

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Estructura genética y posibles eventos de especiación en la
ascidia colonial antártica *Synoicum adareanum* (Urochordata,
Ascidiacea)**

por

Lic. María Paula Wiernes

Directora: Dra. Marina B. Chiappero

Co-Director: Dr. Ricardo Sahade

Ecología Marina. FCEFN. UNC



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

Dra. Marina Beatriz Chiappero, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Esteban Rubén Hasson, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Dr. Juan César Vilardi, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

*Con mucho cariño dedico esta
Tesis a mi abuela Martha, y a
mis padres*

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora y guía de esta tesis doctoral Dra. Marina Beatriz Chiappero, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, por haber tenido la paciencia necesaria para ayudarme, por transmitirme su conocimiento y por ser accesible en todo momento. Su confianza y sostén han sido un aporte inestimable en el desarrollo de esta tesis. También quiero agradecer a mi co-director Dr. Ricardo Sahade por haberme facilitado el espacio físico para llevar a cabo las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis y por haber depositado su confianza en mí en el desarrollo de la misma.

A los miembros de la Comisión Asesora de tesis, los Doctores Esteban Rubén Hasson y Juan César Vilardi por su tiempo dedicado en estos años, aportándome sus conocimientos y sugerencias, que han sido de gran utilidad en el desarrollo y escritura del manuscrito de esta tesis.

A la Dra. Noemí Gardenal y al Dr. Raúl González por haberme brindado sus conocimientos y respondido cada vez que me surgían preguntas mientras realizaba mi trabajo en el laboratorio.

También agradezco al Dr. Marcos Tatián su tiempo, sugerencias, buena onda, y que haya colaborado desinteresadamente con sus muestras para llevar a cabo esta tesis.

A la Cátedra de Ecología Marina de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba por haberme brindado el espacio físico para poder realizar la tesis. A mis compañeros, muy especialmente a Milagros Demarchi y Cristian Lager por su responsabilidad y amabilidad al haberme traído muestras para el desarrollo de la tesis. A Carla de Aranzamendi, Luciana Torre y a Soledad Acosta por ayudarme cuando las necesité.

A la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba por la oportunidad de seguir adelante en mi formación y darme la posibilidad de

llevar a cabo mi trabajo. A su vez, quiero agradecer al CONICET, por las dos becas que me proporcionaron, las cuales fueron de suma utilidad para realizar este trabajo.

A Beba Molina por contar con su gran afecto, su amabilidad y generosidad. A Lía Bossio por su paciencia y por haber estado incondicionalmente siempre que la necesité.

A mis amigas cordobesas (Ange, Vicky, Popi, Virgi, Caro, Carla, Mari y Gabi) y a mi familia Scout, por abrirme sus corazones, darme fuerzas para seguir adelante y por sobre todas las cosas por ser tan hermosas personas. También quiero agradecerles a mis amigas de toda la vida, Rubia y Celes, que desde el comienzo de este trabajo estuvieron siempre.

Finalmente quiero agradecer enormemente a mi familia. A mis abuelas por acompañarme con sus cariñosos llamados telefónicos, haciéndome sentir que las tenía cerca. A mi hermano Pablo, por su inteligencia, sus llamados, y sus consejos. A mi amor Nico, por su paciencia, comprensión y estar siempre a mi lado. A mis padres Pilar y Manuel, las personas más importantes que tengo en esta vida, a quienes agradezco profundamente su apoyo incondicional, su enorme paciencia y las fuerzas que me dieron y me dan siempre para seguir adelante.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Artículo Publicado en Revista con Referato

Wiernes M P, Sahade R, Tatián M, Chiappero MB (2013) Genetic variability and differentiation among polymorphic populations of the genus *Synoicum* (Tunicata, Ascidiacea) from the South Shetland Islands. *Polar Biology* 36:871-883

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	1
INDICE DE FIGURAS.....	2
RESUMEN.....	3
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	4
1.1. Características y origen del Océano Antártico.....	5
1.2. La importancia de la ascidiofauna en las comunidades bentónicas Antárticas y sus características.....	7
1.3. Diversidad y estructura genética.....	11
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
CAPÍTULO 2: <i>SYNOICUM ADAREANUM</i> Y <i>SYNOICUM OSTENTOR</i> : ¿POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO O ESPECIES DIFERENTES?.....	16
2.1. Introducción.....	17
2.2. Materiales y Métodos.....	20
2.2.1. Toma de Muestras.....	20
2.2.2. Observaciones morfológicas.....	24
2.2.3. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.....	25
2.2.4. Análisis genéticos poblacionales.....	28
2.2.5. Análisis demográfico.....	31
2.2.6. Estimación de tiempos de divergencia.....	32
2.2.6.1. Análisis Interespecífico.....	33
2.2.6.2. Análisis Intraespecífico.....	34
2.3. Resultados.....	36
2.3.1. Observaciones morfológicas.....	36
2.3.2. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.....	37
2.3.3. Gen COI: Análisis genéticos poblacionales.....	38
2.3.4. Gen COI: Análisis demográfico.....	49
2.3.5. Gen Citb: Análisis genéticos poblacionales.....	51
2.3.6. Gen Citb: Análisis demográfico.....	53

2.3.7. Estimación de tiempos de divergencia	55
2.3.7.1. Análisis Interespecífico	57
2.3.7.2. Análisis Intraespecífico	58
2.4. Discusión.....	60
2.4.1. Observaciones morfológicas	60
2.4.2. Análisis genéticos poblacionales.....	60
2.4.3. Análisis demográfico.....	70
2.4.4. Estimación de tiempos de divergencia	74
2.4.4.1. Análisis Interespecífico	74
2.4.4.2. Análisis Intraespecífico	78
CAPÍTULO 3: RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS TUNICADOS Y DE LAS FAMILIAS DEL ORDEN APLOUSOBRANCHIA	80
3.1. Introducción	81
3.2. Materiales y Métodos.....	87
3.2.1. Análisis filogenético del Subfilo Urochordata/Tunicata	87
3.2.2. Relaciones filogenéticas entre familias del orden Aplousobranchia	91
3.3. Resultados	95
3.3.1. Análisis filogenético del subfilo Urochordata/Tunicata.....	95
3.3.2. Relaciones filogenéticas entre familias del orden Aplousobranchia	98
3.4. Discusión.....	100
3.4.1. Análisis filogenético del subfilo Urochordata/Tunicata.....	100
3.4.2. Relaciones filogenéticas entre familias del orden Aplousobranchia.....	101
CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE POSIBLES ENDOSIMBIOTES DE <i>SYNOICUM</i> <i>ADAREANUM</i>	104
4.1. Introducción	108
4.2. Materiales y Métodos.....	108
4.2.1. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.....	108
4.2.2. Análisis de datos.....	110
4.3. Resultados	1122
4.3.1. Análisis de datos.....	112
4.4. Discusión.....	120
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	136

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Características y ubicación geográfica de las muestras analizadas.....	22
Tabla 2.2: Especies de ascidias utilizadas para la obtención de la secuencia consenso....	27
Tabla 2.3: Órdenes, familias y especies empleadas para la obtención de la secuencia consenso.....	28
Tabla 2.4: Especies y genes empleados en los análisis Inter e Intraespecíficos	34
Tabla 2.5: Niveles de variabilidad genética del gen COI en <i>Synoicum adareanum</i>	40
Tabla 2.6: Morfotipos y haplotipos COI encontrados por colonia analizada.....	41
Tabla 2.7: Análisis de AMOVA con el gen COI en <i>Synoicum adareanum</i>	44
Tabla 2.8: Valores Φ_{ST} de a pares con el gen COI en <i>Synoicum adareanum</i>	45
Tabla 2.9: Distancias genéticas Tamura-Nei entre haplotipos COI de Low46 y Low45.....	46
Tabla 2.10: Niveles de variabilidad genética del gen Citb en <i>Synoicum adareanum</i>	52
Tabla 2.11: Sitios de muestreo, morfotipos, y haplotipos de los genes combinados.....	55
Tabla 2.12: Diversidad nucleotídica y haplotípica en <i>P. communis</i> y <i>P. crucigaster</i>	64
Tabla 3.1: Clasificación de los tunicados.....	82
Tabla 3.2: Clasificación tradicional del orden Aplousobranchia.....	84
Tabla 3.3: Especies de tunicados empleadas en los estudios filogenéticos de los tunicados.....	89
Tabla 3.4: Especies de ascidias empleadas en los estudios filogenéticos del orden Aplousobranchia.....	93
Tabla 4.1: Especies y clones de bacterias utilizados en los estudios filogenéticos.....	110
Tabla 4.2: Haplotipos de las bacterias aisladas de <i>Synoicum adareanum</i>	113
Tabla 4.3. Filo y/o Clase al que corresponderían las bacterias aisladas de <i>Synoicum adareanum</i>	121

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Principales corrientes marinas que rodean a la Antártida.....	6
Figura 1.2: Características morfológicas de ascidias solitarias y coloniales.....	9
Figura 1.3: Metamorfosis de la larva de ascidias solitarias.....	9
Figura 2.1: Mapa con los sitios de muestreo de <i>Synoicum adareanum</i>	21
Figura 2.2: Fotografías “in vivo” de las colonias de <i>Synoicum adareanum</i>	23
Figura 2.3: Fotografía bajo lupa de dos zooides de dos morfotipos de <i>S. adareanum</i>	24
Figura 2.4: Mapa del área de estudio que muestra la frecuencia de cada morfotipo de <i>S. adareanum</i>	36
Figura 2.5: Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del gen COI.....	37
Figura 2.6: Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del gen Citb.....	38
Figura 2.7: Mapa del área de estudio que muestra la frecuencia de cada haplotipo del gen COI.....	39
Figura 2.8: Correlación entre divergencia genética y distancia geográfica de poblaciones de <i>S. adareanum</i>	47
Figura 2.9: Relaciones filogenéticas entre haplotipos COI en <i>Synoicum adareanum</i>	48
Figura 2.10: Red de haplotipos del gen COI obtenida mediante el programa Network.....	49
Figura 2.11: Análisis de la distribución de las diferencias de a pares con el gen COI.....	51
Figura 2.12: Relaciones filogenéticas entre haplotipos Citb en <i>Synoicum adareanum</i>	54
Figura 2.13: Red de haplotipos del gen Citb obtenida mediante el programa Network.....	55
Figura 2.14: Árbol filogenético resultante del análisis Interespecífico.....	58
Figura 2.15: Árbol filogenético resultante del análisis Intraespecífico.....	59
Figura 2.16: Secuencia nucleotídica del gen COI de <i>S. adareanum</i> con la secuencia poli-T.....	61
Figura 2.17: Mapa del área de estudio que muestra la dirección de las corrientes principales de agua.....	68
Figura 3.1: Hipótesis propuestas para explicar la evolución de los tunicados.....	84
Figura 3.2: Árbol Bayesiano resultante de secuencias nucleotídicas de los genes COI+Citb combinados...	96
Figura 3.3: Árbol resultante de secuencias aminoacídicas de los genes COI+Citb combinados.....	97
Figura 3.4: Árbol Bayesiano resultante de secuencias nucleotídicas del gen COI particionadas por codón	99
Figura 4.1: Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa de productos por PCR del gen 16S.....	113
Figura 4.2: Árbol filogenético obtenido a partir de secuencias nucleotídicas del gen 16S.....	117

RESUMEN

En la Antártida, uno de los principales componentes de las comunidades bentónicas son las ascidias. Dos formas similares de ascidias del género *Synoicum* fueron muestreadas a lo largo de las Islas Shetland del Sur, una de color verde-amarillenta con pedúnculos alargados, y otra de color naranja-amarillenta con pedúnculos más cortos y cabezas más redondeadas. Los análisis taxonómicos indicaron que la forma verde-amarillenta corresponde a la descripción de *S. ostentor* y la forma naranja-amarillenta a *S. adareanum*. Sin embargo, no se detectaron diferencias genéticas claras entre ambas formas en dos genes mitocondriales. La frecuencia y la distribución geográfica de los haplotipos indicaron que cierto grado de flujo génico podría ocurrir, sugiriendo que ambos morfotipos todavía no habrían alcanzado un aislamiento reproductivo completo, podrían cruzarse y por lo tanto ser consideradas como una única especie. Las ascidias dependen en gran medida de la producción de productos químicos como una forma de defensa contra enemigos naturales, y se sabe que algunos de estos compuestos son producidos por bacterias simbiotes. En este trabajo se identificaron endosimbiontes bacterianos en ambos morfotipos, los cuales podrían colaborar en el metabolismo celular, en la defensa química contra depredadores de esta ascidia, y en la síntesis de Palmerólidos.

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Características y origen del Océano Antártico

El Océano Antártico posee características únicas, principalmente porque a diferencia de los otros Océanos principales quedó aislado hace unos 30 millones de años (MA) cerca del límite entre el Eoceno y el Oligoceno (ver Apéndice) con la creación de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA) y sus frentes asociados (Lawver y col. 2011).

El inicio de la glaciación Antártica a nivel del mar ocurrió como consecuencia de un gran enfriamiento cerca del límite entre el Eoceno y el Oligoceno hace unos 34 MA. La CCA comenzó a circular alrededor de esa época, y se considera que contribuyó a la glaciación Antártica mediante el aislamiento del Continente dentro de un anillo de agua fría y a la estabilización de la glaciación Antártica (Toggweiler y Bjornsson 1999; Nong y col. 2000; Barker y Thomas 2004). Posteriormente ocurrieron variaciones de las temperaturas y del volumen de hielo: hubo un calentamiento y una disminución del volumen de hielo hace unos 26 MA, un aumento más gradual del volumen de hielo hace 16-13 MA y un gran aumento ocurrió durante el Pleistoceno (Zachos y col. 2001).

La CCA actúa como una barrera para el intercambio Norte-Sur de agua, aislando geográficamente, climáticamente, térmicamente y oceanográficamente a las comunidades Antárticas de plataforma, constituyendo una importante barrera biogeográfica (Clarke y Crame 1989; Clarke y col. 2005; Barnes y col. 2006). La CCA es impulsada por el cinturón de vientos del Oeste y fluye hacia el Este a través del Pasaje de Drake, luego vira hacia el Norte a través de brechas, o “gaps”, en las dorsales del arco de Escocia (Barker 2001). La mayor parte del flujo de la CCA se considera que es de gran alcance (Nowlin y Klinck 1986; Gille 1994), donde estrechos chorros se asocian con dos frentes distintos, el Frente Polar (FP) y el Frente Sub-Antártico (FSA) que son continuos alrededor de todo el Continente (Fig.1.1). En general, en aguas superficiales se pueden distinguir los efectos separados de los Frentes, pero en algunos lugares pueden fusionarse (Gille 1994). Las causas del desarrollo y el mantenimiento de los Frentes aún siguen siendo poco conocidas. Gille (1994) estimó que entre el 40-70% del transporte de la CCA se produce dentro del FP y del FSA.

