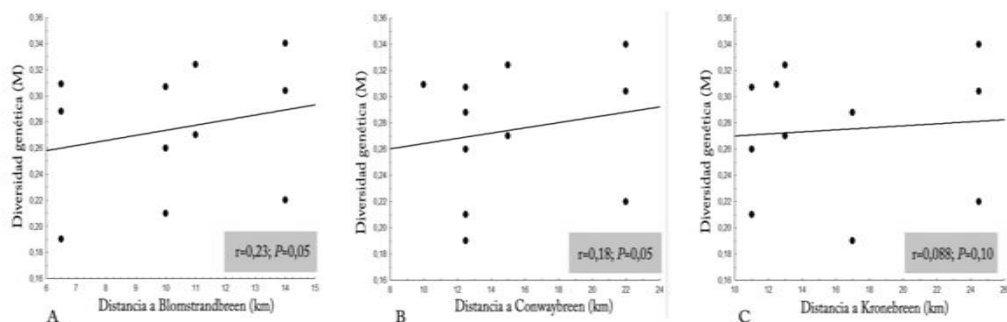
| Población | M    | Grupos SNK |
|-----------|------|------------|
| KN        | 0,34 | A          |
| Pu        | 0,27 | B          |
| PH        | 0,26 | B          |

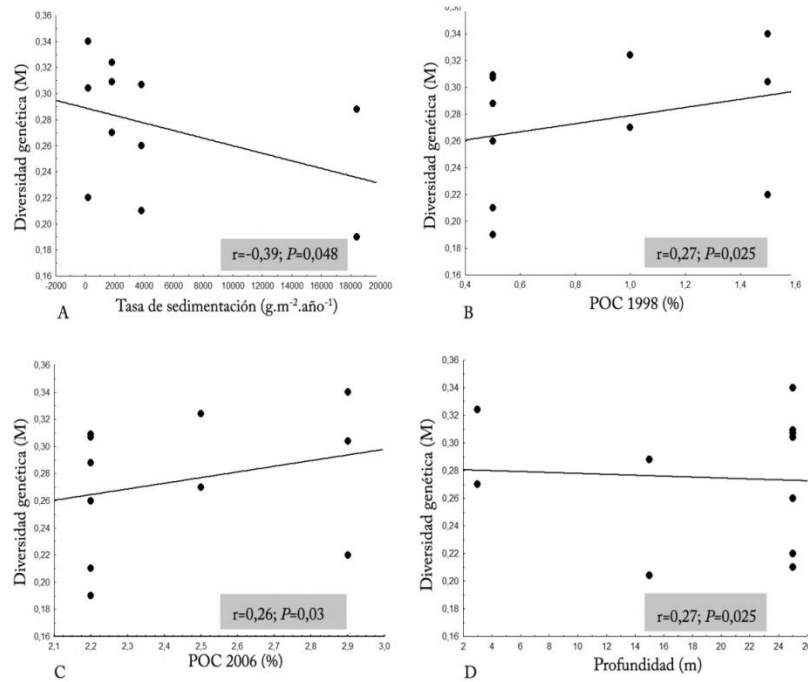
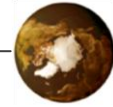
TABLA II.6: Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las tres poblaciones de *B. echinata*. Las letras A y B indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el ANOVA ( $P < 0,05$ ) según el test *a posteriori* SNK.

5.3- CORRELACIONES entre DIVERSIDAD GENÉTICA y VARIABLES AMBIENTALES

Se encontró una correlación negativa significativa entre la diversidad genética M y la tasa de sedimentación ( $r = -0,39$ ;  $P = 0,048$ ). Con la variable distancia a los glaciares la correlación fue positiva aunque no significativa en todos los casos, (Bloomstrandbreen  $r = 0,23$ ,  $P = 0,050$ ; Conwaybreen  $r = -0,18$ ,  $P = 0,050$  y Kronebreen  $r = -0,088$ ,  $P = 0,10$ ). Con la variable profundidad no hubo correlación y con la cantidad de carbono orgánico particulado (POC) fue positiva y significativa en los dos años (2006:  $r = -0,26$ ,  $P = 0,030$  y 1998:  $r = -0,27$ ,  $P = 0,025$ ) (FIGURA II.4-II.5).

FIGURA II.4:  
Correlación entre M y distancia a los glaciares A) Bloomstrandbreen, B) Conwaybreen y C) Kronebreen, de Kongsfjord.





**FIGURA II.5:**  
 Correlación entre diversidad genética M y  
 A) tasa de sedimentación de materiales inorgánicos ( $\text{g.m}^{-2}.\text{año}^{-1}$ ),  
 B) % de carbono orgánico particulado (POC) del año 1998, C) del año 2006 y D) profundidad (m).

#### 5.4- ESTRUCTURA POBLACIONAL: AMOVA

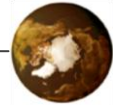
##### *Styela rustica*

El análisis de AMOVA de la especie *Styela rustica* mostró que un 1,08% de la variación total era debida a diferencias entre poblaciones, la mayor parte de la variabilidad se encontró dentro de las poblaciones (98,92%) (TABLA II.7). Las poblaciones de esta especie no presentaron diferenciación genética significativa ( $\Phi_{ST}=0,011$ ;  $P>0,05$ ). Sin embargo, cuando se realizó un análisis de AMOVA entre pares de poblaciones se obtuvo un valor estadísticamente significativo entre el par HN y PH,  $\Phi_{ST}=0,034$  ( $P<0,05$ ). Las diferencias entre los otros pares de poblaciones no fueron significativas (TABLA II.8).

**TABLA II.7:** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 5 poblaciones de *Styela rustica*.

| Fuente de variación       | SC      | g.l. | Componentes de variación | % de variación | $\Phi_{ST}$  | P               |
|---------------------------|---------|------|--------------------------|----------------|--------------|-----------------|
| <b>Entre poblaciones</b>  | 30,308  | 4    | 0,0016                   | 1,08           |              |                 |
| <b>Dentro poblaciones</b> | 491,273 | 76   | 0,1492                   | 98,92          | <b>0,011</b> | <b>&gt;0,05</b> |
| <b>Total</b>              | 521,580 | 80   | 0,1508                   | 100            |              |                 |

\* $P<0,05$  \*\* $P<0,01$  \*\*\* $P<0,001$



**TABLA II.8:**  $\Phi_{ST}$  entre pares de poblaciones de *Styela rustica*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de  $P$  por encima de la diagonal.

| Poblaciones | PH            | Lo    | Pu    | HN    | KN    |
|-------------|---------------|-------|-------|-------|-------|
| PH          | -             | 0,248 | 0,258 | 0,018 | 0,434 |
| Lo          | 0,007         | -     | 0,339 | 0,498 | 0,112 |
| Pu          | 0,007         | 0,008 | -     | 0,304 | 0,22  |
| HN          | <b>0,034*</b> | 0,003 | 0,003 | -     | 0,35  |
| KN          | 0,002         | 0,014 | 0,015 | 0,019 | -     |

\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$

### *Halocynthia pyriformis*

La diferenciación genética en la especie *Halocynthia pyriformis* fue alta y estadísticamente significativa ( $\Phi_{ST} = 0,167$ ;  $P < 0,01$ ) (TABLA II.9). Los valores de  $\Phi_{ST}$  entre pares de poblaciones fueron un orden de magnitud mayores que los encontrados en la especie *Styela rustica*, aunque sólo el correspondiente al par KN-HN fue significativo (TABLA II.10).

**TABLA II.9:** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 3 poblaciones de *Halocynthia pyriformis*

| Fuente de variación | SC     | g.l. | Componentes de variación | % de variación | $\Phi_{ST}$    | $P$          |
|---------------------|--------|------|--------------------------|----------------|----------------|--------------|
| Entre poblaciones   | 11,251 | 2    | 0,38664                  | 16,71          |                |              |
| Dentro poblaciones  | 52,016 | 27   | 1,92651                  | 83,29          | <b>0,167**</b> | <b>0,002</b> |
| Total               | 63,267 | 29   | 2,31316                  | 100            |                |              |

\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$

**TABLA II.10:**  $\Phi_{ST}$  calculado entre pares de poblaciones de *Halocynthia pyriformis*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de  $P$  por encima de la diagonal.

| Poblaciones | HN             | PH    | KN    |
|-------------|----------------|-------|-------|
| HN          | -              | 0,067 | 0,002 |
| PH          | 0,115          | -     | 0,101 |
| KN          | <b>0,221**</b> | 0,120 | -     |

\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$



### *Boltenia echinata*

El análisis de AMOVA en la especie ovovivípara *B. echinata*, reveló una diferenciación genética baja y no significativa ( $\Phi_{ST} = 0,012$ ;  $P > 0,05$ ) (TABLA II.11). Los valores de  $\Phi_{ST}$  entre pares de poblaciones no fueron significativos, aunque el par PH-Pu fue un orden de magnitud más alto que los otros pares de poblaciones (TABLA II.12).

**TABLA II.11:** Resultados del análisis de la varianza molecular en las tres poblaciones de *Boltenia echinata*.

| Fuente de variación       | SC      | g.l. | Componentes de variación | % de variación | $\Phi_{ST}$  | <i>P</i>     |
|---------------------------|---------|------|--------------------------|----------------|--------------|--------------|
| <b>Entre poblaciones</b>  | 14,576  | 2    | 0,0765                   | 1,25           |              |              |
| <b>Dentro poblaciones</b> | 284,344 | 47   | 6,0498                   | 98,75          | <b>0,012</b> | <b>0,154</b> |
| <b>Total</b>              | 298,920 | 49   | 6,1263                   | 100            |              |              |

\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$

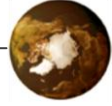
**TABLA II.12:**  $\Phi_{ST}$  calculado entre pares de poblaciones de *B. echinata*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de *P* por encima de la diagonal.

| Poblaciones | PH    | Pu    | KN    |
|-------------|-------|-------|-------|
| <b>PH</b>   | -     | 0,092 | 0,381 |
| <b>Pu</b>   | 0,018 | -     | 0,238 |
| <b>KN</b>   | 0,004 | 0,009 | -     |

\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$

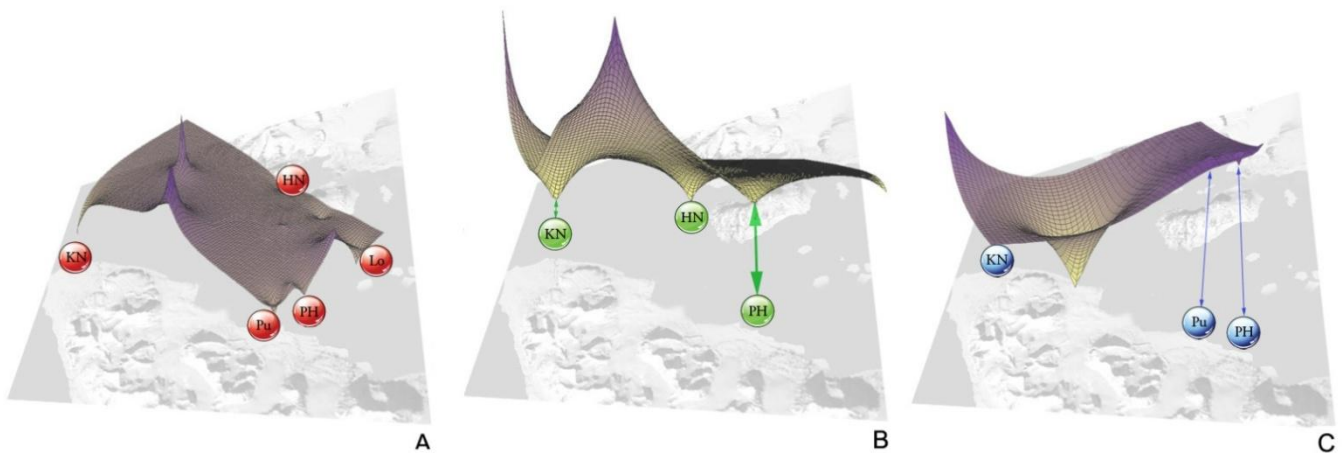
### 5.5- ESTRUCTURA POBLACIONAL: MÉTODOS ESPACIALMENTE EXPLÍCITOS. PAISAJES GENÉTICOS

Los mapas de paisaje genético generados a partir de la interpolación de los datos de ISSR con el programa *Alleles in Space* fueron diferentes para las tres especies. Para *Styela rustica* el análisis encontró máximas discontinuidades genéticas (posibles barreras al flujo génico graficadas como picos positivos o crestas) entre dos grandes regiones: la población KN de la boca del fiordo está separada del resto de las poblaciones del interior del fiordo (FIGURA II.6-A). A su vez otros picos menores están representando discontinuidades entre las poblaciones HN y PH. Esto es concordante con los valores de  $\Phi_{ST}$ , los cuales no mostraron diferencias significativas entre KN y el resto de las poblaciones, pero



fueron en su mayoría un orden de magnitud más altos que para el resto de los pares de poblaciones (TABLA II.8).

En la especie *Halocynthia pyriformis* (FIGURA 6-B), se encuentra un pico de máxima discontinuidad genética entre las poblaciones KN y HN, coincidente con el valor de  $\Phi_{ST}$  altamente significativo (TABLA II.10). En ambas especies los picos máximos están situados en el centro del fiordo, en donde las profundidades superan los 300m. En la especie *Boltenia echinata* el patrón es diferente, las tres poblaciones se encuentran en el mismo nivel en la grilla, y hay un pico negativo que indica continuidad genética entre todas las poblaciones (FIGURA II.6-C).



**FIGURA II.6:** Mapas del paisaje genético de las tres especies A) *Styela rustica*, B) *Halocynthia pyriformis* y C) *Boltenia echinata*, en donde los picos positivos representan diferenciación genética y los picos negativos similitudes genéticas. Interpolación construida con AIS, a partir de distancias genéticas y geográficas interindividuales.

### ANÁLISIS DE ASIGNACIÓN

La estructura genética se analizó utilizando el método de *clusters* bayesiano con el programa STRUCTURE. El número más probable de unidades genéticas (K) en la muestra resultó igual para las tres especies de ascidias árticas estudiadas, en todos los casos se obtuvo un valor máximo promedio del  $\ln P(D)$  en  $K=1$  (FIGURA II.7).

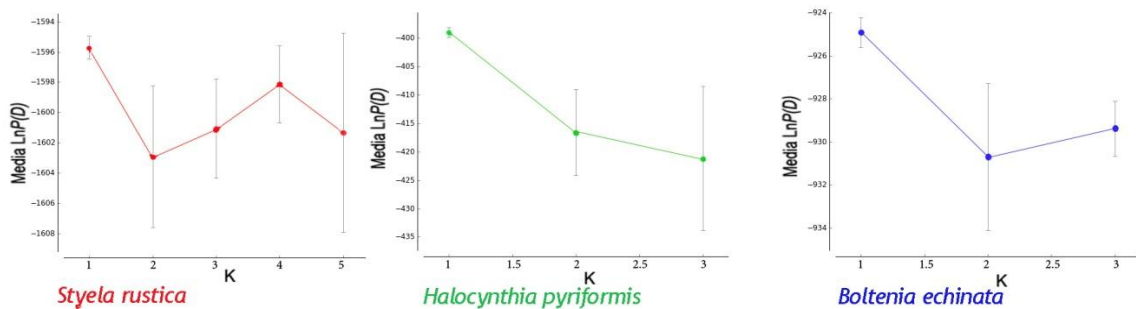


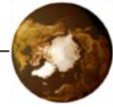
FIGURA II.7: Resultados del análisis del programa STRUCTURE. Se muestra la media  $\pm$  error estándar de  $\text{Ln } P(D)$ , para las tres especies de ascidias árticas, basado en 5 réplicas para cada valor de  $K$ , usando el modelo LOCPRIOR.

#### ANÁLISIS ESPACIAL DE COMPONENTES PRINCIPALES (sPCA)

El análisis de sPCA realizado con el programa Adegenet para la especie *Halocynthia pyriformis*, indicó una estructura global significativa ( $\max(t)=0,056$ ;  $P=0,013$ , concordante con el análisis de AMOVA). El modelo global se define como el patrón en el cual los individuos son más similares genéticamente a sus vecinos inmediatos que lo esperado en una distribución espacial al azar. Sólo el primer *eigenvalue* o autovector fue retenido debido a que explicaba la mayor proporción de la variabilidad (FIGURA II.8). Los *scores* o valores asignados a los individuos, generados en base al primer componente global, sugieren que la estructura está atribuida a las poblaciones KN y HN. En la figura se indican además, en flechas rojas, los valores de  $\Phi_{ST}$  significativos entre pares de poblaciones resultantes del análisis de AMOVA, y en flechas naranjas, los valores de  $\Phi_{ST}$  marginalmente no significativos. En las especies *Styela rustica* ( $\max(t)=0,021$ ;  $P=0,079$ ) y *Boltenia echinata* ( $\max(t)=0,03$ ;  $P=0,075$ ) no se detectó estructura global ni local, indicando que no hay unidades genéticas diferentes distinguibles (FIGURA II.8).

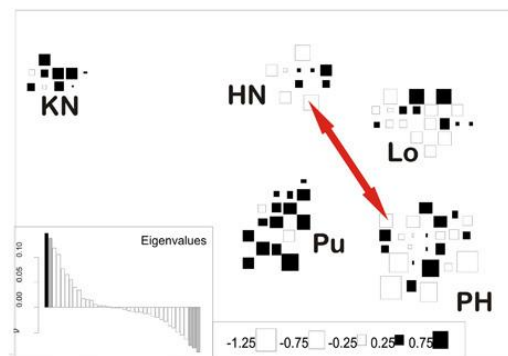
#### 5.6- TEST DE MANTEL

El modelo de aislamiento por distancia (IBD) se puso a prueba mediante un Test de Mantel, tomando como distancia geográfica entre poblaciones a la menor distancia lineal en km, así como también la distancia siguiendo la línea de costa y la circulación de las corrientes marinas superficiales que describen un giro ciclónico en Kongsfjord, entrando por

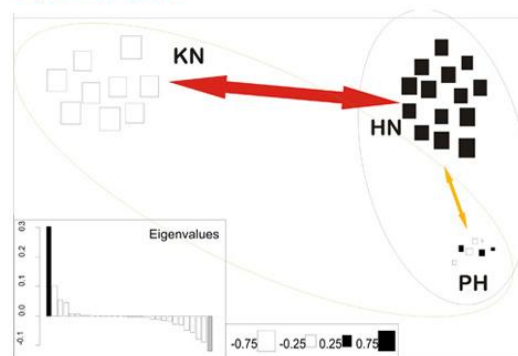


el extremo norte de la boca de fiordo, y saliendo por el extremo sur. La distancia genética utilizada fue la distancia de Nei y Li (1985).

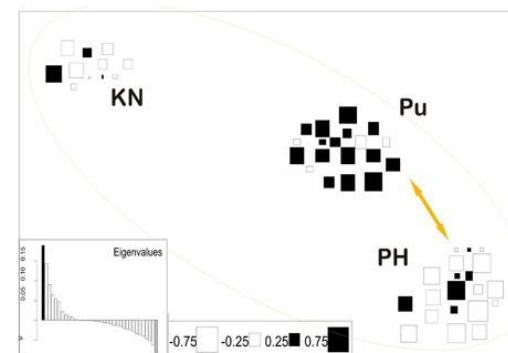
En las tres especies de ascidias árticas no se detectó un patrón de aislamiento por distancia, ya sea utilizando las distancias geográficas por línea de costa según las corrientes, o por línea recta entre pares de poblaciones. Para la especie *Styela rustica* se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson positivo aunque no significativo ( $r=0,19$ ,  $P=0,59$ ), mientras que en las especies *Halocynthia pyriformis* y *Boltenia echinata* se obtuvieron correlaciones negativas entre las matrices ( $r=-0,11$ ,  $P=0,65$  y  $r=-0,01$ ,  $P=0,43$ ).



*Styela rustica*



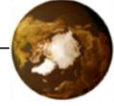
*Halocynthia pyriformis*



*Boltenia echinata*

**FIGURA II.8:** Gráfico de la estructura global de las poblaciones de las tres ascidias árticas, mediante el análisis sPCA. Los cuadrados representan los scores o vectores de cada genotipo individual, según el primer autovector positivo (recuadro izquierda abajo), y están posicionadas aproximadamente según sus coordenadas espaciales. Los individuos están representados por un cuadrado de tamaño proporcional al valor del vector, siendo la máxima diferenciación es entre los cuadrados grandes negros y los grandes blancos.

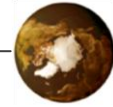




## 6. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo que aborda el estudio de los patrones de dispersión de ascidias con diferentes características de sus ciclos de vida en los ambientes costeros de plataformas del Océano Ártico, desde el enfoque de la genética de poblaciones. En este sentido, los ISSRs demostraron ser una herramienta de mucha utilidad para revelar la variabilidad genética y analizar la estructura genética poblacional, ya que pusieron de manifiesto altos niveles de polimorfismo. En la especie *Halocynthia pyriformis* se realizó un gran esfuerzo de muestreo del genoma probando casi el triple de *primers* en relación a las especies *Styela rustica* y *B. echinata*, sugiriendo que el bajo polimorfismo encontrado se deba más a características inherentes a esta especie que a limitantes de la técnica.

Los patrones de estructura genética de las tres especies de ascidias estudiadas no fueron los esperados para especies con diferentes características reproductivas tales como fecundación externa vs. fecundación interna e incubación (cuidado parental de las larvas). Los patrones de estructuración genética de las poblaciones de estas especies de ascidias parecen no estar determinados en todos los casos por el tiempo de vida de sus larvas. Esta hipótesis debe ser revisada a la luz de los resultados de este trabajo y teniendo en cuenta un mayor número de variables que puedan tener efecto sobre la estructuración de estas poblaciones, más allá del tiempo de vida pelágico de gametas y/o larvas, tal como ocurre en otras especies de ascidias (Ayre *et al.*, 1997; Yund y O'Neil, 2000; Ben-Shlomo *et al.*, 2001; López-Legentil *et al.*, 2006; Bock *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012).

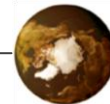


## DIVERSIDAD GENÉTICA

En las tres especies se esperaba encontrar una diversidad genética baja, al tratarse de especies que estarían recién colonizando el sistema bentónico, como resultado ya sea de una reciente expansión del rango desde el sur hacia altas latitudes, o por cuellos de botella genéticos en los refugios glaciares durante las glaciaciones y el posterior efecto fundador desde esos centros siguiendo la retirada de los hielos (Avice, 2000; Hewitt, 2001; 2003; Petit *et al.*, 2003; Marko, 2004). La hipótesis de una reciente expansión del rango desde latitudes menores predice que se encontrarán niveles bajos de diversidad genética, con unos pocos alelos dominando desproporcionadamente grandes áreas de las latitudes altas (Hewitt, 1999). En concordancia con esta hipótesis, son numerosas las especies marinas bentónicas que muestran un gradiente en la diversidad genética a lo largo de un gradiente latitudinal siguiendo la expansión y retracción del casquete polar (Coyer *et al.*, 2003; Gysels *et al.*, 2004; Provan *et al.*, 2005). Por ejemplo la ascidia colonial *Botryllus schlosseri* de origen Mediterráneo y actualmente cosmopolita, refleja en el patrón de diversidad genética de sus poblaciones el retroceso de los hielos del último máximo glacial en la costa norte de Europa (Ben-Shlomo *et al.*, 2006).

Contrariamente a lo esperado, la especie ovovivípara *Boltenia echinata*, mostró niveles de diversidad genética similares a la especie solitaria ovulípara *Styela rustica*, a pesar de su aparente limitado potencial de dispersión. La única especie que acusó niveles bajos de diversidad genética fue la ascidia ovulípara *Halocynthia pyriformis*. Según Yakovis *et al.* (2008) *Boltenia echinata* y *Styela spp.* serían especies pioneras o fundadoras, las primeras en llegar a un ambiente y modificarlo para que otras especies puedan asentarse y no menciona a *Halocynthia pyriformis* en ese grupo. *Halocynthia pyriformis* podría haber llegado hace poco tiempo al sistema, por lo que constituiría un caso de efecto fundador, en donde unos pocos colonizadores habrían traído una muestra reducida de la variabilidad del *pool* génico original, el de las poblaciones que se refugiaron más al sur del límite del último máximo glacial. Si bien es una hipótesis planteada en otras especies nórdicas por varios autores, no deja de ser una hipótesis abierta en este trabajo, ya que los marcadores utilizados y los resultados obtenidos son más adecuados para considerar procesos a escala ecológica local que a una escala evolutiva.

Se encontraron diferencias en los niveles de diversidad genética si se consideran los sitios muestreados, independientemente de la especie considerada. Por ejemplo, las poblaciones muestreadas en la estación HN, así como también las poblaciones de Lo y PH, presentan los valores de diversidad más bajos, mientras que las poblaciones de Pu y KN presentan los niveles más altos de diversidad genética (TABLAS II.4, II.5 y II.6). Este patrón geográfico de la distribución de la diversidad genética está relacionado con la proximidad de las poblaciones HN,

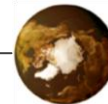


Lo y PH a los glaciares Bloomstrandbreen, Conwaybreen y Kronebreen. El primero está sufriendo una tasa de retracción de 35 metros por año, siendo uno de los más activos en Svalbard (Svendsen *et al.*, 2002). Además del efecto directo que puede tener el hielo desprendido de los glaciares, erosionando las comunidades bentónicas (Gutt y Starmans, 2001), las corrientes de deshielo arrastran material inorgánico particulado a la columna de agua, la mayor parte del cual sedimenta en las zonas internas de las bahías glaciares. Los organismos que habitan en los fondos están sometidos a disturbios físicos crónicos: la alta tasa de sedimentación origina fondos poco consolidados, fácilmente erosionables por corrientes o bioturbación, y los sedimentos son resuspendidos y vuelven a depositar permanentemente (Gorlich *et al.*, 1987; Syvitski *et al.*, 1998; Syvitski, 2002). Por lo tanto las especies bentónicas sésiles son constantemente enterradas, y la fijación de las larvas que necesitan un sustrato duro para adherirse se ve impedida. A estos disturbios se le suma la disminución de la productividad primaria por la gran cantidad de sedimentos inorgánicos en suspensión que bloquean la luz del sol, la poca materia orgánica que sedimenta hacia el fondo por un efecto de dilución, y, en un caso extremo de una alta tasa de sedimentación de partículas inorgánicas, podría ocurrir la obstrucción de los sistemas de alimentación de las especies filtradoras (Gorlich *et al.*, 1987; Fetzer *et al.*, 2002). Estos procesos (alta turbidez, elevadas tasas de sedimentación inorgánica, baja estabilidad de los sedimentos de los fondos, y baja cantidad de materia orgánica) están interconectados, y dada la imposibilidad de separar sus efectos sobre las comunidades bentónicas se los considera en conjunto como “disturbios inducidos por los glaciares” o complejo de factores generadores de estrés. Se originan en los frentes de glaciares, principalmente en verano, donde ocurren las descargas de agua dulce cargada de sedimentos inorgánicos, y su efecto o intensidad va disminuyendo con el aumento de la distancia (Włodarska-Kowalczyk *et al.*, 2005). Las ascidias, a pesar de tener la capacidad de evitar la ingesta de sedimentos inorgánicos en exceso mediante mecanismos de autolimpieza de sus aparatos de filtrado o de oclusión del sifón inhalante, no estarían bien adaptadas a altos niveles de estrés, ya que la obstrucción de la branquia hace que disminuya no sólo la capacidad de alimentarse, sino también la capacidad de respirar. Una característica del orden Stolidobranchia, al que pertenecen las tres especies estudiadas, es la mayor eficiencia para filtrar, ya que poseen una tasa de filtración y un tamaño y complejidad de la branquia mayores que otros subórdenes. Moderadas concentraciones de sedimento hacen que se active el reflejo de expulsión de agua por el sifón inhalante, se cierra el diámetro del sifón, aumenta la actividad de los cilios y el mucus de la branquia se mueve más lentamente, hay contracciones musculares muy frecuentes para expulsar partículas no digeribles, etc. (Armsworthy *et al.*, 2001). Las ascidias bajo estos niveles de estrés estarían invirtiendo recursos energéticos en la limpieza de la branquia para evitar el sofocamiento. Estas actividades tienen un costo energético muy alto, que se traducirá en menos reservas energéticas para el crecimiento y la reproducción, disminuyendo así la aptitud o *fitness* (Bates, 2005; Petersen, 2007).



Debido a que estos factores generadores de estrés podrían afectar directamente la supervivencia de los individuos e incluso aumentar las tasas de mortalidad, llevando a una reducción del tamaño efectivo poblacional, podrían explicar la diversidad genética baja observada en los tres sitios de muestreo mencionados con respecto al resto de los sitios que se encuentran más alejados de los glaciares. Este patrón es evidente en los análisis de correlación entre diversidad genética M y las variables: distancia al glaciar, tasa de sedimentación inorgánica y porcentaje de carbono orgánico en los sedimentos (POC) (FIGURAS II.4 y II.5), en donde se observó que la diversidad genética de las tres especies estuvo positivamente correlacionada con el aumento de la distancia a los glaciares Bloomstrandbreen y Conwaybreen, con el aumento de POC (alimento que precipita al fondo) e inversamente correlacionada con la tasa de sedimentación de materiales inorgánicos. Es decir, la diversidad genética es más alta en las poblaciones más alejadas a los glaciares, en donde los disturbios disminuyen. En la parte interna del fiordo la gran cantidad de minerales en suspensión limita la productividad primaria y se observa poca abundancia de fitoplancton y poca cantidad de POC en los sedimentos superficiales (Wlodarska-Kowalczuk y Pearson, 2004). La materia inorgánica en suspensión y la sedimentación en fiordos árticos son los responsables de la reducción en la biodiversidad de las comunidades bentónicas según Weslawski *et al.* (1999) y Wlodarska-Kowalczuk *et al.* (2005). Gorlich *et al.* (1987), también señalaron que a medida que aumenta la distancia al glaciar, la biomasa y la biodiversidad también aumentan y la estructura trófica se vuelve más compleja; en las zonas altamente disturbadas la fauna presenta poca biomasa y baja biodiversidad, estando dominada por especies detritívoras (*depositfeeders*) de cuerpos pequeños. Este patrón que se observa a nivel de comunidades estaría reflejado también a nivel de diversidad genética en las tres especies de ascidias estudiadas.

Los valores altos de diversidad genética encontrados en el sitio de muestreo Pu, sobre todo en la especie *Styela rustica*, son llamativos debido al reducido hábitat en donde se tomaron las muestras: la población estaba confinada a una pared de 50 x 8 m en el puerto de Ny-Ålesund. Para las otras poblaciones, el hábitat disponible comprendía varios centenares de metros horizontales sin discontinuidades evidentes. El puerto de Ny-Ålesund tiene en verano un tráfico de barcos muy intenso que podría introducir nuevas variantes alélicas desde afuera del fiordo, mediante el transporte de larvas en el agua de las bodegas y así incrementar la diversidad genética de la población. No fue el caso de *Boltenia echinata* en donde la mayor diversidad genética no estaba en la población Pu, posiblemente debido a que las larvas de esta especie son bentónicas y como no nadan en la columna de agua no tendrían oportunidad de llegar al agua de las bodegas de los barcos. Por lo tanto, el transporte antrópico no sería importante en la dispersión de esta especie. El valor más alto de diversidad genética en las poblaciones de *Boltenia echinata* se encontró en KN, población ubicada en la boca del fiordo bien alejada de los glaciares, y además podría estar recibiendo migrantes de poblaciones externas al fiordo. El menor



valor de diversidad genética en la población más interna, PH, la más próxima al glaciar. Las diferencias entre la diversidad de PH y Pu no fueron significativas, debido a la cercanía geográfica de estas poblaciones que estarían bajo el mismo régimen de disturbios.

En *Halocynthia pyriformis* no se detectaron diferencias significativas entre los valores de M de las tres poblaciones, aunque al igual que en *Boltenia echinata* el valor más alto correspondió a la población KN de la boca del fiordo, y el menor valor a la población HN cercana a los glaciares. Los valores de diversidad M en *Halocynthia pyriformis* fueron más bajos que las otras dos especies.

La lecitotrofia en las larvas de ascidias no sería una característica típica de las especies oportunistas, pero la eclosión de miles de gametas que se fecundan en el agua y tienen un mayor tiempo de vida para poder dispersarse a mayores distancias, en contraposición a las especies que presentan incubación de las larvas (cuidado parental) durante su tiempo de maduración, como en *B. echinata*, sería una característica de la estrategia r de supervivencia. Las ascidias en general, por poseer larvas lecitotróficas, no podrían ser consideradas oportunistas, pero otras características de su ciclo reproductivo (como la época del año en que ocurre el desove ó el tipo de fecundación) estarían determinando la tasa de colonización de un ambiente, y podrían hacer que una especie con limitado potencial de dispersión se comporte como un eficiente colonizador. Por ejemplo la capacidad de dispersión de *Halocynthia pyriformis*, que se reproduce por fecundación externa, debería ser en principio mayor que la de *B. echinata*, que presenta fecundación interna e incubación, y una vez que eclosionan las larvas se fijan pronto en el sustrato. Sin embargo *Halocynthia pyriformis* se reproduce durante el verano boreal, momento en el que ocurre la mayor actividad glaciar y las condiciones de la columna de agua, como materiales inorgánicos en suspensión y cambios en la salinidad por el gran aporte de agua dulce, serían factores estresantes para las larvas. Además durante el verano la presión de predación por parte del zooplancton carnívoro es muy alta (Cottier *et al.*, 2006; Rabindranath *et al.*, 2011). Por el contrario, *Boltenia echinata* se reproduce durante el invierno, o continuamente durante todo el año (según la latitud); durante el invierno las larvas tendrían menor presión de predación y no estarían afectadas por el descenso de la salinidad. Por su parte, *Styela rustica* se reproduce en otoño-invierno, por lo que junto con *Boltenia echinata* tendrían mayor tasa de reclutamiento que *Halocynthia pyriformis*, por tener acoplados sus períodos reproductivos a los momentos del año en que los disturbios ocasionados por la actividad glaciar son mínimos.