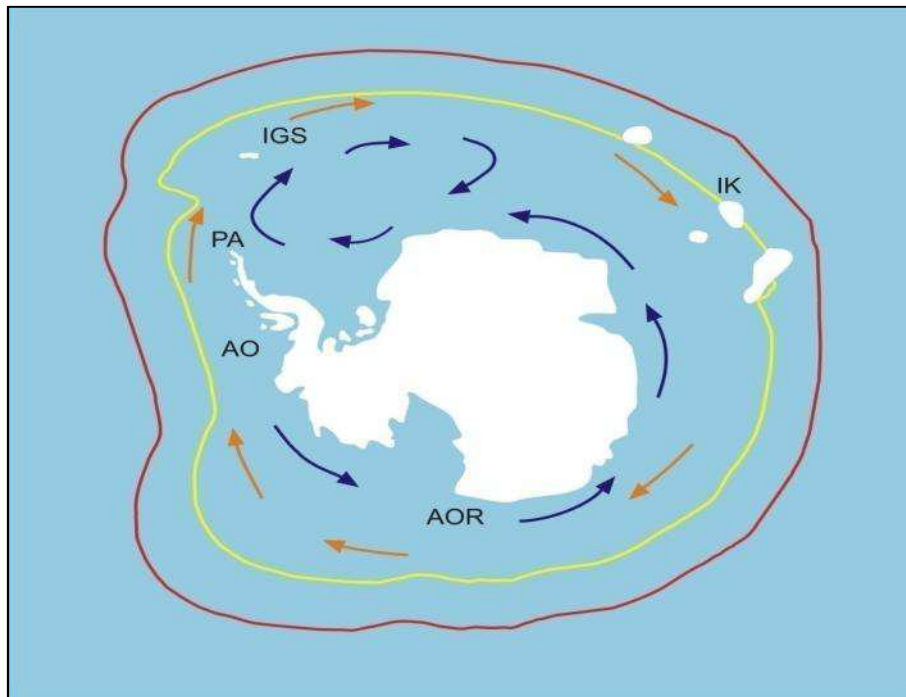


Figura 1.1. Principales corrientes marinas que rodean a la Antártida. Línea roja: Frente Sub-Antártico; línea amarilla: Frente Polar; flechas naranjas: Corriente Circumpolar Antártica; flechas violetas: “East Wind Drift”. PA: Península Antártica; AO: Antártida Occidental; AOR: Antártida Oriental; IK: Islas Kerguelen; IGS: Islas Georgias del Sur. Tomado y modificado de Bargelloni y col. (2000)

El otro componente principal de la circulación Oceánica Austral es una corriente discontinua dirigida por el viento hacia el Este (“East Wind Drift”), que fluye cerca del Continente y al Sur de la CCA (Fig. 1.1; Deacon 1937) y que en ciertos lugares se desarrolla en giros en sentido horario como por ejemplo, el giro de Weddell que está reforzado por las aguas profundas del Sur del Mar de Weddell.

A lo largo del tiempo se han efectuado diferentes estudios para determinar el origen de la CCA con la mayor exactitud posible. Los trabajos de Toggweiler y Bjornsson (1999), de Nong y col. (2000) y de Barker y Thomas (2004) relacionaron el origen de la CCA con el inicio de la glaciación Antártica, mientras que otros estudios relacionaron el origen de la CCA con la apertura del Pasaje de Drake (Barker y Burrell 1977; Diester-Haass y Zahn 1996). En estos últimos trabajos se han sugerido diferentes hipótesis para el origen de ambos sucesos.

Barker y Burrell (1977) basándose en la edad del suelo Oceánico del Pasaje de Drake, mantuvieron la ambigüedad de la edad del inicio de la CCA considerando que sería de por lo menos 28 MA, o quizás más antiguo. Barker en un estudio posterior (Barker 2001), sostuvo que existiría la posibilidad de un mayor retraso en el desarrollo de la CCA, y sugirió una correlación entre el crecimiento de la CCA y el enfriamiento de mediados del Mioceno. Por otro lado, otros trabajos propusieron diferentes edades para la apertura inicial del Pasaje de Drake. Diester-Haass y Zahn (1996) sugirieron que el Pasaje de Drake se habría abierto lo suficiente como para crear el Frente Polar y una CCA de profundidad intermedia hace unos 37 MA. Estudios moleculares de diversificación llevados a cabo en especies de peces nototénidos de distribución Antártica y sub-Antártica, sugieren que hace 25-22 MA, podría haber ocurrido una profundización del Pasaje de Drake y el Frente Polar se habría creado (Bargelloni y col. 2000). Lawver y Gahagan (2003) argumentaron que el Pasaje de Drake se abrió a la circulación de aguas profundas a través de la Cuenca de Powell antes de los 28 MA y propusieron un origen de la CCA de 31 MA.

1.2. La importancia de la ascidiofauna en las comunidades bentónicas Antárticas y sus características

Actualmente el Continente Antártico presenta una biota de plataforma única, siendo las ascidias (filo Chordata; subfilo Urochordata = Tunicata) uno de los principales componentes de las comunidades bentónicas Antárticas (Jazdzewski y col. 1986; Kirkwood y Burton 1988; Mühlenhardt- Siegel 1988; Galéron y col. 1992; Gerdes y col. 1992; Sáiz- Salinas y col. 1997; Dayton 1990; Clarke 1996; Clarke y Johnston 2003; Gili y col. 2006). Las ascidias (Urochordata, Ascidiacea), representan uno de los taxones más importantes de las comunidades epibentónicas Antárticas ya que se destacan tanto en biomasa como en abundancia (Turon 1988; Arnaud y col. 1998). Pueden llegar a ser dominantes en determinados fondos someros y sectores de la Antártida como la Península Antártica y Mar de Weddell (Gallardo 1987; Voß 1988; Galéron y col. 1992; Sáiz-Salinas y col. 1997; Arnaud y col. 1998; Sahade y col. 1998; Kowalke 1999; Kowalke y col. 2001). A su vez, son consideradas como especies clave en la estructura de los ecosistemas bentónicos, debido al importante rol que desarrollan en el acoplamiento bentopelágico y a

que pueden servir de sustrato susceptible de ser colonizado por numerosas especies epibiontes (Wahl 1995; Gili y col. 2001). Las ascidias adultas (Fig. 1.2) son sésiles, filtradoras, bentónicas, poseen un tegumento o túnica constituido por un polisacárido de estructura semejante a la celulosa llamado tunicina, que aporta soporte y protección. Su estadio embrionario es una larva pelágica de vida libre (Fig. 1.3-a), que es la responsable de la dispersión y de la selección de hábitat de la especie. La larva es lecitotrófica (no se alimenta mientras se encuentra dentro de la columna de agua, ya que obtiene los nutrientes del vitelo sintetizado durante la oogénesis) y posee una notocorda en la región caudal, motivo por el cual las ascidias se encuentran dentro del sub-filo Urochordata, conjuntamente con los taliáceos (Thaliacea) y apendicularios (Appendicularia). El estadio larval es el más vulnerable, presentando la mayor mortalidad (Svane y Young, 1989; Stoner y Weissman, 1996; Cloney y col. 2002), y poseen un tiempo de permanencia en el plancton muy corto (de minutos a pocas horas, aunque algunas pueden vivir varios días, Svane y Young 1989). En la parte anterior del cuerpo presentan órganos sensoriales (quimio y fotoreceptores) y papilas adhesivas que les sirven para localizar y fijarse al sustrato en el que se desarrollarán como adultos.

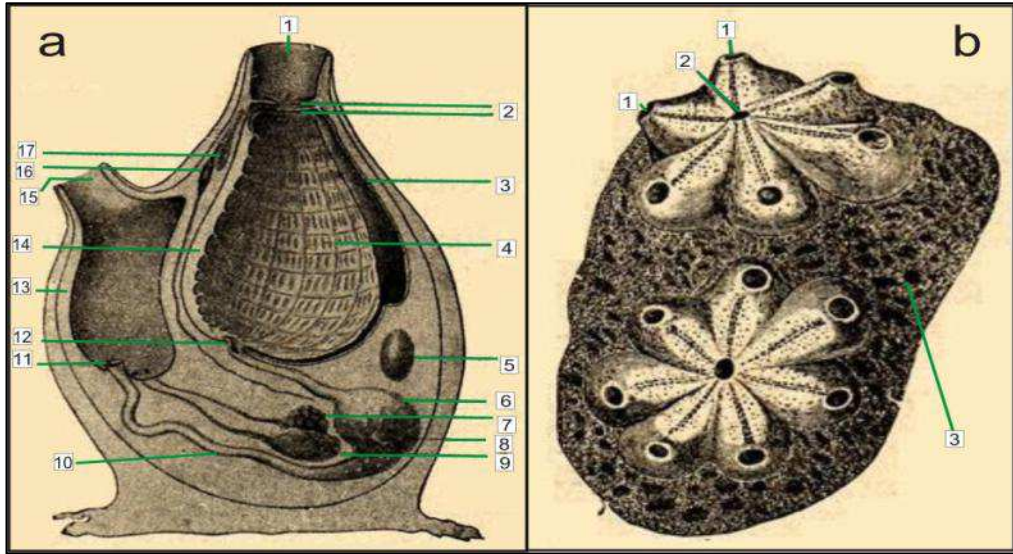


Figura 1.2. a: Corte longitudinal esquemático de una ascidia solitaria. 1: sifón oral, 2: tentáculos orales, 3: endostilo, 4: hendidura de la branquia, 5: corazón, 6: estómago, 7: testículo, 8: túnica, 9: ovario, 10: intestino, 11: ano, 12: entrada al esófago, 13: manto, 14: faringe, 15: sifón atrial, 16: ganglio, 17: glándula subneural. Tomada y modificada de Boas (1953). b: Corte vertical de una ascidia colonial (*Botryllus violaceus*), mostrando la disposición de los zooides en un sistema. 1: sifón oral independiente, 2: sifón atrial común, 3: túnica común. Tomada y modificada de Milne-Edwards (1841)

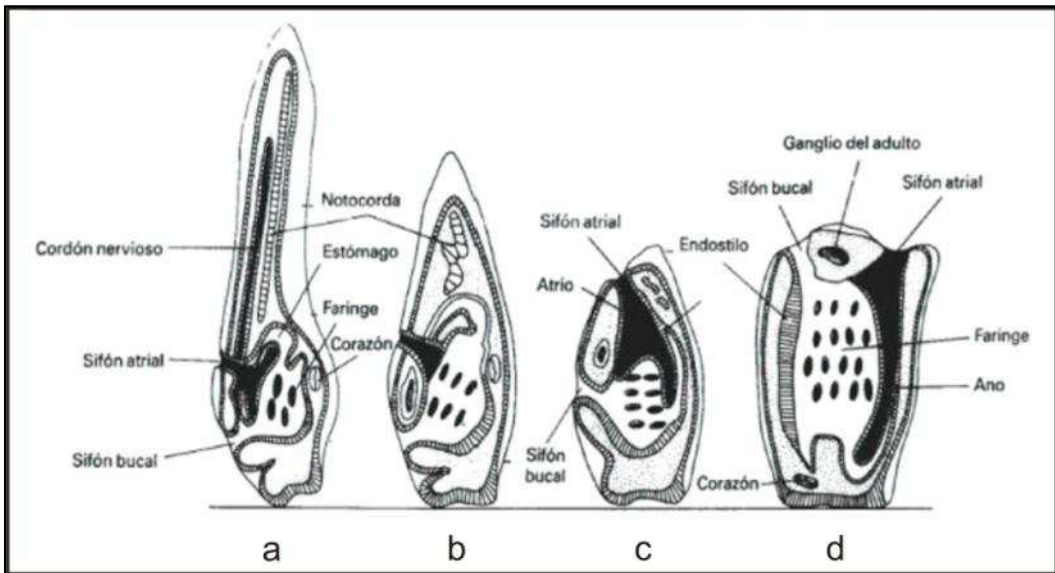


Figura 1.3. Metamorfosis de la larva de una ascidia solitaria. a: vista esquemática lateral de una larva de una ascidia recién fijada al sustrato por su extremo anterior. b y c: metamorfosis. d: individuo joven inmediatamente después de la metamorfosis. Tomada y modificada de Seeliger (1885)

Las ascidias adultas presentan dos modelos básicos de organización corporal, solitaria o colonial. Las especies solitarias, de reproducción sexual, son ovíparas, liberando huevos que serán fecundados en el agua. Después de eclosionar y permanecer un tiempo en el agua, las larvas se fijan al sustrato y sufren un proceso de metamorfosis (Fig. 1.3-b y c) durante la cual la cola se retrae, la notocorda y el cordón nervioso se reabsorben, para llegar a la forma adulta (Fig. 1.3-d). Durante la metamorfosis el cuerpo gira 180° y adopta la característica forma de “U” con extremo fijo al sustrato y en el opuesto, los sifones oral y atrial. La faringe (o saco branquial) se encuentra muy desarrollada ya que a través de ella se produce el filtrado del plancton del cual se alimenta (Fig. 1.3-b y c; Svane y Young 1989). Las especies coloniales alternan ciclos sexuales similares a las solitarias pero, después de la metamorfosis, un oozooide u oozoide (zooide desarrollado a partir de un huevo fecundado) da lugar mediante gemación (reproducción asexual) a una nueva colonia compuesta por zooides genéticamente idénticos (Svane y Young 1989; Sommerfeld y Bishop 1999).

Las ascidias se pueden clasificar en base a dos características principales: considerando la estructura de la faringe o la posición de las gónadas. Basándonos en la estructura y desarrollo de la faringe (Lahille 1886, 1887, 1890), la clase se divide en tres órdenes: **Aplousobranchia** (faringe plana sin vasos longitudinales internos); **Phlebobranchia** (faringe plana con numerosos vasos longitudinales internos), y **Stolidobranchia** (faringe plegada, con vasos longitudinales internos). Por otro lado, teniendo en cuenta la posición de las gónadas (Perrier 1898; Garstang 1928; Kott 1969), la clase es dividida en dos órdenes: **Enterogona**, que agrupa especies con las gónadas asociadas al sistema digestivo (incluye a Aplousobranchia y a Phlebobranchia), y **Pleurogona**, con las gónadas unidas a la pared del cuerpo (incluye a Stolidobranchia). Ambos sistemas de clasificación son empleados hoy en día. Podemos encontrar el caso donde las ascidias son clasificadas considerando los órdenes Enterogona y Pleurogona, con sus respectivos subordenes Aplousobranchia y Phlebobranchia para el primero y Stolidobranchia para el segundo (Berrill 1950; Millar 1970; Kott 1985), o bien el caso donde otros autores como Harant y Vernières (1933), Van Name (1945) y Monniot y col. (1991), utilizan la clasificación propuesta por Lahille.

1.3. Diversidad y estructura genética

Se define a la diversidad o variabilidad genética como las diferencias heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Fu 2001; Piñero y col. 2008) y constituye el componente básico de la biodiversidad, al ser la base de la cual dependen los procesos de adaptación y especiación que conducen a la evolución de los organismos (Noss 1990; Amos y Harwood 1998). La Convención sobre la Diversidad Biológica define a la biodiversidad como un concepto jerárquico, con tres principales niveles de organización: diversidad genética, de especies y de ecosistemas (Bonn y Gaston 2005).

Dado que tanto la diversidad de especies como la diversidad de ecosistemas derivan de los procesos evolutivos que operan sobre la variabilidad genética, su conocimiento y entendimiento es de gran importancia, tanto para la sustentabilidad (Bonn y Gaston 2005; Allendorf y Luikart 2007; Piñero y col. 2008), la conservación de las especies y el avance de la genética evolutiva, la salud pública (Piñero y col. 2008; Hamilton 2009), como así también para la productividad agrícola, pecuaria, pesquera y forestal (Piñero y col. 2008; Hedrick 2011). Este conocimiento se puede utilizar específicamente para evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies frente los cambios ambientales naturales o antropogénicos, planear las estrategias de aprovechamiento, conservación y evaluar los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos de los organismos, conocer la riqueza genética de un sitio y su distribución geográfica, entender las causas de la pérdida de la variabilidad genética, evaluar los riesgos de introducción de enfermedades y plagas, entre otros (Piñero y col. 2008).

La estructura genética de una especie se describe como la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones (distribución no aleatoria de genotipos o alelos en el espacio y tiempo). Las fuerzas evolutivas principales que determinan la estructura genética de las poblaciones son las mutaciones, la deriva genética y el flujo génico. También influyen las adaptaciones a condiciones ambientales locales que conducen a la diferenciación genética de las poblaciones (Slatkin 1987; Hartl 2000; Hedrick 2011). Debido a esto, el conocimiento de la estructura genética en la población

nos permite hacer inferencias sobre el papel de estos procesos en la evolución de las poblaciones (Slatkin y Barton 1989).

Las mutaciones son errores que ocurren durante la replicación del material genético, que provocan diferencias en las copias de secuencias de ADN ancestrales y descendientes (Allendorf y Luikart 2007; Hamilton 2009). Los cambios en el material genético pueden ocurrir a nivel cromosómico o a nivel molecular, incluyendo cambios en los elementos genéticos transponibles o rearrreglos cromosómicos, sustituciones de nucleótidos, inserciones y deleciones (Allendorf y Luikart 2007; Hedrick 2009). A pesar de que tienen una baja probabilidad de ocurrencia, las mutaciones son un parámetro a considerar en la genética de poblaciones, ya que explican cómo nueva variación genética es añadida a las poblaciones (Hamilton 2009).