En resumen, lo que explicaría la menor diversidad genética en las poblaciones de *Halocynthia pyriformis* en comparación a las otras dos especies, sería una baja tasa de reclutamiento de las larvas debido a la predación por parte del zooplancton y la disminución de la salinidad, por tener su período de desove acoplado con el verano boreal. Por el contrario, *Styela rustica* y *Boltenia echinata* desovan durante el otoño-invierno, y esta característica de su período



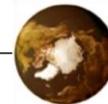
reproductivo aumentaría la capacidad de dispersión de estas dos especies, siendo colonizadoras más eficientes. Por otra parte, lo que explicaría la menor diversidad genética en las poblaciones cercanas a los glaciares de las tres especies estudiadas, sería el efecto combinado de los factores generadores de estrés, que reducirían la aptitud de los individuos y el tamaño efectivo poblacional.

### ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

Cuando se analizaron las cinco poblaciones juntas de *Styela rustica* no se detectó estructura genética poblacional con el análisis de AMOVA (TABLA II.7) y con el análisis de sPCA (FIGURA II.8). Sin embargo, en el análisis de AMOVA entre pares de poblaciones se encontró una diferenciación significativa entre las poblaciones HN y PH (TABLA II.8). Este patrón está de acuerdo con lo esperado para una especie con larvas planctónicas de vida libre en un sistema relativamente joven como las plataformas árticas. En la especie *Boltenia echinata* no se observó estructuración genética de sus poblaciones. Se obtuvo un índice de diferenciación  $\Phi_{ST}$  bajo y no significativo (TABLA II.11) y no se identificó estructura global ni local en el análisis de sPCA (FIGURA II.8). Al igual que en la especie *Styela rustica* no hubo diferenciación significativa en ninguna de las comparaciones de a pares de poblaciones (TABLA II.12). Este patrón de estructuración genética no sería esperable para una especie con bajo potencial de dispersión a pesar de ser una especie ovovivípara y tener larvas bentónicas de vida corta. Sin embargo existen ejemplos de especies con desarrollo larval directo, o ausencia de fase planctónica, que presentan muy poca o ninguna estructuración en sus poblaciones, que resaltan la importancia de otros factores ambientales o de la biología de la especie, en favorecer la dispersión. Por ejemplo, Muniz Días *et al.*, (2006) atribuyen la baja diferenciación entre las poblaciones de la ascidia colonial *Symplegma rubra* a la acción de las corrientes marinas en el arrastre de las colonias desprendidas para facilitar el flujo génico a grandes distancias en las costas de Brasil. En un estudio similar que involucra a dos especies de anfípodos incubadores, muestreados en un rango de 350 km en un arrecife de Florida (EE.UU.), Richards *et al.* (2007) no detectaron subdivisión poblacional en ninguna de las dos especies, y lo atribuyeron al transporte a larga distancia de individuos dentro de esponjas que fueron arrastradas durante los huracanes. Ayre y Hughes (2000) estudiaron nueve especies de corales en arrecifes de Australia con diferentes modos reproductivos y tipos larvales. Encontraron que especies incubadoras tenían poblaciones panmícticas en arrecifes de 1.200 km de largo, indicando altos niveles de flujo génico a larga distancia.

El resultado de la estructuración genética dado por el análisis de AMOVA y de sPCA para *Halocynthia pyriformis* fue opuesto a lo esperado según su modo

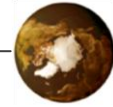




reproductivo y aparente potencial de dispersión; se esperaría una estructuración genética baja al igual que en la especie *Styela rustica*, sin embargo la diferenciación genética fue alta y significativa (TABLA II.9, FIGURA II.8). Entre pares de poblaciones se encontró diferenciación entre HN y KN (TABLA II.10), que aunque no son las más alejadas geográficamente, sí lo son según la dirección de las corrientes.

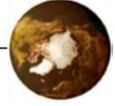
En el caso de las tres especies de ascidias árticas estudiadas, el tipo de desove y el tiempo de vida de las larvas no son buenos pronosticadores de la dispersión y la magnitud de la diferenciación genética entre poblaciones. Existirían otras características del ciclo de vida y de las interacciones de las larvas con los procesos oceanográficos que estarían más relacionadas; por ejemplo el momento del año en que ocurre el desove: en *Boltenia echinata* es durante el invierno principalmente, en *Styela rustica* durante el otoño, y en *Halocynthia pyriformis* solamente en verano, como se mencionó anteriormente. Durante el verano la densidad y biomasa del macrozooplankton carnívoro es mayor, acompañando a los florecimientos del fitoplancton; la predación que ejercen los peces, chetognatos, zooplankton gelatinoso, anfípodos, eufásidos etc., sobre las larvas de otras especies, incluidas las de ascidias, es mucho más fuerte que en invierno, cuando los zoopláncteres están en diapausa o con una actividad reducida (Walkusz *et al.*, 2009). Por lo tanto, las larvas de *Halocynthia pyriformis* serían más vulnerables a la predación que las de *Boltenia echinata* (que además no son pelágicas) y que *Styela rustica*, la cual se reproduce en invierno cuando la predación no es significativa. Por lo tanto, el invierno con su estabilidad ambiental, resulta ser la época más favorable para la dispersión y el reclutamiento de las larvas, y sería más importante la época del año en que ocurre el desove que el modo reproductivo y el tiempo de vida libre de los propágulos, en la determinación de los patrones de dispersión y de flujo génico de estas especies.

Teniendo en cuenta la diferenciación genética entre pares de poblaciones, se puede afirmar que en las tres especies hay una característica en común: siempre se observó que los valores de diferenciación fueron más altos (aunque no siempre estadísticamente significativos) en las comparaciones que involucran a las poblaciones PH ó HN. En el caso de *Styela rustica* el par PH-HN tuvo el  $\Phi_{ST}$  más alto y estadísticamente significativo, en *Halocynthia pyriformis* el par HN-KN tuvo el  $\Phi_{ST}$  más alto y significativo, y en caso de *Boltenia echinata* el par PH-Pu fue el más alto, aunque no significativo estadísticamente pero fue un orden de magnitud mayor que los otros pares (no se encontró esta especie en el sitio HN). Siempre la población PH tuvo una tendencia a diferenciarse de alguna otra población, y tanto PH como HN son las poblaciones con los menores o intermedios (según la especie) valores de diversidad genética, y están ubicadas en las zonas más próximas a los glaciares. En estos sitios podrían estar ocurriendo extinciones locales con mayor intensidad y frecuencia que en las



poblaciones más alejadas –en la boca del fiordo–, y la pérdida de alelos al azar estaría aumentando la diferenciación genética entre las poblaciones. Es necesario aclarar que durante el muestreo de la especie *Boltenia echinata* no se encontraron individuos en la estación HN. No se puede afirmar que no está presente en este sitio por alguna restricción fisiológica relacionada a los disturbios de esta zona, o por un sesgo en los muestreos. Probablemente, si esta especie está presente, se hubiera observado cierta diferenciación genética con las otras poblaciones, como se observó en *Styela rustica* y *Halocynthia pyriformis*. Sin embargo, la ausencia de estructura genética observada en *Boltenia echinata* no se debería a que en el análisis estaría faltando precisamente esta población (que fue la que más se diferenció de las otras dos especies) y a que las tres poblaciones están próximas en la misma línea de costa. Teniendo en cuenta los pares de poblaciones KN-PU y KN-PH, que están presentes en las tres especies, la diferenciación obtenida en *Halocynthia pyriformis* fue uno o dos órdenes de magnitud en comparación con las otras especies. Sería interesante realizar muestreos nuevos en las zonas próximas a los frentes de glaciar, para ampliar el conocimiento acerca de cuáles especies son particularmente vulnerables a los disturbios ocasionados por la retracción glaciar.

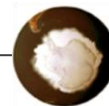
El Test de Mantel no reconoció un patrón de aislamiento por distancia en ninguna de las tres especies, lo cual sugiere un patrón más bien caótico de la distribución de la variabilidad genética, no siendo la distancia geográfica un factor determinante en reducir el flujo génico en la escala en la cual se llevó a cabo este estudio. Esto podría deberse a un evento de expansión reciente y es concordante con el análisis de asignación de individuos a diferentes grupos genéticos en cada localidad (STRUCTURE) del cual se obtuvo que el número más probable de grupos genéticos es  $K=1$ . El análisis del paisaje genético (FIGURA II.6) indica que el centro del fiordo se puede considerar como una zona de barrera al flujo génico; la grilla muestra picos de discontinuidad genética que coinciden geográficamente con la fosa central del fiordo, la cual presenta profundidades de más de 300 m, que están más allá de la tolerancia batimétrica de estas especies (Van Name, 1945). El transporte de las larvas estaría facilitado por la circulación del agua dentro del fiordo: la corriente ingresa por el norte de la boca del fiordo, y describe un giro ciclónico paralelo a la costa, y sale por la parte sur del fiordo, realizando un recorrido en forma de “U”. Además existen las corrientes de marea que se mueven paralelas a la línea de costa (Svendsen *et al.*, 2002). En la especie *Boltenia echinata* no hubo picos de discontinuidad genética ya que las poblaciones se encuentran sobre la misma línea de costa, y no en la costa enfrentada separadas por fosas profundas, como en las otras dos especies.



Los picos de discontinuidad genética fueron más altos en el paisaje genético de *Halocynthia pyriformis*, coincidente con la estructura genética significativa encontrada en el AMOVA, indicando barreras al flujo génico en esta especie. Las corrientes marinas y el tipo de reproducción y cuidado parental, no influyen de la misma manera en la capacidad de dispersión de larvas y el mantenimiento del flujo génico en las tres especies estudiadas; ya que otros factores como la disponibilidad de sustrato adecuado y la época del año en que ocurre el desove, tuvieron un rol más protagónico en describir la estructura genética de las poblaciones.

CAPÍTULO III  
TUNICADOS BENTÓNICOS  
del OCÉANO ANTÁRTICO

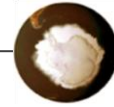




## 1. INTRODUCCIÓN: EL SISTEMA BENTÓNICO ANTÁRTICO

Desde la fragmentación de Gondwana, el continente Antártico comenzó a migrar hacia el sur, experimentando un aislamiento y un enfriamiento progresivo. Este proceso se acentuó cuando se abrió el Pasaje de Drake, al separarse Sud América de la Península Antártica hace aproximadamente 25-30 MA. Es en este momento cuando se establece la Corriente Circumpolar Antártica (CCA), un evento crucial para el aislamiento térmico y biogeográfico del Océano Sur, la glaciación del continente y la evolución de la fauna marina polar (Clarke y Crame, 1989; 2010; Thomson *et al.*, 1991; Maldonado *et al.*, 2003).

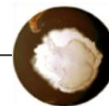
El Océano Antártico limita hacia el sur con el continente Antártico, y hacia el norte con el Frente Polar (FP), y es considerado uno de los ecosistemas más grandes y mejor definidos de la tierra. El FP o Convergencia Antártica es una zona de transición entre las aguas antárticas y sub-antárticas en donde se observa un gradiente en la temperatura, la salinidad y en los nutrientes del agua (Dell, 1972). Esta zona de cambio en las condiciones físicas proporciona una barrera para la circulación de masas de agua y el transporte de organismos hacia y desde el Océano Sur, aislando a las comunidades marinas de plataforma de manera geográfica, climática, térmica y oceanográfica, por lo tanto representa junto con la CCA, una importante barrera biogeográfica (Clarke *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2006). La biota antártica se desarrolló bajo estas condiciones de aislamiento durante millones de años, en un sistema helado pero físicamente estable, y presenta en la actualidad un alto grado de endemismo y una biodiversidad única en sus comunidades de plataforma. Las plataformas antárticas son consideradas un verdadero “laboratorio evolutivo” (Dayton 1990; Clarke 1996; Clarke y Johnston, 2003; Gili *et al.*, 2006; Clarke 2008; Clarke y Crame, 2010).



Dos características llamativas se presentan solamente en la Antártida y estarían involucradas en la ecología bentónica: la ausencia de predadores durófagos y la excepcional profundidad de la plataforma continental. La durofagia -predación sobre animales de esqueleto duro- se encuentra prácticamente ausente (Dell, 1972; Dayton *et al.*, 1974; Arntz *et al.*, 1994; McClintock y Baker, 1997). Los predadores durófagos modernos, peces y crustáceos decápodos, son los responsables de estructurar las cadenas tróficas en las comunidades submareales en latitudes templadas, subtropicales y tropicales. En contraste, en el Océano Antártico no hay cangrejos brachiuros, langostas, tiburones o rayas; la diversidad y abundancia de Rajidae es baja, y la fauna de peces teleósteos está dominada por dos clados no durófagos (Clarke y Johnston, 1996; 2003; Dayton *et al.*, 1994; Eastman y Clarke, 1998; Long, 1992; 1994). A pesar que las focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) se alimentan en profundidad, lo hacen sobre presas móviles como peces y calamares, y las focas serían el equivalente ecológico a las morsas (*Odobenus rosmarus*) y ballenas durófagas del Ártico, que se alimentan sobre el bentos sésil. Con la ausencia de predadores modernos y de bioturbaciones, las comunidades bentónicas antárticas tienen una clara similitud estructural con la biota Paleozoica, la biota arcaica de aguas profundas: comunidades dominadas por especies suspensívoras sésiles que forman estructuras biogénicas tridimensionales complejas, asentadas sobre fondos blandos (Arntz *et al.*, 2005; Aronson y Blake, 2001; Clarke *et al.*, 2004; Gili *et al.*, 2006). Sin embargo, como casi todas las faunas, la fauna bentónica antártica es una mezcla de taxa que se incorporaron hace poco tiempo y taxa que evolucionaron *in situ* (Clarke y Crame, 1989). La segunda característica distintiva del Océano Antártico, es que relativamente muy poco del lecho marino es plataforma continental, y gran parte de esta plataforma es inusualmente profunda como resultado de la presión que genera la enorme masa del casquete polar (Clarke, 1996). Las plataformas de otros continentes tienen entre 100-200 m de profundidad y 75 km de ancho, mientras que aquellas alrededor de la Antártida son de 500-600 m de profundidad y en algunos sitios hasta 1.000 m. Aunque en algunas áreas como en el Mar de Weddell y en el Mar de Ross es extensa, normalmente es angosta y está ocupada por hielo (Clarke y Johnston, 2003).

Las características geológicas, geográficas y biológicas mencionadas, hacen de las plataformas antárticas un ambiente único, en donde prosperaron comunidades dominadas por organismos suspensívoros sésiles, que no existen en otras plataformas. Durante la retracción de las masas de hielo del último ciclo glaciar del Pleistoceno, el aporte de materiales terrígenos arrastrados al mar por las corrientes de deshielo, no afectó negativamente a las comunidades bentónicas de plataforma debido a que el continente sigue aun congelado y no posee sistemas hídricos. A diferencia de las plataformas del resto de los continentes en donde el aporte de materiales clásticos extinguió prácticamente a las comunidades de suspensívoros sésiles (Gili *et al.*, 2006).



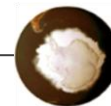


Uno de los eventos más interesantes fueron las glaciaciones del Cenozoico (Zachos *et al.*, 2001a), en donde las expansiones del casquete polar redujeron los hábitats de plataforma, forzando a las especies a recluirse más allá de la misma en aguas profundas, y a evolucionar en un rango batimétrico amplio. La euribatía es una característica que se observa en la actualidad en muchas especies de aguas poco profundas. En lugar de extinguir a la fauna de plataforma, el avance y retroceso de los hielos habría promovido la especiación al separar poblaciones durante largos períodos de tiempo, y luego al eliminarse las barreras al flujo génico se generó un contacto secundario entre varios linajes (Thatje *et al.*, 2005; 2008; Thornhill *et al.*, 2008; Heimeier *et al.*, 2010; Havermans *et al.*, 2011). Thatje *et al.* (2005; 2008) hipotetizaron que la especiación por vicarianza podría haber ocurrido también en la plataforma continental dentro de los refugios en las fosas profundas que no fueron afectadas por el hielo. La fauna bentónica actual sería el resultado de la migración y vicarianza, el resultado de la llamada “bomba biológica de biodiversidad” (Clarke y Crame, 1992; 2010).

Millones de años de aislamiento ha llevado a la evolución de una fauna bentónica diversa y abundante, haciendo de la Antártida un escenario interesante para llevar a cabo estudios sobre el origen y mantenimiento de la diversidad biológica, a nivel de poblaciones y de especies (Clarke y Johnston, 2003; Barnes y Griffiths, 2008; Hoffman *et al.*, 2011). Trabajos recientes realizados en invertebrados bentónicos antárticos revelaron una inesperada diversidad. Se encontraron especies crípticas en moluscos (Linse *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2009; Allcock *et al.*, 2011), en artrópodos (Held, 2003; Held y Wägele, 2005; Raupach y Wägele, 2006; Raupach *et al.*, 2007; Leese y Held, 2008; Brandão *et al.*, 2010; Krabbe *et al.*, 2010; Baird *et al.*, 2011; Havermans *et al.*, 2011), en equinodermos (Wilson *et al.*, 2007; Hunter y Halanych, 2008; 2010; Heimeier *et al.*, 2010), anélidos (Schüller, 2011) y nemertinos (Thornhill *et al.*, 2008).

Anteriormente, en la literatura, muchas de estas especies fueron consideradas de distribución circumpolar y euribática, y los estudios más recientes se contraponen a lo sospechado para un ambiente con corrientes marinas homogeneizadoras como la CCA, y la ausencia de barreras obvias al flujo génico. Esto implica que hay que tomar con cautela los datos de distribución en la Antártida, y no generalizar sobre la capacidad de dispersión de las especies con supuesta gran movilidad.

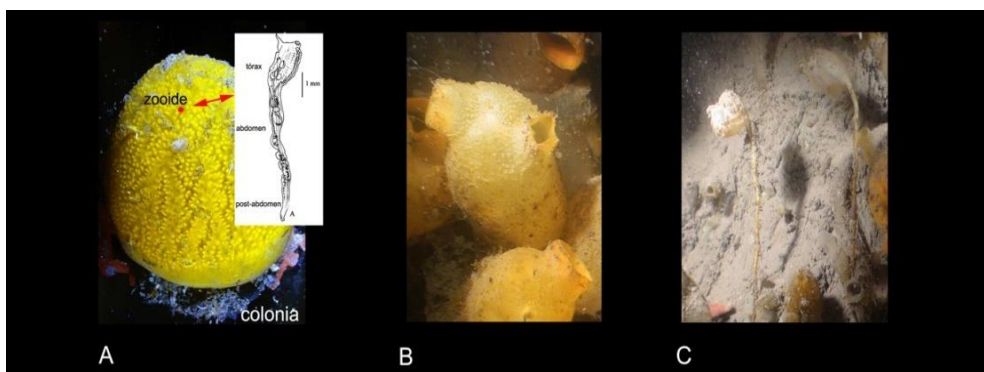
En este capítulo se propone estudiar la estructura genética poblacional y los patrones de dispersión de tres especies de ascidias del Océano Antártico, con diferentes características en su ciclo reproductivo y diferente tiempo de vida de su fase dispersiva (gametas y larvas). Se estudiaron las siguientes especies: *Aplidium falklandicum* (colonial, ovovivípara), *Cnemidocarpa verrucosa* y *Pyura bouvetensis* (solitarias, ovulíparas).



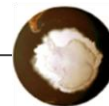
### ESPECIES MODELOS DE ESTUDIO

***Aplidium falklandicum***, Millar, 1960: (FIG. III.1-A) Es una ascidia del Orden Enterogona, familia Polyclinidae. Su distribución es antártica y subantártica y abarca la costa sur de la Patagonia, Islas Malvinas, Islas Georgias del Sur y Orcadas del Sur, Península Antártica e islas Kerguelen y Archipiélago de Palmer. Presente en profundidades desde el submareal hasta 800 m de profundidad. Es una especie colonial, ovovivípara (fecundación interna) y además de reproducción asexual (gemación) para aumentar el número de zooides en la colonia. La presencia de larvas en el atrio se observa durante todo el año. Está formada por un sistema de zooides dispuestos concéntricamente formando una esfera o un ovoide de 20 cm de diámetro máximo, de color amarillo limón. Los zooides son independientes salvo por la unión de las cloacas, las cuales desembocan en varias aperturas cloacales comunes redondeadas. Se encuentra fijada al sustrato por una base ancha o en algunos casos por un pedúnculo corto (Millar, 1960; Monniot *et al.*, 2011).

**FIGURA III.1:**  
Ascidas  
muestreadas en la  
península  
Antártica. A)  
*Aplidium  
falklandicum*,  
B) *Cnemidocarpa  
verrucosa* y C)  
*Pyura bouvetensis*.



***Cnemidocarpa verrucosa***, Lesson, 1830: (FIG. III.1-B). Pertenece al Orden Stolidobranchia, Familia Styelidae. Posee una amplia distribución circumpolar, antártica y subantártica, se encuentra en Islas Malvinas, Georgias del Sur, Archipiélago Palmer, Islas Sandwich del Sur, Shetlands, y en la Patagonia austral. Si bien puede encontrarse hasta los 300 m de profundidad, es más común en aguas poco profundas. Es la ascidia antártica más conspicua, abundante y mejor estudiada (McClintock *et al.*, 1991; Tatián *et al.*, 2002). Es una especie solitaria ovípara (fecundación externa) que libera las gametas a la columna de agua, en donde ocurre la fecundación (Van Name, 1945). Presenta una marcada estacionalidad en la reproducción, desacoplada del máximo de productividad primaria del verano austral, y aunque la gametogénesis es continua durante todo el año, la vitelogenénesis y la maduración de oocitos y espermatocitos se observa durante el invierno boreal (Sahade *et al.*, 2004). Los

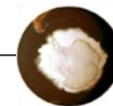


embriones eclosionan a los 8 días de ocurrida la fecundación, y las larvas permanecen en la columna de agua nadando unos 8 días más, es decir que el tiempo de vida libre es de unos 16 días (Strathmann *et al.*, 2006). Su forma es ovalada, con apariencia de estar inflada. Es uno de los estiélidos más grandes, mide 6-7 cm de largo, pudiendo alcanzar como máximo 18 cm. El color de la túnica es anaranjado rojizo, y la textura es áspera llena de papilas o verrugas, pero fina y flexible.

***Pyura bouvetensis***, Michaelsen, 1904: (FIG. III.1-C). Pertenece al Orden Stolidobranchia, Familia Pyuridae. Es una especie exclusivamente antártica, de distribución circumentártica, en las Islas Shetland del Sur, Archipiélago Palmer, Islas Bouvet y Victoria. Esta especie se caracteriza por una amplia tolerancia batimétrica, y se encuentra hasta los 1.600 m de profundidad. Tiene un pedúnculo de hasta 21 cm (unas 10 veces el largo del cuerpo), que se origina en la parte anteroventral del cuerpo, en donde es grueso y se va afinando hacia el extremo opuesto terminando en un disco o un proceso en forma de raíz que se ancla al sustrato. Esto le permite filtrar partículas presentes a una mayor distancia del fondo y evitar la competencia por el alimento. La túnica es fina, semi transparente, con colores que varían del marrón al ocre y está cubierta por espinas cónicas cortas. Es ovípara con fecundación externa (Millar, 1960; Kott, 1969; Van Name, 1945). El género *Pyura* presenta una dispersión larval muy acotada (Clarke *et al.*, 1999). No se han realizado estudios reproductivos de *Pyura bouvetensis*, pero se conoce que el tiempo de vida libre de las larvas de *Pyura praeputialis* de Chile y Australia es de 1-3 horas, de *Pyura chilensis* de 7 horas, y *Pyura stolonifera* de Sudáfrica, “unas pocas horas luego de la eclosión” (Griffiths, 1976). Además *Pyura praeputialis* presenta una característica que facilitaría la filopatría: las gametas tienen sustancias surfactantes que generan espuma y las mantiene juntas para facilitar la fecundación. Estos “nidos de espuma” o “*bio-foams*” quedan adheridos en las rocas cercanas a los progenitores, y es lo que explicaría la reducida distribución que presenta esta especie en las costas de Chile (Castilla *et al.*, 2007). Esto sugeriría que el tiempo de vida de las larvas de *Pyura bouvetensis* también podría ser muy corto.

## 2. HIPÓTESIS

Las especies de ascidias antárticas presentan fuerte estructuración genética de sus poblaciones y altos niveles de diversidad genética. A su vez, las especies con fecundación interna e incubación de las larvas están más estructuradas genéticamente que las especies con fecundación externa.



### *Predicciones*

Cabría esperar que en las plataformas antárticas las especies de ascidias presenten una estructuración genética fuerte en sus poblaciones, y altos niveles de diversidad genética, al tratarse de especies con limitado potencial de dispersión, debido a sus larvas lecitotróficas, que habrían evolucionado en un sistema que está aislado geográficamente y físicamente del resto de las plataformas desde hace 30 millones de años, con una larga historia de evolución *in situ* de su fauna antigua y endémica.

A su vez, se esperaría observar una mayor estructura genética en las poblaciones de la especie colonial de reproducción ovovivípara, que en las especies solitarias ovulíparas, lo que estaría determinado por su capacidad de dispersión reducida, debido al tiempo de vida larval más corto que el de las especies solitarias ovulíparas.

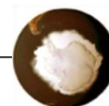
### 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la estructura genética poblacional en tres especies de ascidias antárticas: *Aplidium falklandicum*, *Cnemidocarpa verrucosa* y *Pyura bouvetensis*, utilizando PCR-ISSRs como marcadores moleculares.
- Determinar los niveles de diversidad genética en las subpoblaciones de dichas especies.
- Inferir las posibles relaciones de la diversidad genética con factores ambientales y oceanográficos de cada sitio.
- Comparar la estructura genética poblacional de especies que difieren en sus modos de reproducción (fecundación interna *versus* reproducción externa) y posiblemente en sus capacidades de dispersión.

### 4. MATERIALES y MÉTODOS

#### 4.1 – ÁREA de ESTUDIO

La Península Antártica tiene 1.500 km de largo y limita con el Mar de Bellingshausen hacia el oeste y el Mar de Weddell hacia el este. La plataforma continental limita con el Estrecho de Bransfield en el norte, tiene una profundidad de 500 m y presenta una batimetría escarpada, con mesetas de poca profundidad y trincheras muy profundas. Existe un sistema complejo de corrientes marinas cercanas a la costa oeste que se mueven hacia el oeste y hacia el sur, aunque la principal es la Corriente Circumpolar Antártica (CCA)



que en ese sector se desplaza perpendicularmente a la Península Antártica (Hofmann y Klinck, 1998; Thorpe *et al.*, 2007). Los muestreos se realizaron en el Estrecho de Bransfield, cerca de las Islas Low y Decepción, pertenecientes al archipiélago de las Islas Shetland del Sur (63°01'S, 60°32'O) (FIGURA III.2).

#### 4.2 - OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

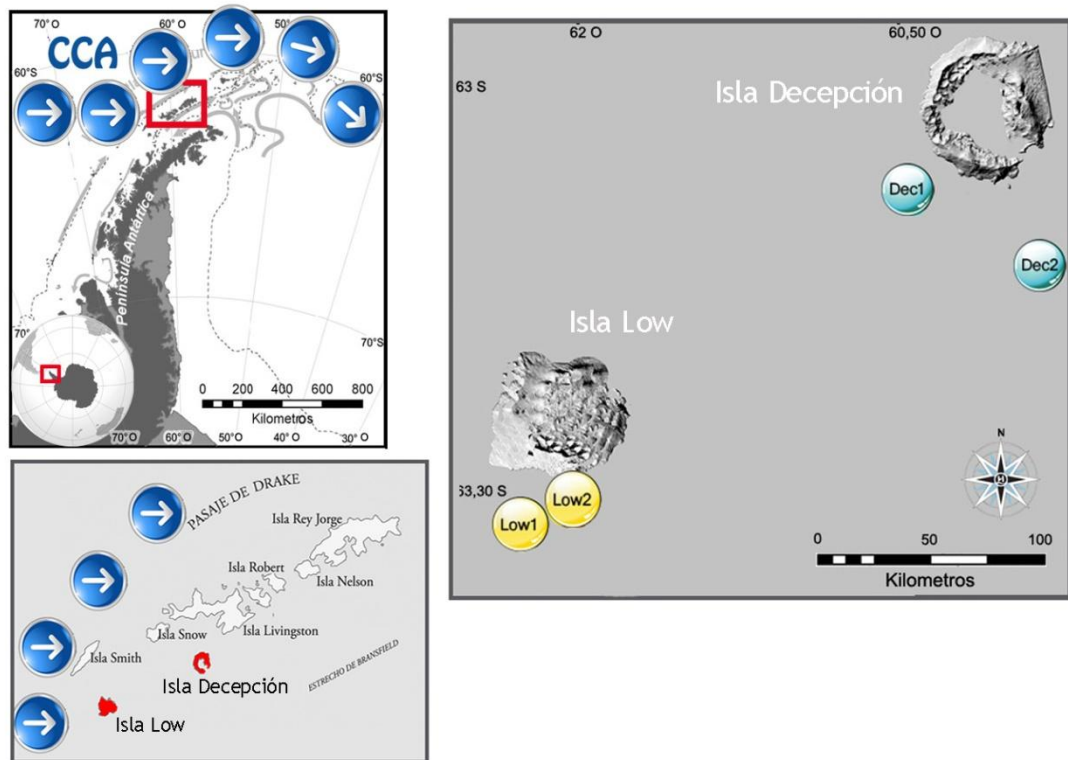
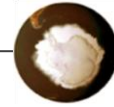
Se muestrearon poblaciones de *Aplidium falklandicum*, *Cnemidocarpa verrucosa* y *Pyura bouvetensis* en el Mar de Bellingshausen durante el verano austral de 2006, en el marco del Proyecto Antártico BENTART-06, a bordo del B/O-Hespérides. El arte de pesca utilizado fue un trineo suprabentónico MACER-GIROQ modificado (Cartes *et al.*, 1994). La especie *Aplidium falklandicum* fue muestreada en 3 estaciones: Low1 a 97 m de profundidad, Low2 a 86 m, y Decepción (Dec1) a 250 m. *Cnemidocarpa verrucosa* fue muestreada en Low1 a 97 m, Low2 a 86 m, y en las cercanías a la isla Decepción en la estación Dec.2 a 106 m. La especie *Pyura bouvetensis* fue muestreada en 4 estaciones: Low1 (97 m), Dec.1 (167 m), Dec.2 (402 m), y Low2 (115 m) (TABLA III.1) (FIG. III.2).

TABLA III.1: Estaciones de muestreo y especies colectadas en la Península Antártica.

| Especies   | Estaciones de Muestreo | Profundidad (m) | Nº individuos | Total |
|--|------------------------|-----------------|---------------|-------|
| <b><i>Aplidium falklandicum</i></b><br>Colonial-ovovivípara<br>Fecundación interna | Low1                   | 97              | 9             | 29    |
|  | Low2                   | 86              | 10            |       |
|  | Dec1                   | 250             | 10            |       |
| <b><i>Cnemidocarpa verrucosa</i></b><br>Solitaria-ovulípara<br>Fecundación externa | Low1                   | 97              | 9             | 27    |
|  | Low2                   | 86              | 9             |       |
|  | Dec2                   | 106             | 9             |       |
| <b><i>Pyura bouvetensis</i></b><br>Solitaria-ovulípara<br>Fecundación externa      | Low1                   | 97              | 6             | 31    |
|  | Low2                   | 115             | 9             |       |
|  | Dec1                   | 167             | 10            |       |
|  | Dec2                   | 402             | 6             |       |

#### 4.3 - TÉCNICAS MOLECULARES

Se tomaron muestras de tejido del manto (músculo) de las especies solitarias, y del post-abdomen de la especie colonial *Aplidium falklandicum*. En esta especie se utilizó un zooid individual por colonia, al cual se le quitó el aparato filtrador

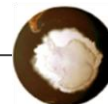


**FIGURA III.2:** Área de muestreo en el oeste de la Península Antártica, en azul la Corriente Circumpolar Antártica. Se indican las estaciones de muestreo en las cercanías de las Islas Low y Decepción, estaciones Low en amarillo y estaciones Decepción en celeste.

y digestivo para evitar la contaminación con ADN proveniente de partículas filtradas.

La extracción y purificación de ADN se realizó con la técnica de extracción salina de Bruford *et al.* (1992). En todos los casos se obtuvo ADN de muy buena calidad: de alto peso molecular y en gran cantidad (entre 70-1500 ng/ $\mu$ l), con la excepción de *Aplidium falklandicum*, de donde se obtuvo poca cantidad por zooide, por lo que se unificaron las extracciones de varios zooides de la misma colonia. El ADN fue resuspendido en agua bidestilada estéril y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se probaron en total 11 *primers* anclados de ISSRs en las tres especies antárticas (TABLA III.2), y se seleccionaron aquellos que mostraron patrones de amplificación claros y alto polimorfismo. La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: *Buffer* 1X, 2,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200 $\mu$ M dNTP, 100 pmoles de *primer*, 1U de TaqDNA polimerasa (Invitrogen<sup>®</sup>), 10 ng de ADN genómico y agua bidestilada hasta completar un volumen final de 10  $\mu$ l. En todos los casos, los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1,5% P/V en buffer TBE 0,5x con 0.005  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio) a un voltaje





constante de 120V durante 3 horas. Los patrones se visualizaron en un transiluminador UV y se fotografiaron con cámara digital para su posterior análisis.

#### 4.4 - ANÁLISIS de los DATOS

Se realizaron los mismos análisis que para las especies árticas, según se detalla en el CAPÍTULO II.3.6. En los análisis de correlación entre diversidad genética M y variables ambientales, sólo se realizaron correlaciones con la profundidad de muestreo, ya que no se contaba con información de otras variables en el sitio de muestreo.

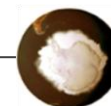
## 5 RESULTADOS

### 5.1 - PATRONES DE AMPLIFICACIÓN DE ISSR-PCR

Los patrones de amplificación resultaron muy nítidos y repetibles. Fueron seleccionados entre tres y cuatro *primers* para las amplificaciones de cada una de las tres especies antárticas (TABLA III.3). Los *primers* utilizados en *Aplidium falklandicum* revelaron un total de 79 bandas, de las cuales 74 fueron polimórficas y 6 fueron exclusivas de la población Dec. En la especie *Cnemidocarpa verrucosa* se amplificaron un total de 75 bandas, de las cuales 66 fueron polimórficas. En la especie *Pyura bouvetensis* se amplificaron 76 bandas, de las cuales 73 fueron polimórficas y 4 fueron exclusivas de las poblaciones de Dec.

**TABLA III.2:** Listado de los *primers* utilizados para la amplificación con ISSRs en las tres especies de ascidias antárticas. Las pruebas están marcadas con “x” y los *primers* que se seleccionaron por su repetitividad y patrones claros están marcados con “√”.

| <i>Primers</i> (5'-3') | <i>Aplidium falklandicum</i> | <i>Cnemidocarpa verrucosa</i> | <i>Pyura bouvetensis</i> |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| (AC) <sub>10</sub> AG  | X√                           | X                             | X                        |
| (AC) <sub>10</sub> AA  | X√                           | X                             | X                        |
| (CCCT) <sub>4</sub>    | -                            | X                             | -                        |
| (GT) <sub>10</sub> GC  | X                            | -                             | -                        |
| (GACA) <sub>4</sub>    | X√                           | X√                            | X                        |
| (TG) <sub>10</sub> CG  | X                            | -                             | -                        |
| (AC) <sub>8</sub> C    | X√                           | X√                            | X√                       |
| (AG) <sub>8</sub> Y    | X                            | X√                            | X√                       |
| (CA) <sub>8</sub> RT   | X                            | -                             | -                        |
| (CTT) <sub>5</sub> TT  | -                            | X                             | -                        |
| (GTG) <sub>3</sub> GC  | X                            | X√                            | X√                       |



**TABLA III.3:** Secuencias de los *primers* utilizados en las reacciones de PCR-ISSR y temperaturas de hibridación que arrojaron los mejores patrones de bandas, en las tres especies de ascidias antárticas.

| Especies                      | Primers (5'-3')       | T° hibridación | Nº de bandas polimórficas | Nº de bandas monomórficas | Total Bandas amplificadas |
|-------------------------------|-----------------------|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Aplidium falklandicum</i>  | (AC) <sub>10</sub> AG | 51°C           | 15                        | 1                         | <b>79</b>                 |
|                               | (AC) <sub>10</sub> AA | 52°C           | 19                        | -                         |                           |
|                               | (GACA) <sub>4</sub>   | 51°C           | 18                        | 4                         |                           |
|                               | (AC) <sub>8</sub> C   | 48°C           | 22                        | -                         |                           |
|                               |                       |                | Total <b>74</b>           | Total <b>5</b>            |                           |
| <i>Cnemidocarpa Verrucosa</i> | (GACA) <sub>4</sub>   | 51°C           | 13                        | 1                         | <b>75</b>                 |
|                               | (AC) <sub>8</sub> C   | 48°C           | 20                        | 5                         |                           |
|                               | (GTG) <sub>3</sub> G  | 50°C           | 21                        | 1                         |                           |
|                               | C                     | 50°C           | 12                        | 2                         |                           |
|                               | (AG) <sub>8</sub> Y   |                | Total <b>66</b>           | Total <b>9</b>            |                           |
| <i>Pyura bouvetensis</i>      | (AG) <sub>8</sub> Y   | 50°C           | 20                        | 1                         | <b>76</b>                 |
|                               | (AC) <sub>8</sub> C   | 48°C           | 30                        | 2                         |                           |
|                               | (GTG) <sub>3</sub> C  | 47°C           | 23                        | -                         |                           |
|                               |                       |                | Total <b>73</b>           | Total <b>3</b>            |                           |

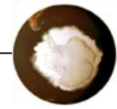
## 5.2 - VARIABILIDAD GENÉTICA

### *Aplidium falklandicum*

La diversidad genética en cada población, obtenida utilizando el índice de diversidad del marcador (M), varió entre 0,25 y 0,35. La población Dec ubicada muy próxima a la isla Decepción mostró el mayor valor del índice M. Esta población fue muestreada a 250 m de profundidad, mientras que las otras dos (Low1 y Low2) estaban a menor profundidad (unos 90 m). Estas dos últimas poblaciones mostraron los índices más bajos de diversidad (TABLA III.4).

| Población | M    | Grupos SNK |
|-----------|------|------------|
| Dec       | 0,35 | A          |
| Low1      | 0,25 | B          |
| Low2      | 0,23 | B          |

**TABLA III.4:** Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las tres poblaciones de *Aplidium falklandicum*. Las letras A y B indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el ANOVA y el test SNK ( $P < 0,05$ ).



### *Cnemidocarpa verrucosa*

La diversidad genética en las poblaciones de *Cnemidocarpa verrucosa* fue mayor en la población Low1 y menor en Low2 y Dec, según el análisis de ANOVA y el test de SNK (TABLA III.5).

| Población | M    | Grupos SNK |
|-----------|------|------------|
| Low1      | 0,23 | A          |
| Dec       | 0,19 | B          |
| Low2      | 0,18 | B          |

TABLA III.5: Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las tres poblaciones de *Cnemidocarpa verrucosa*. Las letras A y B indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el ANOVA y el test SNK ( $P < 0,05$ ).

### *Pyura bouvetensis*

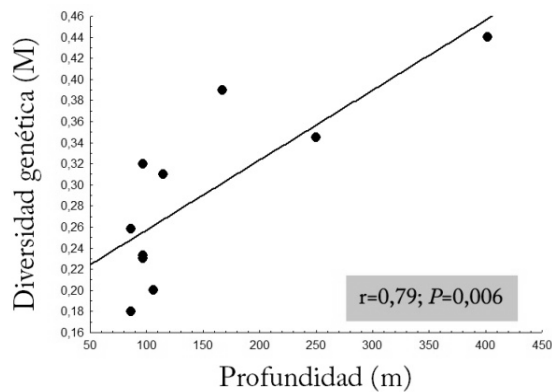
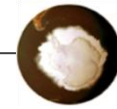
La diversidad genética M en cada población varió entre 0,31 y 0,44. Las poblaciones ubicadas próximas a la isla Decepción mostraron también los mayores valores del índice M. Estas poblaciones fueron muestreadas a 402 m y 167 m de profundidad, mientras que Low1 y Low2, que presentaron valores más bajos de diversidad, lo fueron a menor profundidad (TABLA III.6).

| Población | M    | Grupos SNK |
|-----------|------|------------|
| Dec1      | 0,44 | A          |
| Dec2      | 0,39 | B          |
| Low1      | 0,32 | C          |
| Low3      | 0,31 | C          |

TABLA III.6: Niveles de variabilidad genética según el índice de Diversidad del Marcador (M), en las cuatro poblaciones de *Pyura bouvetensis*. Las letras A, B y C indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el análisis de ANOVA y el test SNK ( $P < 0,05$ ).

## 5.3- CORRELACIONES: DIVERSIDAD GENÉTICA vs. PROFUNDIDAD

Se realizó un análisis de correlación entre la diversidad genética (M) y la profundidad de muestreo de las poblaciones, a los fines de evaluar la relación que estas variables mantienen, y se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ). Se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson  $r = 0,79$ ;  $P = 0,006$  (FIG. III.3).

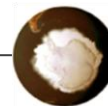


**FIGURA III.3:** Análisis de correlación entre la diversidad genética y la profundidad en las 3 especies antárticas. Coeficiente de correlación de Pearson  $r=0,79$ ;  $P=0,006$

Según la TABLA III.7 la especie *Aplidium falklandicum* mostró el mayor valor de diversidad M en la población ubicada a mayor profundidad (Dec a 250 m), la especie *Pyura bouvetensis* también tuvo el mayor valor en la población más profunda (Dec 1 a 402 m) y *Cnemidocarpa verrucosa* no fue muestreada en un rango amplio de profundidades (entre 86 y 106 m) a pesar de ello el máximo valor de M fue encontrado en una profundidad intermedia.

**TABLA III.7:** Resumen de los índices de diversidad M de las 3 especies, indicando la profundidad de muestreo. Las letras A, B y C indican grupos diferentes de diversidad genética M detectados por el ANOVA y el test SNK ( $P<0,05$ ).

| Especie y estación            | Profundidad (m) | Diversidad (M) | Grupos SNK |
|-------------------------------|-----------------|----------------|------------|
| <i>Aplidium falklandicum</i>  |                 |                |            |
| - Dec                         |                 | 0,35           | A          |
| - Low 1                       | 97              | 0,25           | B          |
| - Low 2                       | 86              | 0,23           | B          |
| <i>Cnemidocarpa verrucosa</i> |                 |                |            |
| - Low1                        | 97              |                | A          |
| - Dec                         | 106             | 0,19           | B          |
| - Low 2                       | 86              | 0,18           | B          |
| <i>Pyura bouvetensis</i>      |                 |                |            |
| - Dec1                        |                 |                | A          |
| - Dec 2                       | 167             | 0,39           | B          |
| - Low 3                       | 115             | 0,32           | C          |
| - Low 1                       | 97              | 0,31           | C          |



## 5.4- ESTRUCTURA POBLACIONAL: AMOVA

*Aplidium falklandicum*

En el análisis de AMOVA de la especie colonial *Aplidium falklandicum* se obtuvo un índice de diferenciación genética alto y significativo (TABLA III.8), y el análisis de diferenciación entre pares de poblaciones reveló valores de  $\Phi_{ST}$  estadísticamente significativos en todos los casos (TABLA III.9).

**TABLA III.8:** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 3 poblaciones de *Aplidium falklandicum*.

| Fuente de variación       | SC     | g.l. | Componentes de variación | % de variación | $\Phi_{ST}$     | P             |
|---------------------------|--------|------|--------------------------|----------------|-----------------|---------------|
| <b>Entre poblaciones</b>  | 34,54  | 2    | 0,9649                   | 10,81          |                 |               |
| <b>Dentro poblaciones</b> | 206,90 | 26   | 7,9579                   | 89,19          | <b>0,108***</b> | <b>0,0009</b> |
| <b>Total</b>              | 241,44 | 28   | 8,9226                   | 100            |                 |               |

\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$

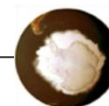
**TABLA III.9:**  $\Phi_{ST}$  calculado entre pares de poblaciones de *Aplidium falklandicum*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de P por encima de la diagonal.

| Poblaciones | Low1           | Low2            | Dec    |
|-------------|----------------|-----------------|--------|
| <b>Low1</b> | -              | 0,0016          | 0,0058 |
| <b>Low2</b> | <b>0,101**</b> | -               | <0,000 |
| <b>Dec</b>  | <b>0,106**</b> | <b>0,117***</b> | -      |

\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$

*Cnemidocarpa verrucosa*

En la especie solitaria *Cnemidocarpa verrucosa*, se obtuvo un índice de diferenciación genética significativo con el análisis de AMOVA ( $\Phi_{ST} = 0,061$ ;  $P < 0,001$ ) (TABLA III.10), aunque fue un orden de magnitud menor que en la especie *Aplidium falklandicum*. Los valores de  $\Phi_{ST}$  entre pares de poblaciones fueron significativos entre las poblaciones más distantes entre sí (TABLA III.11).



**TABLA III.10:** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 3 poblaciones de *Cnemidocarpa verrucosa*.

| Fuente de variación       | SC     | g.l. | Comp. de variación | % de variación | $\Phi_{ST}$    | <i>P</i>      |
|---------------------------|--------|------|--------------------|----------------|----------------|---------------|
| <b>Entre poblaciones</b>  | 25,11  | 2    | 0,5169             | 6,14           | <b>0,061**</b> | <b>0,0020</b> |
| <b>Dentro poblaciones</b> | 189,66 | 24   | 7,9027             | 93,86          |                |               |
| <b>Total</b>              | 214,77 | 26   | 8,4197             | 100            |                |               |

\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$

**TABLA III.11:**  $\Phi_{ST}$  calculado entre pares de poblaciones de *Cnemidocarpa verrucosa*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de *P* por encima de la diagonal.

| Poblaciones | Low1          | Low2           | Dec    |
|-------------|---------------|----------------|--------|
| <b>Low1</b> | -             | 0,056          | 0,042  |
| <b>Low2</b> | 0,041         | -              | 0,0029 |
| <b>Dec</b>  | <b>0,054*</b> | <b>0,089**</b> | -      |

\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$

### *Pyura bouvetensis*

El análisis de AMOVA de la especie solitaria *Pyura bouvetensis* mostró un índice de diferenciación genética alto y estadísticamente significativo  $\Phi_{ST} = 0,139$  ( $P < 0,05$ ) (TABLA III.12). En el análisis realizado entre pares de poblaciones se obtuvieron valores de  $\Phi_{ST}$  estadísticamente distintos de cero entre todos los pares menos entre el par Dec1 y Dec2, poblaciones que están muy próximas geográficamente (TABLA III.13).

**TABLA III.12:** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 4 poblaciones de *Pyura bouvetensis*.

| Fuente de variación       | SC      | g.l. | Comp. de variación | % de variación | $\Phi_{ST}$     | <i>P</i>         |
|---------------------------|---------|------|--------------------|----------------|-----------------|------------------|
| <b>Entre poblaciones</b>  | 72,108  | 3    | 1,74004            | 13,89          | <b>0,139***</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>Dentro poblaciones</b> | 291,311 | 27   | 10,7893            | 86,11          |                 |                  |
| <b>Total</b>              | 363,419 | 30   | 12,5293            | 100            |                 |                  |

\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$



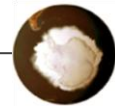


TABLA III.13:  $\Phi_{ST}$  calculado entre pares de poblaciones de *Pyura bouvetensis*. Se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$  debajo de la diagonal y los valores de  $P$  por encima de la diagonal.

| Poblaciones | Dec1            | Dec2            | Low1          | Low2        |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------|-------------|
| Dec1        | -               | 0,063           | $P < 0,000$   | $P < 0,000$ |
| Dec2        | 0,047           | -               | 0,0039        | $P < 0,000$ |
| Low1        | <b>0,153***</b> | <b>0,117**</b>  | -             | 0,009       |
| Low2        | <b>0,181***</b> | <b>0,197***</b> | <b>0,11**</b> | -           |

\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$

## 5.5 - ESTRUCTURA POBLACIONAL: MÉTODOS ESPACIALMENTE EXPLÍCITOS.

### PAISAJES GENÉTICOS

Los mapas de paisaje genético generados a partir de la interpolación de los datos de ISSR con el programa *Alleles in Space*, fueron similares para las tres especies de ascidias antárticas. En los mapas de las tres especies se observan picos de máxima discontinuidad genética entre las islas Decepción y Low (FIG. III.4).

Esto es concordante con los índices  $\Phi_{ST}$  de diferenciación entre pares de poblaciones, que son todos estadísticamente significativos. Además hay picos menores entre las poblaciones Low1 y Low2 de las tres especies, aunque es menor en *Cnemidocarpa verrucosa* (FIG. 16 B) que tuvo un  $\Phi_{ST}$  marginalmente no significativo. Las poblaciones Dec1 y Dec2 de *Pyura bouvetensis* no tuvieron un pico de discontinuidad genética entre ellas (FIG. III.4 C).

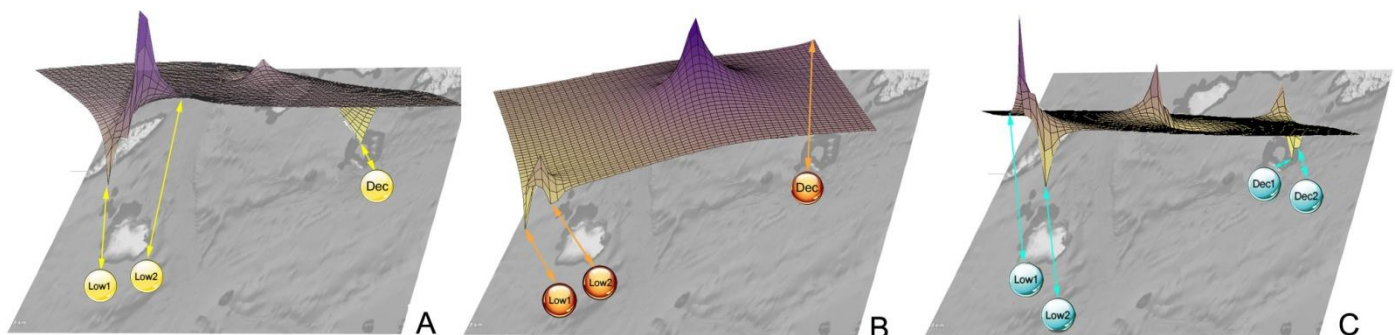
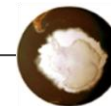


FIGURA III.4: Mapas del paisaje genético de las tres especies antárticas A) *Aplidium Falklandicum*, B) *Cnemidocarpa verrucosa* y C) *Pyura bouvetensis*. Los picos positivos representan diferenciación genética y los picos negativos similitudes genéticas. Interpolación construida con AIS, a partir de distancias genéticas y geográficas interindividuales.



### ANÁLISIS DE ASIGNACIÓN

La estructura genética se analizó utilizando un método de agrupamiento bayesiano con el programa STRUCTURE. El número más probable de unidades genéticas diferentes (K) en la muestra resultó, según el valor máximo promedio del  $\text{Ln } P(D)$ : *Aplidium falklandicum* K=2, *Cnemidocarpa verrucosa* K=1 y *Pyura bouvetensis* K=2 (FIG. III.5).

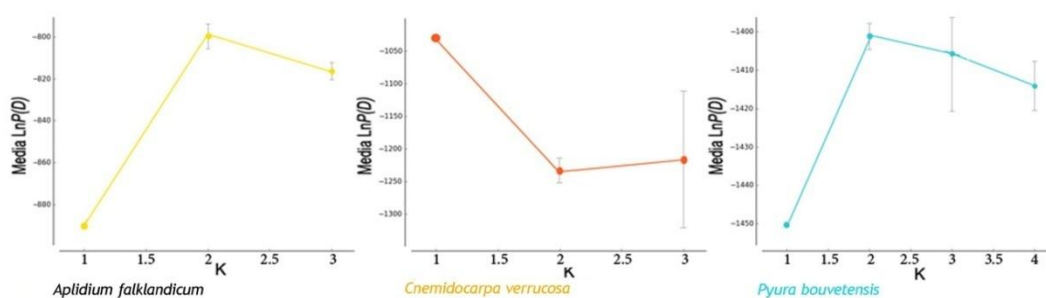
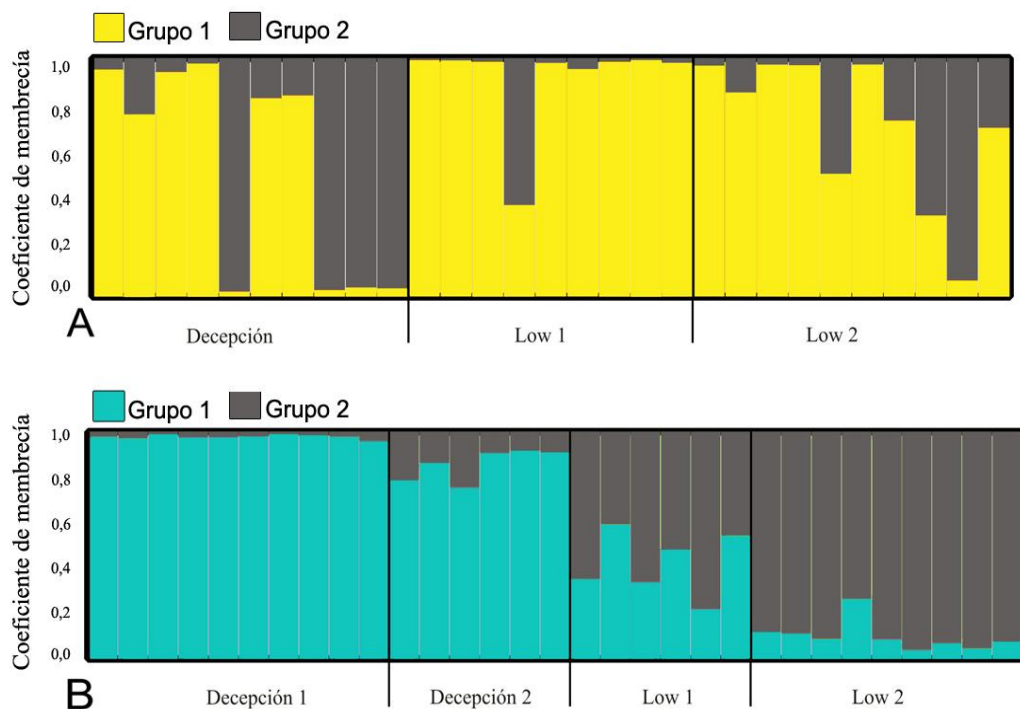
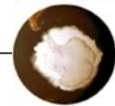


FIGURA III.5: Resultados del análisis del programa STRUCTURE. Se muestra la media  $\pm$  error estándar de  $\text{Ln } P(D)$ , para las tres especies de ascidias antárticas, basado en 5 réplicas para cada valor de K, usando el modelo LOCPRIOR.

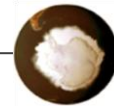
El coeficiente de membresía o pertenencia de cada individuo a cada grupo genético o *cluster* se muestran en la FIGURA III.6 para las dos especies donde  $k=2$ . En la especie *Aplidium falklandicum* (FIG. III.6-A) los individuos tuvieron un 70% de pertenencia promedio al grupo genético 1 (amarillo), los individuos de la población Low1 tuvieron más de un 90% de probabilidad de pertenecer al grupo 1, los individuos de la población Low2: 69% y Dec: 54% de pertenencia. Los individuos de la especie *Pyura bouvetensis* (FIG. III.6-B) tuvieron un coeficiente promedio de pertenencia a los grupos 1 y 2 de 47% y 58% respectivamente. Los individuos de las poblaciones Dec1 y Dec2 resultaron bastante homogéneos genéticamente, tuvieron un 90% (Dec1) y un 60% (Dec2) de pertenencia al grupo 1 (celeste). Las poblaciones Low1 y Low2 tuvieron la mayor parte de sus genomas provenientes del grupo 2 (gris), teniendo 77% y 85% respectivamente, de probabilidad de pertenencia a este grupo genético.



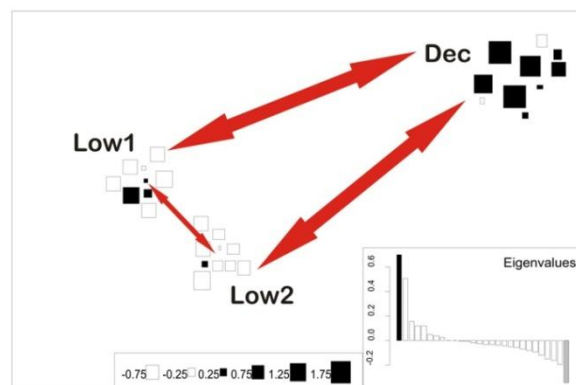
**FIGURA III.6:** Esquema de los resultados de la prueba de asignación bayesiana de individuos a dos grupos genéticos de: A) *Aplidium falklandicum* y B) *Pyura bouvetensis* con  $K=2$  y el modelo LOCPRIOR. Cada individuo está representado por una columna particionada en dos segmentos de colores. El largo de cada segmento indica la probabilidad *a posteriori* de pertenencia de ese individuo a cada grupo genético. También se indica la localidad de muestreo.

#### ANÁLISIS ESPACIAL DE COMPONENTES PRINCIPALES (sPCA)

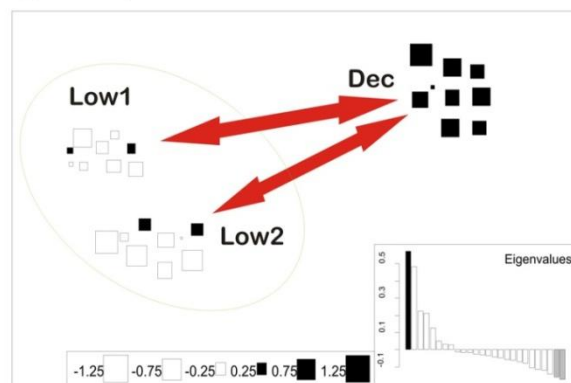
En el análisis de sPCA realizado con el programa Adegenet mostró en todas las especies un patrón similar. Se encontró una estructura global significativa ( $P < 0,05$ ) para las tres especies de ascidias antárticas, siendo la estructuración genética de *Pyura bouvetensis* ( $\max(t)=0,079$ ;  $P=0,001$ ) y de *Aplidium falklandicum* ( $\max(t)=0,074$ ;  $P=0,019$ ) más marcadas que la estructura global identificada para la especie *Cnemidocarpa verrucosa* ( $\max(t)=0,053$ ;  $P=0,03$ ). Estos resultados son concordantes con los análisis de AMOVA en donde el índice de diferenciación genética  $\Phi_{ST}$  más bajo fue calculado para *Cnemidocarpa verrucosa*. Solo el primer *eigenvalue* o autovector fue retenido debido a que explicaba la mayor proporción de la variabilidad (FIG. III.7). El gráfico de los scores o valores asignados a los individuos, generado en base al primer componente global, sugiere que la estructura se debe principalmente a las



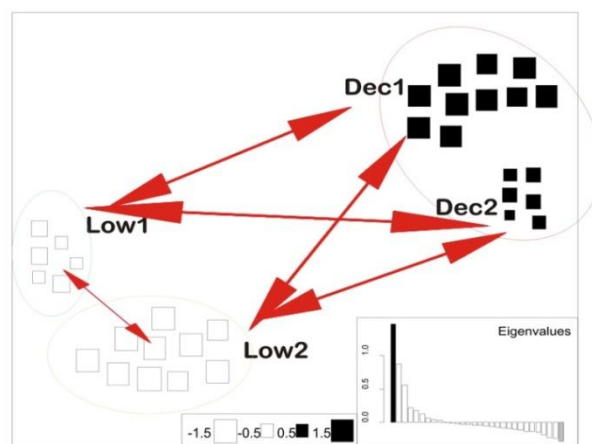
diferencias genéticas entre Low y Dec. En el gráfico se indican, además, en flechas rojas los valores de  $\Phi_{ST}$  significativos entre pares de poblaciones, resultantes del análisis de AMOVA.



*Aplidium falklandicum*



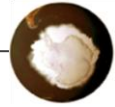
*Cnemidocarpa verrucosa*



*Pyura bouvetensis*

FIGURA III.7:

Gráfico de la estructura global de las poblaciones de las tres especies de ascidias antárticas, mediante el análisis sPCA. Los cuadrados representan los scores o vectores de cada genotipo individual, según el primer autovector positivo (recuadro derecho abajo), y están posicionadas aproximadamente según sus coordenadas espaciales. Los individuos están representados por un cuadrado de tamaño proporcional al valor del vector, siendo la máxima diferenciación entre los cuadrados grandes negros y los blancos grandes.



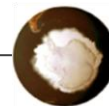
#### 5.6- TEST DE MANTEL

El modelo de aislamiento por distancia (IBD) se puso a prueba mediante un Test de Mantel, tomando como distancia geográfica entre poblaciones a la menor distancia lineal en km y la distancia genética utilizada fue la distancia de Nei y Li (1985). En ninguna de las especies antárticas se encontró correlación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica, lo que estaría indicando la ausencia de un patrón de aislamiento por distancia (TABLA III.14).

| Especie                       | R     | P    |
|-------------------------------|-------|------|
| <i>Aplidium falklandicum</i>  | -0,06 | 0,25 |
| <i>Cnemidocarpa verrucosa</i> | 0,043 | 0,67 |
| <i>Pyura bouvetensis</i>      | 0,05  | 0,66 |

**TABLA III.14:** Test de Mantel de correlación entre distancia genética y geográfica entre poblaciones en tres especies de ascidias antárticas.

\* $P < 0,05$



## 6 DISCUSIÓN

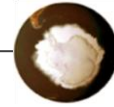
Este trabajo es el primero en abordar el análisis de la estructura genética poblacional de tres especies de ascidias para intentar dilucidar los patrones de dispersión de especies con diferentes características de sus ciclos de vida, en un ambiente costero Antártico. En este sentido, los ISSRs demostraron ser una herramienta de mucha utilidad para revelar la variabilidad genética y analizar la estructura genética poblacional, ya que pusieron de manifiesto altos niveles de polimorfismo.

### DIVERSIDAD GENÉTICA

En las ascidias antárticas *Aplidium falklandicum*, *Cnemidocarpa verrucosa* y *Pyura bouvetensis*, se obtuvieron distintos niveles de diversidad genética poblacional. *Pyura bouvetensis* y *Aplidium falklandicum* mostraron valores mayores de diversidad genética  $M$  que la especie *Cnemidocarpa verrucosa*. La diversidad  $M$  tuvo una correlación positiva con el aumento de la profundidad de muestreo (FIG. III.3) y esto se observó principalmente en las poblaciones muestreadas en la Isla Decepción. Resulta significativo el aumento de la diversidad a partir de los 150 m de profundidad. (TABLA III.7). Este patrón se podría adjudicar a una mayor estabilidad del sistema en las zonas más profundas, y esta estabilidad tendría un origen doble: la estabilidad térmica y salina por debajo de los 100 m de profundidad, y la ausencia de témpanos que causan erosión mecánica.

En cuanto a la estabilidad térmica y salina, las aguas superficiales antárticas sufren una variación estacional ya que interactúan con la atmósfera y la criósfera: se calientan y se vuelven menos salinas entrando al verano, y se enfrían y se vuelven más salinas entrando al invierno (Clarke *et al.*, 2007).

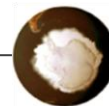




Esta capa de agua superficial llega hasta los 20 m de profundidad, y está influenciada por el intercambio con la atmósfera, la dinámica del hielo marino y las interacciones con las aguas profundas. Aproximadamente a los 100 m de profundidad se encuentra la capa superior de las aguas profundas circumpolares, que es relativamente más cálida, más rica en nutrientes y menos oxigenada que las capas más profundas y que las aguas superficiales. Además, en este sector de la Península Antártica, el extremo sur de la CCA colinda con la plataforma continental e impacta perpendicularmente en la plataforma, a diferencia del resto del continente en donde circula paralela a la costa, de la cual está, además, separada por giros subpolares. Esta proximidad de la CCA en este sector hace posible que la capa superior de las aguas profundas circumpolares fluyan sobre las plataformas, trayendo calor y nutrientes, teniendo grandes implicancias en la dinámica del hielo. Las aguas superficiales antárticas se calientan durante el verano y aumentan su volumen por el derretimiento del hielo invernal, y esta capa que llega en invierno hasta los 20 m se extiende hasta los 100 m durante el verano, y se vuelve más caliente y menos salina, siendo una zona de mezcla y turbulencia. Por lo tanto, los organismos que viven por encima de los 100 m de profundidad estarán influenciados por la variabilidad térmica estacional, mientras que aquellos que viven en zonas más profundas del lecho marino estarían en una zona térmicamente más estables (Klinck, 1998; Smith y Klinck, 2002).

En cuanto a los disturbios mecánicos por acción de los hielos, los mismos constituyen uno de los factores estructurantes de las comunidades bentónicas en las aguas someras de la plataforma antártica (Gutt y Starman, 2001). Los disturbios ocasionados por los témpanos son muy frecuentes y de efectos devastadores en su área de impacto, demostrando que las plataformas antárticas no son tan estables como se creía anteriormente (Peck *et al.*, 1999). El hielo actúa a escalas geológicas como un barredor de las comunidades sésiles durante los períodos de máxima glaciación, y a escalas ecológicas como un disturbio regional (Gutt, 2001; Clarke *et al.*, 2004; Gili *et al.*, 2006, Barnes y Conlan, 2007). Las marcas dejadas por la quilla de los témpanos más grandes pueden alcanzar kilómetros de largo y decenas de metros de ancho y alcanzar profundidades de hasta 200 m. Existe evidencia de que la erosión de los fondos reduce la diversidad y abundancia de especies. En áreas con una gran frecuencia de disturbios provocados por el hielo existe una diversidad de especies considerablemente menor que en áreas con menor impacto del hielo, y la recuperación de las comunidades es muy lenta (Brown *et al.*, 2004). Gutt y Piepenburg (2003) analizando videos del lecho marino a una escala local, encontraron que las comunidades donde el hielo no producía ningún disturbio eran más diversas que en los hábitats más disturbados.

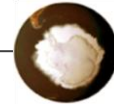
Smale *et al.* (2008) encontraron que la abundancia relativa de las especies con poca movilidad y sésiles era mayor con niveles bajos de disturbios ocasionados por el hielo. El hielo, por lo tanto, afecta la estructura de las comunidades bentónicas y afectaría también la diversidad genética de las poblaciones al



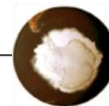
remover una considerable cantidad de biomasa, con la subsiguiente pérdida de individuos y alelos. Unos 18.000 km de costa antártica está constituida por hielo flotante (Drewry, 1982), y a lo largo de la Península Antártica se encuentran mayormente témpanos de 150-200 m de profundidad (Dowdeswell y Bamber, 2007). Las estaciones en la isla Low fueron muestreadas a profundidades inferiores o muy próximas a 100 m y por lo tanto serían más vulnerables a la erosión de los témpanos, que al remover los fondos y eliminar o dañar a los individuos, podrían estar causando fluctuaciones en el tamaño efectivo poblacional con la consiguiente pérdida de variabilidad genética. Las poblaciones de *Aplidium falklandicum* y *Pyura bouvetensis* muestreadas de las estaciones Dec1 y Dec2, por estar a mayor profundidad (250-400 m) sufrirían menos disturbios, lo que explicaría los niveles altos de diversidad genética observados. Demarchi *et al.* (2010) encontraron que otra población de *Aplidium falklandicum* de las Islas Orcadas del Sur, muestreada a 400 m de profundidad, también mostró un valor alto en el índice de diversidad genética M, incluso mayor al valor obtenido en la estación Decepción, muestreada a 250 m. Las poblaciones de *Cnemidocarpa verrucosa* están ubicadas a menor profundidad, y tuvieron los valores más bajos de diversidad en todas las poblaciones. Schüller (2011) encontró una correlación positiva entre la diversidad haplotípica y la profundidad en las poblaciones del poliqueto *Glycera kerguelensis* del Mar de Weddell. En las zonas profundas, al ser más estables que las aguas someras, sería menor la pérdida de diversidad genética debido a fluctuaciones poblacionales y a cuellos de botellas inducidos por el ambiente. Un tamaño efectivo grande junto con la estabilidad del ambiente permitiría a las poblaciones retener niveles más altos de polimorfismo ancestral, y tener más diversidad genética (Etter *et al.*, 2005).