Otra de las fuerzas evolutivas es la deriva genética, que se define como cambios al azar en las frecuencias alélicas de una generación a otra, que se producen como resultado del tamaño finito de la población. Debido a este tamaño limitado, cada generación proviene de una muestra al azar de todas las gametas producidas por los padres. Cuanto más pequeña sea esta muestra, será menos representativa de las frecuencias alélicas de la generación anterior y los cambios serán más pronunciados. Estas fluctuaciones al azar en las frecuencias de los alelos finalmente conllevan a su pérdida o fijación, por lo que, además, la deriva genética tiende a disminuir la heterocigosis de la población y a aumentar la probabilidad de identidad por descendencia (Hartl 2000). A su vez, esta fuerza evolutiva es considerada como el factor determinante de la diferenciación genética entre poblaciones, a menos que la mutación y el flujo génico contrarresten el proceso y lo hagan más lento (Cruzan 2001; Letelier 2007; Hamilton 2009). La tasa de pérdida de variación genética por deriva genética está determinada por el tamaño efectivo de la población (Letelier 2007). Por lo que un tamaño efectivo grande es indicador de una pérdida reducida de diversidad genética por deriva genética.

La selección natural es otra de las fuerzas evolutivas que operan sobre la variabilidad genética. Es la consecuencia de la reproducción diferencial de algunos genotipos con respecto a otros bajo ciertas condiciones ambientales que prevalecen en un momento determinado (Futuyma 1986; Li 1997). Esta diferencia en el éxito reproductivo

entre clases genotípicas, conduce a una transmisión asimétrica de los alelos a las siguientes generaciones y a un cambio en sus frecuencias en la población. Este cambio, a su vez, puede conducir a la adaptación de las poblaciones a su ambiente particular (Eguiarte y col. 2007; Hamilton 2009; Hedrick 2011). Cuando una población local es lo suficientemente pequeña, los efectos de la selección pueden ser muy pequeños frente a la deriva genética. Así, en una población pequeña, los alelos que presentan una ventaja selectiva pueden perderse y los alelos que están en desventaja selectiva pueden fijarse a través de deriva genética (Slatkin 1987; Allendorf y Luikart 2007; Hedrick 2011).

El flujo génico es otra de las fuerzas evolutivas que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la variabilidad genética. Se lo define como el movimiento de genes desde el “pool” génico de una población hacia el de otra (Slatkin 1985). El flujo génico tiende a homogenizar a las poblaciones de una especie y contrarrestar la diferenciación genética que pudiera ocurrir por aislamiento geográfico. A pesar de que los conceptos de dispersión y flujo génico están relacionados, no son equivalentes, ya que para que éste último ocurra, cada migrante debe reproducirse con éxito en la nueva población de modo de contribuir con sus alelos a la siguiente generación de la población receptora (Slatkin 1985; Hamilton 2009; Hedrick 2009). El flujo génico puede ocurrir como consecuencia del movimiento de gametas, del movimiento de segmentos extranucleares de ADN (por ej, plásmidos, virus, mitocondrias), o de la extinción y recolonización de una población entera (Slatkin 1985). Dentro de una población estructurada, el flujo génico tiende a homogeneizar la variación genética al introducir variantes alélicas originadas en otras poblaciones (Hedrick 2009).

El estudio de la estructura genética en poblaciones de especies marinas tiene características particulares. Dado que es imposible el seguimiento de larvas o adultos a través de los océanos, es necesario utilizar métodos indirectos para cuantificar el flujo génico, en base a la distribución de la variabilidad genética. Estos métodos son una herramienta muy útil para estudiar distintos demos, relacionar la diferenciación genética con rasgos de la biología de la especie, su potencial de dispersión y estrategia reproductiva (Hellberg y col. 2002), y para distinguir especies crípticas (Barber y col. 2002; Tarjuelo y col. 2004). En las poblaciones marinas, los niveles y patrones de migración están modulados por la biología reproductiva de las especies y diversos factores oceanográficos

y climáticos, los cuales influyen en el patrón de dispersión de gametas, larvas y adultos (Grosberg y Cunningham 2001). En particular, la estructura genética de las especies bentónicas sésiles suele estar vinculada con las capacidades de dispersión de las larvas, que puede estar directamente relacionado con el tiempo de permanencia en el plancton. Las especies con larvas planctónicas de larga vida mostrarían patrones de distribución geográfica más extendidos y una estructuración genética menor (Cassista y Hart 2007) que aquellas especies con larvas no planctónicas y de vida corta. Sin embargo, se han reportado situaciones inversas: por ejemplo, se encontró una estructura genética baja en grupos con un bajo potencial de dispersión como desarrolladores directos y larvas pelágicas de vida corta o, una estructura genética elevada en grupos con larvas planctónicas, situaciones que han sido explicadas por las condiciones oceanográficas locales y/o por rasgos de comportamiento, o por una reproducción particular (Kyle y Boulding 2000; Holmes y col. 2004; Marko 2004; Dias y col. 2006; Kenchington y col. 2006; Jeffrey y col. 2007). También se han reportado patrones más llamativos donde especies con un supuesto potencial de dispersión limitado exhibieron una baja diferenciación genética en escalas espaciales grandes, pero presentaron poblaciones estructuradas localmente (Casu y col. 2005; Ben-Shlomo y col. 2006; Yu y Chu 2006).

Objetivo general

En este trabajo se pretende contribuir a una mayor comprensión de la historia evolutiva y los procesos de conformación del ecosistema Antártico a través de un enfoque interdisciplinario con aportes desde la taxonomía, ecología, biogeografía, fisiología y genética de poblaciones de una de las especies más abundantes del bentos Antártico, *Synoicum adareanum*.

Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente a los individuos de dos morfotipos de la ascidia colonial *Synoicum adareanum* que se encuentran a lo largo de diferentes localidades de la Península Antártica
- Evaluar el grado de diferenciación genética de los morfotipos, a fin de establecer si la variabilidad morfológica se corresponde con un polimorfismo intraespecífico o bien, si se trata de especies diferentes
- Inferir los procesos demográficos y factores biogeográficos involucrados en la determinación de la estructura genética y posibles eventos de especiación en *S. adareanum*
- Contribuir al conocimiento de las relaciones filogenéticas existentes entre los órdenes del subfilum Tunicata y entre familias del orden Aplousobranchia, según la clasificación propuesta por Kott, utilizando los genes mitocondriales COI y Citb
- Caracterizar la presencia de posibles endosimbiontes en los dos morfotipos de *S. adareanum* utilizando el gen 16S como marcador molecular

CAPÍTULO 2:

SYNOICUM ADAREANUM Y

SYNOICUM OSTENTOR:

¿POLIMORFISMO

INTRAESPECÍFICO O ESPECIES

DIFERENTES?

2.1. Introducción

Synoicum adareanum (Herdman 1902), una especie de ascidia colonial de la familia Polyclinidae, es reportada comúnmente sobre sustratos duros en aguas Antárticas poco profundas, aunque también ha sido hallada en profundidades que van desde los 15 a los 796 m. Presenta una amplia distribución que se extiende desde algunas islas subantárticas, a lo largo del Arco de Escocia, en la Península Antártica y a lo largo de toda la línea costera del Continente Antártico. Los zooides se encuentran agrupados en una túnica y están ordenados en un sistema de rosetas circulares de 6 a 10 zooides alrededor de una cloaca común (Kott 1969). Una especie similar, *Synoicum ostentor* (Monniot y Monniot 1983), comparte algunas características con *S. adareanum*, como la forma de la colonia y la disposición de los zooides dentro de la colonia. *S. ostentor* ha sido encontrada en áreas distantes entre sí, por ejemplo en las Islas Orcadas del Sur, Islas Balleny y Tierra de Wilkes, y su presencia en general no es muy común (Monniot y Monniot 1983; Monniot y col. 2011).

De acuerdo con Monniot y Monniot (1983), las características diagnósticas de ambas especies son las siguientes: el número de filas de estigmas, el número de estigmas por fila y la posición del ovario. Según estos autores, *S. adareanum* presenta aproximadamente 16 filas de estigmas en el saco branquial, y *S. ostentor* un rango de 20-22 filas de estigmas. *S. adareanum* presenta 25 estigmas por fila, mientras que *S. ostentor* 35 estigmas por fila. En lo que respecta a la posición del ovario, *S. adareanum* posee el ovario en la parte superior de la región posterior del abdomen, por debajo del intestino, mientras que *S. ostentor* lo posee aproximadamente en la mitad de la región posterior del abdomen, muy por debajo del intestino.

S. ostentor podría haber sido mal identificada y confundida con *S. adareanum* en muchos estudios bioquímicos y ecológicos, ya que las diferencias entre ambas especies sólo pueden ser distinguidas cuando los zooides son examinados bajo la lupa. En los estudios, la coloración “in vivo” de ambas especies no ha sido mencionada, probablemente debido a que las determinaciones han sido llevadas a cabo sobre material fijado en formaldehído (Kott 1969; Monniot y Monniot 1983; Monniot y col. 2011). Sin embargo, Kott (1969) mencionó a un colector que observó a las colonias vivas de *S. adareanum*

describiéndolas como de color naranja. Recientemente, Koplovitz y col. (2011) encontraron que las colonias de *S. adareanum* tomadas de la estación Palmer de EE.UU (Isla Anvers, Península Antártica Occidental) diferían en la forma de las colonias, y mostraban también diferencias marcadas en la actividad anti-diatomea de sus metabolitos secundarios. No se realizó mención alguna del color de las colonias.

En las Islas Shetland del Sur, dos formas similares de *Synoicum* han sido encontradas: una de color verde-amarillenta con pedúnculos alargados, y otra de color naranja-amarillenta con pedúnculos más cortos y cabezas más redondeadas (observación personal de Marcos Tatián). Es probable que varios taxónomos hayan considerado ambas formas como *S. adareanum*, ya que en la mayoría de las descripciones de *S. adareanum* (Herdman 1902; Van Name 1945; Millar 1960; Kott 1969; y otros) se tuvo en cuenta el rango completo de las características diferenciales de los zooides usadas por Monniot y Monniot (1983) para separar a *S. adareanum* de *S. ostentor*. Dado que estas diferencias de color no han sido reportadas en descripciones previas para estas especies, surge la pregunta si estas dos formas se corresponden a un polimorfismo intraespecífico dentro de una especie, o si se trata de especies diferentes.

En los últimos años, los estudios llevados a cabo con marcadores moleculares han permitido distinguir polimorfismos intraespecíficos de rasgos fenotípicos que caracterizan diferentes especies dentro de las ascidias. Por ejemplo, se ha encontrado que las diferencias de color en poblaciones de *Botryllus schlosseri* están determinadas por varios loci que se heredan en forma mendeliana simple, y por lo tanto, las diferencias en la coloración constituyen un polimorfismo intraespecífico (Sabbadin 1982; Yund y O'Neil 2000). Por otro lado, se encontró que especies que presentaban polimorfismo en su forma y coloración resultaron ser complejos de especies como en las ascidias coloniales *Pseudodistoma crucigaster* (Tarjuelo y col. 2004), especies que han sido asignadas a los géneros *Cystodytes* (López-Legentil y col. 2005) y *Pycnoclavella* (Pérez-Portela y col. 2008) del Mar Mediterráneo, y la especie *Didemnum molle* de las Islas Ryukyu en Japón (Hirose y col. 2010).

El ADN mitocondrial, específicamente el gen Citocromo Oxidasa I (COI), ha sido utilizado con éxito en estudios de especiación, para resolver problemas de límites de

especies, en análisis filogeográficos y filogenéticos de este grupo (Tarjuelo y col. 2001, 2004; Turon y col. 2003; López-Legentil y Turon 2006; López-Legentil y col. 2006; Pérez-Portela y Turon 2008; Hirose y col. 2009; Goldstien y col. 2010; Haydar y col. 2011; Pineda y col. 2011). A su vez, el gen mitocondrial Citocromo b (Cit b) ha sido ampliamente utilizado en animales para evaluar la estructura genética poblacional. Este gen también ha sido considerado uno de los más útiles para el estudio filogenético en varios niveles taxonómicos dentro de los vertebrados (Irwin y col. 1991; Graybeal 1993; Lamb y col. 1994; Moore y DeFilippis 1997; Nunn y Stanley 1998; Carnaval y Bates 2007; Larmuseau y col. 2009; Trucchi y Sbordoni 2009; Qi y Qian 2011). Los genes ribosomales (28S, 5.8S y 18S) presentan diferentes tasas de evolución y han sido ampliamente utilizados en análisis filogenéticos. Los genes RNAr 18S evolucionan más lentamente que los genes 28 S RNAr, por lo que suelen ser empleados en la construcción de filogenias profundas (Bargues y Mas-Coma 1997; Wada 1998; Swalla y col. 2000; Stach y Turbeville 2002; Zeng y col. 2006; Stach 2009; Stach y Kirbach 2009 Matsuda y col. 2014)

Objetivos que se abordarán en el capítulo:

- Caracterizar morfológicamente a los individuos de dos morfotipos de la ascidia colonial *Synoicum adareanum* que se encuentran a lo largo de diferentes localidades de la Península Antártica
- Evaluar el grado de diferenciación genética de los morfotipos, a fin de establecer si la variabilidad morfológica se corresponde con un polimorfismo intraespecífico o bien, si se trata de especies diferentes
- Inferir los procesos demográficos y factores biogeográficos involucrados en la determinación de la estructura genética y posibles eventos de especiación en *S. adareanum*

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Toma de Muestras

Un total de 71 colonias de *S. adareanum* fueron colectadas en las Islas Shetland del Sur, durante el Proyecto Antártico BENTART-06 del “BIO Hespérides” (Enero y Febrero de 2006), durante el Proyecto Antártico Mission Antarctique-06 del “Sedna IV” (Noviembre de 2006) y durante la campaña de verano del Instituto Antártico Argentino en Caleta Potter (Enero de 2009). Las estaciones de muestreo se indican en la Figura 2.1, y las características de dichas estaciones en la Tabla 2.1. Las muestras de Decepción, Low45 y Low46, fueron colectadas con una red de arrastre, mientras que las muestras de la Isla 25 de Mayo (Caleta Potter), Melchior y Palmer, fueron obtenidas mediante buceo. Las colonias muestreadas en Decepción, Low45 y Low46 fueron fotografiadas inmediatamente luego de haber sido colectadas. Las muestras obtenidas mediante buceo en la estación de Caleta Potter permitieron realizar observaciones “in situ” de las colonias y tomar fotografías subacuáticas. Las fotografías de las colonias mostrando el color “in vivo” se muestran en la Figura 2.2. Una vez colectadas, las colonias fueron relajadas por inmersión en agua de mar con cristales de mentol durante varias horas. Luego, una pequeña porción de cada colonia fue disecada, fijada en etanol 95% y almacenada a -20°C hasta llevar a cabo los análisis genéticos. Bajo un microscopio binocular, empleando instrumentos histológicos, se extrajeron varios zooides de cada porción de colonia preservada en etanol, a los cuales se les removió la túnica, el intestino y larvas (en el caso de encontrar), para evitar la amplificación de posibles contaminantes como organismos comensales, y/o contenidos intestinales. Las porciones de colonias que no fueron utilizadas para estudios genéticos, se fijaron en agua de mar con formaldehído 2,5%, para examinar los zooides, y efectuar los análisis morfológicos.