Además de la profundidad de muestreo, las poblaciones de la Isla Decepción tienen una ventaja debido a su ubicación geográfica, ya que están protegidas de la CCA por una cadena de islas y fondos poco profundos que impiden el paso de los témpanos más grandes. Contrariamente, las poblaciones de la Isla Low (muestreadas a menor profundidad), están en el trayecto de la corriente, y expuestas directamente a la circulación de los témpanos grandes que se originan más al sur en el Mar de Ross. Como las estaciones más profundas son las ubicadas en la Isla Decepción, la ausencia de disturbios en las cercanías de la Isla Decepción se debería a una combinación de dos variables: su situación topográfica y batimétrica.

Además de la variación en la diversidad M observada en las poblaciones según la profundidad en las tres especies, se puede observar que los niveles de M en las tres poblaciones de *Cnemidocarpa verrucosa*, son considerablemente menores que en las otras dos especies. Este resultado podría explicarse por la historia de las glaciaciones en la Península Antártica que propició una expansión reciente del rango de distribución de esta especie. Durante las máximas glaciares el casquete polar se extendió a lo largo de la plataforma continental, y efectivamente removió el bentos de plataforma, ya sea por la



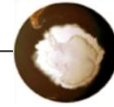
presencia de grandes masas de hielo hundido o por la erosión intensa causada por los témpanos. Estos disturbios ocurrieron a gran escala, y durante la última máxima glaciación (hace alrededor 10.000 años) el avance del hielo alcanzó el margen del talud continental en prácticamente toda la costa antártica (Anderson *et al.*, 2002; Thatje *et al.*, 2005). Esto hizo que las zonas más profundas alejadas de la plataforma se convirtieran en el único hábitat disponible que serviría de refugio para la fauna euribática. Aunque también existirían refugios disponibles en zonas de la plataforma como por ejemplo en el oeste de la Península Antártica, en el Estrecho de Bransfield (Thatje *et al.*, 2008). Este sitio habría sido un refugio glaciario importante para algunos organismos que expandieron su rango recolonizando la región de las Islas Shetland del Sur muy tempranamente, ya que la retracción glaciaria fue asincrónica y comenzó primero en el norte de la Península Antártica hace unos 18.000-14.000 años (Ingólfsson *et al.*, 1998; Heroy y Anderson 2005). El proceso de ciclos repetidos de expansión y retracción glaciaria ha sido denominado “bomba de diversidad antártica” (Clarke y Crame, 1989; 1992) por provocar eventos de especiación alopátrica importantes, y que sirven para explicar algunas de las radiaciones de invertebrados marinos en la Antártida. En los últimos 2,4 millones de años han ocurrido al menos 50-60 ciclos de períodos glaciares-interglaciares (Imbrie *et al.*, 1984; Tiedemann *et al.*, 1994). Especies como *Pyura bouvetensis* y *Aplidium falklandicum*, con reducida capacidad de dispersión de sus larvas, no serían los primeros colonizadores al terminar dichos ciclos. Con poca movilidad, parece probable que una población aislada en un refugio va a permanecer aislada aún cuando haya hábitats disponibles libres de hielo. Poblaciones de tamaño pequeño y períodos de aislamiento largos, habrían incrementado el rol de la deriva genética en la fijación de alelos. Al terminar cada ciclo glaciario, ocurriría un contacto secundario entre las poblaciones, y se mantendría la diversidad en la región. *Pyura bouvetensis* y *Aplidium falklandicum* tienen una tolerancia batimétrica mayor que *Cnemidocarpa verrucosa*, estando presente la primera hasta los 1.600 m de profundidad. Además, estas dos especies mostraron alelos exclusivos en las poblaciones más profundas de las estaciones Dec. Por el contrario, *Cnemidocarpa verrucosa* es una especie de menor tolerancia batimétrica, es más común en aguas poco profundas. Durante la máxima expansión glaciaria esta especie habría tenido que refugiarse en latitudes menores (por ejemplo en el Arco de Escocia), en donde el efecto de los hielos no fue tan drástico, y posteriormente en el período interglaciario recolonizar las zonas libres de hielo, teniendo a su favor una capacidad mayor de dispersión de sus larvas en comparación con las otras dos especies. Los bajos niveles de diversidad genética podrían ser también el reflejo de un efecto fundador, al recolonizar las zonas que fueron quedando libres de hielos, desde las latitudes menores que habrían funcionado como refugios en la Península Antártica.



## ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

Se encontró estructura genética poblacional significativa en las tres especies analizadas con AMOVA, y aunque el índice  $\Phi_{ST}$  fue significativo estadísticamente en todas las especies, en la especie solitaria ovulípara *Cnemidocarpa verrucosa* fue un orden de magnitud menor que en la especie colonial ovovivípara *Aplidium falklandicum* y que en la especie solitaria ovulípara *Pyura bouvetensis* (TABLAS III.8, III.10 y III.12). Un patrón similar se obtuvo con el análisis de sPCA (FIG. III.7) y en los mapas de paisajes genéticos construidos con AIS (FIG. III.4). En los mapas de paisajes genéticos se observaron picos de discontinuidad genética, que se pueden interpretar como zonas de barreras al flujo génico, entre todas las poblaciones a excepción del par Dec1 y Dec2 de la especie *Pyura bouvetensis*, ubicadas en el mismo valle de similitud genética. Entre las poblaciones Low1 y Low2 de la especie *Cnemidocarpa verrucosa* se reconoció un pico de discontinuidad genética, aunque menor que en las otras especies, probablemente debido a una sobreestimación de las diferencias, ya que el análisis trabaja con la interpolación de distancias genéticas y geográficas interindividuales en la grilla aún cuando no se tengan datos en esos puntos. No se obtuvo un patrón de aislamiento por distancia en ninguna de las tres especies. A esta escala (menor a 100 km) la distancia geográfica no sería un factor determinante en evitar el flujo génico, ya que poblaciones muy cercanas mostraron niveles de diferenciación genética similares a los de las poblaciones más alejadas.

El tiempo de vida libre de las larvas de *Cnemidocarpa verrucosa*, que puede alcanzar hasta 16 días (Strathmann *et al.*, 2006), le confiere mayor potencial de dispersión a esta especie, a diferencia de *Aplidium falklandicum* que incuba las larvas hasta que están maduras y una vez que eclosionan se fijan pronto en el sustrato. Además, *Cnemidocarpa verrucosa* tiene la capacidad de colonizar cualquier tipo de sustrato, y no es tan selectiva como las otras dos especies (Sahade, 1999; Sahade *et al.*, 2004). Para esta especie no habría discontinuidad del hábitat a pesar de haber parches de sustrato diferentes, y esto favorecería la existencia de poblaciones intermedias entre los sitios de muestreo, y por lo tanto, una mayor conectividad genética entre las mismas. Por su parte, la especie solitaria *Pyura bouvetensis* podría tener algún mecanismo de retención de las gametas para favorecer la fecundación, reconocido para otras especies del género *Pyura* (Clarke, *et al.*, 1999; Castilla *et al.*, 2007), o bien su período de desove podría estar acoplado al verano austral al igual que *P. setosa*, otro piúrido de las plataformas antárticas. En esta época del año la abundancia del zooplankton es mayor y las larvas estarían más expuestas a la predación (Sahade *et al.*, 1998). Dado que se conoce muy poco de esta especie, sería muy útil realizar en un futuro estudios de su biología reproductiva para verificar estas predicciones realizadas sobre la base de su estructura genética.

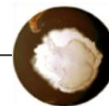


Los índices de diferenciación genética entre todos los pares de poblaciones fueron significativos en la especie *Aplidium falklandicum*, independientemente de la distancia geográfica (TABLA III.9). Esto es coincidente con una limitada capacidad de dispersión, ya que esta especie es incubadora (ovovivípara), y era predecible que muestre un flujo génico limitado aún a corta distancia. En la especie *Cnemidocarpa verrucosa* se observaron valores moderados de diferenciación genética entre las poblaciones más alejadas geográficamente (80 km) pero no hubo diferenciación entre las poblaciones Low<sub>1</sub> y Low<sub>2</sub> (TABLA III.11) situadas a 2 km de distancia, lo que demuestra un mayor potencial de dispersión de las larvas de esta especie en comparación con *Aplidium falklandicum*. Hoffman *et al.* (2010), también encontraron consistencia con la predicción que relaciona una mayor estructura genética en las especies con tiempos de vida larvales reducidos. Estudiaron dos moluscos antárticos con modos reproductivos contrastantes: un bivalvo con desarrollo directo (sin fase pelágica de vida libre) y un gastrópodo ovulíparo cuyas larvas pelágicas tienen una vida media de dos meses. Observaron niveles más altos de estructura genética en las poblaciones del bivalvo, mientras que el gastrópodo tuvo poblaciones panmícticas a lo largo de toda la Península Antártica. Los autores concluyen que este rasgo de la historia de vida es el principal determinante de la estructura genética poblacional de las especies marinas bentónicas.

Contrariamente a lo esperado, *Pyura bouvetensis* también solitaria y ovulípara, mostró diferenciación genética significativa entre todos los pares de poblaciones, con la excepción de las poblaciones Dec<sub>1</sub> y Dec<sub>2</sub> más separadas geográficamente (8 km) que las poblaciones Low<sub>1</sub> y Low<sub>3</sub> (3,5 km) (TABLA III.13). Las poblaciones Dec<sub>1</sub> y Dec<sub>2</sub> son las más profundas, entre 200 y 400 m, y la ausencia de estructuración genética entre ellas sería un reflejo de la estabilidad de los ambientes más profundos, tal como lo demuestran algunos autores. Por ejemplo, Etter *et al.* (2005) estudiaron los patrones de diferenciación poblacional de 4 especies de bivalvos, distribuidos en un gradiente de profundidades en el Atlántico Norte, y encontraron que los niveles de estructura genética poblacional eran más altos en las zonas menos profundas.

Cuando se sumaron a las poblaciones de *Aplidium falklandicum* muestras obtenidas en el Arco de Escocia, en las Islas Georgias del Sur y Orcadas del Sur (Demarchi *et al.*, 2010), se obtuvo un índice de diferenciación mucho más alto ( $\Phi_{ST} = 0,405$ ;  $P < 0,05$ ) que entre las 3 poblaciones del Estrecho de Bransfield. Con un índice de diferenciación tan alto sería pertinente ampliar el estudio utilizando otros marcadores a fin de explorar la posible existencia de especies crípticas. Además, esto sugiere que a pesar de existir la CCA, que serviría para mantener la homogeneidad genética entre las poblaciones, en *Aplidium falklandicum* la breve duración de la fase plantónica no alcanzaría a mantener el flujo génico. Durante mucho tiempo, en numerosos estudios biogeográficos

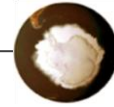




importantes, esta corriente junto con la Corriente Costera Antártica (que circula en sentido contrario) fue considerada como un medio de dispersión para las especies con fase de vida pelágica, (Clarke y Johnston, 2003; De Broyer *et al.*, 2007; Linse *et al.*, 2006; Peña Cantero y Gili, 2006; Griffiths *et al.*, 2009). Estos autores se basaron inevitablemente en la definición morfológica de especie, ya que los estudios genéticos de variabilidad intraespecífica eran escasos en el Océano Antártico. Sin embargo, durante los últimos años salieron a la luz muchos trabajos que contradicen la idea de especies “anulares” o “circumpolares” con supuesto rango de distribución amplio, y el efecto homogeneizador de la CCA. Allcock *et al.* (2011) estudiaron al género de pulpos *Pareledone*, endémicos del Océano Antártico. En este grupo se consideraba que existían dos especies con diferencias morfológicas claras. Sin embargo, encontraron que en este género existían al menos 11 especies crípticas, siendo una de ellas de distribución cuasi-circumpolar aunque con flujo génico restringido. Brandão *et al.* (2010) establecieron que las 5 especies de ostrácodos del género *Macroscapha* consideradas circumpolares y euribáticas, son en realidad 20 morfoespecies con rangos de distribución muy acotados geográficamente y batimétricamente. Krabbe *et al.* (2010) sugirieron tomar con cautela la definición de circumpolar para el género *Colossendeis*, el crinoideo más abundante del Océano Antártico y subantártico, ya que reconocieron al menos 5 linajes mitocondriales crípticos. Así como lo predijo Knowlton (1993; 2000) para todos los ambientes marinos, a medida que se incrementa el esfuerzo de muestreo y la aplicación de herramientas moleculares, se revelarán cada vez más especies crípticas en el Océano Antártico.

El análisis de asignación de individuos a diferentes grupos genéticos en cada localidad (FIG. III.6-A) identificó dos grupos genéticos en la especie *Aplidium falklandicum*, y mostró que en las tres poblaciones convergen individuos que pertenecen a ambos grupos. Este resultado podría ser el reflejo de un proceso de colonización desde diferentes refugios glaciares: poblaciones que se refugiaron en aguas más profundas durante las máximas glaciares, habrían colonizado al retirarse los hielos las áreas que ocupan en su distribución actual. La subsecuente expansión desde estos refugios habría permitido un contacto secundario entre poblaciones aisladas durante mucho tiempo. En la especie *Pyura bouvetensis* (FIG. III.6-B) también se obtuvo un valor de  $K=2$ , aunque en las poblaciones Dec1 y Dec2 la probabilidad de pertenencia de todos los individuos al grupo genético 1 es casi del 100%, sugiriendo que no ocurrió contacto secundario. Los individuos de Low1 y Low2 tuvieron un porcentaje alto de pertenencia al grupo genético 2, aunque con un poco más de mezcla. Esto sugiere que la estructura genética identificada se debería a un factor batimétrico, las poblaciones más profundas con todos los individuos relacionados al grupo 1 y las poblaciones menos profundas con la mayor parte de los individuos pertenecientes al grupo 2. Este patrón podría estar indicando la cercanía a refugios glaciares de profundidad de las poblaciones Dec1 y Dec2, lo que es coincidente también con los niveles altos de diversidad genética

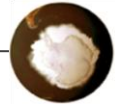




encontrados, mientras que las poblaciones de  $Low_1$  y  $Low_2$ , menos profundas, habrían recibido migrantes que fueron colonizando las zonas liberadas de hielo desde diferentes refugios glaciares. En la especie *Cnemidocarpa verrucosa* no se detectó estructura genética con este análisis, se obtuvo  $K=1$ , esto apoyaría la hipótesis de un evento de expansión reciente. Esta especie no es euribática, por lo tanto durante la máxima glaciación no habría tenido la oportunidad de permanecer en los refugios más profundos, siendo su única posibilidad la de subsistir en la región del Arco de Escocia y en latitudes menores en el norte de la Península Antártica, donde los hielos no afectaron tanto a la plataforma continental. Posterior al retroceso de los hielos y al tener un mayor potencial de dispersión dado por su modo reproductivo ovulíparo, sería un colonizador más eficiente que las otras dos especies.

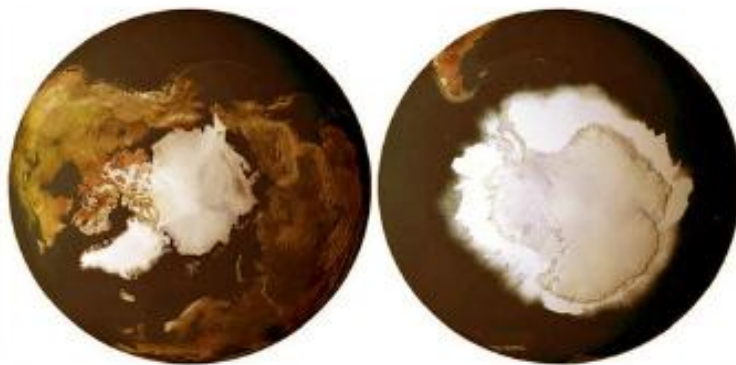
La Isla Decepción es una isla semicircular en cuyo centro se encuentra la caldera de un volcán sumergido, Puerto Foster. Este volcán ha hecho erupción en varias oportunidades, la más reciente en el año 1970, haciendo de este ambiente un sitio ideal para observar los patrones de recolonización de la fauna bentónica luego de un disturbio de gran magnitud (Sáiz-Salinas *et al.*, 1998; Barnes *et al.*, 2008). La diversidad y abundancia de especies del macrozoobentos es considerablemente menor que en otras islas del archipiélago de las Islas Shetland del Sur, y las primeras especies registradas en llegar al sistema son especies con gran potencial de dispersión: equinodermos y gastrópodos con larvas planctotróficas, nemertinos y ofiuros. Entre las ascidias se mencionan 4 especies solitarias entre ellas a *Cnemidocarpa verrucosa* (Cranmer *et al.*, 2003; Barnes *et al.*, 2008). Esto es un indicio de la mayor eficiencia de esta especie en colonizar en poco tiempo nuevos ambientes en comparación con *Pyura bouvetensis* y *Aplidium falklandicum*. Otro ejemplo que apoya esta hipótesis, es lo que sucede en las plataformas de la isla volcánica Bouvetøya, que tiene una edad geológica estimada en 1 millón de años (Prestvik y Winsnes, 1981). Es la isla más remota de todo el planeta, la más alejada de todas las plataformas continentales, encontrándose sobre la Cordillera Dorsal Meso-Atlántica, entre África y la Antártida al sur del Frente Polar, rodeada por profundidades abisales. La ascidiofauna de Bouvetøya es bastante pobre en comparación con otras islas subantárticas: la componen solamente 7 especies euribáticas, entre las cuales están citadas *Pyura bouvetensis* y *Aplidium falklandicum* (Arntz *et al.*, 2006; Primo y Vázquez, 2009). Estos ejemplos explicarían la mayor eficiencia de *Cnemidocarpa verrucosa* en colonizar en poco tiempo zonas poco profundas, y sugiere que *Aplidium falklandicum* y *Pyura bouvetensis* podrían habitar en profundidades mucho mayores que las reportadas hasta el momento y de esta manera haber colonizado esta isla tan remota, proceso mucho más lento y que va más allá de una escala temporal ecológica reciente.

Lamentablemente los marcadores moleculares utilizados no permiten poner a prueba la hipótesis sobre los patrones de colonización luego del último máximo



glaciar, por lo que sería muy interesante en un futuro emplear otros marcadores con una resolución temporal tal, que permita identificar los centros de refugio durante las glaciaciones y dilucidar los patrones de colonización de estas especies en los períodos interglaciares. En este sentido sería importante realizar muestreos más extendidos a lo largo de toda la Península Antártica y del Arco de Escocia, para identificar las rutas de colonización y los rangos de distribución actuales de estas especies.

## CAPÍTULO IV CONCLUSIONES





Es aceptado ampliamente que ciertas características de los ciclos biológicos de los vertebrados y de los invertebrados marinos sésiles como, por ejemplo, el tipo de larva y su duración, pueden estar correlacionadas con la capacidad de dispersión de este organismo y pueden *a priori* determinar el rango de distribución de los mismos y su estructura genética poblacional (Mayr, 1954; Scheltema, 1968; Palumbi, 1994; Shulman, 1998; Hellberg *et al.*, 2002; Shanks, *et al.*, 2003a; Paulay y Meyer, 2006; Hoffman *et al.*; 2011). Muchos trabajos de las últimas décadas reportan excepciones a estas predicciones, ya sea demostrando que especies marinas con un potencial de dispersión aparentemente limitado por su estrategia larval, muestran muy poca subdivisión poblacional (Hedgecock, 1986; France *et al.*, 1992; Imron *et al.*, 2007; Miller y Ayre, 2008), o bien especies con un amplio rango de distribución presentan una marcada división en subpoblaciones (Burton y Feldman, 1982; Porter *et al.*, 2002).

El desarrollo larval y las condiciones oceanográficas no son suficientes para predecir el potencial de dispersión de una especie, existen otros factores como el comportamiento de las larvas, la estacionalidad reproductiva, las condiciones ambientales de un microhábitat, la selección y los eventos históricos, que tienen un rol importante en la determinación de la estructura genética actual de las poblaciones (Bowen *et al.*, 2006; Severance y Karl; 2006; Bird *et al.*, 2007; Miller y Ayre, 2008).

De los resultados obtenidos en este trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:



Los niveles de diversidad genética en las tres especies de ascidias árticas estudiadas están correlacionados con factores generadores de estrés y vinculados a la retracción de los glaciares que, a su vez, responden al proceso de calentamiento global. En este sentido, se detectó una menor diversidad genética en zonas más próximas a los frentes glaciares donde existe una mayor carga de sedimentos inorgánicos en suspensión, lo que genera una menor disponibilidad de alimentos por el efecto de dilución. Por consiguiente, es posible que un proceso a escala global como el cambio climático esté influenciando los patrones de diversidad genética encontrados en las especies estudiadas.



La hipótesis que relaciona al potencial de dispersión y el grado de flujo génico de las especies sésiles con sus estrategias larvales, o el tiempo que éstas permanecen en la columna de agua, no fue corroborada en todos los casos de las especies estudiadas en Kongsfjord. La estructura genética poblacional no fue la esperada en función del tipo larval. Aunque, en cambio, fue acorde a lo esperado en un sistema geológicamente joven que se encuentra en las primeras etapas de



colonización, como son las plataformas del Océano Ártico. La especie *Styela rustica* (solitaria y ovulípara) no mostró estructuración genética en sus poblaciones, concordante con el tipo de desarrollo larval y su potencial de dispersión. *Boltenia echinata* (solitaria y ovovivípara) tampoco mostró estructuración genética en sus poblaciones, patrón inesperado para una especie con limitado potencial de dispersión. A su vez, *Boltenia echinata* sería una especie colonizadora eficiente por reproducirse principalmente en invierno, comportamiento que evitaría la presión de predación fuerte del verano e incrementaría el éxito de reclutamiento. *Halocynthia pyriformis* (solitaria y ovulípara) mostró estructuración genética significativa en sus poblaciones, contrariamente a lo esperado para una especie con fecundación externa y tiempo de vida libre de las larvas similar a *Styela rustica*. Al tener su período reproductivo acoplado al verano boreal, la mayor intensidad en la predación sobre las larvas podría hacer que el reclutamiento sea menor que en las otras dos especies, haciendo de esta especie una colonizadora menos eficiente.



La diversidad genética en las poblaciones de las ascidias antárticas estuvo relacionada con la profundidad, siendo mayor a profundidades de 200-400 m. Este patrón podría deberse a que existe mayor estabilidad ambiental a profundidades mayores, y no habría tantos disturbios físicos como la erosión mecánica de los témpanos que es muy frecuente en las plataformas de aguas someras. Por consiguiente, se mantendrían poblaciones de tamaño efectivo grande, en donde la pérdida de variabilidad por efecto de la deriva génica no sería tan drástica.



La estructura genética poblacional de las ascidias antárticas fue la esperada según su desarrollo larval y el potencial de dispersión en casi todas las especies, como así también para un sistema como las plataformas antárticas con una larga historia de glaciaciones y aislamiento de su biota. La especie *Aplidium falklandicum* (colonial y ovovivípara) mostró una estructuración genética fuerte, según lo esperado por el limitado potencial de dispersión de sus larvas de vida corta. La especie *Cnemidocarpa verrucosa* (solitaria y ovulípara) también mostró una estructura genética significativa a pesar de que sus larvas tienen mayor potencial de dispersión que *Aplidium falklandicum*. Sin embargo, la magnitud de la diferenciación fue un orden menor que en esta última. Entre las poblaciones más próximas no hubo diferenciación significativa, sugiriendo que el tiempo de vida medio de 16 días de sus larvas alcanzaría para mantener el flujo génico a distancias de 2km. La especie *Pyura bouvetensis* (solitaria y ovulípara) tuvo una estructura genética mayor que las otras dos especies, aún teniendo un modo reproductivo que le aseguraría un mayor potencial de dispersión. Posiblemente otras características de su ciclo de vida tengan mayor influencia que el modo reproductivo en la capacidad de dispersión de esta especie.



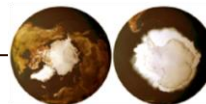
En conclusión, el presente trabajo representa un primer intento de estudiar, en forma comparada en los océanos polares, los patrones de estructura genética poblacional de especies que son importantes elementos faunísticos del bentos de las plataformas árticas y antárticas como son las ascidias.

En algunas de las especies de ascidias analizadas en la presente tesis doctoral se observaron patrones de estructuración genética que no siempre pueden predecirse según el tipo de desarrollo larval, y que en algunos casos estuvieron relacionados a estrategias de colonización de un ambiente nuevo, o relacionados a la historia evolutiva y geológica de un determinado ecosistema. Se puede generalizar que en las plataformas del Océano Antártico las poblaciones están más fuertemente estructuradas genéticamente que en las plataformas del Ártico, respondiendo principalmente a las estrategias reproductivas y al potencial de dispersión de los propágulos. Los ambientes costeros antárticos, en cambio, sostienen comunidades muy diversas y complejas, con altos niveles de competencia e interacciones entre las especies; se trata de las llamadas “comunidades maduras ó biológicamente acomodadas de k-estrategas”, en donde el reclutamiento de los nuevos individuos es un proceso muy dificultoso (Dayton *et al.*, 1994; Teixidó *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 2004; Gili *et al.*, 2006). Estas comunidades tuvieron la oportunidad de establecerse a lo largo de tiempos geológicos bajo condiciones ambientales estables, debido principalmente al establecimiento del Frente Polar y la Corriente Circumpolar Antártica hace unos 20 millones de años, que mantuvieron un aislamiento biogeográfico y condiciones estables de temperatura y producción primaria y con un efecto reducido de las glaciaciones. Contrariamente, en el Ártico, las glaciaciones del Cuaternario impactaron fuertemente devastando al ecosistema, que comenzó a ser recolonizado recientemente por especies con ciertas características de su ciclo de vida y capacidad de adaptación que favorecerían su dispersión. Sin embargo, a nivel local, el disturbio del hielo es muy importante en ambos polos como factor estructurante de la diversidad genética en las poblaciones, ya sea en forma de témpanos que erosionan las zonas poco profundas o el efecto de los factores relacionados a la retracción de los glaciares. Algunos autores estiman que el efecto de la erosión de los témpanos se intensificará en las regiones costeras Antárticas que están experimentando los efectos del calentamiento global, y la estructura de las comunidades bentónicas y la diversidad se verán considerablemente amenazadas por un cambio en la presión de los disturbios. Esto ocurriría a una escala ecológica limitada, pero a una mayor escala (siglos) se pronostica una disminución drástica de los disturbios causados por hielos, ya que los glaciares de la Península Antártica experimentarán un retroceso tierra adentro, hasta más allá de la línea de costa, y no descargarán los témpanos en el agua (Clarke *et al.*, 2007; Clarke y Crame, 2010).

### ***Cambio climático y predicciones***

El cambio climático está teniendo un impacto significativo en los sistemas marinos y terrestres y continuará teniendo implicancias en la diversidad biológica (Hughes *et al.*, 2000; Walther *et al.*, 2002). Las especies marinas son particularmente





vulnerables a estos cambios, aún cuando el calentamiento es más evidente en el aire que en los mares. Las regiones polares están sufriendo estos cambios más rápido que cualquier otro lugar, especialmente en el Mar de Beaufort en el ártico y en el oeste de la Península Antártica, en donde los registros de los últimos 50 años indican que el aumento de la temperatura es más rápido que en otras partes del continente (Vaughan *et al.*, 2001; Vaughan *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2005).

Los registros climáticos tomados de mediciones de isótopos del oxígeno en núcleos de hielo de Groenlandia y Antártida, revelan en detalle los cambios atmosféricos de los últimos 7 ciclos glaciares, y esto permite enmarcar los registros actuales en un contexto más amplio que incluye 800.000 años de historia. A pesar de que en el último período interglaciar el planeta experimentó temperaturas más altas que las actuales, los niveles de CO<sub>2</sub> en la atmósfera tienen concentraciones sin precedentes en los últimos 20 millones de años y siguen aumentando rápidamente (King *et al.*, 2003; Raupach *et al.*, 2007).

Las predicciones sobre los efectos que pueda tener el aumento de la temperatura en la composición de las comunidades y en la dinámica del hielo en los dos sistemas polares son muy diferentes. La pérdida del hielo ártico sería muy rápida; algunos modelos indican que estaría libre de hielo durante los meses de verano para el año 2050 (Johannessen y Miles, 2000; Comiso *et al.*, 2008; Weslawki *et al.*, 2011). El hielo en la costa, ya sea el pie de hielo o el hielo anual, reduce el impacto del oleaje en las comunidades de plataforma, y la pérdida de esta protección aumentaría la exposición y generaría erosión y turbidez en las costas (Rachold *et al.*, 2004). Además se incrementaría el aporte de agua dulce y la sedimentación de materiales inorgánicos. Los cambios en la diversidad de los ecosistemas bentónicos dependerán de qué tan conectados estén éstos con los ecosistemas boreales, a aquellas áreas que estén abiertas al intercambio de propágulos y larvas llegarán nuevas especies que expandirán su distribución más al norte y desplazarán a las preexistentes. El principal mecanismo que dispararía estos cambios es la transferencia directa de propágulos por la intensificación de las corrientes Oeste de Spitsbergen y del Atlántico Norte, que importarían nuevas especies. Aparecerán nuevos patrones de distribución de las especies a medida que las especies boreales invadan las aguas del norte, y compitan con las residentes, que son similares funcionalmente. Como muchas especies árticas están muy emparentadas con otras de distribución más boreal, aún comparten características ecológicas muy similares, por lo tanto competirían directamente por el mismo hábitat y los mismos recursos. En un corto plazo se espera un aumento de la diversidad, sin embargo con el tiempo se estabilizaría como resultado de las relaciones de competencia y predación (Beuchel *et al.*, 2006). Los cambios que se pronostican no erradicarían a la fauna bentónica, pero generaría cambios irreversibles en la estructura y función del Océano Ártico conocido hasta hoy (Weslawski *et al.*, 2011).



A diferencia de las plataformas del Ártico, las condiciones físicas en la Península Antártica fueron mucho más estables históricamente, y la fauna que evolucionó *in situ* sería mucho más sensible al aumento de la temperatura (Barnes y Peck, 2008). Algunos experimentos de laboratorio están confirmando que las especies más comunes de las plataformas poco profundas son estenotermas (Peck, 2005), pequeñas diferencias en la temperatura de un grado o dos, tendrían grandes impactos en la fisiología de estos organismos así como también en la extensión del hielo marino, y por lo tanto en la historia de vida y biología de muchas especies (Barnes y Peck, 2008).

Los patrones actuales de biodiversidad y distribución son una consecuencia de procesos que han actuado a escalas evolutivas y ecológicas. Entre los factores químicos y físicos que controlan la distribución de las faunas polares modernas, los más importantes son la erosión de los témpanos, la topografía, el tipo de sustrato, las temperaturas, las corrientes, la cobertura de hielo, el oxígeno, la luz, los vientos y los nutrientes. Además de estar estrechamente interconectados, algunos de estos factores no son constantes, y varían en un rango de escalas temporales, desde menos de un día hasta interanualmente.

Esta variabilidad es de fundamental importancia en la dinámica de estos ecosistemas y pueden ocurrir cambios impredecibles e irreversibles si estos patrones de variabilidad son alterados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Abbot P. (2001). Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science*, 1: 8.
- Abbott DP. (1975). Phylum Chordata: introduction and Urochordata. In: Smith RI, Carlton JT (eds.) *Lights manual: intertidal invertebrates of the central California coast*, 3rd edn. University of California Press, Berkeley, p 638–655.
- Allcock AL, Barratt I, Eléaume M, Linse K, Norman MD, Smith PJ, Steinke D, Stevens DW, Strugnel JM. (2011). Cryptic speciation and the circumpolarity debate: A case study on endemic Southern Ocean octopuses using the COI barcode of life. *Deep-Sea Research II*, 58: 242–249.
- Anderson JB, Shipp SS, Lowe AL, Wellner JS, Mosola AB. (2002). The Antarctic ice sheet during the last glacial maximum and its subsequent retreat history: a review. *Quaternary Science Reviews*, 22: 49–70.
- Armsworthy SL, MacDonald BA, Ward JE. (2001). Feeding activity, absorption efficiency and suspension feeding processes in the ascidian, *Halocynthia pyriformis* (Stolidobranchia: Ascidiacea): responses to variations in diet quantity and quality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 260: 41–69.
- Arntz WE, Brey T, Gallardo VA. (1994). Antarctic zoobenthos. *Advances in Marine Biology*, 32: 241–304.
- Arntz WE, Thatje S, Gerdes D, Gili J-M, Gutt J, Montiel A, Orejas C, Teixidó N. (2005). The Antarctic-Magellan connection: macrobenthos ecology on the shelf and upper slope, a progress report. (K). *Scientia Marina*, 69(2): 237–269.
- Arntz WE, Thatje S, Linse K, Avila C, Ballesteros M, Barnes DKA, Cope T, Cristobo FJ, De Broyer C, Gutt J, Isla E, López-González P, Montiel A, Munilla T, Ramos Esplá AA, Raupach M, Rauschert M, Rodríguez E, Teixidó N. (2006). Missing link in the Southern Ocean: sampling the marine benthic fauna of remote Bøvet Island. *Polar Biology*, 29: 83–96.
- Aronson RB, Blake DB. (2001). Global climate change and the origin of modern benthic communities in Antarctica. *American Zoologist*, 41:27–39.
- Arrigo KR, Thomas DN. (2004). Large-scale importance of sea ice biology in the Southern Ocean. *Antarctic Science*, 16: 471–486.
- Avise JC. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Ayre DJ, Davis AR, Billingham M, Llorens T, Styan C. (1997). Genetic evidence for contrasting patterns of dispersal in solitary and colonial ascidians. *Marine Biology*, 130: 51–61.
- Ayre DJ, Hughes TP. (2000). Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the Great Barrier Reef, Australia. *Evolution*, 5: 1590–1605.
- Baird HP, Miller KJ, Stark JS. (2011). Evidence of hidden biodiversity, ongoing speciation and diverse patterns of genetic structure in giant Antarctic amphipods. *Molecular Ecology*, 20(16): 3439–3454.