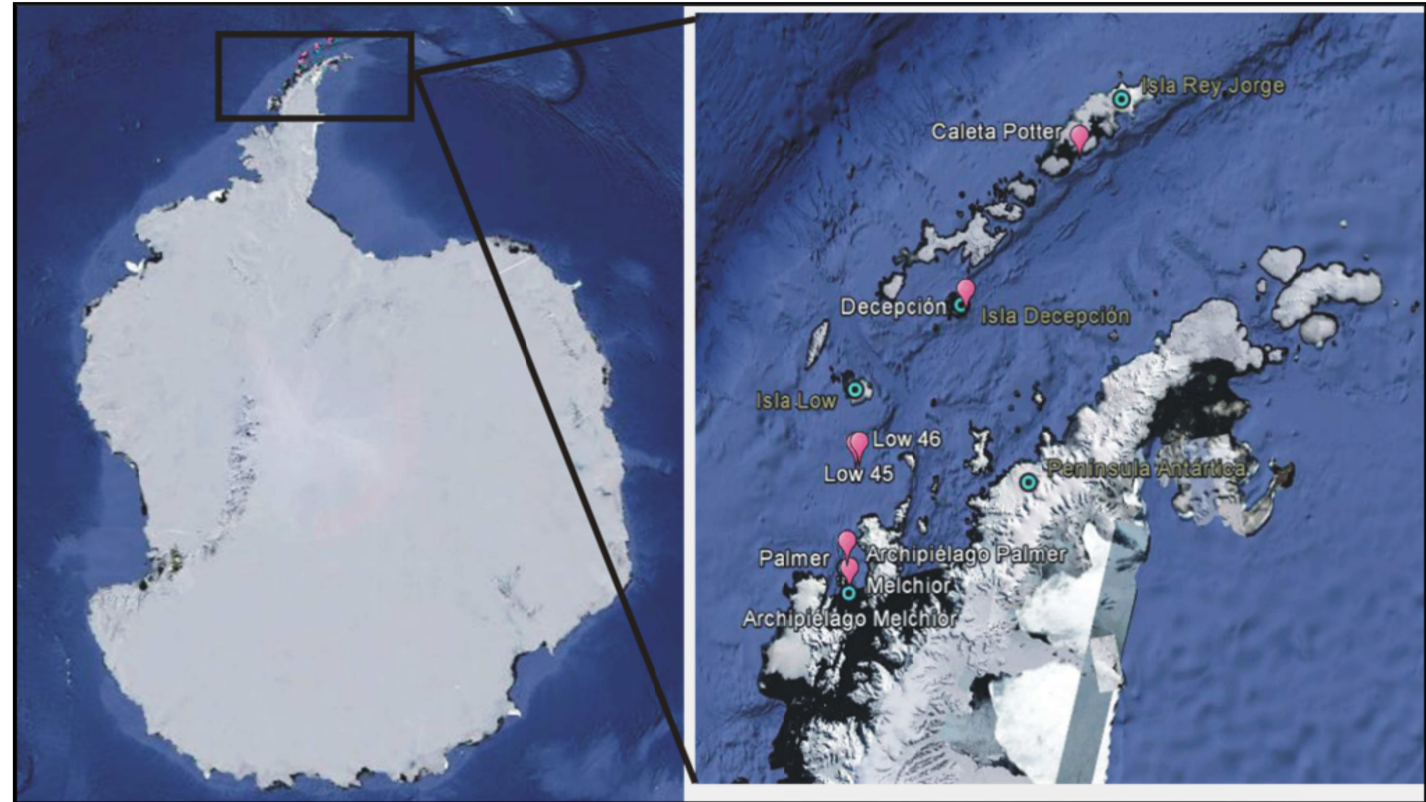


Figura 2.1. Mapa del Continente Antártico, donde se indican con color rosado los sitios de muestreo de la ascidia colonial *Synoicum adareanum*. Con color celeste se indican las islas cercanas, o estaciones científicas donde se realizaron los muestreos

Tabla 2.1. Estaciones de muestreo, localizaciones (coordenadas geográficas), número total de muestras (N), profundidad de muestreo de los individuos y el morfotipo de los individuos muestreados: NA (naranja-amarillento), o VA (verde-amarillento)

ESTACIÓN DE MUESTREO	LOCALIZACIÓN	PROFUNDIDAD DE MUESTREO	MORFOTIPO	N
Isla Decepción (Dec)	63° 01'S, 60° 32'O	215 m	NA	10
Isla Low (Low45)	63° 43' S, 62° 21'O	86 m	NA; VA	20
Isla Low (Low46)	63°43' S, 62° 24' O	97 m	NA; VA	20
Isla 25 de Mayo (Caleta Potter)	62° 13'S, 58° 42'O	20 m	NA	13
Archipiélago de Melchior (Melchior)	64° 38'S, 62° 60'O	15 m	NA	4
Archipiélago de Palmer (Palmer)	64° 14'S, 62° 49'O	18 m	NA	4

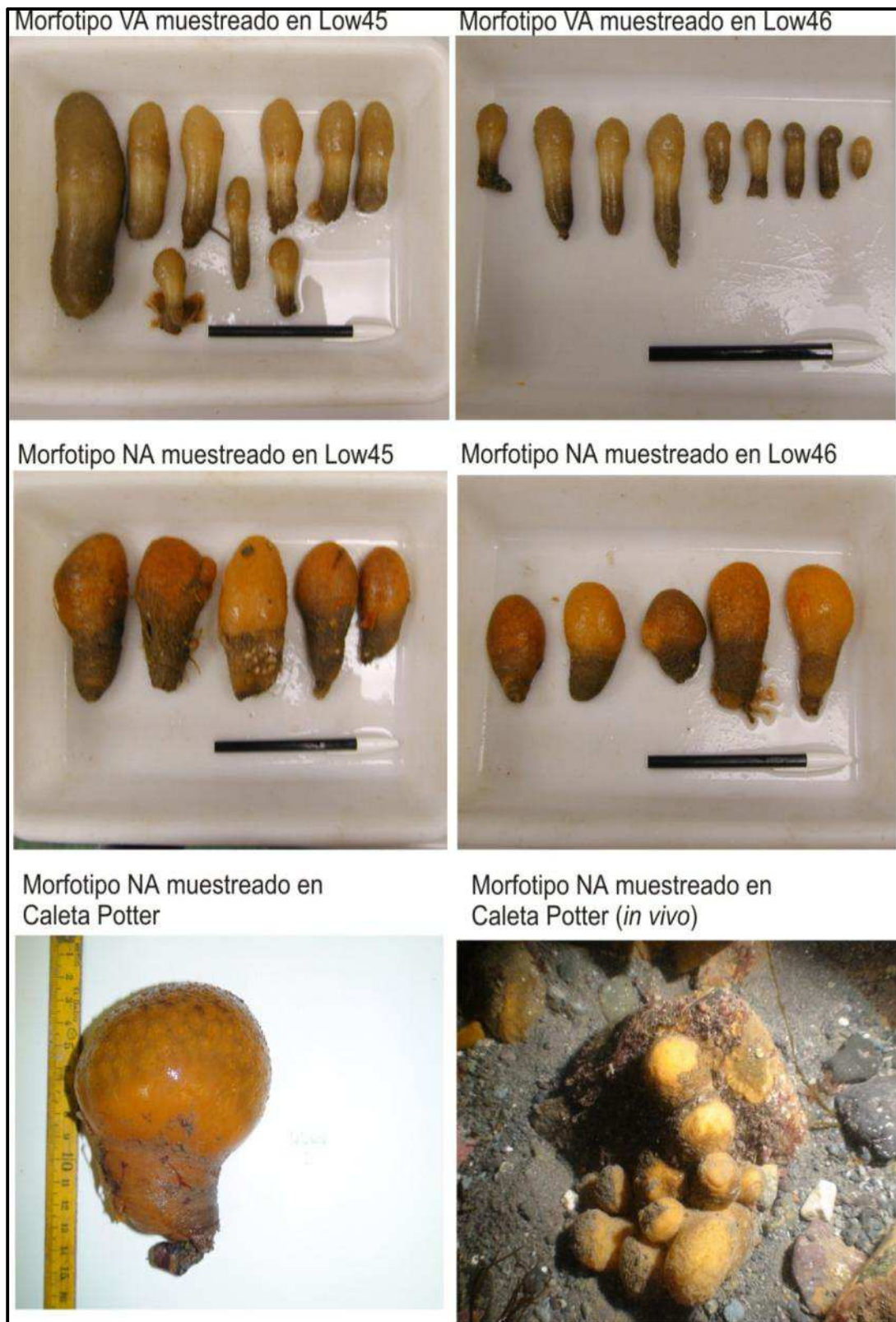


Figura 2.2. Fotografías de las colonias de *Synoicum adareanum* mostrando el color “in vivo” de los morfotipos. NA: naranja-amarillento; VA: verde-amarillento

2.2.2. Observaciones morfológicas

Se registraron los caracteres morfológicos que diferencian a *S. adareanum* de *S. ostentor* de acuerdo a las descripciones de Monniot y Monniot (1983): número de filas de estigmas en el saco branquial, número de estigmas por fila y posición del ovario (en la parte superior de la región posterior del abdomen, por debajo del intestino, o en la mitad de la región posterior del abdomen, muy por debajo del intestino).

Por cada sitio de muestreo se examinaron tres colonias y diez zooides por colonia de cada morfotipo bajo lupa a partir de material fijado en formaldehído (Fig. 2.3).

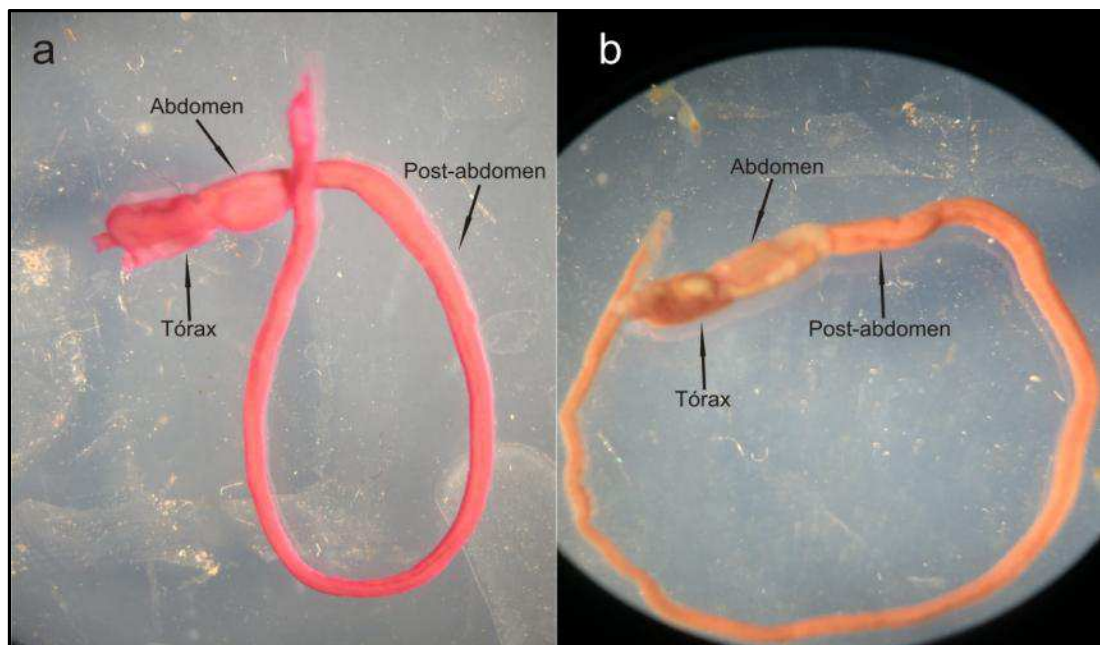


Figura 2.3. Fotografía bajo lupa de dos zooides pertenecientes a morfotipos diferentes de *S. adareanum*, teñidos con el colorante Rosa de Bengala. La Figura a) muestra un zoide de una colonia del morfotipo naranja-amarillento y la Figura b) muestra a un zoide de una colonia del morfotipo verde-amarillento

2.2.3. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN genómico total se extrajo a partir del abdomen posterior de un zooid individual por colonia, utilizando el método de purificación salina descrito en el protocolo 1 de Bruford y col. (1992), seguido por una precipitación con etanol. Una vez realizada la extracción, el ADN se almacenó en agua bidestilada a 4°C hasta llevar a cabo la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Para la reacción de amplificación por PCR del gen ribosomal 18S, se utilizó el set de cebadores 18S 5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' y 18S 5'-GATCCTTCTGCAGGTTACACCT-3' ya empleado por Stach y Turbeville (2002) en un estudio filogenético de los tunicados. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 50µl. Además de incluir el ADN molde de cada ejemplar (1µl de ADN sin diluir), cada reacción de PCR incluyó 5µl del "buffer" 10x de reacción [750mM Tris-HCl pH 8,8, 200mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween-20], 2,5µl MgCl₂ 25mM, 0,75µl de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; stock 20mM), 1,5µl de cada cebador (stock 10mM), 0,3µl de Taq ADN Polimerasa (stock 5 U/ µL; "Thermo Scientific" EP0402, Brasil) y ddH₂O para completar el volumen final. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Px2, "Thermo ELECTRON CORPORATION" con el siguiente programa de amplificación: 1 min a 94°C, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 seg, unión del cebador a 60°C por 25 seg, y extensión a 72°C por 30 seg, seguido de un post-tratamiento de 7 min a 72°C, y un enfriamiento a 4°C. En cada reacción de PCR incluimos un control negativo para detectar posibles contaminaciones. Debido a que no se lograron amplificaciones exitosas en *S. adareanum* con la reacción de amplificación anteriormente descrita, se hicieron modificaciones en la misma probando distintos volúmenes de ADN (0,5 a 5µl), concentraciones de MgCl₂ (2,5 a 4µl), se varió el número de ciclos de reacción (28 a 34), y la temperatura de unión del cebador (45 a 65°C).

Para la reacción de amplificación por PCR del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) se utilizó el set de cebadores universales (LCO1490:5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' y HCO21985'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') diseñados por Folmer y col. (1994). Las reacciones de PCR siguieron las mismas especificaciones generales mencionadas

anteriormente. El programa de amplificación fue: 3 min a 94°C, 36 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, unión del cebador a 50°C por 1 min, y extensión a 72°C por 2 min, seguido de un post-tratamiento de 7 min a 72°C, y un enfriamiento a 4°C. En cada reacción de PCR incluimos un control negativo para detectar posibles contaminaciones. Los productos de doble cadena amplificados fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones en MacroGen (EE.UU). Se realizó una búsqueda “Blast” en el Banco de Genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y se encontró que sólo 4 de los 15 haplotipos obtenidos a partir de los zooides amplificados mostraron una alta homología con secuencias COI de otras especies de ascidias de la familia Polyclinidae. El resto de los haplotipos mostraron una alta homología con genes COI bacterianos. Por lo tanto, a partir de secuencias COI de ascidias de la familia Polyclinidae obtenidas del Banco de Genes (Tabla 2.2), y de las secuencias COI de *S. adareanum* que presentaron una elevada homología con ascidias, se obtuvo una secuencia consenso y mediante el empleo del programa Primer3 2.2.2 (Rozen y Skaletsky 2000), se diseñó un set de cebadores específicos para *S. adareanum*: PolCOI-F 5'-TTGATCTGCTCCTHCTTAGA-3' y PolCOI-R 5'-CCACTAGARTGTGCTAARCC-3'.

Las reacciones de PCR siguieron las mismas especificaciones generales mencionadas previamente. El programa de amplificación fue: 3 min a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, unión del cebador a 40°C por 1 min, y extensión a 72°C por 1 min, seguido de un post-tratamiento de 7 min a 72°C, y un enfriamiento a 4°C. En cada reacción de PCR incluimos un control negativo para detectar una posible contaminación.

Por otro lado, para la reacción de amplificación por PCR del gen mitocondrial Citocromo b, se utilizó el set de cebadores ya empleado por Zeng y col. (2006) en un estudio filogenético del orden Stolidobranchia. Sin embargo, no se lograron amplificaciones exitosas en *S. adareanum*. Debido a este inconveniente, se utilizaron secuencias del gen Citb de ascidias de los órdenes Aplousobranchia y Phlebobranchia obtenidas del Banco de Genes (Tabla 2.3) para obtener una secuencia consenso, a partir de la cual y mediante el empleo del programa Primer3 2.2.2 (Rozen y Skaletsky 2000), se diseñó un set de cebadores específicos: cobF 5'-TGGGTGRYCAAGAAGAAG-3' y CobR 5'-GGRAANARRAARTAYCAYTC-3'. Con este par de cebadores logramos amplificar sólo

las secuencias para el gen *Citb* de los individuos de *S. adareanum* del morfo verde-amarillento. Estas secuencias se utilizaron para obtener una secuencia consenso, a partir de la cual, con el programa Primer3 2.2.2 (Rozen y Skaletsky 2000), se diseñó un segundo par de cebadores específico para *S. adareanum*: Syn_Cytb-F 5'-GGTTTGTGTWGGWTTTTTTTTTAATTATTCAAG-3' y Syn_Cytb-R5'-CTTAAAGGATTYCYAGATCTTCTACC-3'.

Las reacciones de PCR siguieron las mismas especificaciones generales mencionadas anteriormente. El programa de amplificación fue: 2 min a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, unión del cebador a 43°C por 1 min, y extensión a 72°C por 1 min, seguido de un post-tratamiento de 7 min a 72°C, y un enfriamiento a 4°C. En cada reacción de PCR incluimos un control negativo para detectar posible contaminación.

Tabla 2.2. Especies de ascidias utilizadas para la obtención de la secuencia consenso y sus respectivos números de acceso al Banco de Genes

ESPECIE	Nº ACCESO
<i>Aplidium conicum</i>	NC_013584.1
<i>Aplidium elegans</i>	AY600971.1
<i>Aplidium fuscum</i>	AY600975.1
<i>Aplidium pseudolobatum</i>	AY600967.1

Tabla 2.3. Órdenes, familias y especies de ascidias empleadas para la obtención de la secuencia consenso y sus respectivos números de acceso al Banco de Genes

ORDEN	FAMILIA	ESPECIE	N° ACCESO
Aplosubbranchia	Clavelinidae	<i>Clavelina lepadiformis</i>	NC_012887.1
Aplosubbranchia	Polyclinidae	<i>Aplidium conicum</i>	NC_013584.1
Aplosubbranchia	Didemnidae	<i>Diplosoma listerianum</i>	NC_013556.1
Phlebobranchia	Cionidae	<i>Ciona intestinalis</i>	NC_004447.2
Phlebobranchia	Cionidae	<i>Ciona savignyi</i>	AB079784.1
Phlebobranchia	Asciidiidae	<i>Phallusia mammillata</i>	NC_009833.1
Phlebobranchia	Asciidiidae	<i>Phallusia fumigata</i>	NC_009834.1

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1% P/V en buffer TBE 0,5x con 0,005µg/ml de bromuro de etidio) a un voltaje constante (100V) durante 2 horas, se visualizaron bajo UV y se fotografiaron. Luego, los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en MacroGen (EE.UU) empleando los mismos cebadores que se utilizaron para la reacción de PCR. Con el fin de descartar la amplificación de secuencias que no se correspondieran con las de ascidias, se secuenciaron ambas hebras y se realizó una búsqueda “Blast” en el Banco de Genes con cada haplotipo encontrado.

Las secuencias se analizaron con el programa CHROMAS version 2.23 (McCarthy 1998) y se editaron manualmente. Posteriormente, se alinearon empleando el programa MEGA versión 5 (Tamura y col. 2011). Una vez alineadas (para cada gen por separado) las secuencias de todos los individuos se colapsaron en haplotipos. A su vez, las secuencias pudieron ser traducidas a aminoácidos sin la presencia de codones stop.

2.2.4. Análisis genéticos poblacionales

Utilizando el programa DNAsp 4.10 (Librado y Rozas 2009) se estimaron diferentes índices de diversidad genética dentro de las estaciones de muestreo: diversidad nucleotídica

(π), número de sitios polimórficos (S ; Nei 1987; Lynch y Crease 1990), diversidad haplotípica (Hd ; Nei 1987) y el número de diferencias nucleotídicas.

Mediante el programa Modeltest 3.0 (Posada y Crandall 1998), considerando el Criterio de Información de Akaike (CIA) y comparaciones estadísticas de 56 modelos de evolución diferentes, se seleccionó el mejor modelo de sustitución nucleotídica que se ajustó a nuestros datos. Para el gen COI el mejor modelo fue GTR+G, con un valor del parámetro gamma de 0,032, mientras que para el gen Citb, el mejor modelo fue GTR. Debido a que ninguno de estos modelos está implementado en el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier y col. 2005), las distancias genéticas de a pares entre haplotipos se estimaron empleando el modelo de sustitución nucleotídica más cercano: el de Tamura-Nei (TrN) con una corrección de gamma para la heterogeneidad de las tasas de mutación de 0,032 para el gen COI. La matriz de distancia resultante se empleó para realizar un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y para calcular, mediante la utilización del índice Φ_{ST} , la diferenciación entre pares de sitios de muestreo. El índice Φ_{ST} es análogo a la medida de varianza en las frecuencias alélicas entre poblaciones (F_{ST}) de Wright (1969), pero también tiene en cuenta las diferencias mutacionales entre haplotipos (Excoffier y col. 1992). El índice Φ_{ST} entre pares de sitios se calculó considerando la localidad geográfica y la localidad geográfica y morfotipo. Mediante el análisis de AMOVA se evaluaron diferentes estructuras poblacionales: A) un grupo de poblaciones: i) considerando sitios geográficos de muestreo sin tener en cuenta el morfotipo), o ii) considerando sitios de muestreo y morfotipo; B) dos grupos: sitios de muestreo del morfo NA vs sitios de muestreo del morfo VA. La significancia de todos los índices se evaluó a través de 10.000 permutaciones. La correlación de los valores Φ_{ST} de a pares y la distancia geográfica entre poblaciones de *S. adareanum* se estimó utilizando la prueba de Mantel. Se realizaron tres pruebas: a) entre sitios de muestreo sin considerar el morfotipo, b) entre sitios de muestreo considerando el morfotipo, c) entre sitios de muestreo considerando el morfotipo excepto las muestras NA de Low45. Se utilizó el programa Arlequín para todos estos cálculos.

Las relaciones entre los haplotipos se estimaron a partir de diferentes aproximaciones. En primer lugar se aplicaron tres métodos de construcción de árboles, uno basado en Máxima Parsimonia (MP), otro en distancias genéticas, y el último en Inferencia Bayesiana. Los árboles filogenéticos obtenidos a partir de los métodos de MP y distancias

se estimaron empleando el programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2001). Mientras que el árbol filogenético con la mayor probabilidad posterior (PP), se estimó utilizando el programa MrBayes (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Para el análisis de MP se empleó un algoritmo de búsqueda heurístico, obteniéndose el árbol inicial por adición secuencial, utilizando el algoritmo de bisección-reconexión de árboles (TBR) para el intercambio de ramas. El árbol basado en distancias se construyó sobre la base de las distancias TrN entre haplotipos utilizando el método de “Neighbor-Joining” (NJ). En ambos análisis, se realizaron 1.000 repeticiones de “bootstrap” para construir un árbol consenso de mayoría, y evaluar el soporte estadístico de los nodos de los árboles filogenéticos encontrados.

El análisis Bayesiano se realizó empleando secuencias nucleotídicas particionadas por codón. Dicha partición se llevó a cabo con el programa MEGA versión 5 (Tamura y col. 2011). Los modelos de sustitución nucleotídica que se ajustaron a nuestros datos fueron seleccionados por comparación estadística de 56 modelos de evolución diferentes empleando el programa Modeltest 3.0 (Posada y Crandall 1998) y utilizando el Criterio de Información de Akaike. Los modelos seleccionados fueron: GTR para la primera posición, F81+I para la segunda posición, y HKY para la tercera posición del codón. Para evaluar las topologías, se usaron 4 cadenas de un algoritmo de Cadena de Markov-Monte Carlo, con 5 millones de generaciones cada una, en dos corridas independientes. Los árboles se muestrearon cada 1.000 generaciones, y el primer 25% de ellos se lo consideró como período de calentamiento, y se lo descartó.

Los tres análisis filogenéticos se realizaron para cada uno de los genes mitocondriales. En el caso del gen COI, se incluyó una secuencia de *S. adareanum* de Tierra Adelia (Base de datos BoLD ASCAN011-10). En todos los análisis (tanto para el gen COI, como para el gen Citb), se utilizaron como extragrupos a *Ciona intestinalis*, *Clavelina lepadimorfis* y *Herdmania momus* (Números de acceso al Banco de Genes: NC_004447.2, NC_012887.1 y NC_013561.1 respectivamente). Los árboles resultantes se graficaron utilizando el software TreeView (Page 1996).

En segundo lugar, se construyó una red de haplotipos con el programa Network (Bandelt y col. 1999), el cual implementa el algoritmo de “Median Joining”. Este algoritmo genera secuencias hipotéticas (vectores medianos, frecuentemente ancestrales), necesarios

para conectar según el principio de máxima parsimonia las secuencias existentes dentro de la red, sin asumir la bifurcación de las relaciones.

2.2.5. Análisis demográfico

La neutralidad selectiva de las mutaciones se evaluó mediante el índice F_s (Fu 1997) utilizando el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier y col. 2005). La distribución de las frecuencias de las diferencias de a pares entre individuos se comparó con la distribución esperada de un modelo de expansión poblacional implementado en ARLEQUIN (Rogers y Harpending 1992; Excoffier y Schneider 1999), para evaluar un posible evento de expansión poblacional histórico. La validez del modelo demográfico estimado se evaluó a través de la distribución estadística de SSD (suma de las diferencias al cuadrado) con remuestreo paramétrico (Excoffier y Schneider 1999). El índice de irregularidad (Harpending 1994) se utilizó para evaluar la desviación de la distribución unimodal de las diferencias de a pares. El parámetro poblacional τ (escala de tiempo mutacional) también se obtuvo empleando el programa Arlequin. El cálculo de F_s y de las distribuciones de diferencias de a pares se realizaron considerando: al set de datos completo, los haplotipos hallados solamente en los individuos NA (morfotipo naranja-amarillento), los haplotipos hallados solamente en los individuos NA más los haplotipos compartidos entre los dos morfotipos, y finalmente considerando los haplotipos VA (morfotipo verde-amarillento), y los haplotipos compartidos entre ambos morfotipos.

La escala de tiempo mutacional $\tau=2ut$ puede ser utilizada para estimar el tiempo de la expansión poblacional, por lo que a partir de τ y de los análisis de las distribuciones de las diferencias de a pares entre individuos, se estimó el tiempo (en años) desde el último evento de expansión demográfica, $t=\tau/2u$, donde t es el tiempo en generaciones, τ es la escala de tiempo mutacional, y u es la tasa de mutación por generación de la secuencia entera ($u=2\mu k$, μ es la tasa de mutación por nucleótido, y k es el número de nucleótidos de la secuencia entera) (Castro 2007; Qi y Qian 2011). Para el gen COI se tuvo en cuenta el valor de $\mu= 4,95 \times 10^9$ por sitio y por año, obtenida de ectodermos (Morita 1999), la cual fue empleada por Tarjuelo y col. (2004) en el análisis de coalescencia de la ascidia colonial *Pseudodistoma crucigaster*. Mientras que para el gen Citb, se tuvo en cuenta el valor de $\mu=$

$2,7 \times 10^{-9}$ por sitio y por año, resultante de los estudios llevados a cabo por Qi y Qian (2011) con cefalocordados (anfioxos).

2.2.6. Estimación de tiempos de divergencia

La estimación de los tiempos de divergencia entre los morfotipos presentes en la Península Antártica y entre éstos y *S. adareanum* de Tierra Adelia, se realizó mediante el programa BEAST versión 1.6 (Drummond y col. 2005), utilizando las secuencias de los genes COI y Citb combinados. Se decidió emplear a los genes combinados ya que brindan más información que si se consideran los análisis con los genes por separado (Gray y col. 2006). Los haplotipos resultantes de la combinación de los genes mitocondriales se obtuvieron con el programa DNAsp 4.10 (Librado y Rozas 2009).

Se tuvieron en cuenta tres puntos de calibración para la estimación de los tiempos de divergencia. Por un lado, el tiempo de divergencia entre dos especies de *Ciona* (*Ciona intestinalis* y *Ciona savignii*) que fue de aproximadamente 184 (+/- 15) MA (Berná y col. 2009); por otro lado se consideró el tiempo de divergencia de los Cordados de aproximadamente 896 MA (832-1022 MA; Swalla y Smith 2008), y el de Ambulacraria (Equinodermos + Hemicordados) de aproximadamente 876 MA (725-1074 MA; Swalla y Smith 2008). Debido a que el modelo de evolución del árbol es diferente si se trata de estimaciones intra-especie, para lo cual se utiliza un modelo de coalescencia, o si se trata de análisis inter-específicos, donde se aplica el modelo Yule (“yule process”), se realizaron dos análisis por separado. Por un lado, se estimó el tiempo de separación entre *S. adareanum* de Tierra Adelia y los morfotipos encontrados en las localidades de la Península Antártica, y entre éstas y otras especies del género *Synoicum* y de la familia Polyclinidae. Por otro lado, se estimó el tiempo de separación entre haplotipos dentro de *S. adareanum*. Se utilizó el programa BEAUti versión 1.7.2 (Drummond y col. 2012) para obtener el archivo de entrada para el programa BEAST y establecer los parámetros del modelo de sustitución de las secuencias, del reloj molecular y de evolución del árbol.

2.2.6.1. Análisis Interespecífico

Se utilizaron cuatro miembros de la familia Polyclinidae (un representante del morfotipo naranja-amarillento de *S. adareanum*, un individuo de la especie *S. adareanum* muestreado en Tierra Adelia, un miembro de la especie *Synoicum castellatum*, y un representante de *Aplidium conicum*), un miembro de la familia Clavelinidae (*Clavelina lepadiformis*), y dos representantes de la familia Cionidae (*Ciona intestinalis* y *Ciona savignyi*). El equinodermo *Stichopus horrens*, y el hemicordado *Rhabdopleura compacta* fueron utilizados como extragrupos. Todas las secuencias utilizadas en este estudio (a excepción de la perteneciente al morfotipo NA de *S. adareanum*), fueron tomadas del Banco de Genes, y de la Base de datos BoLD, sus respectivos números de acceso se encuentran en la Tabla 2.4. En el análisis se incluyeron secuencias del gen COI y del gen Citb de todos los individuos, excepto de *S. castellatum* y del individuo de *S. adareanum* muestreado en Tierra Adelia, donde sólo se incluyeron las secuencias COI, debido a que hasta la fecha no ha sido amplificado el gen Citb para estas especies.

El mejor modelo de sustitución nucleotídica para cada gen se obtuvo con el programa Modeltest 3.0 (Posada y Crandall 1998), y se establecieron como GTR+G para el gen COI, y GTR+I+G para el gen Citb. Se eligió la opción “uncorrelated lognormal relaxed clock”, que permite tasas independientes de sustitución nucleotídica sobre diferentes ramas. El árbol de partida fue aleatorio.

Para el análisis con los genes combinados se realizaron 3 corridas de 5 millones de generaciones cada una, con un muestreo cada 100 generaciones, y se descartó el 10% inicial de las muestras como período de calentamiento “burn-in”. Las 3 corridas fueron combinadas mediante el programa LogCombiner versión 1.6 (Drummond y col. 2005). La convergencia, la mezcla de cadenas, y la evaluación de que los tamaños de muestra efectivos (ESS) fueran mayores a 200 para todos los parámetros, se realizó con el programa TRACER 1.5 (Rambaut y Drummond 2007).