- Barnes DKA, Conlan KE. (2007). Disturbance, colonization and development of Antarctic benthic communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.*, 362:11-38.
- Barnes DKA, Griffiths HG. (2008). Biodiversity and biogeography of southern temperate and polar bryozoans. *Global Ecology and Biogeography*, 17: 84-99.
- Barnes DKA, Hodgson DA, Convey P, Allen CS, Clarke A. (2006). Incursion and excursion of Antarctic biota: past, present and future. *Global Ecology and Biogeography*, 15: 121-142.
- Barnes DKA, Linse K, Enderlein P, Smale D, Fraser KPP, Brown M. (2008). Marine richness and gradients at Deception Island, Antarctica. *Antarctic Science*, 20: 271-280.
- Barnes DKA, Peck LS. (2008). Vulnerability of Antarctic shelf biodiversity to predicted regional warming. *Climate Research*, 37: 149-163.
- Barnes DKA, Rothery P, Clarke A. (1996). Colonisation and development in encrusting communities from the Antarctic intertidal and sublittoral. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 196(1-2): 251-265.
- Barnes PW, Lien R. (1988). Icebergs rework shelf sediments to 500 m of Antarctica. *Geology*, 16:1130-1133.
- Barnes R. (1996). *Zoología de los Invertebrados*. Sexta edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. pp.: 929-975.
- Bates WR. (2005). Environmental factors affecting reproduction and development in ascidians and other protochordates. *Canadian Journal of Zoology*, 83: 51-61.
- Bay LK, Crozier RH, Caley MJ. (2006). The relationship between population genetic structure and pelagic larval duration in coral reef fishes on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 149(5), 1247-1256.
- Ben-Shlomo R, Douek J, Rinkevich B. (2001). Heterozygote and chimerism in remote populations of a colonial ascidian from New Zealand. *Marine Ecology Progress Series*, 209:109-117.
- Ben-Shlomo R, Paz G, Rinkevich B. (2006). Postglacial-period and recent invasions shape the population genetics of botryllid ascidians along European Atlantic coasts. *Ecosystems*, 9: 1118-1127.
- Berkeley SA, Chapman C, Sogard SM. (2004). Maternal age as a determinant of larval growth and survival in a marine fish, *Sebastes melanops*. *Ecology*, 85:1258-1264.
- Bernatchez L, Wilson CC. (1998). Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology*, 7: 431-452.
- Beuchel F, Gulliksen B, Carroll ML. (2006). Long-term patterns of rocky bottom macrobenthic community structure in an Arctic fjord (Kongsfjorden, Svalbard) in relation to climate variability (1980-2003). *Journal of Marine Systems*, 63: 35-48.
- Bird CE, Holland BS, Bowen BW, Toonen RJ. (2007). Contrasting phylogeography in three endemic Hawaiian limpets (*Cellana spp.*) with similar life histories. *Molecular Ecology*, 16: 3173-3186.

- Bleil U, Thiede J. (1990). The geological history of Cenozoic polar oceans: Arctic versus Antarctic—an introduction. In: Bleil U, Thiede J (eds) Geological history of Cenozoic polar oceans: Arctic versus Antarctic. Kluwer, Dordrecht, pp 1–8.
- Bock DG, MacIsaac HJ, Cristescu ME. (2012). Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proceedings of the Royal Society B*, 297: 2377–2385.
- Bornet B, Branchard M (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biological Reports*, 19: 209–215.
- Bossart JL, Prowell DP. (1998). Genetic estimates of population structure and gene flow: Limitations, lessons and new directions. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 202–206.
- Bourque D, Davidson J, MacNair NG, Arsenault G, LeBlanc AR, Landry T, Miron G. (2007). Reproduction and early life history of an invasive ascidian *Styela clava* Herdman in Prince Edward Island, Canada. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 342: 78–84.
- Bowen BW, Bass AL, Muss A, Carlin JL, Robertson DR. (2006). Phylogeography of two Atlantic squirrelfishes (Family Holocentridae): exploring links between pelagic larval duration and population connectivity. *Marine Biology*, 149: 899–913.
- Bradbury IR, Laurel B, Snelgrove PVR, Bentzen P, Campana SE. (2008). Global patterns in marine dispersal estimates: the influence of geography, taxonomic category and life history. *Proceedings of the Royal Society B*, 275: 1803–1809.
- Brandão SN, Sauer J, Schön I. (2010). Circumantarctic distribution in Southern Ocean benthos? A genetic test using the genus *Macroscapha* (Crustacea, Ostracoda) as a model. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 1055–1069.
- Brey T, Dahm C, Gorny M, Klages M, Stiller M, Arntz W. (1996). Do Antarctic benthic invertebrates show an extended level of eurybathy? *Antarctic Science*, 8(1):3–6.
- Brochmann C, Gabrielsen TM, Nordal I, Landvik JY, Elven R. (2003). Glacial survival or tabula rasa? The history of North Atlantic biota revisited. *Taxon*, 52: 417–450.
- Brown KM, Fraser KPP, Barnes DKA, Peck LS. (2004). Links between the structure of an Antarctic shallow water community and ice-scour frequency. *Oecologia*, 141: 121–129.
- Bruford ME, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T. (1992). Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel, A.R. (Ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach*. Oxford University Press, p. 228.
- Brusca RC, Brusca G J. (2003). *Invertebrates*. United States of America, Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Burighel P, Cloney RA. (1997). Urochordata: Ascidiacea. In: Harrison, F.W., Ruppert, E.E. (Eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates*, vol. 15. Wiley-Liss, New York, pp. 221–347.



- Burton RS, Feldman MW. (1982). Population genetics of coastal and estuarine invertebrates: does larval behavior influence population structure? Pp. 537-551 in V.S. Kennedy, eds. Estuarine comparisons. Academic Press, New York.
- Cartes JE, Sorbe JC, Sarda F. (1994). Spatial distribution of deep-sea decapods and euphausiids near the bottom in the northwestern Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 179: 131-144.
- Castilla JC, Manríquez PH, Delgado AP, Gargallo L, Leiva A, Radic D. (2007). Bio-foam enhances larval retention in a free-spawning marine tunicate. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104(46): 18120-18122.
- Casu M, Casu D, Lai T, Cossu P, Curini-Galletti M. (2007). A molecular tool for genetic surveys in the red coral (*Corallium rubrum*): An Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs) perspective. *Biochemistry and Systematics Ecology*. doi:10.1016/j.bse.2007.08.011.
- Ceplitis A. (2001). The importance of sexual and asexual reproduction in the recent evolution of *Allium vineale*. *Evolution*, 55: 1581-1591.
- Clarke A. (1996). The distribution of Antarctic marine benthic communities. *Antarctic Research Series*, 70: 219-230.
- Clarke A. (2008). Antarctic marine benthic diversity: patterns and processes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 366: 48-55. doi:10.1016/j.jembe.2008.07.008).
- Clarke A, Aronson RB, Crame JA, Gili J-M, Blake DB. (2004). Evolution and diversity of the benthic fauna of the Southern Ocean continental shelf. *Antarctic Science* 16(4): 559-568.
- Clarke A, Barnes DKA, Hodgson DA. (2005). How isolated is Antarctica? *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 1-3.
- Clarke A, Crame JA. (1989). The origin of the Southern Ocean marine fauna. In: Crame, J.A. (Ed.). *Origins and Evolution of the Antarctic Biota*. The Geological Society, London, pp. 253-268.
- Clarke A, Crame JA. (1992). The Southern Ocean benthic fauna and climate change: a historical perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 338: 299-309.
- Clarke A, Crame JA. (2010). Evolutionary dynamics at high latitudes: speciation and extinction in polar marine faunas. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365: 3655-3666.
- Clarke A, Johnston IA. (1996). Evolution and adaptive radiation of Antarctic fishes. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 212-218.
- Clarke A, Johnston NM. (2003). Antarctic marine benthic diversity. *Oceanography and Marine Biology*, 41: 47-114.
- Clarke A, Murphy EJ, Meredith MP, King JC, Peck LS, Barnes DKA, Smith RC. (2007). Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*: 362, 149-166.

- Clarke M, Ortiz V, Castilla JC. (1999). Does early development of the Chilean tunicate *Pyura preputialis* (Heller, 1878) explain the restricted distribution of the species? *Bulletin of Marine Science*, 65(3): 745-754.
- Cockerham CC. (1973). Analyses of gene frequencies. *Genetics*, 74: 679-700.
- Comes HP, Kadereit JW. (1998). The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science*, 3: 432-438.
- Comiso JC, Parkinson CL, Gersten R, Stock L. (2008). Accelerated decline in the Arctic sea ice cover, *Geophysical Research Letters*, 35, L01703, doi:10.1029/2007GL031972.
- Cook AJ, Fox AJ, Vaughan DG, Ferrigno JG. (2005). Retreating Glacier Fronts on the Antarctic Peninsula over the Past Half-Century. *Science*, 308: 541-544.
- Cottier FR, Tarling GA, Wold A, Petersen SF. (2006). Unsynchronized and synchronized vertical migration of zooplankton in a high arctic fjord. *Limnology and Oceanography*, 51(6): 2586-2599.
- Cowen RK, Lwiza KMM, Sponaugle S, Paris CB, Olson DB. (2000). Connectivity of Marine Populations: Open or Closed? *Science*, 287: 857-859.
- Cowen RK, Sponaugle S. (2009). Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*. 1: 443-66.
- Coyer JA, Peters AF, Stam WT, Olsen JL. (2003). Post-ice age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Phaeophyceae; Fucaceae) populations in Northern Europe. *Molecular Ecology*, 12(7): 1817-1829.
- Crame JA. (1999). An evolutionary perspective on marine faunal connections between southernmost South America and Antarctica. *Scientia Marina*, 63(1): 1-14.
- Cranmer TL, Ruhl HA, Baldwin RJ, Kaufmann RS. (2003). Spatial and temporal variation in the abundance, distribution and population structure of epibenthic megafauna in Port Foster, Deception Island. *Deep-Sea Research II*, 50: 1821-1842.
- Crisp DJ. (1976). Settlement responses in marine organisms. Pp. 83-124 in *Adaptation to Environment: Essays on the Physiology of Marine Animals*, R.C. Newell, ed., Butterworths, London.
- Curtis MA. (1975). The marine benthos of Arctic and sub-Arctic continental shelves. A review of regional studies and their general results. *Polar Research*, 17: 595-626.
- Dahlgren TG, Weinberg JR, Halanych KM. (2000). Phylogeography of the ocean quahog (*Arctica islandica*): influences of paleoclimate on genetic diversity and species range. *Marine Biology*, 137: 487-495.
- Dannewitz J, Maes GE, Johansson L, Wickstrom H, Volckaert FAM, Jarvi T. (2005). Panmixia in the European eel: a matter of time. . . *Proceedings of the Royal Society B- Biological Sciences*, 272: 1129-1137.
- Darling KF, Wade CM, Stewart IA, Kroon D, Dinglek R, Brown AJL. (2000). Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. *Nature*, 405: 43-47.
- Dayton PK. (1990). Polar benthos. In: WE Smith (ed) *Polar Oceanography, part B: Chemistry, Biology and Geology*. Academic Press, London pp 631-685.

- Dayton PK, Mordida BJ, Bacon F. (1994). Polar marine communities. *American Zoologist*, 34: 90-99.
- Dayton PK, Robilliard GA, Paine RT, Dayton LB. (1974). Biological accommodation in the benthic community at McMurdo Sound, Antarctica. *Ecological Monographs*, 44: 105-128.
- De Aranzamendi MC, Sahade R, Tatián M, Cchiappero MB. (2008). Genetic differentiation between morphotypes in the Antarctic limpet *Nacella concinna* as revealed by Inter-simple Sequence Repeat markers. *Marine Biology*, 154: 875-885.
- De Broyer C, Lowry JK, Jazdezewski K, Robert H. (2007). Census of Antarctic Marine Life. Synopsis of the Amphipoda of the Southern Ocean. Volume 1: Part 1. Catalogue of the Gammaridean and Corophiidean Amphipoda (Crustacea) of the Southern Ocean with distribution and ecological data. *Bull. Inst. Roy. Sci. Nat. Belg.* 77 (Suppl. 1), 1-325.
- Dell RK. (1972). Antarctic benthos. *Advances in Marine Biology*, 10: 1-216.
- Demarchi M, Chiappero M, Laudien J, Sahade. (2008). Population genetic structure of the ascidian *Styela rustica* at Kongsfjorden, Svalbard, Arctic, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 364(1): 29-34.
- Demarchi M, Chiappero MB, Tatián M, Sahade R. (2010). Population genetic structure of the Antarctic ascidian *Aplidium falklandicum* from Scotia Arc and South Shetland Islands. *Polar Biology*, 33(11): 1567-1576.
- Doherty PJ, Dufour V, Galzin R, Hixon MA, Meekan MG, Planes S. (2004). High mortality during settlement is a population bottleneck for a tropical surgeonfish. *Ecology*, 85:2422-2428.
- DORIS. (2009). *Halocynthia pyriformis* (Rathke, 1806), [http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche\\_numero=1549](http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche_numero=1549)
- Dowdeswell JA, Bamber JL. (2007). Keel depths of modern Antarctic icebergs and implications for sea-floor scouring in the geological record. *Marine Geology*, 243: 120-131.
- Dowdeswell JA, Villinger H, Whittington RJ, Marienfeld P. (1993). Iceberg scouring in Scoresby Sund and on the East Greenland continental shelf. *Marine Geology*, 111:37-53.
- Drewry DJ. (1982). Ice flow, bedrock and geothermal studies from radio echo sounding inland of McMurdo Sound, Antarctica. In Craddock, C. (ed), *Antarctic Geoscience*. U. of Wisconsin Press, 977-983.
- Dunton K. (1992). Arctic biogeography: The paradox of the marine benthic fauna and flora. *Trends in Ecology and Evolution*, 7(6): 183-189.
- Dupont L, Viard F, Bishop JDD. (2006). Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers for the invasive ascidian *Styela clava* (Tunicata). *Molecular Ecology Notes*, 6: 101-103.
- Eastman JT, Clarke A. (1998). A comparison of adaptive radiations of Antarctic fish with those of non-Antarctic fish. In *Fishes of Antarctica: a biological overview*, G. di Prisco et al. (eds). Berlin: Springer-Verlag, 3-26.
- Endler JA. (1977). *Geographic variation, speciation and clines*. Princeton, NJ: Princeton University Press. 470-517.

- Etter RJ, Rex MA, Chase MR, Quattro JM. (2005). Population differentiation decreases with depth in deep-sea bivalves. *Evolution*, 59(7): 1479-1491.
- Excoffier LGL, Schneider S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- Fetzer I, Lønne OJ, Pearson T. (2002). The distribution of juvenile benthic invertebrates in an arctic glacial fjord. *Polar Biology*, 25: 303-315.
- France SC, Hessler RR, Vrijenhoek RC. (1992). Genetic differentiation between spatially-disjunct populations of the deep-sea, hydrothermal vent-endemic amphipod *Ventiella sulfuris*. *Marine Biology*, 114: 551-559.
- Galéron JA, Herman RL, Arnaud PM, Arntz WE, Hain S, Klages M. (1992). Macrofaunal communities on the continental shelf and slope of the southeastern Weddell Sea, Antarctica. *Polar Biology*, 12: 283-290.
- Gili JM, Arntz WE, Palanques A, Orejas C, Clarke A, Dayton PK, Isla E, Teixidó N, Rossi S, López-González PJ. (2006). A unique assemblage of epibenthic sessile suspension feeders with archaic features in the high-Antarctic. *Deep-Sea Research II*, 53: 1029-1052.
- Gili JM, Coma R, Orejas C, Lopez-Gonzales PJ, Zabala M. (2001). Are Antarctic suspension-feeding communities different from those elsewhere in the world? *Polar Biology*, 24: 473-485.
- Goldson AJ, Hughes RN, Gliddon CJ. (2001). Population genetic consequences of larval dispersal mode and hydrography: A case study with bryozoans. *Marine Biology*, 138: 1037-1042.
- Goodbody I. (1974). The physiology of ascidians. *Advances in Marine Biology*, 12: 1-149.
- Goodbody I. (2004). Diversity and distribution of ascidians (Tunicata) at TwinCays, Belize. *Atoll Research Bulletin*, 524:1-20.
- Gorlich K, Weslawski JM, Zajackowski M. (1987). Suspension settling effect on macrobenthos biomass distribution in the Hornsund fjord, Spitsbergen. *Polar Research*, 5: 175-192.
- Gray JS. (2001). Marine diversity: The paradigms in patterns of species richness examined. *Scientia Marina*, 65(2): 41-56.
- Griffiths HJ, Barnes DKA, Linse K. (2009). Towards a generalized biogeography of the Southern Ocean. *Journal of Biogeography*, 36: 162-177.
- Griffiths R. (1976). The larval development of *Pyura stolonifera* (Tunicata). *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 42: 1-9.
- Grosberg R, Cunningham CW. (2001). Genetic structure in the sea from populations to communities. En: Bertness, M.D., Gaines, S., Hay, M.E. (Eds.), *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, M. A., pp. 61-84.
- Gutt J. (2000). Some "driving forces" structuring communities of the sublittoral Antarctic macrobenthos. *Antarctic Science* 72 (3): 297-373.
- Gutt J. (2001). On the direct impact of ice on marine benthic communities, a review. *Polar Biology*, 24: 553-564.

- Gutt J, Piepenburg D. (2001). Scale-dependent impact on diversity of Antarctic benthos caused by grounding of icebergs. *Marine Ecology Progress Series*, 253: 77–83.
- Gutt J, Schickan T. (1998). Epibiotic relationships in the Antarctic benthos. *Antarctic Science*, 10 (4): 398–405.
- Gutt J, Starmans A. (2001). Quantification of iceberg impact and benthic recolonization patterns in the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biology*, 24: 615–619.
- Gysels ES, Hellemans B, Pampouli C, Volckaert FAM. (2004). Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Molecular Ecology*, 13: 403–417.
- Havermans C, Nagy ZT, Sonet G, De Broyer C, Martin P. (2011). DNA barcoding reveals new insights into the diversity of Antarctic species of *Orchomene sensu lato* (Crustacea: Amphipoda: Lysianassoidea). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58: 230–241.
- Hedgecock D. (1986). Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bulletin of Marine Science*, 39: 550–565.
- Hedrick PW. (2005). *Genetics of Populations*, Third Edition. In Jones and Bartlett Publishers.
- Heimeier D, LaVery S, Sewell MA. (2010). Molecular species identification of *Astrotoma agassizii* from planktonic embryos: Further Evidence for a Cryptic Species Complex. *Journal of Heredity*, 101(6): 775–779.
- Held C. (2003). Molecular evidence for cryptic speciation within the widespread Antarctic crustacean *Ceratoserolis trilobitoides* (Crustacea, Isopoda). In: A. Huiskes, W.W. Gieskes, J. Rozema, R.M. Schorno, S.M. van der Vies, W.J. Wolff (eds.), *Antarctic biology in a global context*, pp. 135–9. Backhuys Publishers, Leiden.
- Held C, Wägele W. (2005). Cryptic speciation in the giant Antarctic isopod *Glyptonotus antarcticus* (Isopoda: Valvifera: Chaetiliidae). *Scientia Marina*, 69: 175–181.
- Hellberg ME, Burton RS, Neigel JE, Palumbi SR. (2002). Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*, 70(1): 273–290.
- Heroy DC, Anderson JB. (2005). Ice-sheet extent of the Antarctic Peninsula region during the Last Glacial Maximum (LGM) – Insights from glacial geomorphology. *Geological Society of the American Bulletin*, 117: 1497–1512.
- Hewitt GM. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 247–276.
- Hewitt GM. (1999). Postglacial recolonization of European Biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 87–112.
- Hewitt GM. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907–913.



- Hewitt GM. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10: 537-549.
- Hewitt GM. (2003). A climate for colonization. *Heredity*, 92: 1-2.
- Hewitt GM. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B- Biological Sciences*, 359: 183-195.
- Hoffman JI, Clarke A, Linse K, Peck LS. (2010). Effects of brooding and broadcasting reproductive modes on the population genetic structure of two Antarctic gastropod molluscs. *Marine Biology*, 158: 287-296.
- Hoffman JI., Peck LS., Linse K, Clarke A. (2011). Strong population genetic structure in a broadcast-spawning Antarctic marine invertebrate. *Journal of Heredity*, 102(1): 55-66.
- Hofmann EE, Klinck JM. (1998). Thermohaline variability of the waters overlying the west Antarctic Peninsula continental shelf. *Antarctic Research Series*, 75: 67-81.
- Holmes SP, Dekker R, Williams ID. (2004). Populations dynamics and genetic differentiation in the bivalve mollusc *Abra tenuis*: aplanic dispersal. *Marine Ecology Progress Series*, 268: 131-140.
- Honso S. (2004). Particle export and the biological pump in the Southern Ocean. *Antarctic Science*, 16: 501-516.
- Hop H, Pearson T, Hegseth EN, Kovacs KM, Wiencke C, Kwasniewski S, Eiane K, Mehlum F, Gulliksen B, Wlodarska-Kowalczyk M, Lydersen C, Weslawski JM, Cochrane S, Gabrielsen GW, Leakey RJG, Lønne OJ, Zajaczkowski M, Falk-Petersen S, Kendall M, Wängberg S-Å, Bischof K, Voronkov AY, Kovaltchouk NA, Wiktor J, Poltermann M, di Prisco G, Papucci C, Gerland S. (2002). The marine ecosystem of Kongsfjorden, Svalbard. *Polar Research* 21: 167-208.
- Hou L, Lü H, Zou X, Xiangdong B, Yan D, He C. (2006). Genetic characterizations of *Macra veneriformis* (Bivalve) along the Chinese coast using ISSR-PCR markers. *Aquaculture*, 261: 865-871.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322-1332.
- Hughes TP, Baird AH, Dinsdale EA, Moltschaniwskyj NA, Pratchett MS, Tanner JE, Willis BL. (2000). Supply-Side Ecology Works Both Ways: The Link between Benthic Adults, Fecundity, and Larval Recruits. *Ecology*, 81: 2241-2249.
- Hunt HL, Scheibling RE. (1997). Role of early post-settlement mortality in recruitment of benthic marine invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, 155:269-301.
- Hunter RL, Halanych KM. (2008). Evaluating connectivity in the brooding brittle star *Astrotoma agassizii* across the Drake Passage in the Southern Ocean. *Journal of Heredity*, 99: 137-148.
- Hunter RL, Halanych KM. (2010). Phylogeography of the Antarctic planktotrophic brittle star *Ophionotus victoriae* reveals genetic structure inconsistent with early life history. *Marine Biology*, 157: 1693-1704.



- EG. (2009). Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers. *Molecular Ecology*, 18: 2165-2184.
- Ibrahim KM, Nichols RA, Hweitt GM. (1996). Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity*, 77: 282-291.
- Imbrie J, Hays JD, Martinson D, McIntyre A, Mix A, Morley J, Pisias N, Prell W, Shackleton N J. (1984). The orbital theory of Pleistocene climate: support from a revised chronology of the marine  $\delta^{18}\text{O}$  record. In *Milankovitch and Climate, Part 1* (eds. ALBERGER *et al.*), pp. 269-305. D Reidel.
- Imron JB, Hale P, Degnan BM, Degnan SM. (2007). Pleistocene isolation and recent gene flow in *Haliotis asinina*, an Indo-Pacific vetigastropod with limited dispersal capacity. *Molecular Ecology*, 16: 289-304.
- Ingólfsson Ó, Hjort C, Berkman PA, Björck S, Colhoun E, Goodwin ID, Hall B, Hirakawa K, Melles M, Möller P, Prentice ML. (1998). Antarctic glacial history since the last glacial maximum: an overview of the record on land. *Antarctic Science*, 10(3): 326-344.
- Jakobsson M, Rosenberg NA. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23: 1801-1806.
- Jiang D, Smith WC. (2005). Self- and cross-fertilization in the solitary ascidian *Ciona savignyi*. *Biological Bulletin*, 209: 107-112.
- Johannessen OM, Miles MW. (2000). Arctic sea ice and climate change-will the ice disappear in this century? *Science Progress*, 83:209-22.
- Johnson MS, Black R. (2006). Islands increase genetic subdivision and disrupt patterns of connectivity of intertidal snails in a complex archipelago. *Evolution*, 60: 2498-2506.
- Jombart T, Devillard S, Dufour A-B, Pontier D. (2008). Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity*, 101: 92-103.
- Jombart T. (2008). Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24: 1403-1405.
- Kapralov MV, Gabrielsen TM, Sarapultsev IE, Brochmann C. (2006). Genetic enrichment of the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* at its southern periphery via the alpine sexual *Saxifraga sibirica*. *Molecular Ecology*, 15: 3401-3411.
- Kattner DN, Engbrodt R, Giannelli V, Kennedy H, Haas C, Dieckmann GS. (2001). Dissolved organic matter in Antarctic sea ice. *Annals of Glaciology*, 33: 297-303.
- Kendall MA, Widdicombe S, Weslawski JM. (2003). A multi-scale study of the biodiversity of the benthic infauna of the high-latitude Kongsfjord, Svalbard. *Polar Biology*, 26: 383-388.

- Kendra M, Wiodarska-Kowalczyk M, Wdosiawski JM. (2010). Decadal change in macrobenthic soft-bottom community structure in a high Arctic fjord (Kongsfjorden, Svalbard). *Polar Biology*, 33: 1–11.
- Khalaman VV. (2001). Succession of Fouling Communities on Artificial Substrates of Mussel Plants in the White Sea, *Biol. Morya*, 2001, vol. 27, no. 6, pp. 399–406.
- Khalaman VV, Belyaeva DV, Flyachinskaya LP. (2008). Effect of excretory–secretory products of some fouling organisms on settling and metamorphosis of the larvae of *Styela rustica* (Ascidiae). *Russian Journal of Marine Biology*, 34: 170–173.
- Kim WJ, Lee CI, Kim HS, Han HS, Jee YJ, Kong HJ, Nam BH, Kim YO, Kim KK, Kim BS, Lee SJ, Hong KE, Yu JN, Yoon M. (2012). Population genetic structure and phylogeography of the ascidian, *Halocynthia roretzi*, along the coasts of Korea and Japan, inferred from mitochondrial DNA sequence analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44: 128–135.
- King JC, Turner J, Marshall GJ, Connolley WM, Lachlan-Cope TA. (2003). Antarctic Peninsula climate variability and its causes as revealed by analysis of instrumental records. In *Antarctic Peninsula climate variability: historical and paleoenvironmental perspectives*, vol. 79 (ed. E. Domack, A. Leventer, A. Burnett, R. Bindshadler, P. Convey & M. Kirby), Antarctic research series, pp. 17–30. Washington, DC: American Geophysical Union.
- Kinlan BP, Gaines SD. (2003). Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology*, 84: 2007–2020.
- Klinck JM. (1998). Heat and salt changes on the continental shelf west of the Antarctic Peninsula between January 1993 and January 1994. *J. Geophysics and Research in Oceans*, 103: 7617–7636.
- Knowlton N. (1993). Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 189–216.
- Knowlton N. (2000). Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia*, 420: 73–90.
- Kott P. (1969). Antarctic Ascidiacea. A monographic account of the known species based on specimens collected under US government auspices 1947 to 1963. *Antarctic Research Series*, 13: 1–239.
- Krabbe K, Leese F, Mayer C, Tollrian R, Held C. (2010). Cryptic mitochondrial lineages in the widespread pycnogonid *Colossendeis megalonyx* Hoek, 1881 from Antarctic and Subantarctic waters. *Polar Biology*, 33: 281–292.
- Kuklinski P, Barnes DKA. (2010). First bipolar benthic brooder. *Marine Ecology Progress Series*, 401: 15–20.
- Lambeck K, Esat TM, Potter EK. (2002). Links between climate and sea levels for the past three million years. *Nature*, 419: 199–206.
- Lambert CL. (2005). Historical introduction, overview, and reproductive biology of the protochordates. *Canadian Journal of Zoology*, 83: 1–7.
- Lawyer LA, Gagagan LM, Coffin FM. (1992). The development of paleoseaways around Antarctica. *Antarctic Research Series*, 56: 7–30.

- Leese F, Held C. (2008). Identification and characterization of microsatellites from the Antarctic isopod *Ceratoserolis trilobitoides*—nuclear evidence for cryptic species. *Conservation Genetics*, 9: 1369–1372.
- Levin LA. (2006). Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. *Integrative and Comparative Biology*, 46(3): 282–297.
- Lewallen EA, Anderson TW, Bohonak AJ. (2007). Genetic structure of leopard shark (*Triakis semifasciata*) populations in California waters. *Marine Biology*, 152: 599–609.
- Linse K, Cope T, Lörz A-N, Sands C. (2007). Is the Scotia Sea a centre of Antarctic marine diversification? Some evidence of cryptic speciation in the circum-Antarctic bivalve *Lissarca notorcadensis* (Arcoidea: Philobryidae). *Polar Biology*, 30: 1059–1068.
- Linse K, Griffiths HJ, Barnes DKA, Clarke A. (2006). Biodiversity and biogeography of Antarctic and sub-Antarctic mollusca. *Deep-Sea Research. Part II*, 53: 985–1008.
- Long DJ. (1992). Paleoecology of Eocene Antarctic sharks. In J. P. Kennett and D. A. Warnke (eds.), *The Antarctic paleoenvironment: A perspective on global change*, Part 1, pp. 131–139. *Antarctic Res. Ser.* 56, American Geophysical Union, Washington, D.C.
- Long DJ. (1994). Quaternary colonization or Paleogene persistence?: Historical biogeography of skates (Chondrichthyes: Rajidae) in the Antarctic ichthyofauna. *Paleobiology*, 20: 215–228.
- López-Legentil S, Turon X, Planes S. (2006). Genetic structure of the star sea squirt, *Botryllus schlosseri*, introduced in southern European harbours. *Molecular Ecology*, 15: 3957–3967.
- Maggs CA, Castilhor, R, Foltz D, Henzler C, Jolly MT, Kelly J, Olsen J, Perez KE, Stam W, Vainola R, Viard F, Wares J. (2008). Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology*, 89(11): 108–122.
- Maldonado A, Barnolas A, Bohoyo F, Galindo-Zaldívar J, Hernández-Molina J, Lobo F, Rodríguez-Fernández J, Somoza L, Tomás Vázquez J. (2003). Contourite deposits in the central Scotia Sea: the importance of the Antarctic Circumpolar Current and the Weddell Gyre flows. *Palaeogeography and Palaeoclimatology*, 198: 187–221.
- Maltagliati F, Lai T, Casu M, Valdesalici S, Castelli A. (2006). Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochemistry and Systematics Ecology*, 34: 626–634.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 189–197.
- Marino R, Pinto MR, Cotelli F, Lamia CL, De Santis R. (1998). The hsp70 protein is involved in the acquisition of gamete self-sterility in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development*, 125: 899–907.
- Marko PB. (2004). ‘What’s larvae got to do with it?’ Disparate patterns of post-glacial population structure in two benthic marine gastropods with identical dispersal potential. *Molecular Ecology*, 13: 597–611.

- Mayr E. (1954). Change of genetic environment and evolution. In *Evolution as a process*, ed. J. Huxley, A. C. Hardy, and E. B. Ford. London: Allen and Unwin, pp. 157-180.
- McClintock JB, Baker BJ. (1997). A review of the chemical ecology of shallow-water Antarctic marine invertebrates. *American Zoologist*, 37: 329-342.
- McClintock JB, Heine J, Slattery M, Weston J. (1991). Biochemical and energetic composition, population biology, and chemical defense of the antarctic ascidian *Cnemidocarpa verrucosa* lesson. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 147: 163-175.
- McCormick MI. (2006). Mothers matter: Crowding leads to stressed mothers and smaller offspring in marine fish. *Ecology* 87(5):1104-1109.
- Mercier A, Hamel JF. (2010). Synchronized breeding events in sympatric marine invertebrates: role of behavior and fine temporal windows in maintaining reproductive isolation. *Behavior, Ecology and Sociobiology*, 64:1749-1765.
- Millar RH. (1960). Ascidiacea. *Discovery Reports*, 30: 1-160.
- Millar RH. (1971). The biology of ascidians. *Advances in Marine Biology*, 9: 1-100.
- Miller KJ, Ayre DJ. (2008). Population structure is not a simple function of reproductive mode and larval type: insights from tropical corals. *Journal of Animal Ecology*, 77: 713-724.
- Miller MP. (2005). Alleles in space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, 96: 722-724.
- Monniot C, Dettai A, Eleaume M, Cruaud C, Ameziane N. (2011). Antarctic Ascidiaceans (Tunicata) of the French-Australian survey CEAMARC in Terre Adélie. *Zootaxa*, 2817: 1-54.
- Monniot C, Monniot F. (1983). Ascidiées antarctiques et subantarctiques: morphologie et biogéographie. *Mem Mus Natl Hist Nat Ser A Zool* 125: 1-135.
- Moran P. (1948). The interpretation of statistical maps. *J R Stat Soc Ser B* 10: 243-251.
- Moran P. (1950). Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika*, 37: 17-23.
- Morgan TH. (1944). The genetic and the physiological problems of self-sterility in *Ciona*. VI. Theoretical discussion of genetic data. *Journal of Experimental Zoology*, 95: 37-59.
- Muniz Dias G, Lembo Duarte LF, Solferini VN. (2006). Low genetic differentiation between isolated populations of the colonial ascidian *Symplegma rubra* Monniot, C. 1972. *Marine Biology*, 148: 807-815.
- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nei M. (1986). Definition and estimation of fixation indices. *Evolution*, 40:643-645.
- Nei M, Li WH. (1985). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 76: 5269-5273.
- Nei M, Tajima F, Tateno Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153-170.

- Olsen JL, Zechman FW, Hoarau G, Coyer JA, Stam WT, Valero M, Åberg P. (2010). The phylogeographic architecture of the fucoid seaweed *Ascophyllum nodosum*: an intertidal “marine tree” and survivor of more than one glacial–interglacial cycle. *Journal of Biogeography*, 37: 842–856.
- Palumbi SR. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25: 547–572.
- Palumbi SR, Wilson AC. (1990). Mitochondrial DNA diversity in the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *S. droebachiensis*. *Evolution*, 44: 403–415.
- Pannacciulli FG, Manetti G, Maltagliati F. (2009). Genetic diversity in two barnacle species, *Chthamalus stellatus* and *Tesseropora atlantica* (Crustacea, Cirripedia), with different larval dispersal modes in the archipelago of the Azores. *Marine Biology*, 156: 2441–2450.
- Paulay G, Meyer C. (2006). Dispersal and divergence across the greatest ocean region: Do larvae matter? *Integrative and Comparative Biology*, 46(3): 269–281.
- Paz G, Douek J, Mo C, Goren M, Rinkevich B. (2003). Genetic structure of *Botryllus schlosseri* (Tunicata) populations from the Mediterranean coast of Israel. *Marine Ecology Progress Series*, 250: 153–162.
- Pearse JS, McKlintock JB, Bosch I. (1991). Reproduction of Antarctic benthic marine invertebrates: tempos, modes and timing. *American Zoologist*, 31: 65–80.
- Peck LS. (2005). Prospects for surviving climate change in Antarctic aquatic species. *Frontiers in Zoology*, 2005: 2–9.
- Peck LS, Brockington S, Vanhove S, Beghyn M. (1999). Community recovery following catastrophic iceberg impacts in a soft-sediment shallow-water site at Signy Island, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series*, 186:1–8.
- Peña Cantero AL, Gili JM. (2006). Benthic hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from off Bouvet Island (Antarctic Ocean). *Polar Biology*, 29: 764–771.
- Petersen JK. (2007). Ascidian suspension feeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 342(1): 127–137.
- Petit RJ, Aguinalalde I, De Beaulieu JL, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Müller-Starck G, Demesure-Musch B, Palmé A, Martín JP, Rendell S, Vendramin GG. (2003). Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, 300: 1563–1565.
- Piepenburg D. (2005). Recent research on Arctic benthos: Common notions need to be revised. *Polar Biology*, 28: 733–755.
- Pineda J, Hare JA, Sponaugle S. (2007). Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography*, 20:22–39.
- Porter JS, Ryland JS, Carvalho GR. (2002). Micro- and macrogeographic genetic structure in bryozoans with different larval strategies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 272: 119–130.
- Pradeep RM, Sarla N, Siddiq EA. (2002). Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128: 9–17.



- Prestvik T, Winsnes TS. (1981). Geology of Bouvetøya, South Atlantic. *Skr Norsk Polarinst* 175:41–68.
- Primo C, Vázquez E. (2007). Zoogeography of the Antarctic ascidian fauna in relation to the sub-Antarctic and South America. *Antarctic Science*, 19: 321–336.
- Primo C, Vázquez E. (2009). Antarctic ascidians: an isolated and homogeneous fauna. *Polar Research*, 28 (3): 403–414.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Provan J, Wattier RA, Maggs CA. (2005). Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmari palmate* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Molecular Ecology*, 14: 793–803.
- Rabindranath A, Daase M, Falk-Petersen S, Wold A, Wallace MI, Berge J, Brierley AS. (2011). Seasonal and diel vertical migration of zooplankton in the High Arctic during the autumn midnight sun of 2008. *Marine Biodiversity*, 41(3): 365–382.
- Rachold V, Eiken H, Gordeev VV, Grigoriev MN, Hubberten HW, Lisitzin AP, Shevchenko VP, Schirmeister L. (2004). Modern terrigenous organic carbon input to the Arctic Ocean, in *The Organic Carbon Cycle in the Arctic Ocean*, edited by R. S. Stein and R. W. Macdonald, pp. 33–55, Springer, New York.
- Raupach MJ, Malyutina M, Brandt A, Wägele JW. (2007). Molecular data reveal a highly diverse species flock within the munnopsoid deep-sea isopod *Betamorpha fusiformis* (Barnard, 1920) (Crustacea: Isopoda: *Asellota*) in the Southern Ocean. *Deep-Sea Research II*, 54: 1820–1830.
- Raupach MJ, Mayer C, Malyutina M, Wägele JW. (2009). Multiple origins of deep-sea *Asellota* (Crustacea: Isopoda) from shallow waters revealed by molecular data. *Proceedings of the Royal Society B*, 276: 799–808.
- Raupach MJ, Wägele JW. (2006). Distinguishing cryptic species in Antarctic *Asellota* (Crustacea, Isopoda)—a preliminary study of mitochondrial DNA in *Acanthaspidia drygalskii* Vanhöffen, 1914. *Antarct Scientia*, 18: 191–198.
- Raven P, Johnson GB, Mason KA, Losos JB, Singer SS. (2011). *Biology*. In: McGraw-Hill (Ed). 9<sup>o</sup> ed. pp: 948.
- Richards VP, Thomas JD, Stanhope MJ, Shivji MS. (2007). Genetic connectivity in the Florida reef system: comparative phylogeography of commensal invertebrates with contrasting reproductive strategies. *Molecular Ecology*, 16: 139–157.
- Roderick GK. (1996). Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41: 325–352.
- Rosenberg NA. (2004). Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137–138.
- Rossi S, Gili JM. (2009). Near bottom phytoplankton and seston: importance in the pelagic-benthic coupling processes. In: *Marine Phytoplankton*, Ed: W. T. Kersey, S. P. Munger. Chapter 2. pp. 45–85.
- Rupper R, Barnes RD. (1996). *Zoología de los Invertebrados*. Ed. Mc Graw- Hill Interamericana. 6ta. ed.



- Sahade R. (1999). Patrones y procesos en una comunidad epibentónica antártica: el caso de Caleta Potter. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- Sahade R, Tatián M, Esnal GB. (2004). Reproductive ecology of the ascidian *Cnemidocarpa verrucosa* at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series*, 272: 131-140.
- Sahade R, Tatián M, Kowalke J, Khüne S, Esnal GB. (1998). Benthic faunal associations in soft substrates at Potter Cove, King George Island, Antarctica. *Polar Biology*, 19: 85-91.
- Sáiz-Salinas JI, Ramos A, Munilla T, Rauschert M. (1998). Changes in the biomass and dominant feeding mode of benthic assemblages with depth off Livingston Island (Antarctica). *Polar Biology*, 19: 424-428.
- Sawada HE, Tanaka SB, Yamasaki C, Fujino J, Ooura K, Abe Y, Matsumoto K, Yokosawa H. (2004). Self/nonsel recognition in ascidian fertilization: vitelline coat protein HrVC70 is a candidate allorecognition molecule. *Proceedings of Natural Academy of Science*, 101: 15615-15620.
- Schüller M. (2011). Evidence for a role of bathymetry and emergence in speciation in the genus *Glycera* (Glyceridae, Polychaeta) from the deep Eastern Weddell Sea. *Polar Biology*, 34: 549-564.
- Severance EG, Karl SA. (2006). Contrasting population genetic structures of sympatric, mass-spawning Caribbean corals. *Marine Biology*, 150: 57-68.
- Shanks AL, Grantham BA, Carr MH. (2003a). Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecological Applications*, 13: 159-169.
- Shcltema RS. (1968). Dispersal of larvae by equatorial ocean currents and its importance to the zoogeography of shoal-water tropical species. *Nature*, 217:1159-1162.
- Shenkar N, Swalla BJ. (2011). Global diversity of Ascidiacea. *Plos ONE* 6(6): e20657.doi:10.1371/journal.pone.0020657.
- Sherman CDH, Hunt A, Ayre DJ. (2008). Is life history a barrier to dispersal? Contrasting patterns of genetic differentiation along an oceanographically complex coast. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95: 106-116.
- Shulman MJ. (1998). What can population genetics tell us about dispersal and biogeographic history of coral-reef fishes? *Australian Journal of Ecology*, 23: 216-225.
- Slatkin M. (1985a). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39: 53-65.
- Slatkin M. (1985b). Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 393-430.
- Slatkin M. (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236: 787-792.
- Smale DA, Brown KM, Barnes DKA, Fraser KPP, Clarke A. (2008). Ice Scour Disturbance in Antarctic Waters. *Science*, 321: 371.
- Smith CR, Mincksa S, DeMaster DJ. (2006). A synthesis of benthic-pelagic coupling on the Antarctic shelf: Food banks, ecosystem inertia and global climate change. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 53: 875-894.

- Smith DA, Klinck JM. (2002). Water properties on the west Antarctic Peninsula continental shelf: a model study of effects of surface fluxes and sea ice. *Deep-Sea Research II*, 49:4863-4886.
- Sotka EE, Palumbi SR. (2006). The use of genetic clines to estimate dispersal distances of marine larvae. *Ecology*, 87(5): 1094-1103.
- Stanwell-Smith D, Peck LS. (1998). Temperature and embryonic development in relation to spawning and field occurrence of larvae of three Antarctic echinoderms. *Biological Bulletin*, 194: 44-52.
- StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Stoner DS, Ben-Schlomo R, Rinkevich B, Weissman IV. (2002). Genetic variability of *Botryllus schlosseri* invasions to the east and west coasts of the USA. *Marine Ecology Progress Series*, 243: 93-100.
- Stoner DS, Weissman IS. (1996). Somatic and germ cell parasitism in a colonial ascidian: possible role for a highly polymorphic allorecognition system. *Evolution*, 93: 15254-15259.
- Strathmann RR, Kendall LR, Marsh AG. (2006). Embryonic and larval development of a cold adapted Antarctic ascidian. *Polar Biology*, 29: 495-501.
- Svane I. (1983). Ascidian reproductive patterns related to long-term population dynamics. *Sarsia*, 68:249-255.
- Svane I, Lundälv T. (1982). Population dynamics and reproductive patterns of *Boltenia echinata* (Ascidicea) on the Swedish west coast. *Netherlands Journal of Sea Research*, 16: 105-118.
- Svane I, Young CM. (1989). The ecology and behaviour of ascidian larvae. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 27: 45-90.
- Svendsen H, Beszczynska-Møller A, Hagen JO, Lefauconnier B, Tverberg V, Gerland S, Ørbæk JB, Bischof K, Papucci C, Zajaczkowski M, Azzolini R, Bruland O, Wiencke C, Winther JG, Dallmann W. (2002). The physical environment of Kongsfjorden-Krossfjorden, an Arctic fjord system in Svalbard. *Polar Research*, 21:133-166.
- Syvitski JPM. (2002). Sediment discharge variability in Arctic rivers: implications for a warmer future. *Polar Research*, 21: 323- 330.
- Syvitski JPM, Morehead M, Nicholson M. (1998). HydroTrend: a climate-driven hydrologic-transport model for predicting discharge and sediment to lakes or oceans. *Computers and Geoscience*, 24: 51-68.
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall KA, Pascual M, Turon X. (2004). Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. *Molecular Ecology*, 13: 3125-3136.
- Tatián M, Antacli JC, Sahade R. (2005). Ascidians (Tunicata, Ascidiacea): species distribution along the Scotia Arc. *Scientia Marina* 69 (2): 205-214.
- Tatián M, Sahade R, Kowalke J, Kivatinitz SC, Esnal GB. (2002). Food availability and gut contents in the ascidian *Cnemidocarpa verrucosa* at Potter Cove, Antarctica. *Polar Biology*, 25: 58-64.
- Teixidó N, Garrabou J, Arntz WE. (2002). Spatial pattern quantification of Antarctic benthic communities using landscape indices. *Marine Ecology Progress Series*, 242: 1-14.

- Thatje S. (2012). Effects of capability for dispersal on the evolution of diversity in Antarctic benthos. *Integrative and Comparative Biology*, 52(4): 470–482.
- Thatje S, Hillenbrand CD, Larter R. (2005). On the origin of Antarctic marine benthic community structure. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 534–540.
- Thatje S, Hillenbrand C-D, Mackensen A, Larter R. (2008). Life hung by a thread: endurance of Antarctic fauna in glacial periods. *Ecology*, 89: 682–692.
- Thomas DN, Fogg GE, Convey P, Fritsen CH, Gili J-M, Gradinger R, Laybourn-Parry J, Reid K, Walton DWH. (2008). *The biology of polar regions*. Oxford, Oxford University Press, xiv, 394p.
- Thomas EK, Briner JP. (2009). Climate of the past millennium inferred from varved proglacial lake sediments on northeast Baffin Island, Arctic Canada. *Journal of Paleolimnology*, 41: 209–224.
- Thomson MRA, Crame JA, Thomson JW, eds. (1991). *Geologic evolution of Antarctica*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Thornhill DJ, Mahon AR, Norenburg JL, Halanych KM. (2008). Open-ocean barriers to dispersal: a test case with the Antarctic Polar Front and the ribbon worm *Parborlasia corrugatus* (Nemertea: Lineidae). *Molecular Ecology*, 17: 5104–5117.
- Thorpe SE, Murphy EJ, Watkins JL. (2007). Circumpolar connections between Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana) populations: investigating the roles of ocean and sea ice transport. *Deep Sea Research I*, 54: 792–810.
- Tiedemann R, Sarnthein M, Shackleton NJ. (1994). Astronomic timescale for the Pliocene Atlantic  $\delta^{18}O$  and dust flux records of ODP Site 659. *Paleoceanography*, 9: 619–638.
- Turner J, Colwell SR, Marshall GJ, Lachlan-Cope TA, Carleton AM, Jones PD, Lagun V, Reid PA, Iagovkina S. (2005). Antarctic climate change during the last 50 years. *International Journal of Climatology*, 25: 279–294.
- Turon X. (1990). Distribution and abundance of ascidians from a locality on the northeast coast of Spain. *PSZN I: Marine Ecology*, 11: 291–308.
- Van Name WG. (1945). The North and South American ascidians. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 84:1-476.
- Varela MA, González-Tizón A, Mariñas L, Martínez-Lage A. (2007). Genetic Divergence Detected by ISSR Markers and Characterization of Microsatellite Regions in *Mytilus* Mussels. *Biochemistry and Genetics*, 45: 565–578.
- Vaughan DG, Marshall GJ, Connolley WM, King JC, Mulvaney R. (2001). Devil in the Detail. *Science*, 293: 1777–1779.
- Vaughan DG, Marshall GJ, Connolley WM, Parkinson C, Mulvaney R, Hodgson DA, King JC, Pudsey CJ, Turner J. (2003). Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula. *Climatic Change*, 60: 243–274.
- Walkusz W, Kwasniewski S, Petersen SF, Hop H, Tverberg V, Wieczorek P, Weslawski JM. (2009). Seasonal and spatial changes in the zooplankton community of Kongsfjorden, Svalbard. *Polar Research*, 28: 254–281.
- Walther GR, Post E, Convey P *et al.* (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416: 389–395.

- Watson DF. (1992). Contouring: a guide to the analysis and display of spatial data. Pergamon Press, New York.
- Watson DF, Philips GM. (1985). A refinement of inverse distance weighted interpolation. *Geo-processing*, 2, 315-327.
- Watts PC, Thorpe JP. (2006). Influence of contrasting larval developmental types upon the population-genetic structure of *Cheilostome* bryozoans. *Marine Biology*, 149: 1093-1101.
- Weider LJ, Hobæk A. (2000). Phylogeography and arctic biodiversity: A review. *Annales Zoologici Fennici*, 7: 217-231.
- Weir BS, Cockerham CC. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population substructure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wesławski JM, Kendall MA, Włodarska-Kowalczyk M, Iken K, Kędra M, Legezynska J, Sejr MK. (2011). Climate change effects on Arctic fjord and coastal macrobenthic diversity—observations and predictions. *Marine Biodiversity* 41: 71-85.
- Weslawski JM, Szymelfenig M, Zajackowski M, Keck A. (1999). Influence of salinity and suspended matter on benthos of an Arctic tidal flat. *Journal of Marine Science*, 56: 194-202.
- Wilson K, Thorndyke M, Nilsen F, Rogers A, Martinez P. (2005). Marine systems: moving into the genomics era. *Marine Ecology*, 26(1) :3-16.
- Wilson NG, Hunter RL, Lockhart SJ, Halaynch KM. (2007). Multiple lineages and absence of panmixia in the 'cirumpolar' crinoids *Promachocrinus kerguelensis* from the Atlantic sector of Antarctica. *Marine Biology*, 152: 895-904.
- Wilson NG, Schrod M, Halanych KM. (2009). Ocean barriers and glaciation: evidence for explosive radiation of mitochondrial lineages in the Antarctic sea slug *Doris kerguelensis* (Mollusca, Nudibranchia). *Molecular Ecology*: 18, 965-984.
- Włodarska-Kowalczyk M, Pearson TH. (2004). Soft-bottom macrobenthic faunal associations and factors affecting species distributions in an Arctic glacial fjord (Kongsfjord, Spitsbergen). *Polar Biology*, 27: 155-167.
- Włodarska-Kowalczyk M, Pearson TH, Kendall MA. (2005). Benthic response to chronic natural physical disturbance by glacial sedimentation in an Arctic fjord. *Marine Ecology Progress Series*, 303: 31-41.
- Wright S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138.
- Wright S. (1978). Evolution and the genetics of populations. Vol. 4, Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.
- XLSTAT Version 2012.1.01. Copyright Addinsoft 1995-2012.  
<http://www.xlstat.com/es/learning-center/tutorials.html>.
- Yakovis EL, Artemieva AV, Shunatova NN, Varfolomeeva MA. (2008). Multiple foundation species shape benthic habitat islands. *Oecologia*, 155: 785-795.

- Young CM. (1989). Distribution and dynamics of an intertidal ascidian pseudopopulation. *Bulletin of Marine Science*, 45: 288-303.
- Yund PO, O'Neil PG. (2000). Microgeographic genetic differentiation in a colonial ascidian (*Botryllus schlosseri*) population. *Marine Biology* 137: 583-588.
- Zachos J, Pagani M, Sloan L, Thomas E, Billups K. (2001a). Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292: 686-693.
- Zachos J, Shackleton NJ, Revenaugh JS, Palike H, Flower BP. (2001b). Climate response to orbital forcing across the Oligocene-Miocene boundary. *Science*, 292: 274-278.
- Zenkevitch LA. (1963). *Biology of the seas of the USSR*. George Allen and Unwin, London, 955 pp.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

ANEXO  
PUBLICACIONES DERIVADAS  
de la TESIS





## Population genetic structure of the ascidian *Styela rustica* at Kongsfjorden, Svalbard, Arctic

Milagros Demarchi<sup>a,b</sup>, Marina Chiappero<sup>b</sup>, Jürgen Laudien<sup>c</sup>, Ricardo Sahade<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Ecología Marina, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sársfield 299, CP 5000, Córdoba, Argentine

<sup>b</sup> Genética de Poblaciones y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sársfield 299, CP 5000, Córdoba, Argentine

<sup>c</sup> Alfred Wegener Institut für Polar und Meeresforschung, PO Box 120161, 27568 Bremerhaven, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 December 2007

Accepted 19 June 2008

#### Keywords:

Arctic

Ascidians

Genetic structure

### ABSTRACT

The actual Arctic biota shows a strong affinity with that of the Boreal Atlantic and Pacific ones, as a result of an active recolonization process after the Quaternary glaciations. The geographic distribution of sessile species is usually linked to larvae dispersive capabilities which can be directly related with time spent in the plankton. Ascidians larvae are lecithothrophic and short-lived, which suggest that ascidians could be not efficient dispersers. However, the solitary ascidian *Styela rustica* (Linnaeus, 1767) (Tunicata, Ascidiacea) shows a wide distribution pattern from the North Atlantic to the Arctic that, together with the relatively recent colonization of the Arctic system could indicate that this species efficiently disperses and colonizes new habitats. In this study we used ISSR-PCR markers to study the genetic structure of five populations of the ascidian *Styela rustica* at Kongsfjorden, west Spitsbergen (Svalbard archipelago). We analyzed whether this species presents a low genetic structure, as can be expected due to the historical process of recent post glaciations colonization, or if there is genetic differentiation at a local scale, caused by short-lived larvae and limited dispersal potential. The genetic diversity in each population assessed using the marker diversity index (M) ranged from 0.288 to 0.324. Population HN, situated close to a fast retreating glacier, showed the lowest diversity. Processes associated with deglaciation (icebergs calving from the glacier that scour the benthos and the increment of inorganic particulate matter on the water column) would drive to reduced population sizes and explain the reduced genetic variability observed in the HN population with respect to the others in the fjord. This suggests a possible linkage with the global warming process. Although the weak genetic structure found among the studied populations could indicate a founder effect, the genetic landscape shape analysis together with a positive relationship between genetic and geographic distances also suggest possible current gene flow among populations in the fjord.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Shallow arctic shelves host a relative young marine assemblage which history reaches back some 15,000 years, due to the devastating effect the Quaternary glaciations had on these ecosystems. These events had occurred several times during the Quaternary and the last major one was that of Wisconsin, 18,000 years ago. At that time, sea level dropped down at least 85 m and almost all the actual Arctic Ocean was ice covered. These conditions drastically reduced most of the biological activity and almost eradicated the benthic fauna, which was disturbed as well by the impact caused by the huge amounts of sediments introduced into the ecosystem during the deglaciation process (Dunton, 1992; Piepenburg, 2005). The process of recolonization of the Arctic shelves has been active, and still is, during

the last 6,000 to 14,000 years, since deglaciation begun (Dayton et al., 1994; Weider and Hobæk, 2000). Therefore, the actual Arctic biota shows a strong affinity with that of the Boreal Pacific and mainly Atlantic ones and is characterized by low levels of endemism and lower biodiversity compared with temperate, tropical and also Antarctic ecosystems (Dayton, 1990; Dunton, 1992; Gray, 2001). The effects of the ice age are also reflected in the population genetic structure of species living in the Atlantic coasts, that show a gradient in genetic diversity in many species with increasing latitude and also showing the important role of glacial refugia (Hewitt, 2000; Coyer et al., 2003; Petit et al., 2003; Ben-Shlomo et al., 2006). It is possible to hypothesize that most of the species in the Arctic Ocean would present low genetic structure and low genetic diversity, but studies dealing with population genetic structure in benthic marine invertebrates in the Arctic are lacking so far.

Dispersion in the sea is thought to be facilitated by the homogeneous nature of the habitat, and many marine invertebrates are wide-ranging species with virtually continuous distributions. Species

\* Corresponding author.

E-mail address: [rsahade@efn.uncor.edu](mailto:rsahade@efn.uncor.edu) (R. Sahade).

range may extend until a barrier stops the expansion, such as habitat suitability and oceanographic conditions like currents, salinity and temperature (Grosberg and Cunningham, 2001). The geographic distribution of sessile benthic species is usually linked to larvae dispersive capabilities, which can be directly related with time spent in the plankton. Then, species with long-lived planktonic larvae would exhibit more extended geographical distribution patterns and lower genetic structure (Cassista and Hart, 2007) than those species with short-lived or non planktonic larvae. However, the reverse situations have been reported: low genetic structure was found in groups with low dispersal potential as direct developers and short-lived pelagic larvae or high genetic structure in groups with planktonic larvae, situations that have been explained by local oceanographic conditions and/or particular reproductive or behavioral traits (Dias et al., 2006; Holmes et al., 2004; Imron, 2007; Kenchington et al., 2006; Kyle and Boulding, 2000; Marko, 2004). More striking patterns were also reported, where species with supposed limited dispersal potential exhibit low genetic differentiation over long spatial scales, but present locally structured populations (Casu et al., 2005; Ben-Shlomo et al., 2006; Yu and Chu, 2006).

*Styela rustica* (Linnaeus, 1767) (Tunicata, Ascidiacea) is a boreal-arctic solitary ascidian. As a filter-feeder, it depends on suspended organic matter. The free-living stage is a tadpole larva, capable of autonomous locomotion. Ascidiaceans larvae are lecithothrophic and short-lived, which suggest that ascidians could be not efficient dispersers. However, *S. rustica*, as other ascidian species, shows a wide distribution range from the North Atlantic to the Arctic that, together with the relatively recent colonization of the Arctic system, could indicate that this species efficiently disperses and colonizes new habitats. This can be related to a longer larval period spent in the plankton than supposed, or a high generational turnover coupled with an efficient use of suitable habitats resulting in a rapid stepping stone process.

In this study we analyzed the genetic structure of the ascidian *Styela rustica* at Kongsfjorden, west Spitsbergen (Svalbard archipelago), using ISSR-PCR as molecular markers, in order to analyze whether it presents a low genetic structure, as can be expected due to

the historical process of recent post glaciations colonization, or if locally a degree of genetic differentiation was established, caused by short-lived larvae and limited dispersal potential.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area

Kongsfjorden is a 20 km-long and 4 to 10 km-wide high-latitude Arctic fjord in Spitsbergen that covers an area of 209 Km<sup>2</sup>. It has a maximum depth of 350 m in the central part of the fjord. Three glaciers, that discharge ice rafted materials in the fjord head, have been retreating several kilometres during the last 10–15 years. These glaciers are the most actively retreating ones in Svalbard archipelago (Svendsen et al., 2002; Wlodarska-Kowalczyk and Pearson, 2004).

### 2.2. Sample collection

Sampling of *Styela rustica* populations was carried out by SCUBA diving during the 2004 campaign in Koldewey-Station (Alfred Wegener Institut for Polar and Marine Research, Germany) in Kongsfjord, Spitsbergen (78°55' N, 11°56' E). A total of 81 individuals were collected in five populations (putative status; Fig. 1); Prins Heinrichoya (PH=25 individuals), London (Lo=19 individuals), Hansneset (HN=10 individuals) and Kongsfjordneset (KN=11 individuals) between 15 and 25 m depth, and Ny-Alesund Harbour (NA=16 individuals) between 3 and 8 m depth. Individuals were conserved in 80% ethanol until DNA extraction.

### 2.3. Laboratory methods

Genomic DNA was extracted from mantle (muscle) using the salt purification method described in protocol 1 of Bruford et al. (1992), and stored in aqueous solution at -15 °C until amplifications.

Genetic variability was assessed using inter-simple sequence repeats (ISSR-PCR) genetic markers. This technique is similar to

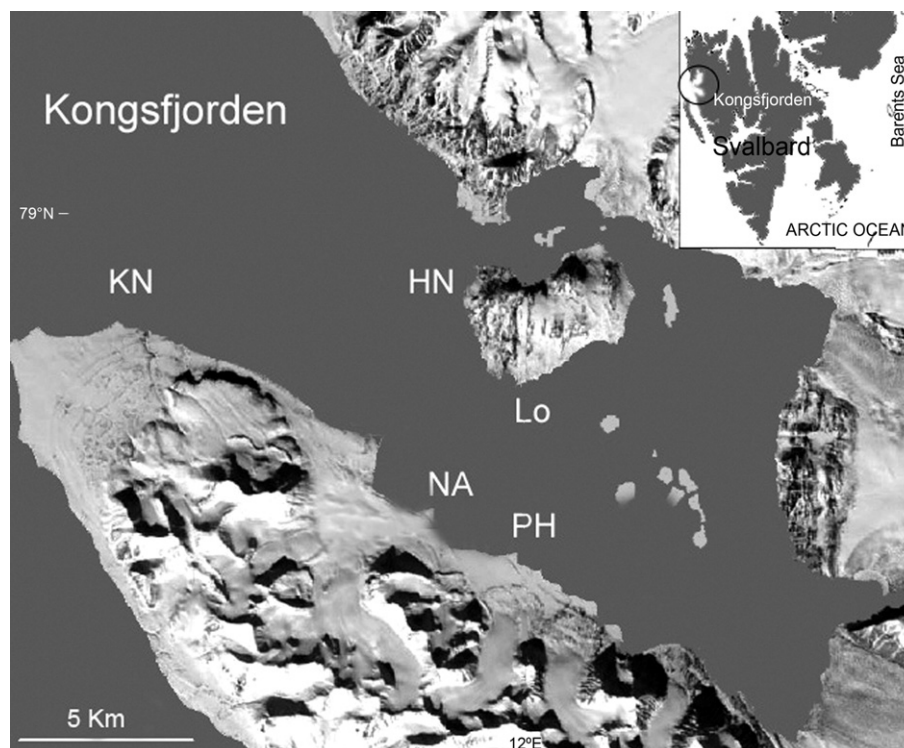


Fig. 1. Map and location of sampling sites in Kongsfjorden (Svalbard Archipelago).

**Table 1**

Genetic diversity in five populations of *Styela rustica* from Kongsfjorden (Svalbard), estimated using the Marker diversity index (M)

| Population | M     | SNK Groups |
|------------|-------|------------|
| NA         | 0.324 | A          |
| Lo         | 0.309 | AB         |
| PH         | 0.307 | AB         |
| KN         | 0.304 | AB         |
| HN         | 0.288 | B          |

Letters indicate the groups detected by Student-Newman-Keuls (SNK) multiple comparison procedure. Groups A and B indicate significant differences.

RAPDs, except that the ISSR primer consists of a di- or trinucleotide sequence repeat with a 5' or 3' anchoring sequence of 1 to 3 nucleotides. Primer sequence is also longer, allowing for a higher primer annealing temperature which results in greater band reproducibility than RAPD markers. The principle of ISSRs is that primer binding sites (microsatellite loci) are dispersed throughout the genome, so that there is a high chance that the primer binds to two sites located on opposing DNA strands within an amplifiable distance of one another. Thus, single-primer amplifications often result in a high degree of polymorphic bands, useful in population genetic studies. This technique does not require genome sequence information.

Each reaction volume contained 6 pmol primer, 200  $\mu$ M dNTP, 1 $\times$  Buffer (INVITROGEN®), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 U *Taq* DNA Polymerase (INVITROGEN®), 10 ng DNA and sterile water up to 10  $\mu$ l. Amplifications were carried out in an UNO II Biometra thermocycler. The thermocycling program consisted of an initial denaturation step of 94 °C for 2 min, followed by 34 cycles of 30 s at 94 °C, 1 min at 48 °C and 1 min 30 s extension at 72 °C, followed by a final 5 min extension at 72 °C. We tested 12 ISSR primers and 3 were chosen for the analysis due to its reproducibility and polymorphism: 5'-(AC)<sub>10</sub>AA-3'; 5'-(AC)<sub>8</sub>C-3' and 5'-(AG)<sub>8</sub>Y-3'. Negative controls for each primer were included in the amplifications in order to detect bands caused by contamination. Amplification products were electrophoresed in 1X TBE buffer (0.045 M Tris Borate, 0.001 M EDTA) on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide, along with a 1 Kb ladder. Gels were run at 110 V for 5 hours. Band patterns were visualized with UV illumination and photographed.

#### 2.4. Data analysis

Each ISSR band corresponds to a DNA sequence delimited by two inverted microsatellites. ISSR are diallelic markers, inherited in a dominant Mendelian fashion. The two possible phenotypes are: presence of a band (homozygote for the dominant allele or the heterozygote) and absence of a band (homozygote for the recessive allele). Allelic frequencies can be calculated only assuming Hardy-Weinberg equilibrium. As this information is not available for *S. rustica*, analyses that do not require converting band frequencies to allelic frequencies were performed.

A matrix of genetic distances between pairs of individuals (1-% matching) was calculated from the matrix of presence/absence of bands with the program RAPDPLOT 3.0 (Black, 1995).

Genetic diversity estimates were obtained for each population according to Kapralov et al (2006). The proportion of unmatched ISSR bands between pairs of individuals within populations was averaged for each population to obtain the Marker Diversity Index (M), defined analogously to Nei's (1978) heterozygosity (Kapralov et al., 2006). One-way Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the genetic diversity among populations, and Cochran C test was used to check the homogeneity of variances. When means were different a Student-Newman-Keuls (SNK) multiple comparison procedure was used to identify which populations differed significantly.

The matrix of interindividual distances was used to perform an analysis of molecular variance (AMOVA), where total band variation

was partitioned into a within populations and a between populations component. The level of differentiation between pairs of populations was calculated with the  $\Phi_{ST}$  index, an analogous to  $F_{ST}$  (Wright, 1969) which is a measure of the variance in allelic frequencies (or band diversity, in this case) among populations. To test for significant deviation of between-groups variation from within-group variation, 1000 permutations were conducted to obtain a *p* value. The program Arlequin 3.11 (Excoffier and Schneider, 2005) was used for these calculations.

Isolation by distance was tested by regression of the pairwise genetic differentiation and the pair-wise corresponding geographical distance between sampled populations. Geographic distance was measured as the shortest aquatic distance along the prevailing marine currents, and  $\Phi_{ST}$  between pairs of populations was used as genetic distance.

Since spatial distance is not the only factor depicting genetic patterns, but they are affected by the quality of a landscape as well (Holderegger and Wagner, 2006), a landscape-scale exploration analysis of patterns of genetic diversity and structure (genetic landscape shape) was performed using the program AIS (Miller, 2005) in order to detect the location of putative barriers or zones with low gene flow. This procedure allows the graphical representations of genetic distance patterns across landscape, through interpolation procedures of interindividual genetic distances.

### 3. Results

The three primers used revealed a total of 42 bands in the 81 individuals of *S. rustica* analysed, 38 bands were polymorphic and none was privative of populations. Primer 5'-(AC)<sub>10</sub>AA-3' amplified 18 bands; primer 5'-(AC)<sub>8</sub>C-3' amplified 15 bands and primer 5'-(AG)<sub>8</sub>Y-3' amplified 9 bands. The size of fragments ranged from 250 bp to 1,600 bp.

The genetic diversity in each population, assessed using the marker diversity index (M), ranged from 0.288 to 0.324. The HN population, located in the middle of the fjord and very close to the Blomstrandbreen glacier, showed the lowest genetic diversity. The highest diversity was exhibited by NA population, which was sampled at the harbour wall of Ny Ålesund (Fig. 1), while the other 3 populations (PH, Lo and KN) showed intermediate values of genetic diversity. Although slight, the differences were significant, and the SNK multiple comparison procedure indicated that the HN and NA populations were responsible for the statistical difference of genetic diversity (Table 1).

The AMOVA analysis showed that only 1.05% of total variation was due to differences among populations ( $\Phi_{ST}=0.011$ ;  $p>0.05$ ); most of the variability resided within populations (98.95%). However, when performed pair-wise the AMOVA analysis showed a statistically significant differentiation between PH and HN populations ( $\Phi_{ST}=0.034$ ;  $p<0.001$ ) the differences between the other pairs examined were not statistically significant (Table 2).