Tabla 2.4. Especies, genes y números de acceso al Banco de Genes y Sistema BOLD, empleados en los análisis Inter e Intraespecíficos

ESPECIE	GEN	N° ACCESO
<i>Synoicum adareanum</i>	COI	ASCAN011-10
<i>Synoicum castellatum</i>	COI	KC017441.1
<i>Aplidium conicum</i>	COI	NC_013584.1
<i>Aplidium conicum</i>	Citb	NC_013584.1
<i>Clavelina lepadiformis</i>	COI	AM292603.2
<i>Clavelina lepadiformis</i>	Citb	AM292603.2
<i>Ciona intestinalis</i>	COI	NC_004447.2
<i>Ciona intestinalis</i>	Citb	NC_004447.2
<i>Ciona savignyi</i>	COI	AB079784.1
<i>Ciona savignyi</i>	Citb	AB079784.1
<i>Stichopus horrens</i>	COI	NC_014454.1
<i>mitochondrion</i>		
<i>Stichopus horrens</i>	Citb	NC_014454.1
<i>mitochondrion</i>		
<i>Rhabdopleura compacta</i>	COI	FN908482.1
<i>Rhabdopleura compacta</i>	Citb	FN908482.1

2.2.6.2. Análisis Intraespecífico

Para el análisis intraespecífico se utilizaron los haplotipos obtenidos a partir de los dos morfotipos de *S. adareanum*. En el análisis con los genes combinados, se utilizaron como extragrupos al individuo de *S. adareanum* muestreado en Tierra Adelia, un representante de *S. castellatum* y uno de *A. conicum*. Las secuencias utilizadas como extragrupos fueron tomadas del Banco de Genes y de la Base de datos BoLD, sus respectivos números de acceso se encuentran en la Tabla 2.4. En este análisis se incluyeron secuencias del gen COI y del gen Citb de todos los individuos, excepto de *S. castellatum* y del representante de *S. adareanum* muestreado en Tierra Adelia, que hasta la fecha no poseen secuenciado el gen Citb, y de los individuos del morfo NA de *S. adareanum* en

donde no se logró amplificar el gen COI (individuos 152, 153, 155, 157, 158, 159 de Low45, los individuos 6, 9, 10, 12, 13 de Caleta Potter, los individuos A, B, C, D de Melchior y los individuos 1, 2, 3, 4 de Palmer).

El mejor modelo de sustitución nucleotídica para cada gen se obtuvo con el programa Modeltest 3.0 (Posada y Crandall 1998), el cual fue GTR+G para ambos genes mitocondriales. Se seleccionaron las opciones “uncorrelated lognormal relaxed clock”, y la opción tamaño constante para el parámetro “Tree Prior” de coalescencia. El árbol de partida fue aleatorio.

Se tuvieron en cuenta tres puntos de calibración para la estimación de los tiempos de divergencia a nivel intraespecie tomados del análisis interespecífico efectuado previamente. El primer punto de calibración fue el tiempo de divergencia de la familia Polyclinidae, que fue de aproximadamente 219 (+/- 73) MA; el segundo punto de calibración fue el tiempo de divergencia de las dos especies de *Synoicum*, que fue de 204 (+/- 72) MA aproximadamente. Por último, el tercer punto de calibración fue el tiempo de divergencia de los dos haplotipos de *S. adareanum* geográficamente distantes (haplotipo de Tierra Adelia, y uno de los haplotipos de las Islas Shetland del Sur), que fue aproximadamente de 127 (+/- 46) MA.

Para el análisis con los genes combinados, se realizaron 4 corridas de 5 millones de generaciones cada una, con un muestro cada 100 generaciones. Las 4 corridas fueron combinadas mediante el programa LogCombiner versión 1.6 (Drummond y col. 2005). Se descartó el 10% inicial de las muestras como período de calentamiento “burn-in”. La convergencia, la mezcla de cadenas, y la evaluación de que los ESS fueran mayores a 200 para todos los parámetros, se realizó con el programa TRACER 1.5 (Rambaut y Drummond 2007).

2.3. Resultados

2.3.1. Observaciones morfológicas

Los zooides exhibieron diferencias que fueron constantes en los dos morfotipos. La frecuencia de cada morfotipo por estación de muestreo se indica en la figura 2.4.

El morfotipo NA exhibió colonias de color naranja-amarillento con pedúnculos cortos y cabezas redondeadas. Los tórax fueron largos, con 14-16 filas de estigmas en el saco branquial. El número de estigmas por fila varió de 24 a 26. El ovario se situó en la parte superior de la región posterior del abdomen, por debajo del intestino (abdomen).

El morfotipo VA exhibió colonias de color verde-amarillento sin cabezas redondeadas y con pedúnculos alargados. Los tórax mostraron de 21 a 22 filas de estigmas en el saco branquial. El número de estigmas por fila varió de 31 a 34. El ovario se situó aproximadamente en la mitad de la región posterior del abdomen, muy por debajo del intestino (abdomen).

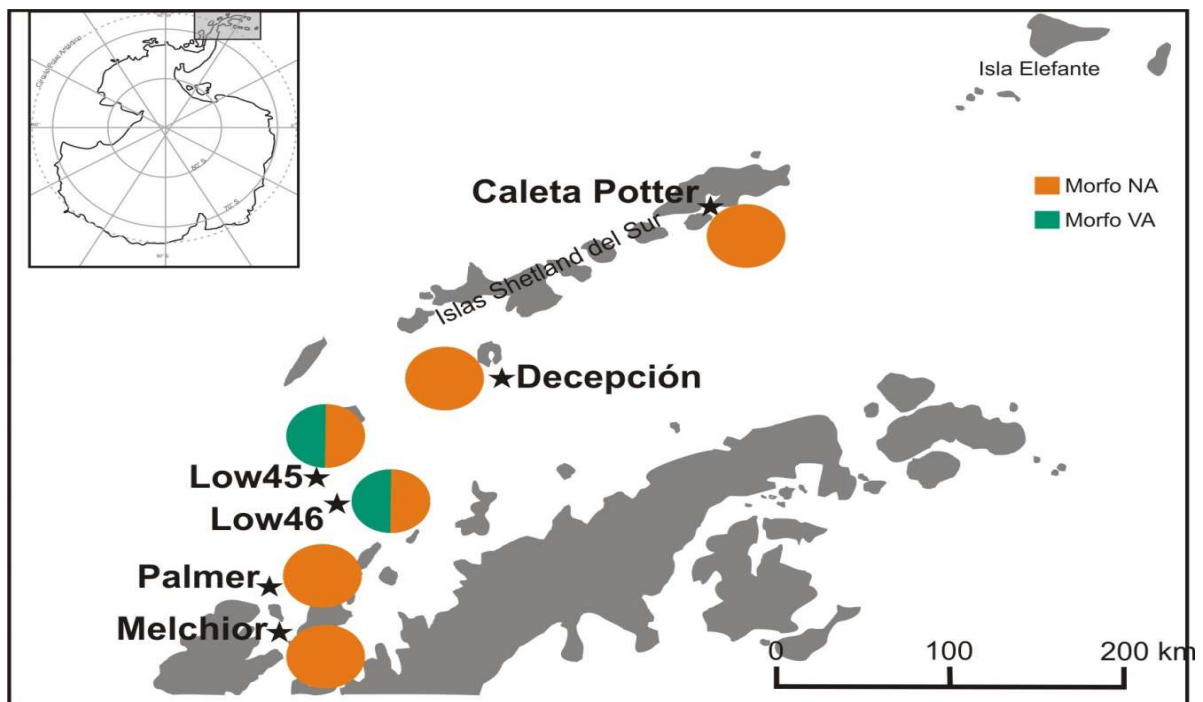


Figura 2.4. Mapa del área de estudio que muestra la ubicación de los sitios de muestreo (estrellas). La frecuencia de cada morfotipo por estación de muestreo se indica en los gráficos de tortas. Los morfotipos están representados con colores diferentes en el gráfico de tortas. Color naranja: Morfotipo naranja-amarillento, color verde: Morfotipo verde-amarillento

2.3.2. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

A pesar de los esfuerzos y las diferentes pruebas efectuadas en las reacciones de PCR, no se logró amplificar el gen ribosomal 18S en ninguno de los dos morfotipos.

Por otro lado, el set de cebadores específicos diseñados para *S. adareanum*, permitió la amplificación parcial del gen mitocondrial COI en 53 representantes de las colonias muestreadas de ambos morfotipos de *S. adareanum* (Tabla 2.5). La longitud final de las secuencias amplificadas (Fig. 2.5) luego del alineamiento y el recorte fue de 304 pares de bases (pb) y libre de gaps.

Para la reacción de amplificación por PCR del gen mitocondrial citocromo b, el set de cebadores específico diseñado para *S. adareanum*, permitió la amplificación parcial del gen Citb de todos los representantes de las colonias muestreadas de ambos morfotipos de *S. adareanum*. La longitud final de las secuencias amplificadas (Fig. 2.6) luego del alineamiento y recorte fue de 504 pb (un gap de tres nucleótidos se incorporó hacia el final del alineamiento en algunas de las secuencias).

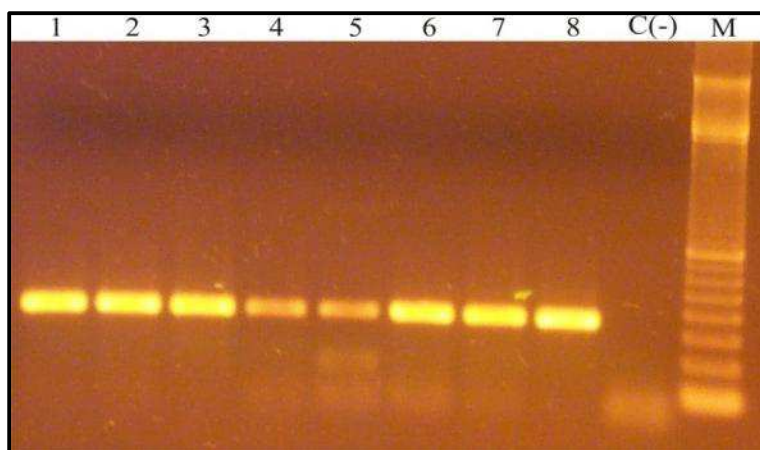


Figura 2.5. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR del gen COI. Los números representan las calles: calles 1 a 8: fragmento amplificado de 304 pb del gen COI para 8 individuos de *S. adareanum*; control negativo C(-); marcador de 100 pares de bases (M)

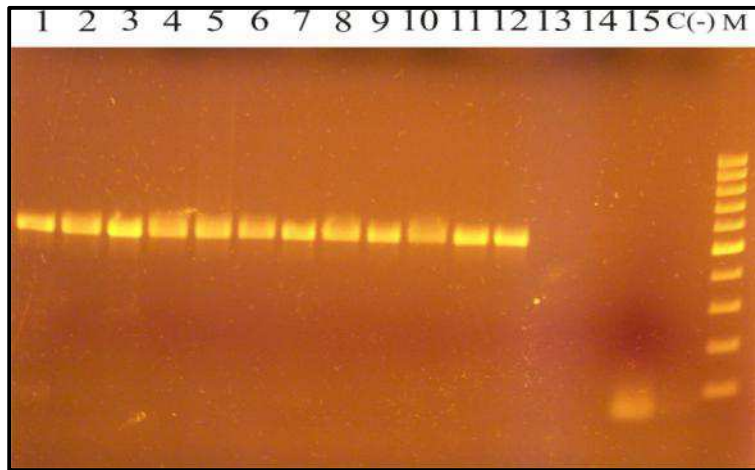


Figura 2.6. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR del gen Citb. Los números representan las calles: calles 1 a 12, fragmento amplificado de 504 pb del gen Citb para 12 individuos de *S. adareanum*; control negativo C(-); marcador de 100 pares de bases (M); en las calles 13, 14 y 15 no se obtuvieron amplificaciones

2.3.3. Gen COI: Análisis genéticos poblacionales

Se identificaron 17 haplotipos diferentes (Tabla 2.5) que presentaron 11 sitios polimórficos. El detalle de los haplotipos encontrados en cada colonia individual se presenta en la Tabla 2.6. El número de haplotipos encontrado en cada estación de muestreo, el número de sitios polimórficos (S), los valores de diversidad haplotípica (Hd) y los valores de diversidad nucleotídica (π) se muestran en la Tabla 2.5.

Las frecuencias de haplotipos por estación de muestreo se presentan en la Figura 2.7. La diversidad nucleotídica total fue de 0,009. La diversidad de haplotipos fue $0,763 \pm 0,058$ (media \pm DE), y el número medio de diferencias nucleotídicas fue 2,938. Caleta Potter y la Isla Decepción presentaron los valores más altos de diversidad nucleotídica, como así también de diversidad de haplotipos.

De los 17 haplotipos encontrados, sólo 2 (Hap VII y Hap VIII) fueron compartidos entre los dos morfotipos, 13 fueron exclusivos del morfotipo NA y 2 fueron exclusivos del morfotipo VA (Hap X y Hap XI). A su vez, sólo 4 de los 17 haplotipos fueron compartidos

entre sitios de muestreo (Hap I entre Low45 y Caleta Potter, Hap II entre Decepción y Caleta Potter, Hap VII y Hap VIII entre Low45, Low46 y Decepción). El porcentaje de singletones (haplotipos representados por un solo miembro en el conjunto de datos) fue de 52,94%. El haplotipo más frecuente (Hap VIII) se distribuyó ampliamente; se observó en el 47,17% de los individuos, en la mayoría de las localidades (Low46, Low45 y Decepción) y además fue compartido entre los morfos NA y VA. El segundo haplotipo más frecuente (Hap VII) presentó características similares a las del haplotipo VIII. Decepción presentó 3 haplotipos exclusivos (Hap VI, Hap IX y Hap XVII), al igual que Low45 (Hap IV, Hap VI y Hap XI) y Low46 (Hap III, Hap X y Hap XVI), mientras que Caleta Potter tuvo 4 haplotipos exclusivos (Hap XII, Hap XIII, Hap XIV y Hap XV).

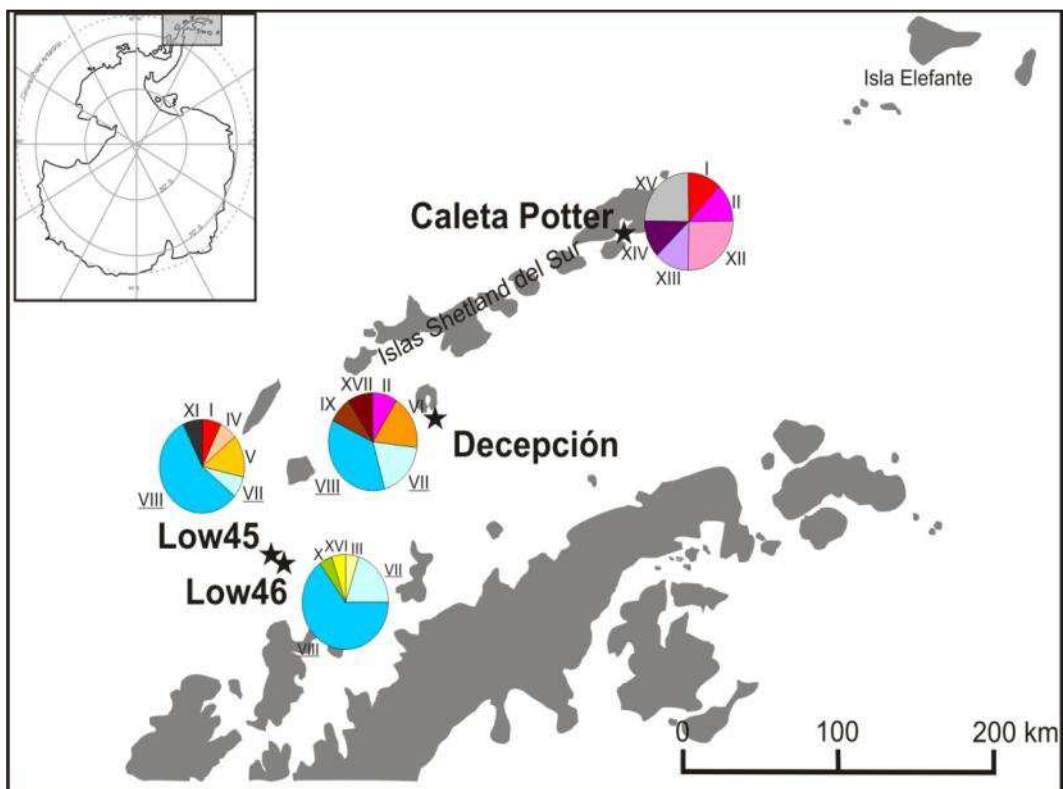


Figura 2.7. Mapa del área de estudio que muestra la ubicación de los sitios de muestreo (estrellas). La frecuencia de cada haplotipo del gen COI por estación de muestreo se indica en los gráficos de tortas. Los haplotipos están representados con números romanos y colores diferentes en el gráfico de tortas. Los haplotipos subrayados indican aquellos haplotipos compartidos entre los morfos NA y VA y las localidades de Low45, Low46 y Decepción