The isolation by distance pattern was examined using pair-wise genetic differentiation ( $\Phi_{ST}$ ) regressed against geographical distance, taken indirectly via the path of the prevailing currents. There was not a relationship between genetic and geographical distance ( $r^2=0.08$ ;

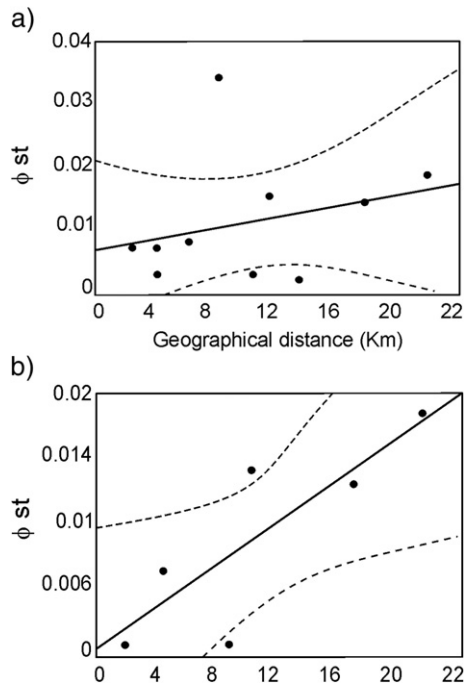
**Table 2**

Genetic differentiation between pairs of populations of *S. rustica* in Kongsfjorden

| Populations | PH    | Lo    | Pu    | HN    | KN    |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PH          | -     | 0.248 | 0.258 | <0.05 | 0.434 |
| Lo          | 0.007 | -     | 0.339 | 0.498 | 0.112 |
| Pu          | 0.007 | 0.008 | -     | 0.304 | 0.221 |
| HN          | 0.034 | 0.003 | 0.003 | -     | 0.355 |
| KN          | 0.002 | 0.014 | 0.015 | 0.019 | -     |

Pair-wise  $\Phi_{ST}$  values are shown below the diagonal, *p* values are above the diagonal.

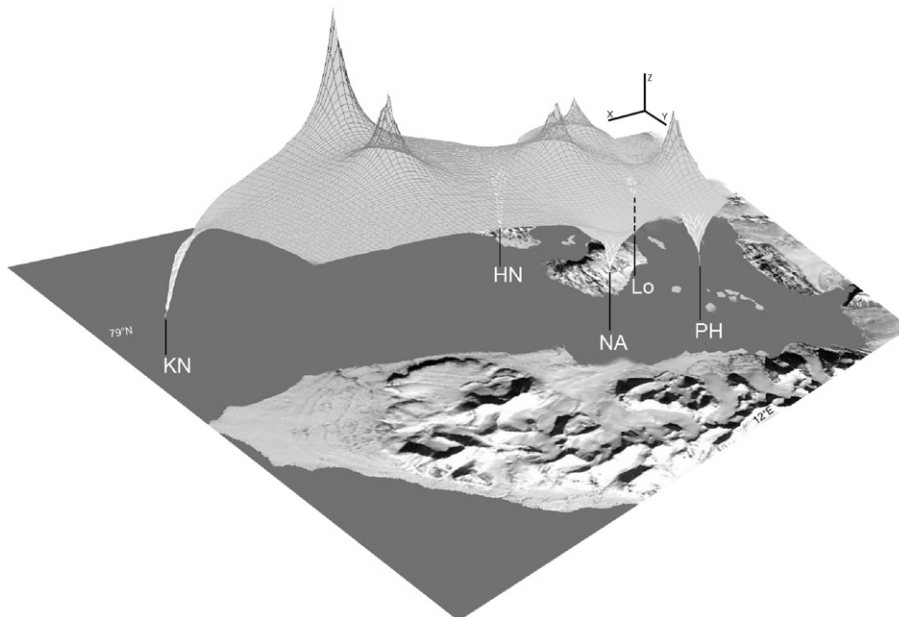




**Fig. 2.** Regressions of *Styela rustica* pair-wise geographic distances (in Km) and  $\Phi_{ST}$  values. a) Pair-wise distances among the five populations. b) Pair-wise distances excluding PH population.

$F=0.71$ ;  $p>0.05$ ) (Fig. 2a). However, if PH population is excluded, a positive relationship between genetic and geographic distances is exhibited ( $r^2=0.69$ ;  $F=9.02$ ;  $p<0.05$ ) (Fig. 2b).

The genetic landscape shape analysis, that allows the graphical representation of genetic distance patterns across landscape through interpolation procedures of interindividual genetic distances, indicated a probable important barrier to gene flow located at the middle of the fjord, where the maximum depths are present (>300 m). Other minor peaks are present at the inner fjord (Fig. 3).



**Fig. 3.** Genetic Landscape Shape interpolation analysis using a distance weighting parameter (a) of 1. Similar results were obtained using different weighting parameters. X and Y axes correspond to geographic locations; genetic distances are on the Z axis. Positive peaks show genetic discontinuities or possible barriers to gene flow.

## 4. Discussion

Genetic data demonstrated to be very useful to infer and to increase the actual understanding about the possible processes that lead to the Arctic colonization and ecosystem functioning after the last Quaternary glaciations, moreover when fossil record is lacking (Hewitt, 1996, 2000; Widmer and Lexer, 2001; Marko, 2004). A growing interest on population genetic structure surveys at different scales in the Arctic has been evident in the last decade. Most of the work in the marine realm was devoted to fishes and mammals (Wilson et al., 1996; Brown-Gladden et al., 1997; Paetkau et al., 1999; Weider and Hobæk, 2000, and others). Terrestrial plants, invertebrates, birds and mammals have been the focus of several works as well (Tollefsrud et al., 1998; Holder et al., 1999; Ehrich et al., 2000). However, this is the first work, at least to our knowledge, dealing with the population genetic structure of a benthic marine faunal organism in the high Arctic, and using ISSR-PCR markers that just recently have been used in marine species (Casu et al., 2007; Hou et al., 2006; Maltagliati et al., 2006; Lewallen et al., 2007; Varela et al., 2007).

### 4.1. Genetic Diversity

Low genetic diversity would be an expected pattern for most Arctic species as a result of the recent range expansion from southern ecosystems, of bottleneck effects on the remaining glacial refugia during the glaciations and of the posterior founder episodes from these centers when deglaciation begun (Hewitt, 2003). Consistently, a clear genetic diversity cline along a latitudinal gradient resembling ice expansion is shown by several species with some high latitude hotspots that would indicate the position of those ice free areas that harboured surviving populations (Coyer et al., 2003; Gysels et al., 2004; Provan et al., 2005; Ben-Shlomo et al., 2006). The genetic diversity found in *S. rustica* was similar to that exhibited by an Antarctic ascidian species *Aplidium falklandikum* (Demarchi unpub data). Due to the evolutionary history and stability of the Antarctic ecosystem, genetic diversity is supposed to be higher than in comparable species in the Arctic. This suggest that either, *S. rustica* shows a higher than expected diversity that could be related to the proximity of a glacial refugium or *A. falklandikum* has a lowered genetic diversity.

Data of Southern populations of *S. rustica* will be useful to answer this question.

At a local scale, the five populations of *Styela rustica* surveyed showed significant differences in genetic diversity: HN and NA populations showed the lowest and highest diversities respectively, while the other three populations showed intermediate values. Besides the historical processes previously discussed, current ecological processes can also affect the genetic variability of local populations. In the present case, HN population is situated close to the Bloomstrandbreen glacier, which has been retreating at a rate of 35 m per year being one of the most actively retreating glaciers in Svalbard (Svendsen et al., 2002). Besides the direct effect of icebergs and growlers calving from the glacier that scour the benthos causing a significant physical disturbance (Gutt and Starms, 2001), the increment of inorganic particulate matter on the water column could also play a very important role affecting benthic communities. The amount of organic carbon available for organisms, especially filter feeders like ascidians, can be severely reduced and in an extreme case the sedimentation of inorganic particles may cause filter-feeder's gills clogging (Fetzer et al., 2002). Since these processes would directly affect the population fitness and even increase mortality rates, leading to reduced population sizes, they could explain the reduced genetic variability observed in the HN population with respect to the others in the fjord. Similarly, suspended matter and sedimentation in Arctic fjords has been considered as the principal disturbance factor reducing diversity in benthic communities (Weslawski et al., 1999; Włodarska-Kowalczyk et al., 2005). Taking into account that the Arctic region, together with the West Antarctic Peninsula, is where the climate change is taking place faster (while the mean global temperature increase in the last 50 years was around 0.6 °C, in these polar areas it was around 2 °C, Vaughan et al., 2001), and glacier retreat can be a consequence of the global warming, then our results could be related to that process. On the other hand, the high diversity registered in the NA population was striking given the reduced habitat available; it is confined to a wall of 50×8 m in the harbour of Ny Ålesund. In contrast, at all the other sites (with the exception of HN that will be discussed further) the available habitat without evident discontinuities comprised several hundreds of meters horizontally, and vertically at least to the dived depths of ca. 35 m. However, the harbour of Ny Ålesund supports in summer time an intense traffic of ships that could introduce new colonizers, increasing the genetic diversity of the population.

#### 4.2. Differentiation among populations

When analysed together, no genetic differentiation was detected among the five populations of *S. rustica* studied. However, in the pairwise analysis a significant differentiation was observed between HN and PH populations. This suggests that the difference could be slight and then hindered in the global test. Although these results are in line with the expectations, it is not possible to asseverate that the weak structure observed is a signature of the last glaciations and recent colonization. Since the present genetic structure of a species is the result of historical and current processes, and the used technique does not allow differentiating between them (Bossart and Pashley-Prowell, 1998; Grosberg and Cunningham, 2001); it could be also possible that high current gene flow between these populations cause the genetic homogeneity in Kongsfjorden. Solitary ascidians as *S. rustica* are typically broadcast spawners with lecithotrophic larvae which last in average 12 h in the plankton, and in some cases up to 1 week (Svane and Young 1989; Burighel and Cloney, 1997), suggesting limited dispersal potential. However other solitary ascidian, *Pyura gibbosa*, showed no genetic differentiation over a scale of 215 km. Whereas colonial species, which are usually brooders with shorter free larval periods exhibit genetic structure even at scales of meters or tens of meters (Ayre et al 1997), including the species *Botryllus schlosseri* one of the most successful

colonizer and invader species which also shows the influence of the glaciations on their genetic structure along the European coasts (Yund and O'Neil, 2000; Ben-Shlomo et al., 2001, 2006; Stoner et al., 2002). Similarly other taxa as bivalves, corals and bryozoans with lecithotrophic or aplousic larvae show significant genetic variation on scales from tens of meters to few kilometres (Goldson et al., 2001; Holmes et al., 2004). Therefore, although perfectly possible that at the studied scale in Kongsfjorden of ca 20 km the populations of *S. rustica* are under an active gene flow causing the observed genetic structure it is not possible to asseverate that either.

In order to analyze which of the hypothesized processes, founder effect or current larval exchange, is more likely responsible for the weak structure found, isolation by distance patterns and genetic landscape shape were analyzed. When all populations were included, no isolation by distance pattern was detected. But if PH population is excluded from the analyses, a strong positive pattern of isolation by distance along the prevailing currents in the fjord is showed. This would suggest a current degree of gene flow on the fjord. But why the PH population is excluded from this pattern? A likely explanation can be related to the fact that this population, contrary to all the others, is established in an area dominated by soft bottoms, interspersed with small rocks and boulders conforming a mosaic pattern of small islands of suitable habitat where individuals of *S. rustica* are settled, which are isolated from the other populations by the depths in the middle fjord and by soft substrata with those in the same coast. This could suggest that the similarity with the other populations can be due to a founder effect and can also explain the difference with the HN population which diversity was significantly reduced if, by chance, the lost alleles had been those shared with PH population.

The genetic landscape shape analysis is indicating that the middle fjord zone can be considered as important barrier to the gene flow; it shows an unusual high genetic discontinuity which coincides with depths of more than 300 m that are below the bathymetric range of *S. rustica* (Van Name, 1945). This is consistent with the oceanography of Kongsfjorden; the circulation of the water inside the fjord is dominated by tidal currents that go along lateral boundaries, coastlines (Svendsen et al., 2002), so larval transport may be facilitated by currents moving parallel to the coast. This would suggest that the connection between populations on the same coast can be realized via a stepping-stone process in suitable habitats and direct transport of larvae to the opposite coast.

In conclusion, the isolation by distance model, with the exception of PH, and the genetic landscape analysis suggest a current larval exchange, since a founder effect in the postglacial period with sporadic or no posterior gene flow would had produced a more chaotic pattern, mainly driven by genetic drift and inbreeding.

#### Acknowledgements

We thank the members of Koldewey Station (2004) for their assistance, especially to our dive companions Saskiachen Brandt, Danielito Carstensen, Felipe Schubert and Kleine Nik Probst. Financial and logistic supports were provided by Alfred Wegener Institut, BMBF-SECYT and CONICET. This work has been made in the context of a PhD in the Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [SS]

#### References

- Ayre, D.J., Davis, A.R., Billingham, M., Llorens, T., Styan, C., 1997. Genetic evidence for contrasting patterns of dispersal in solitary and colonial ascidians. *Mar. Biol.* 130, 51–61.
- Ben-Shlomo, R., Douek, J., Rinkevich, B., 2001. Heterozygote and chimerism in remote populations of a colonial ascidian from New Zealand. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 209, 109–117.
- Ben-Shlomo, R., Paz, G., Rinkevich, B., 2006. Postglacial-period and Recent Invasions Shape the Population Genetics of Botryllid Ascidians along European Atlantic Coasts. *Ecosystems* 9, 1118–1127.

- Black, B., 1995. FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR data. [wcb4@lamar.colostate.edu](mailto:wcb4@lamar.colostate.edu).
- Bossart, J.L., Prowell, D.P., 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: Limitations, lessons and new directions. *Trends Ecol. Evol.* 13, 202–206.
- Brown-Gladden, J.G., Ferguson, M.M., Clayton, J.W., 1997. Matriarchal genetic population structure of North American beluga whales *Delphinapterus leucas* (Cetacea: Monodontidae). *Mol. Ecol.* 6, 1033–1046.
- Bruford, M.E., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., Burke, T., 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel, A.R. (Ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach*. Oxford University Press, p. 228.
- Burighel, P., Cloney, R.A., 1997. Urochordata: Ascidiacea. In: Harrison, F.W., Ruppert, E.E. (Eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates*, vol. 15. Wiley-Liss, New York, pp. 221–347.
- Cassista, M.C., Hart, M.W., 2007. Spatial and temporal genetic homogeneity in the Arctic surfclam (*Macrotremis polynyma*). *Mar. Biol.* 152, 569–579.
- Casu, M., Maltagliati, F., Cossu, P., Lai, T., Galletti, M.C., Castelli, A., Commiato, J.A., 2005. Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (USA), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 325, 46–54.
- Casu, M., Casu, D., Lai, T., Cossu, P., Curini-Galletti, M., 2007. A molecular tool for genetic surveys in the red coral (*Corallium rubrum*): An Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs) perspective. *Biochem. Syst. Ecol.* doi:10.1016/j.bse.2007.08.011.
- Coyer, J.A., Peters, A.F., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2003. Post-ice age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Phaeophyceae; Fucales) populations in Northern Europe. *Mol. Ecol.* 12 (7), 1817–1829.
- Dayton, P.K., 1990. Polar benthos. In: Smith, W.E. (Ed.), *Polar Oceanography, part B: Chemistry, Biology and Geology*. Academic Press, London, pp. 631–685.
- Dayton, P.K., Mordida, B.J., Bacon, F., 1994. Polar marine communities. *Am. Zool.* 34, 90–99.
- Dias, M.G., Duarte, L.F.L., Solferini, V.N., 2006. Low genetic differentiation between isolated populations of the colonial ascidian *Sympygmia rubra* Monniot, C. 1972. *Mar. Biol.* 148, 807–815.
- Dunton, K., 1992. Arctic biogeography: The paradox of the marine benthic fauna and flora. *Trends Ecol. Evol.* 7 (6), 183–189.
- Excoffier, L.G.L., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* 1, 47–50.
- Ehrich, D., Fedorov, V.B., Stenseth, N.C., Krebs, C.J., Kenney, A., 2000. Phylogeography and mitochondrial DNA (mtDNA) diversity in North American collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*). *Mol. Ecol.* 9, 329–337.
- Fetzer, I., Lønne, O.J., Pearson, T., 2002. The distribution of juvenile benthic invertebrates in an arctic glacial fjord. *Polar Biol.* 25, 303–315.
- Goldson, A.J., Hughes, R.N., Gliddon, C.J., 2001. Population genetic consequences of larval dispersal mode and hydrography: A case study with bryozoans. *Mar. Biol.* 138, 1037–1042.
- Gray, J.S., 2001. Marine diversity: The paradigms in patterns of species richness examined. *Sci. Mar.* 65 (2), 41–56.
- Grosberg, R., Cunningham, C.W., 2001. Genetic structure in the sea from populations to communities. In: Bertness, M.D., Gaines, S., Hay, M.E. (Eds.), *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, M. A., pp. 61–84.
- Gutt, J., Starmans, A., 2001. Quantification of iceberg impact and benthic recolonization patterns in the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biol.* 24, 615–619.
- Gysels, E.S., Hellems, B., Pampouli, C., Volckaert, F.A.M., 2004. Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Mol. Ecol.* 13, 403–417.
- Hewitt, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247–276.
- Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907–913.
- Hewitt, G.M., 2003. A climate for colonization. *Hereditas* 1–2.
- Holderegger, R., Wagner, H.H., 2006. A brief guide to Landscape Genetics. *Landsc. Ecol.* 21, 793–796.
- Holder, K., Montgomerie, R., Friesen, V.L., 1999. A test of the glacial refugium hypothesis using patterns of mitochondrial and nuclear DNA sequence variation in rock ptarmigan (*Lagopus mutus*). *Evolution* 53, 1936–1950.
- Holmes, S.P., Dekker, R., Williams, I.D., 2004. Populations dynamics and genetic differentiation in the bivalve mollusc *Abra tenuis*: aplanic dispersal. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 268, 131–140.
- Hou, L., Lü, H., Zou, X., Xiangdong, B., Yan, D., He, C., 2006. Genetic characterizations of *Macraa veneriformis* (Bivalve) along the Chinese coast using ISSR-PCR markers. *Aquaculture* 261, 865–871.
- Imron, Jeffrey, B., Hale, P., Degnan, B.M., Degnan, S.M., 2007. Pleistocene isolation and recent gene flow in *Haliotis asinina*, an Indo-pacific vetigastropod with limited dispersal capacity. *Mol. Ecol.* 16, 289–304.
- Kapralov, M.V., Gabrielsen, T.M., Sarapultsev, I.E., Brochmann, C., 2006. Genetic enrichment of the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* at its southern periphery via the alpine sexual *Saxifraga sibirica*. *Mol. Ecol.* 15, 3401–3411.
- Kennington, E.L., Patwary, M.U., Zouros, E., Bird, C.J., 2006. Genetic differentiation in relation to marine landscape in a broadcast-spawning bivalve (*Placopecten magellanicus*). *Mol. Ecol.* 15, 1781–1796.
- Kyle, C.J., Boulding, E.G., 2000. Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Mar. Biol.* 139, 835–845.
- Lewallen, E.A., Anderson, T.W., Bohonak, A.J., 2007. Genetic structure of leopard shark (*Triakis semifasciata*) populations in California waters. *Mar. Biol.* 152, 599–609.
- Maltagliati, F., Lai, T., Casu, M., Valdesalici, S., Castelli, A., 2006. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 626–634.
- Marko, P.B., 2004. What's larvae got to do with it? Disparate patterns of post-glacial population structure in two benthic marine gastropods with identical dispersal potential. *Mol. Ecol.* 13, 597–611.
- Miller, M.P., 2005. Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J. Heredity* 96, 722–724.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583–590.
- Petit, R.J., Aguinagalde, I., De Beaulieu, J.L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J.P., Rendell, S., Vendramin, G.G., 2003. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300, 1563–1565.
- Paetkau, D., Amstrup, S.C., Born, E.W., Calvert, W., Derocher, A.E., Garner, G.W., Messier, F., Stirling, I., Taylor, M.K., Wiig, Ø., Strobeck, C., 1999. Genetic structure of the world's polar bear populations. *Mol. Ecol.* 8, 1571–1584.
- Piepenburg, D., 2005. Recent research on Arctic benthos: Common notions need to be revised. *Polar Biol.* 28, 733–755.
- Provan, J., Wattier, R.A., Maggs, C.A., 2005. Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmari palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Mol. Ecol.* 14, 793–803.
- Stoner, D.S., Ben-Schlomo, R., Rinkevich, B., Weissman, I.V., 2002. Genetic variability of *Botryllus schlosseri* invasions to the east and west coasts of the USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243, 93–100.
- Svane, I., Young, C.M., 1989. The ecology and behaviour of ascidian larvae. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 27, 45–90.
- Svendsen, H., Beszczynska-Møller, A., Hagen, J.O., Lefaucconier, B., Tverberg, V., Gerland, S., Ørbæk, J.B., Bischof, K., Papucci, C., Zajaczkowski, M., Azzolini, R., Bruland, O., Wiencke, C., Winther, J.-G., Dallmann, W., 2002. The physical environment of Kongsfjorden-Krossfjorden, an Arctic fjord system in Svalbard. *Polar Res.* 21, 133–166.
- Tollefsrud, M.M., Bachmann, K., Jakobsen, K.S., Brochmann, C., 1998. Glacial survival does not matter. II: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga cespitosa*. *Mol. Ecol.* 7, 1217–1232.
- Van Name, W.G., 1945. The North and South American ascidians. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 84, 1–476.
- Varela, M.A., González-Tizón, A., Mariñas, L., Martínez-Lage, A., 2007. Genetic Divergence Detected by ISSR Markers and Characterization of Microsatellite Regions in *Mytilus* Mussels. *Biochem. Genet.* 45, 565–578.
- Vaughan, D.G., Marshall, G.J., Connolley, W.M., King, J.C., Mulvaney, R., 2001. Devil in the Detail. *Science* 293, 1777–1779.
- Weider, L.J., Hobæk, A., 2000. Phylogeography and arctic biodiversity: A review. *Ann. Zool. Fenn.* 37, 217–231.
- Weslawski, J.M., Szymelfenig, M., Zajaczkowski, M., Keck, A., 1999. Influence of salinity and suspended matter on benthos of an Arctic tidal flat. *J. Mar. Sci.* 56, 194–202.
- Widmer, A., Lexer, C., 2001. Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends Ecol. Evol.* 16 (6), 267–269.
- Wilson, C.C., Hebert, P.D.N., Reist, J.D., Dempson, J.B., 1996. Phylogeography and postglacial dispersal of arctic charr *Salvelinus alpinus* in North America. *Mol. Ecol.* 5, 187–197.
- Włodarska-Kowalczyk, M., Pearson, T.H., 2004. Soft-bottom macrobenthic faunal associations and factors affecting species distributions in an Arctic glacial fjord (Kongsfjord, Spitsbergen). *Polar Biol.* 27, 155–167.
- Włodarska-Kowalczyk, M., Pearson, T.H., Kendall, M.A., 2005. Benthic response to chronic natural physical disturbance by glacial sedimentation in an Arctic fjord. *MEPS* 303, 31–41.
- Wright, S., 1969. Evolution and the genetics of populations. The theory of gene frequencies, Vol. 2. Univ. of Chicago Press, Chicago, IL.
- Yu, D.H., Chu, K.H., 2006. Low genetic differentiation among widely separated populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* as revealed by AFLP. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 333, 140–146.
- Yund, P.O., O'Neil, P.G., 2000. Microgeographic genetic differentiation in a colonial ascidian (*Botryllus schlosseri*) population. *Mar. Biol.* 137, 583–588.



# Population genetic structure of the Antarctic ascidian *Aplidium falklandicum* from Scotia Arc and South Shetland Islands

Milagros Demarchi · Marina B. Chiappero ·  
Marcos Tatián · Ricardo Sahade

Received: 13 November 2009 / Revised: 5 June 2010 / Accepted: 7 June 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** In sessile marine organisms, gene flow between populations depends mainly on free-living reproductive stages (such as larvae and gametes), and usually the strength of genetic structure is related to the time spent in the plankton and physical factors as oceanographic conditions. In Antarctica, abyssal depths that surround the continent and the Polar Front are considered strong barriers for benthic marine fauna, keeping the continent isolated from other shelves. The only available shallow water habitats between South America and the Antarctic continent are those around the Scotia Arc Islands; there are no shallow water habitats between the other southern continents and Antarctica. In this work, ISSRs-PCR markers were used to study the genetic structure of populations of *Aplidium*

*falklandicum*, a compound ascidian with short-lived lecithotrophic larvae. A highly significant genetic differentiation ( $\Phi_{ST} = 0.405$ ;  $P < 0.05$ ) and a pattern of isolation by distance were found. A genetic landscape approach identified a discontinuity in genetic diversity, coincident with the southernmost registered position of the Polar Front. For *A. falklandicum*, a species with presumably low capacity of long distance dispersal, the abyssal depths together with the large geographic distances create a barrier for gene flow.

**Keywords** *Aplidium falklandicum* · Population genetics · ISSR-PCR · Antarctic shallow shelf

## Introduction

The absence of genetic exchange between populations can lead to extreme genetic differentiation and ultimately to reproductive isolation and speciation. Consequently, it is important to estimate not only the dispersion potential of organisms but also their ability of leaving progeny in the recently colonized population, that is, of gene flow (Palumbi 1996). Gene flow not only counteracts divergence generated by genetic drift but also introduces variability into a population, making it less prone to extinction.

Antarctic shelf environments are isolated from those of the adjacent continents by the abyssal depths surrounding Antarctica (up to 5,000 m in some areas) and by a strong oceanic stream, the Antarctic Circumpolar Current (ACC) and its associated fronts (Clarke and Crame 1989). The formation of the ACC was led by the opening of the Drake Passage, in the Late Paleocene, which generated a new seaway between South America and Antarctica (Maldonado et al. 2003). The northern limit of the ACC is conformed by the Antarctic Polar Front (PF) (Dell 1972), a transition area

---

M. Demarchi · M. Tatián · R. Sahade (✉)  
Ecología Marina, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y  
Naturales, Universidad Nacional de Córdoba,  
Av. Vélez Sársfield 299, 5000 Córdoba, Argentina  
e-mail: rsahade@efn.uncor.edu

M. Demarchi  
e-mail: milydemarchi@hotmail.com

M. Tatián  
e-mail: mtatian@efn.uncor.edu

M. Demarchi · M. B. Chiappero  
Genética de Poblaciones y Evolución,  
Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales,  
Universidad Nacional de Córdoba,  
Av. Vélez Sársfield 299, 5000 Córdoba, Argentina

M. B. Chiappero  
e-mail: mbchiappero@efn.uncor.edu

M. Demarchi · M. B. Chiappero · M. Tatián · R. Sahade  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y  
Tecnológicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

between Antarctic and sub-Antarctic waters extending to a depth of 1,000 m. This zone shows steep gradients of temperature, salinity and nutrients that act as a barrier to free north–south exchange of water, isolating Antarctic shelf communities geographically, climatically, thermally and oceanographically, therefore representing an important biogeographic boundary (Clarke et al. 2005; Barnes et al. 2006). Under these conditions of isolation, the Antarctic biota evolved in a cold but physically stable ecosystem with predictable seasonal pulses of biologic productivity, displaying nowadays a unique shelf community biodiversity and a high degree of endemisms (Dayton 1990; Clarke 1996; Clarke and Johnston 2003; Gili et al. 2006).

Many benthic species are present in the Magellanic Province (Subantarctic Region) and in the Antarctic Region (Clarke and Crame 1989; Arntz and Ríos 1999, Barnes and De Grave 2001; Ramos-Esplá et al. 2005). Therefore, several authors have inquired about the permeability of the PF and the different mechanisms to cross it displayed by different species; one possible mechanism would be through intrusions of eddies, the high abundance and biomass of euphausiids in the Subantarctic Region was related with a cold eddy from the Antarctic area (Bernard et al. 2007). On the other hand, two species of decapod crustaceans characteristic of the Subantarctic Region found in Antarctic waters may have crossed the PF through eddies (Thatje and Fuentes 2003). Other possible mechanisms to cross that barrier would include migration through abyssal depths in the case of euribathic species or migration through the shelves of the Scotia Arc Islands. These sets of islands offer a wide area of shallow platforms appropriate for benthic macrofauna settlement as it goes through the abyssal depths surrounding Antarctica, giving the chance to benthic organisms, specially with high dispersal potential to cross from South America to Antarctica and vice versa in a stepping stone process (Clarke and Crame 1989).

*Aplidium falklandicum* Millar 1960 (Polyclinidae) is a colonial benthic sessile ascidian whose distribution includes SW Atlantic (Patagonia), Malvinas/Falkland Islands, South Georgia Island, South Orkney Islands, Antarctic Peninsula and Kerguelen Islands (Millar 1960). Zooids that constitute a colony are completely independent clonemates. In Polyclinidae, sexual reproduction occurs when sperm released by a hermaphroditic zooid enters through the oral siphon of a zooid from the same or another colony and fertilizes eggs in the atrium, self-fertilization being a possible trait in this species. The embryonic stage consists of a pelagic tadpole larva with a locomotory tail that allows some movements; despite this, it can be easily carried out by ocean currents. All ascidian larvae are lecithotrophic and their life span in colonial ascidians ranges from a few minutes to a couple of hours and is extremely short when compared with other taxa (Svane and Young 1989). When the larva disperses from a mother colony, it

rapidly settles down and metamorphoses into a founder individual (oozoid) that like other clonal invertebrates grows through asexual reproduction into a multi-individual colony composed by genetically identical zooids (Stoner and Weissman 1996). The larval stage is responsible for the dispersion of the species and it is also the most vulnerable one. Considering its short lived larvae, *A. falklandicum* would be useful as model for testing the dispersal potential of sessile benthic species across the Scotia Arc Islands.

In this study, the genetic variability of five populations of *A. falklandicum* from the South Shetland, South Orkney and South Georgia Islands was quantified using Inter Simple Sequence Repeats-PCR (ISSR-PCR) as genetic markers. The genetic structure was analyzed, and the possible role of geographic distance as a barrier to gene flow in this species with presumable low dispersive capabilities was evaluated.

## Materials and methods

### Study material

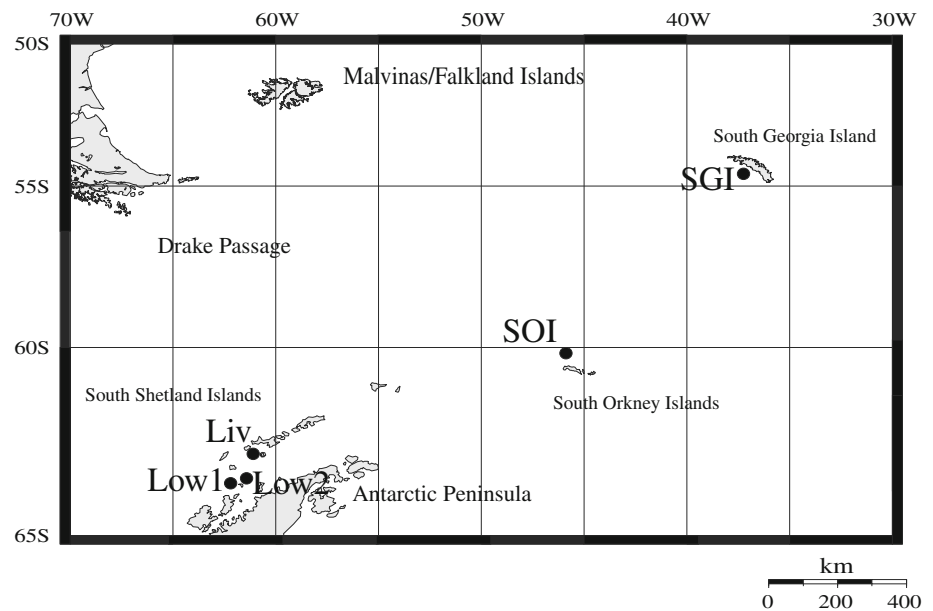
A total of 53 colonies of *A. falklandicum* were collected from the Scotia Arc and Shetland Islands during LAMPOS ANT XIX-5 expedition of the “RV Polarstern” in April 2002, and during the BENTART-06 Antarctic Project of the “BIO Hespérides” in January and February 2006. Two stations were sampled in the Scotia Arc: South Georgia Island (SGI; 54° 27' S, 35° 41' W; 257 m depth;  $n = 12$ ) and South Orkney Islands (SOI; 60° 58' S, 43° 26' W; 400 m depth;  $n = 12$ ). Three stations were sampled in the Shetland Islands: one at Livingston Island (Liv; 63° 01' S, 60° 32' W; 215 m;  $n = 10$ ) and two at Low Island, Low1 (63° 43' S, 62° 21' W; 86 m depth;  $n = 10$ ) and Low2 (63° 43' S, 62° 24' W; 97 m depth;  $n = 9$ ) (Fig. 1). All samples were collected with an Agassiz trawl and kept in 100% ethanol until processing.

### Genomic DNA extraction and amplification conditions

Genomic DNA was purified using the salt purification method described in protocol 1 of Bruford et al. (1992). Zooids were processed by removing the tunic, gut and larvae if any to avoid amplifications from possible contaminants like commensal organisms and gut content.

Genetic variability was studied employing Inter Simple Sequence Repeats (ISSR-PCR) as molecular markers (Zietkiewicz et al. 1994; Bornet and Branchard 2001). The ISSR-PCR technique is based on the amplification of nuclear DNA sequences delimited by two inverted microsatellites, with primers composed of a specific microsatellite sequence. Each primer usually amplifies several loci; polymorphism is revealed as presence or absence of a band

**Fig. 1** Location of the five studied populations of *Aplidium falklandicum* in the west side of the Antarctic Peninsula and in the Scotia Ridge



of a given molecular size and therefore, these markers segregate as dominant. Despite its dominant mode of inheritance, this technique has several advantages. First, it does not require prior sequence knowledge. Second, it reveals high levels of polymorphism. Third, as amplified sequences lie between microsatellite repeats, they are usually located in non-coding regions of the nuclear genome and, therefore, selective neutrality is highly probable. Finally, ISSR primers are longer (typically 18–22 bp) and have higher annealing temperatures (around 50°C) than RAPD primers; therefore, the band patterns obtained with this technique are highly repeatable (Segman et al. 2006).

Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed in each 10 µl reaction, consisting of 6 pmol primer, 200 µM dNTP, 1 × Buffer (SIGMA®), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 U REDTaq DNA Polymerase (SIGMA®), 5% DMSO, and 10 ng of genomic DNA. Amplifications were carried out in an UNO II Biometra thermocycler using the following cycling profile: an initial denaturation step of 94°C for 4 min followed by 27 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at the annealing temperature (50–54°C depending on the primer), and 4 min extension at 72°C, followed by a final 7-min extension at 72°C. Eight primers were screened: (AC)<sub>10</sub>AA, (TG)<sub>10</sub>GG, (GT)<sub>10</sub>TG, (TG)<sub>10</sub>GC, (AC)<sub>10</sub>AG, (TG)<sub>10</sub>, (TCC)<sub>10</sub> and (GACA)<sub>5</sub>. PCR products were electrophoresed through 1.2% agarose gels for 4 h in 0.5 × TBE buffer at 120 V, along with a known molecular size standard. Gels were stained with ethidium bromide, visualized in an UV transilluminator and photographed.

Primers used for further analyses were selected on the basis of number, spacing and intensity of bands amplified and polymorphisms revealed: (AC)<sub>10</sub>AA, (AC)<sub>10</sub>AG, (TCC)<sub>10</sub> and (GACA)<sub>5</sub>.

In order to verify if colonies were formed by cloned zooids exclusively, five randomly chosen zooids from three colonies from the stations SGI and SOI were extracted and amplified independently, prior to the processing of all samples. PCR products were electrophoresed in a single gel to corroborate that band patterns among zooids from the same colony are identical.

#### Genetic data analysis

Two bands were assumed to be homologous if they had the same molecular weight. A presence/absence matrix for all scorable bands for all individuals was generated. The used approach did not require the assumption of Hardy–Weinberg equilibrium, as this information is not available for *A. falklandicum* and it cannot be obtained from dominant markers. Genetic diversity within populations was estimated using the marker diversity index (M), defined analogously to Nei's heterozygosity (Nei 1978; Kapralov et al. 2006). The proportion of unmatched ISSR bands between every pair of individuals within a population was calculated. These values were averaged to obtain M within a population. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare M among populations. In order to compare the differences in mean M among populations, a Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparisons procedure was used with the program Statistica 6 (StatSoft, Inc.) (StatSoft, Inc., STATISTICA 2001). Homogeneity of variances was tested using the Cochran C' Test. A correlation between M diversity index and depth was performed with Statistica 6 (StatSoft, Inc.) (StatSoft Inc., STATISTICA 2001), in order to identify if the genetic variability was related to depth.

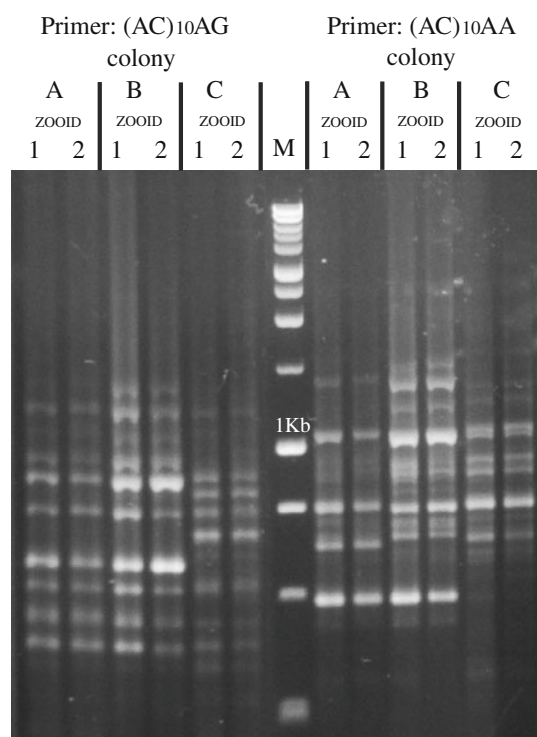
Population structure was analyzed employing the analysis of molecular variance (AMOVA) in order to test the null hypothesis of panmixia among populations. A matrix of Nei and Li (1985) genetic distances between pairs of individuals was calculated from the presence/absence matrix with RAPDplot (Black 1995). The AMOVA analysis was run using the program WINAMOVA 1.55 (Excoffier 1995), which calculates the components of the genetic variance and the  $\Phi_{ST}$  indices for the whole population and between pairs of populations. The  $\Phi_{ST}$  value, which is analogous to  $F_{ST}$  (Wright 1931), is an estimator of the level of genetic differentiation. To test for significant deviation of between groups variation from within-group variation, 1,000 permutations were conducted to obtain a  $P$  value.

Different approaches to investigate genetic landscape features were used. A Mantel test was performed in order to test for correlation between geographic (straight-line) and genetic ( $\Phi_{ST}$  values) distances with the program TFPGA 1.3 (Miller 1998). A plot called “Genetic Landscape Shapes” was obtained with the program AIS (Miller 2005), which is a graphical representation of diversity patterns across the landscape. This analysis starts by constructing a connectivity network of the sampling locations based on a Delaunay triangulation. Then, it assigns a genetic distance to the landscape coordinate at the midpoint of each network edge connecting two populations, and uses an interpolation procedure to infer genetic distances between points located in a uniform grid superimposed on the sampled landscape. This procedure allows the identification of putative barriers to gene flow and has been used widely in vagile and sessile species and can resolve population substructure across different geographic scales (Manel et al. 2003; Holderegger and Wagner 2006). A neighbor-joining tree of Nei and Li (1985) genetic distances between pairs of individuals was constructed with the program Phylip ver 3.5 (Felsenstein 1993) in order to visualize the genetic relationships between individuals.

## Results

The clonal nature of colonies was confirmed running side by side the amplification products from zooids of the same colony. This allowed to pool the DNA from zooids of the same colony and deal with large amounts of DNA (Fig. 2).

The four primers chosen revealed a total of 79 bands (between 16 and 22 for each primer), ranging from 300 to 1,900 bp (Table 1), and only 2 bands were monomorphic. A total of 25 bands were unique for the South Shetland Islands populations, not shared by SGI and SOI, while these two populations had 14 unique bands, not shared with the South Shetland populations. This means that 49.6% of the amplified bands were not shared between South Shet-



**Fig. 2** ISSRs band patterns of two zooids of each of three colonies of *Aplidium falklandicum* obtained with two ISSR primers

**Table 1** ISSRs primers used and number of amplified bands in the PCR reaction

| Sequence              | Polymorphic bands | Monomorphic bands |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
| (AC) <sub>10</sub> AG | 16                | –                 |
| (AC) <sub>10</sub> AA | 19                | –                 |
| (AC) <sub>7</sub> C   | 20                | 2                 |
| (GACA) <sub>4</sub>   | 22                | –                 |
| Total                 | 79                |                   |

land populations and SGI-SOI. SGI had two unique bands. Almost 50% of the monomorphic bands in any of the three South Shetland populations were present neither in SGI nor in SOI.

Marker diversity ( $M$ ) ranged from 0.233 to 0.364 (Table 2). SNK multiple comparison procedure showed significant differences between two groups: (A) SGI, Low1 and Low2; and (B) SOI and Liv.  $M$  diversity index and depth were positively correlated ( $r = 0.7$ ;  $P < 0.05$ ).

The AMOVA analysis showed that 40% of the total variation found was attributable to differences among populations. The  $\Phi$ -statistic revealed significant genetic differentiation ( $\Phi_{ST} = 0.405$ ,  $P < 0.001$ ) (Table 3), indicating that genetic heterogeneity was present at this spatial scale. Pairwise estimations of  $\Phi_{ST}$  were significant in all cases but one (Table 4). The highest value was obtained between SGI and Low1 ( $\Phi_{ST} = 0.587$ ,  $P < 0.001$ ) the most distant locations,

**Table 2** Marker diversity index (M) for populations of *Aplidium falklandicum*

| Pops | M     | Groups |
|------|-------|--------|
| SGI  | 0.241 | A      |
| SOI  | 0.364 | B      |
| LIV  | 0.345 | B      |
| Low1 | 0.233 | A      |
| Low2 | 0.258 | A      |

Different letters indicate significant differences between groups obtained with Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparison procedure

while between the closest ones (Low1 and Low2), the differentiation was the lowest ( $\Phi_{ST} = 0.085$ ,  $P < 0.05$ ) (Table 4). The Mantel test showed a significant correlation between geographic and genetic distances ( $r = 0.95$ ;  $P < 0.05$ ), indicating an isolation by distance pattern where genetic exchange decreases with geographic distance.

The interpolation analysis (Fig. 3) found the greatest peak of genetic discontinuity between SOI and SGI and a smaller one between Low2 and Liv, differentiating tree main groups: (a) Low1, Low2 and Liv, (b) SOI, and (c) SGI.

The cluster analysis grouped the individuals in three clusters, one corresponding to SGI individuals, other to SOI and the third comprising individuals from Liv, Low1 and Low2 (Fig. 4).

## Discussion

This study presents the first analysis of population genetic structure in an Antarctic ascidian species. ISSRs markers demonstrated its power to assess genetic variability information in *A. falklandicum*. This technique has recently become more used in population genetic studies of marine organisms, such as bivalves, fishes, mussels, red coral, leopard sharks, limpets, and arctic ascidians (Hou et al. 2006; Maltagliati et al. 2006; Lewallen et al. 2007; Varela et al. 2007; de Aranzamendi et al. 2008; Demarchi et al. 2008).

**Table 3** Results of analysis of molecular variance in five populations of *Aplidium falklandicum*

| Source of variation | Sum of squares | Degrees of freedom | Variance components | Percentage of variation | $\Phi_{ST}$ | $P$   |
|---------------------|----------------|--------------------|---------------------|-------------------------|-------------|-------|
| Among pops          | 3.630          | 4                  | 0.075               | 40.46                   | 0.405       | <0.05 |
| Within pops         | 5.325          | 48                 | 0.111               | 59.54                   |             |       |
| Total               | 8.955          | 52                 | 0.186               | 100                     |             |       |

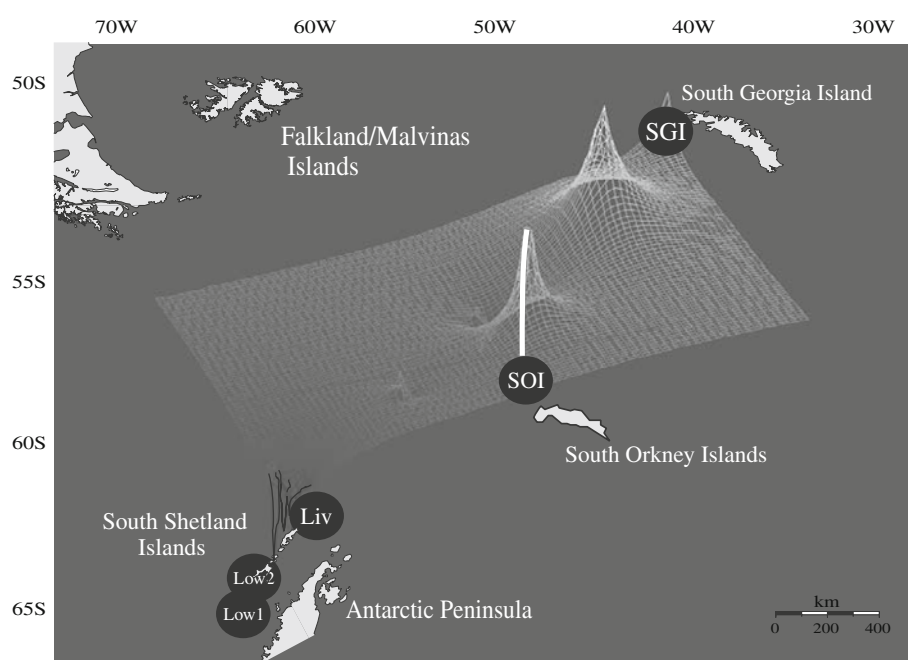
**Table 4**  $\Phi_{ST}$  values between pairs of populations of *Aplidium falklandicum* (below the diagonal); above the diagonal statistical significance

| Pops | SGI   | SOI         | LIV         | Low1        | Low2        |
|------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| SGI  | –     | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ |
| SOI  | 0.399 | –           | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ |
| LIV  | 0.514 | 0.313       | –           | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ |
| Low1 | 0.587 | 0.477       | 0.088       | –           | $P = 0.043$ |
| Low2 | 0.553 | 0.445       | 0.105       | 0.085       | –           |

A positive correlation between M diversity index and depth was observed. Iceberg scouring could explain the increase in the genetic diversity in deeper waters. Ice is one of the major features in structuring benthic communities in Antarctic shallow waters (Gutt and Starmans 2001). It acts in geological scales as a wiper for sessile communities in glacial maxima, and in an ecological scale as a regional disturbing factor (Gutt et al. 1996; Gili 2001; Clarke et al. 2004; Gili et al. 2006). Ice can affect community structure and population genetic diversity by removing a considerable amount of biomass with the consequent loss of individuals and alleles. There is previous evidence that ice scouring reduces species diversity and abundance; in areas with high ice-scouring frequency, there is considerable low species diversity, and the recovery rate of communities is very slow (Brown et al. 2004). Gutt and Piepenburg (2003) found in analysis of seabed videos at a local scale, that iceberg undisturbed megabenthic assemblages were significantly more diverse than disturbed habitats. Smale (2008) found that the relative abundance of the low mobility species was significantly greater at low ice disturbance levels. Along the Antarctic Peninsula, icebergs can impact the bottom up to 150–200 m depth (Dowdeswell and Bamber 2007). Low1 and Low2 stations were sampled at depths less than 100 m, and therefore they would be affected by scouring that could cause fluctuations in the population effective size and the observed loss of genetic variability. SOI and Liv stations, which were sampled in shelves deeper than 200 m, housed the highest diversity. Iceberg scouring would have a slighter effect on these populations. SGI population was sampled at 257 m, but showed the lowest M value, suggesting that the low genetic diversity would not be a result of ice scouring. A possible explanation could



**Fig. 3** Genetic landscape shape interpolation plot of ISSR data, where heights reflect genetic discontinuities and valleys genetic similarities



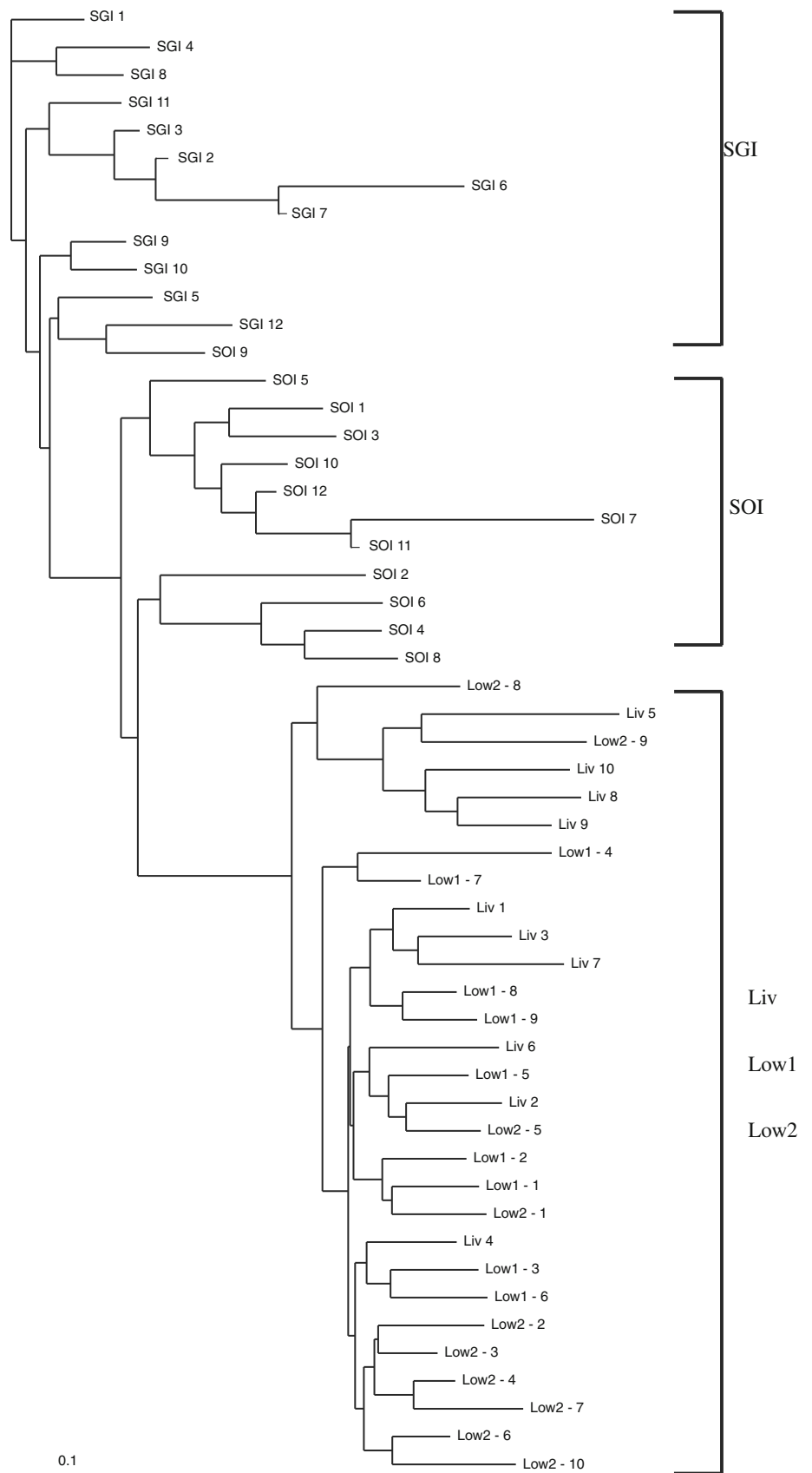
be the instability of the system due to the natural north–south shifts of the PF position. In early literature, the PF position was described to be 50°S (Hedgpeth 1969), but recent cruises, the ANDEEP and LAMPOS of the *RV Polarstern*, have collected data indicating that PF could occasionally be south of the South Georgia Island (Grabbert et al. 2003; Arntz 2005; Barnes 2005). Moreover, there is other important front in the ACC, the southern ACC front (SACCF) that has been registered sometimes north of South Georgia and sometimes wrapping anticyclonically around the island and retroflecting north (Thorpe et al. 2002). Changes in the PF position expose South Georgia Island to a continuous environmental instability and might affect establishment of recruits and migrant larvae, resulting in a low effective population size, which will translate into a loss of genetic variability. Low migration rates would also decrease the effective size of SGI and consequently its genetic variability. However, it might be useful to sample south of the PF, in a homogeneous area before accepting the iceberg scouring hypothesis.

The significant genetic differentiation obtained for the five populations (overall  $\Phi_{ST} = 0.405$ ) was that expected for isolated populations with restricted gene flow. For benthic organisms, patterns reflecting genetic structure and the extent of gene flow may be the result of the interplay of larval development, dispersal potential and local recruitment, coupled with oceanographic features such as oceanographic circulation (gyres and fronts) and physicochemical parameters (temperature, salinity) (Palumbi 1994; Grosberg and Cunningham 2001; Wares et al. 2001). *A. falklandicum*, as the majority of ascidians, has exclusively lecithotrophic larvae, and time as a free living tadpole larva lasts from

minutes to hours. Thus, the limited dispersal potential leads to a reduction in gene flow between distant populations. *A. falklandicum* showed a decrease in genetic similarity among populations with the increase of geographic distance: SGI and Low1, the more distant populations were the most differentiated genetically ( $\Phi_{ST} = 0.587$ ;  $P < 0.05$ ) and Low1 and Low2 (the closest populations) showed the lowest differentiation ( $\Phi_{ST} = 0.085$ ;  $P < 0.05$ ) suggesting more gene flow between them than between the more distant ones. The cluster analysis also highlighted the potential gene flow among the South Shetland Islands populations, as individuals from Low1, Low2 and Liv were clustered together. SOI and SGI were grouped as separate branches, with SOI being closer to South Shetland Island populations than to SGI. A strong genetic structuring was also found in other species of colonial ascidians such as *Pseudodistoma crucigaster* from southwestern Mediterranean (Tarjuelo et al. 2004), *Botryllus schlosseri* from New Zealand (Ben-Shlomo et al. 2001), and from Maine, USA, in a microgeographic scale (Yund and O’Neil 2000). Additionally, there is evidence of restricted gene flow in other species of Antarctic marine organisms. In an allozyme survey of the Antarctic limpet *Nacella concinna*, differences in allele frequency were detected between populations located in South Georgia and in South Orkney Island (Beaumont and Wei 1991). Wilson et al. (2007) reported restricted gene flow in the crinoid *Promachocrinus kerguelensis* of the Antarctic Peninsula, South Sandwich Is., South Georgia and Bouvetøya Islands, a surprising find because of the presence of the ACC which assist in directing water from one population to the other. Brierley et al. (1993) found absence of panmixia in populations of the squid *Martialia hyadesi*



**Fig. 4** Neighbor-joining tree of Nei and Li's (1985) genetic distances between pairs of individuals of *A. falklandicum*



from the Patagonian shelf and the Antarctic PF Zone, suggesting that the PF exerts a barrier effect for dispersal. The Antarctic sea slug (*Doris kerguelensis*) showed deep mitochondrial divergences within populations on both sides of the Drake Passage, this nudibranch is a direct developer and has long generation times and despite its reduced dispersal capabilities has a very broad circumantarctic and Magellanic (southern South America) distribution (Wilson et al. 2009). Linse et al. (2007) have identified strong genetic structure in the brooding bivalve *Lissarca notorcadensis* between Antarctic and sub-Antarctic groups, and within the sub-Antarctic specimens sampled throughout the Scotia arc, providing evidence for reproductive isolation.

The population genetic pattern known as “isolation by distance” (IBD) describes genetic variations between populations originated by spatially restricted gene flow. *A. falklandicum* shows a decrease in genetic similarity among populations in accordance of increasing geographic distance, more distant populations are the most differentiated genetically, and Low1 and Low2 (the nearest populations) showed less differentiation. However, the genetic differences are higher between the pair SGI-SOI ( $\Phi_{ST} = 0.399$ ) than between SOI-Liv populations ( $\Phi_{ST} = 0.313$ ) which are almost at the same geographic distance. Consistently, in the landscape genetic plot a peak representing genetic discontinuity is situated between SGI and SOI stations and not between SOI and Liv stations, suggesting that not only the geographic distance is responsible for the lack of gene flow. This genetic discontinuity would indicate a barrier to genetic exchange, which could be explained by temporal changes in the position of the PF, sometimes south of SGI and sometimes north of the islands. When the PF passes north of the islands, some migration would be allowed, but when it passes south of the islands gene flow would be prevented. The fact that for some ascidians species, SGI is the southernmost limit for exclusive Magellan species and the northernmost limit for exclusive Antarctic species, and thus displaying affinities with these two biogeographic regions (Hedgpeth 1969, Tatián et al. 2005), would support this conclusion. The inclusion of *A. falklandicum* populations north of SGI, would help to further understand the role of Scotia Arc Islands as biogeographic bridge for benthic macrofauna, between Antarctica and the Magellanic region.

## Conclusions

In summary, in *A. falklandicum*, a species with low dispersive capabilities, geographic distance between populations is the main factor that restricts genetic exchange among populations. But in the case of South Georgia islands, there could be a combined effect of the large geographic distances

and the temporal shifts in the PF position, which could be the main factor in determining the genetic discontinuity. The Scotia Ridge shallow shelves south of South Georgia islands would be acting as a bridge that favors gene flow between populations of *A. falklandicum* allowing exchange with SGI only when the PF passes north of the island.

**Acknowledgments** We thank the crew and participants of the LAMPOS Expedition (“R/V Polarstern”) and BENTART-06 (BIO Hespérides) for their help and assistance. We are gratefully acknowledged to Noemi Gardenal, who gave her help for the laboratory techniques and also to Wolf Arntz and Ana Ramos for their constant support. Financial and logistic supports were provided by Alfred Wegener Institute, CONICET, Spanish Council of Scientific and Technical Research (CICYT), Spanish Antarctic Programmes and Instituto Antártico Argentino (IAA) and FONCyT.

## References

- Arntz WE (2005) The Magellan–Antarctic connection: links and frontiers at high latitudes. *Sci Mar* 69:359–365
- Arntz WE, Ríos C (1999) Magellan–Antarctic: ecosystems that drifted apart. *Sci Mar* 63:1–518
- Barnes DKA (2005) Changing chain: past, present and future of the Scotia Arc’s and Antarctica’s shallow benthic communities. *Sci Mar* 69:65–89
- Barnes DKA, De Grave S (2001) Ecological biogeography of southern polar encrusting faunas. *J Biogeogr* 28:359–365
- Barnes DKA, Hodgson DA, Convey P, Allen CS, Clarke A (2006) Incursion and excursion of Antarctic biota: past, present and future. *Global Ecol Biogeogr* 15:121–142
- Beaumont AR, Wei JHC (1991) Morphological and genetic variation in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908). *J Mollus Stud* 57:443–450
- Ben-Shlomo R, Douek J, Rinkevich B (2001) Heterozygote deficiency and chimerism in remote populations of a colonial ascidian from New Zealand. *Mar Ecol Prog Ser* 209:109–117
- Bernard ATF, Ansoergeb IJ, Froneman PW, Lutjeharms JRE, Bernard KS, Swart NC (2007) Entrainment of Antarctic euphausiids across the Antarctic Polar Front by a cold eddy. *Deep-Sea Res I* 54:1841–1851
- Black B (1995) FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR data, wcb4@lamar.colostate.edu
- Bornet B, Branchard M (2001) Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep* 19:209–215
- Brierley AS, Rodhouse PG, Thorpe JP, Clarke MR (1993) Genetic evidence of population heterogeneity and cryptic speciation in the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* from the Patagonian Shelf and Antarctic Polar Frontal Zone. *Mar Biol* 116:593–602
- Brown KM, Fraser KPP, Barnes DKA, Peck LS (2004) Links between the structure of an Antarctic shallow-water community and ice-scour frequency. *Oecologia* 141:121–129
- Bruford ME, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Molecular genetic analysis of populations, a practical approach. Oxford University Press, USA, pp 228
- Clarke A (1996) The distribution of Antarctic marine benthic communities. *Antarct Res Ser* 70:219–230
- Clarke A, Crame JA (1989) The origin of the southern ocean marine fauna. In: Crame JA (ed) Origins and evolution of the Antarctic Biota. The Geological Society, London, pp 253–268

- Clarke A, Johnston NM (2003) Antarctic marine benthic diversity. *Oceanogr Mar Biol* 41:47–114
- Clarke A, Aronson RB, Crme JA, Gili JM, Blake DB (2004) Evolution and diversity of the benthic fauna of the Southern Ocean continental shelf. *Antarct Sci* 16:559–568
- Clarke A, Barnes DKA, Hodgson DA (2005) How isolated is Antarctica? *Trends Ecol Evol* 20:1–3
- Dayton PK (1990) Polar benthos. In: Smith W (ed) *Polar oceanography*. Academic Press, New York, pp 631–685
- de Aranzamendi MC, Sahade R, Tatián M, Chiappero MB (2008) Genetic differentiation between morphotypes in the Antarctic limpet *Nacella concinna* as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Mar Biol* 154:875–885
- Dell RK (1972) Antarctic benthos. *Adv Mar Biol* 10:1–216
- Demarchi M, Chiappero M, Laudien J, Sahade R (2008) Population genetic structure of the ascidian *Styela rustica* at Kongsfjorden, Svalbard, Arctic. *J Exp Mar Biol Ecol* 364:29–34
- Dowdeswell JA, Bamber JL (2007) Keel depths of modern Antarctic icebergs and implications for sea-floor scouring in the geological record. *Mar Geol* 243:120–131
- Excoffier L (1995) WINAMOVA 1.55 (analysis of molecular variance). Computer program distributed by the University of Geneva, <http://acasun1.unige.ch/LGB/Software/Windoze/amova>
- Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package), ver 3.5. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, <http://www.evolution.genetics.washington.edu>
- Gili J (2001) On the direct impact of ice on marine benthic communities, a review. *Polar Biol* 24:553–564
- Gili JM, Arntz WE, Palanques A, Orejas C, Clarke A, Dayton PK, Isla E, Teixidó N, Rossi S, López-González PJ (2006) A unique assemblage of epibenthic sessile suspension feeders with archaic features in the high-Antarctic. *Deep-Sea Res II* 53:1029–1052
- Grabbert S, Gerdes D, Knust R, Bohlmann H (2003) Hydrography. In: Arntz WE, Brey T (eds) *The expedition ANTARKTIS XIX/5 (LAMPOS) of RV ‘‘Polarstern’’ in 2002*. *Ber Polarforsch Meer-esforsch* 462, pp 89–93
- Grosberg R, Cunningham CW (2001) Genetic structure in the sea from populations to communities. In: Bertness MD, Gaines S, Hay ME (eds) *Sinauer associates*. Sunderland, MA, pp 61–84
- Gutt J, Piepenburg D (2003) Scale-dependent impact on diversity of Antarctic benthos caused by grounding of icebergs. *Mol Ecol Prog Ser* 253:77–83
- Gutt J, Starmans A (2001) Quantification of iceberg impact and benthic recolonisation patterns in the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biol* 24:615–619
- Gutt J, Starmans A, Dieckmann G (1996) Impact of iceberg scouring on polar benthic habitats. *Mol Ecol Prog Ser* 137:311–316
- Hedgpeth JW (1969) Introduction to Antarctic Zoogeography. In: *Distribution of selected groups of marine invertebrates in waters south of 35° S latitude*. *Antarctic Map Folio Ser* 11. American Geographical Society, pp 1–9
- Holderegger R, Wagner HH (2006) A brief guide to landscape genetics. *Landscape Ecol* 21:793–796
- Hou L, Lü H, Zou X, Bi X, Yan D, He C (2006) Genetic characterizations of *Macra veneriformis* (Bivalve) along the Chinese coast using ISSR-PCR markers. *Aquaculture* 261:865–871
- Kapralov MV, Gabrielsen TM, Sarapultsev IE, Brochmann C (2006) Genetic enrichment of the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* at its southern periphery via the alpine sexual *Saxifraga sibirica*. *Mol Ecol* 15:3401–3411
- Lewallen EA, Anderson TW, Bohonak AJ (2007) Genetic structure of leopard shark (*Triakis semifasciata*) populations in California waters. *Mar Biol* 152:599–609
- Linse K, Cope T, Lörz A-N (2007) Is the Scotia Sea a centre of Antarctic marine diversification? Some evidence of cryptic speciation in the circum-Antarctic bivalve *Lissarca notorcadensis* (Arcoidea: Philobryidae). *Polar Biol* 30:1059–1068
- Maldonado A, Barnolas A, Bohoyo F, Galindo-Zaldívar J, Hernández-Molina J, Lobo F, Rodríguez-Fernández J, Somoza L, Tomás Vázquez J (2003) Contourite deposits in the central Scotia Sea: the importance of the Antarctic Circumpolar Current and the Weddell Gyre flows. *Palaeogeogr Palaeoclimatol* 198:187–221
- Maltagliati F, Lai T, Casu M, Valdesalici S, Castelli A (2006) Identification endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochem Syst Ecol* 34:626–634
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol Evol* 18:189–197
- Miller RH (1960) Ascidiacea. *Discovery Rep* 30:1–160
- Miller MP (1998) Tools for population genetics analysis (TFPGA) 1.3: A windows program or the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by autor
- Miller MP (2005) Alleles in space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J Her* 96:722–724
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–590
- Nei M, Li WH (1985) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci* 76:5269–5273
- Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu Rev Ecol Syst* 25:547–572
- Palumbi SR (1996) Macrospatial genetic structure and speciation in marine taxa with high dispersal abilities. In: Ferraris JD, Palumbi SR (eds) *Molecular zoology*. Wiley-Liss, New York, p 101
- Ramos-Esplá AA, Cárcel JA, Varela M (2005) Zoogeographical relationships of the litoral ascidiofauna around the Antarctic Peninsula, in the Scotia Arc and in the Magellan region. *Sci Mar* 69:215–223
- Segman K, Bjornstad A, Ndjiondjop MN (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *Afr J Biotech* 5:2540–2568
- Smale D (2008) Ecological traits of benthic assemblages in shallow Antarctic waters: does ice scour disturbance select for small, mobile, secondary consumers with high dispersal potential? *Polar Biol* 31:1225–1231
- StatSoft, Inc., STATISTICA (data analysis software system) version 6, (2001), [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)
- Stoner DS, Weissman IS (1996) Somatic and germ cell parasitism in a colonial ascidian: possible role for a highly polymorphic allorecognition system. *Evolution* 93:15254–15259
- Svane I, Young CM (1989) The ecology and behaviour of ascidian larvae. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 27:45–90
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall A, Pascual M, Turon X (2004) Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. *Mol Ecol* 13:3125–3136
- Tatián M, Antacli JC, Sahade R (2005) Ascidiaceans (Tunicata, Ascidiacea): species distribution along the Scotia Arc. *Sci Mar* 69:205–214
- Thatje S, Fuentes V (2003) First record of anomuran and brachyuran larvae (Crustacea: Decapoda) from Antarctic waters. *Polar Biol* 26:279–282
- Thorpe SE, Heywood KJ, Brandon MA, Stevens DP (2002) Variability of the Southern Antarctic Circumpolar current front North of South Georgia. *J Marine Syst* 37:87–105
- Varela MA, González-Tizón A, Mariñas L, Martínez-Lage A (2007) Genetic divergence detected by ISSR markers and characterization of microsatellite regions in mytilus mussels. *Biochem Genet* 45:565–578
- Wares JP, Gaines SD, Cunningham CW (2001) A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution* 55:295–306

- Wilson NG, Hunter RL, Lockhart SJ, Halanych KM (2007) Multiple lineages and absence of panmixia in the “circumpolar” crinoid *Promachocrinus kerguelensis* from the Atlantic sector of Antarctica. *Mar Biol* 152:895–904
- Wilson NG, Schrödl M, Halanych KM (2009) Ocean barriers and glaciations: evidence for explosive radiation of mitochondrial lineages in the Antarctic sea slug *Doris Kerguelenensis* (Mollusca, Nuidibranchia). *Mol Ecol* 18:965–984
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 28:114–138
- Yund PO, O’Neil PG (2000) Microgeographic genetic differentiation in a colonial ascidian (*Botryllus schlosseri*) population. *Mar Biol* 137:583–588
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176–183