Tabla 2.5. Sitios de muestreo, número de haplotipos, diversidad nucleotídica (π), diversidad haplotípica (Hd) y número de sitios polimórficos (S) estimados a partir del gen mitocondrial COI en *Synoicum adareanum*. Los haplotipos compartidos entre los morfotipos NA y VA se encuentran subrayados

SITIOS DE MUESTREO	HAPLOTIPOS																	TOTAL	π	Hd	S
	I	II	III	IV	V	VI	<u>VII</u>	<u>VIII</u>	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII				
Decepción	-	1	-	-	-	2	2	4	1	-	-	-	-	-	-	-	1	11	0,012	0,855	10
Low46	-	-	1	-	-	-	4	13	-	1	-	-	-	-	-	1	-	20	0,004	0,558	5
Low45	1	-	-	1	2	-	1	8	-	-	1	-	-	-	-	-	-	14	0,008	0,681	7
Caleta Potter	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	1	2	-	-	8	0,011	0,929	9
Total																		53	0,009	0,763	

Tabla 2.6. Sitios de muestreo, morfotipos, y haplotipos encontrados en cada colonia analizada

POBLACIÓN	MORFOTIPO	COLONIA	HAPLOTIPO
Caleta Potter	NA	1	XV
Caleta Potter	NA	2	XV
Caleta Potter	NA	3	II
Caleta Potter	NA	4	I
Caleta Potter	NA	5	XII
Caleta Potter	NA	7	XII
Caleta Potter	NA	8	XIII
Caleta Potter	NA	11	XIV
Low45	VA	140	VIII
Low45	VA	141	VIII
Low45	VA	142	VII
Low45	VA	143	XI
Low45	VA	144	VIII
Low45	VA	145	VIII
Low45	VA	146	VIII
Low45	VA	147	VIII
Low45	VA	148	VIII
Low45	VA	149	VIII
Low45	NA	150	V
Low45	NA	151	I
Low45	NA	154	V
Low45	NA	156	IV

POBLACIÓN	MORFOTIPO	COLONIA	HAPLOTIPO
Low46	VA	90	VIII
Low46	VA	91	VIII
Low46	VA	92	VIII
Low46	VA	93	VIII
Low46	VA	94	VIII
Low46	VA	95	VII
Low46	VA	96	VII
Low46	VA	97	X
Low46	VA	98	VIII
Low46	VA	99	VIII
Low46	NA	110	VIII
Low46	NA	111	XVI
Low46	NA	112	VII
Low46	NA	113	VIII
Low46	NA	114	VII
Low46	NA	115	VIII
Low46	NA	116	III
Low46	NA	117	VIII
Low46	NA	118	VIII
Low46	NA	119	VIII
Decepción	NA	40	VIII
Decepción	NA	41	VI
Decepción	NA	42	VIII
Decepción	NA	43	VI

POBLACIÓN	MORFOTIPO	COLONIA	HAPLOTIPO
Decepción	NA	44	VIII
Decepción	NA	45	VII
Decepción	NA	46	II
Decepción	NA	47	VIII
Decepción	NA	48	XVII
Decepción	NA	49	IX
Decepción	NA	50	VII

Tabla 2.6, continuación

Los resultados del AMOVA mostraron que una parte significativa de la variabilidad total puede ser asignada al componente "entre sitios de muestreo", sin importar la estructura evaluada (Tabla 2.7). Sin embargo, cuando los sitios de muestreo se agruparon conforme al morfotipo presente, las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas (Tabla 2.7). Los valores Φ_{ST} de a pares se presentan en la Tabla 2.8; se encontró una correlación significativa entre la diferenciación genética y la distancia geográfica entre sitios de muestreo cuando no se consideraron a los morfotipos ($r= 0,813$; $p= 0,041$; Figura 2.8-a). Caleta Potter fue la muestra más diferenciada. Decepción mostró una diferenciación genética significativa con Low45, pero no con Low46, mientras que no hubo diferenciación entre los sitios de muestreo en la Isla Low (Tabla 2.8-a). Cuando los morfotipos fueron tenidos en cuenta, se observó que las muestras de VA no mostraron diferenciación genética y el morfotipo NA de Low46 se diferenció menos de las muestras VA de Low46, que de las muestras NA de la estación Low45 (Tabla 2.8-b). De hecho, la separación de las estaciones de muestreo por morfotipo arrojó una correlación no significativa entre Φ_{ST} y la distancia geográfica ($r= 0,193$; $p= 0,245$; Figura 2.8-b), que se tornó significativa cuando se eliminaron las muestras NA de Low45 del análisis ($r= 0,906$; $p= 0,041$; Figura 2.8-c). Esto se debió a que los haplotipos VII y VIII fueron encontrados en individuos NA y VA de Low46, mientras que en Low45, sólo se encontraron en los

individuos VA, probablemente debido al bajo número de individuos NA que pudieron ser secuenciados satisfactoriamente en esa estación de muestreo (sólo cuatro).

Tabla 2.7. Sitios de muestreo, fuente de variación, porcentaje de variación, estadístico F y probabilidad estimados a partir del gen mitocondrial COI en *Synoicum adareanum*

ESTRUCTURA EVALUADA	FUENTE DE VARIACIÓN	PORCENTAJE DE VARIACIÓN	ESTADÍSTICO F	PROBABILIDAD
Sitios de muestreo (sin considerar el morfotipo)	Entre sitios de muestreo	28,87	$F_{ST}=0,289$	< 0,01
	Dentro de los sitios de muestreo	71,13		
Sitios de muestreo y morfotipo	Entre poblaciones	43,18	$F_{ST}=0,432$	< 0,01
	Dentro de las poblaciones	56,82		
Dos grupos: Sitios NA vs sitios VA	Entre grupos	16,52	$F_{CT}=0,165$	0,133
	Entre sitios de muestreo dentro de grupos	30,68	$F_{SC}=0,367$	< 0,01
	Dentro de los sitios de muestreo	52,80	$F_{ST}=0,472$	< 0,01

Los haplotipos VII y VIII, se encontraron en individuos de ambos morfotipos en Low46, y sólo en individuos VA en Low45. En los dos sitios de muestreo las distancias genéticas de Tamura-Nei entre los haplotipos NA y los haplotipos VII y VIII fueron las mayores (entre 3,076 y 6,161 en Low45 y entre 3,039 y 5.135 en Low46; Tabla 2.9). Las distancias genéticas entre pares de haplotipos exclusivos NA, y aquellas entre los haplotipos NA y los haplotipos exclusivos VA (Hap X y Hap XI), presentaron valores intermedios

(entre 2,031 y 4,127; Tabla 2.9). Las distancias menores se encontraron entre los haplotipos VII y VIII, y entre éstos y los haplotipos VA (1,008 – 2,016; Tabla 2.9).

Tabla 2.8. Valores Φ_{ST} (a) entre sitios de muestreo de *Synoicum adareanum*, y (b) entre sitios de muestreo considerando los morfotipos. NA: morfotipo naranja-amarillento; VA: morfotipo verde-amarillento

a)

	Caleta Potter	Decepción	Low45	Low46
Caleta Potter	-			
Decepción	0,358**	-		
Low45	0,659***	0,119*	-	
Low46	0,409***	-0,042	0,046	-

* P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

b)

	Caleta Potter (NA)	Decepción (NA)	Low45 (NA)	Low46 (NA)	Low45 (VA)	Low46 (VA)
Caleta Potter (NA)	-					
Decepción (NA)	0,334***	-				
Low45 (NA)	0,226	0,281*	-			
Low46 (NA)	0,513***	0,023	0,550**	-		
Low45 (VA)	0,673***	0,146	0,779**	0,008	-	
Low46 (VA)	0,673***	0,146	0,779***	0,008	-0,111	-

* P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Tabla 2.9. Distancias genéticas Tamura-Nei entre haplotipos (Hap) de Low46 y Low45. Los haplotipos en negrita indican los haplotipos encontrados exclusivamente en los individuos NA, y los haplotipos en cursiva indican aquellos encontrados en el morfotipo VA. Los haplotipos subrayados fueron compartidos entre ambas poblaciones, y encontrados en individuos de ambos morfotipos en Low46, y sólo en los individuos VA en Low45

Low46	<u>Hap VIII</u>	<u>Hap VII</u>	<i>Hap X</i>	Hap XVI	Hap III
<u>Hap VIII</u>	-				
<u>Hap VII</u>	1,008	-			
<i>Hap X</i>	1,008	2,016	-		
Hap XVI	3,039	4,079	2,031	-	
Hap III	5,135	4,079	4,127	2,031	-

Low45	Hap I	Hap IV	Hap V	<u>Hap VII</u>	<u>Hap VIII</u>	<i>Hap XI</i>
Hap I	-					
Hap IV	4,079	-				
Hap V	3,039	3,041	-			
<u>Hap VII</u>	3,076	5,105	4,065	-		
<u>Hap VIII</u>	4,084	6,161	5,105	1,008	-	
<i>Hap XI</i>	2,034	4,079	3,039	1,008	2,016	-

Los análisis filogenéticos (Fig. 2.9) ubicaron al haplotipo VII en la posición basal (Bootstrap= 100 % en MP y NJ, y PP= 1 en el análisis Bayesiano). Este haplotipo se distribuyó ampliamente en la mayoría de las estaciones de muestreo (Low45, Low46 y Decepción), y en ambos morfotipos. La mayoría de los nodos restantes mostraron un soporte bajo en los tres análisis. La red de haplotipos (Fig. 2.10) mostró que los haplotipos VII y VIII estuvieron estrechamente relacionados y separados el uno del otro por una sola sustitución sinónima. Los otros dos haplotipos compartidos entre sitios de muestreo estuvieron presentes en dos muestras NA (Hap I en Low45 y Caleta Potter, y Hap II en Decepción y Caleta Potter) y estuvieron muy alejados entre sí y con los haplotipos VII y VIII. Las relaciones entre los haplotipos exclusivos de Low45, Low46 y Decepción no presentaron una relación con la ubicación geográfica, mientras que los haplotipos exclusivos de Caleta Potter se agruparon juntos y se ubicaron en el borde de la red.

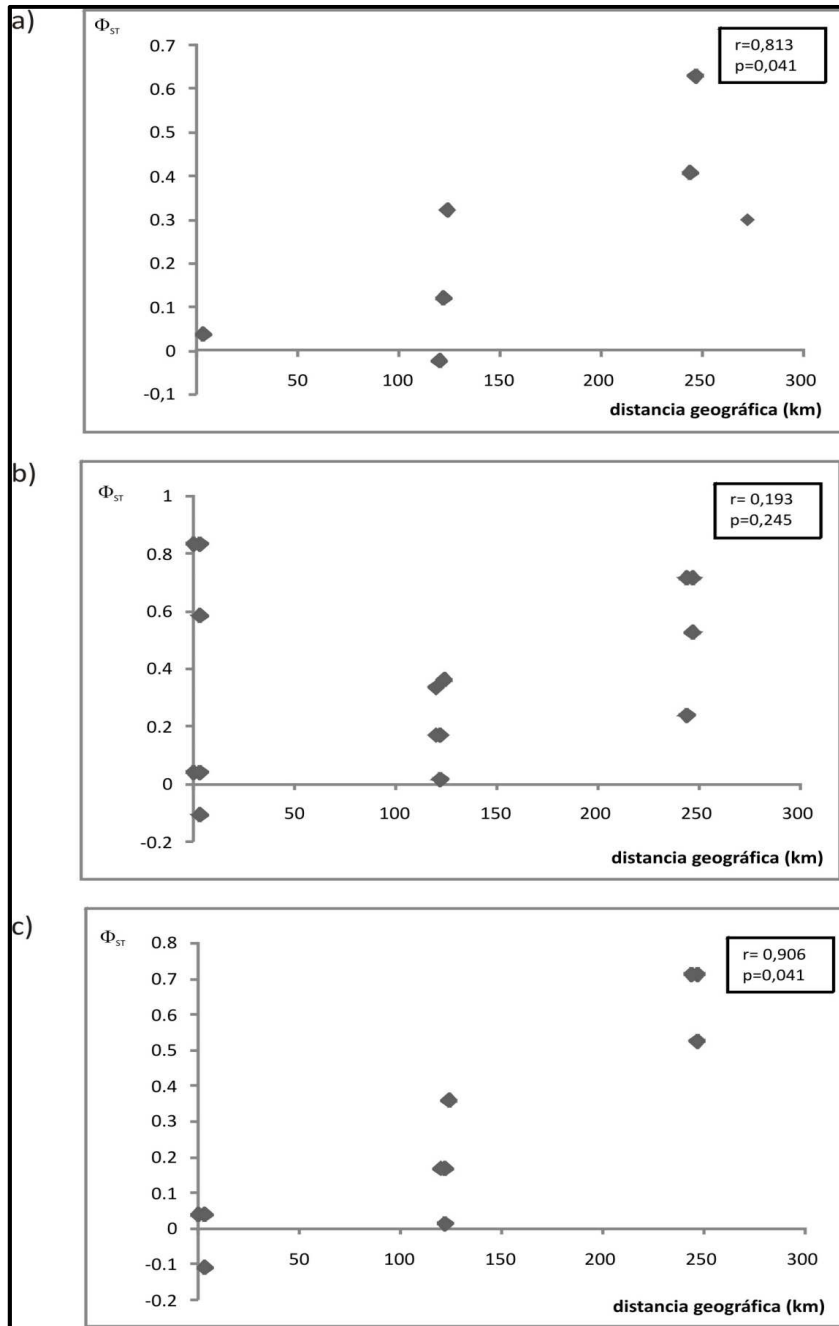


Figura 2.8. Correlación entre la divergencia genética (Φ_{ST}) y la distancia geográfica entre las poblaciones de *S. adareanum* estimada mediante la prueba de Mantel: a) sin considerar el morfotipo, b) considerando el morfotipo, c) considerando el morfotipo, excluyendo la población de Low45 NA

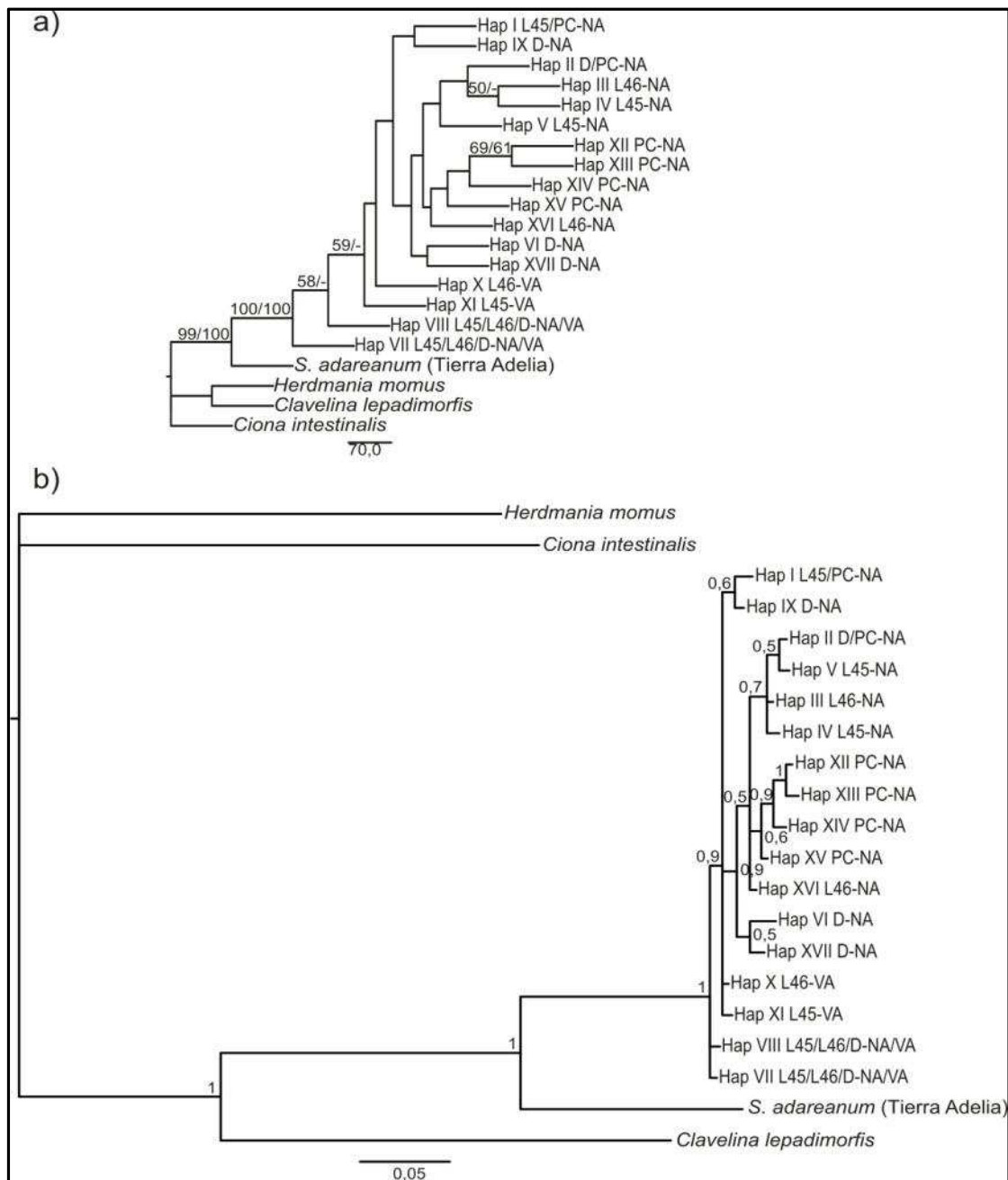


Figura 2.9. Relaciones filogenéticas entre haplotipos de COI en *S. adareanum*. a) Árbol de “Neighbor-joining” resultante de las distancias genéticas Tamura-Nei. La topología del árbol de Máxima Parsimonia fue idéntica. Los valores de bootstrap obtenidos mediante 1000 repeticiones para ambos métodos se muestran por encima de las ramas: antes de la barra se encuentran los valores de bootstrap para NJ, y después de la barra para MP; b) Árbol Bayesiano, los números por encima de las ramas indican las probabilidades posteriores de las mismas. Los haplotipos están representados con números romanos. NA: morfotipo naranja-amarillento, VA: morfotipo verde-amarillento, D: Decepción, PC: Caleta Potter, L45: Low45, L46: Low46. Las especies *Clavelina lepadimorfis*, *Herdmania momus* y *Ciona intestinalis* fueron utilizadas como extragrupos

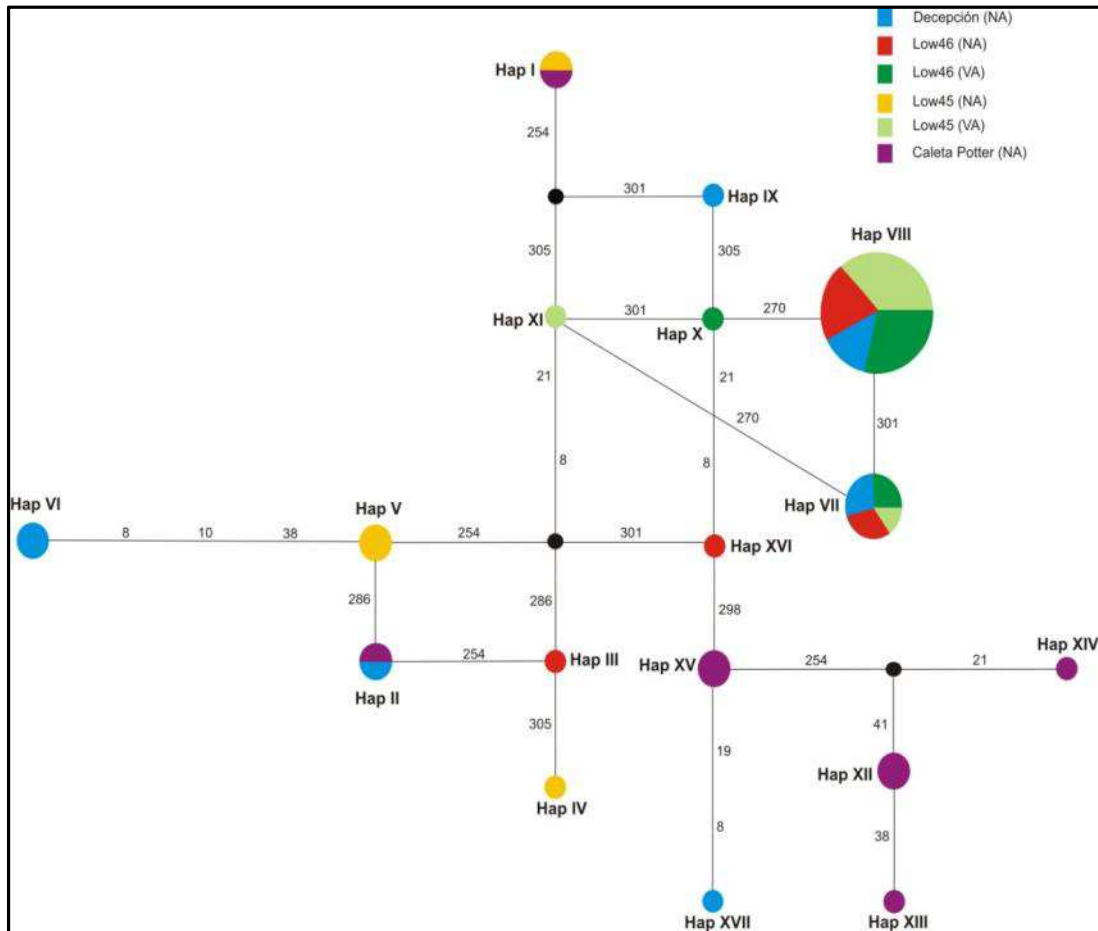


Figura 2.10. Red de haplotipos del gen COI obtenida mediante el programa Network. Los círculos representan a los haplotipos y la superficie del círculo es proporcional a su frecuencia. Cada haplotipo está representado por la abreviatura Hap y un número romano. Los círculos negros representan a los haplotipos intermedios inferidos por el programa. Los números por encima de las ramas indican las posiciones de los sitios variables

2.3.4. Gen COI: Análisis demográfico

Según Fu (1997), F_s debe considerarse como significativo si $P < 0,02$. Para todo el conjunto de datos ($F_s = -6,029$, $p = 0,012$) y para los haplotipos NA ($F_s = -5,587$, $p = 0,004$), las estimaciones de F_s fueron significativas y negativas, mientras que F_s arrojó valores que no fueron significativos cuando se calculó para los haplotipos del morfotipo NA más los haplotipos compartidos entre morfos ($F_s = -4,423$, $p = 0,035$), o para los haplotipos VA más los haplotipos compartidos entre morfotipos ($F_s = -1,450$, $p = 0,050$). Un valor negativo y significativo de F_s puede resultar de diferentes procesos: un locus bajo selección

direccional, un “autostop” (“hitchhiking”) genético o de un exceso de haplotipos de baja frecuencia, como sería de esperar de una expansión poblacional reciente. El análisis de la distribución de las diferencias de a pares obtenido mostró valores no significativos del índice de irregularidad y de SSD (Fig. 2.11), apoyando la hipótesis de expansión demográfica. Sin embargo, vale la pena señalar que la distribución observada de las diferencias de a pares para todos los haplotipos, aunque no significativamente diferente de la que se esperaría bajo una expansión poblacional, mostró una forma bimodal, indicando la presencia de dos (o más) grupos de linajes divergentes. El parámetro τ mostró valores diferentes, siendo 5,824 para todos los haplotipos, 5,103 para los haplotipos NA más los haplotipos compartidos entre ambos morfotipos, 4,281 para los haplotipos NA, y 0,492 para los haplotipos VA más los haplotipos compartidos entre morfos. Estos resultados indicarían que el tiempo desde el último evento de expansión demográfica fue mayor para los haplotipos NA que para los haplotipos VA, y que la expansión poblacional del morfotipo NA podría ser más antigua. Ésto último, también estuvo soportado ya que el valor de t fue de $t = (5,103 / [[2 \times (4,95 \times 10^{-9}) \times 304] \times 2]) = 847787,081$ años en los análisis de las distribuciones de las diferencias de a pares entre individuos, donde se incluyeron a los haplotipos propios del morfo NA, y a los compartidos entre el morfo NA y el morfo VA, (para nuestra secuencia de 304 pb), mientras que para el análisis donde se tuvo en cuenta únicamente a los haplotipos exclusivos del morfo NA, el valor de t fue de $t = (4,281 / [[2 \times (4,95 \times 10^{-9}) \times 304] \times 2]) = 711224,083$ años. Finalmente, en el análisis donde se tuvieron en cuenta a los haplotipos propios del morfo VA y a los compartidos entre ambos morfos, el valor de t fue de $t = (0,492 / [[2 \times (4,95 \times 10^{-9}) \times 304] \times 2]) = 81738,437$ años.

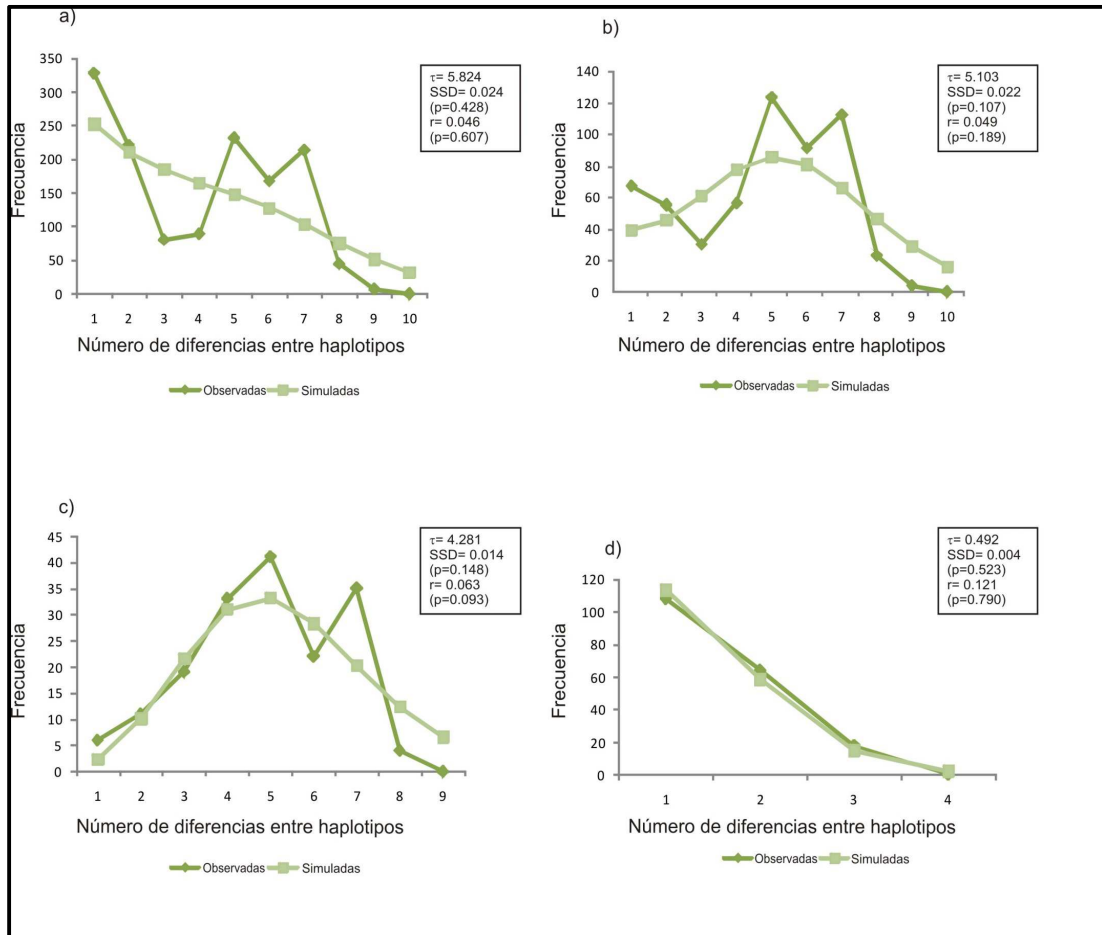


Figura 2.11. Patrones predichos y observados de la distribución de las diferencias de a pares para: a) todos los haplotipos, b) haplotipos NA y haplotipos compartidos entre los dos morfotipos, c) haplotipos NA, d) haplotipos VA y haplotipos compartidos entre ambos morfotipos. τ : escala de tiempo mutacional, SSD: suma de las diferencias al cuadrado, r : índice de irregularidad. El valor P de SSD y de r , se indican entre paréntesis

2.3.5. Gen Citb: Análisis genéticos poblacionales

Empleando el programa DNAsp se identificaron 3 haplotipos diferentes con 103 sitios polimórficos, de los cuales 3 sitios correspondieron a un gap en los haplotipos II y III, con respecto al haplotipo I. La frecuencia de cada haplotipo encontrado en cada estación de muestreo, junto con los valores de diversidad nucleotídica (π), diversidad haplotípica (Hd), y número de sitios polimórficos (S) en cada población se presentan en la Tabla 2.10. El valor promedio de la diversidad nucleotídica total en las 6 poblaciones fue de 0,1. La diversidad haplotípica promedio encontrada dentro de las 6 poblaciones fue de $0,671 \pm$

0,013 (media \pm DE), y el número medio de diferencias nucleotídicas fue 49,917. Low45 y Low46 fueron las poblaciones que presentaron los valores más altos de diversidad nucleotídica, como así también de diversidad de haplotipos. El elevado número de sitios polimórficos encontrados en 4 de las poblaciones estudiadas (Decepción $S= 83$, Low46 $S= 83$, Low45 $S= 83$, y Caleta Potter $S= 62$), junto con los valores relativamente bajos de diversidad haplotípica hallados en cada población, se deben a que los únicos 3 haplotipos divergen entre sí por muchas mutaciones.

De los 3 haplotipos encontrados, 2 (Hap II y Hap III) fueron exclusivos del morfo NA, y el restante fue compartido entre los 2 morfotipos. Se encontraron 62 sitios polimórficos en los haplotipos exclusivos de NA. En las localidades de Low45, Low46 y Decepción, se encontraron el Hap I (compartido entre morfos) y el Hap III (exclusivo del morfo NA), los cuales presentaron 83 sitios polimórficos. En la localidad de Caleta Potter se encontraron los haplotipos II y III, con 62 sitios polimórficos.

Tabla 2.10. Sitios de muestreo, número de haplotipos, diversidad nucleotídica (π), diversidad haplotípica (Hd) y número de sitios polimórficos (S) estimados a partir del gen mitocondrial *Citb* en *Synoicum adareanum*. El haplotipo compartido entre los morfotipos NA y VA se encuentra subrayado

SITIOS DE MUESTREO	HAPLOTIPOS				π	Hd	S
	<u>I</u>	II	III	Total			
Decepción	7	0	3	10	0,077	0,467	83
Low46	10	0	10	20	0,087	0,526	83
Low45	10	0	10	20	0,087	0,526	83
Caleta Potter	0	12	1	13	0,019	0,154	62
Palmer	0	4	0	4	0	0	0
Melchior	0	4	0	4	0	0	0
Total				71	0,1	0,671	

Los análisis filogenéticos (Fig. 2.12) ubicaron al haplotipo I en la posición basal (Bootstrap= 99% y 98% en MP y NJ respectivamente y PP= 1 en el análisis Bayesiano). Este haplotipo se distribuyó ampliamente en la mayoría de las estaciones de muestreo (Low45, Low46 y Decepción), y en ambos morfotipos. El nodo que separó a los haplotipos II y III, también presentó niveles de soporte altos (Bootstrap= 99% y 98% en MP y NJ respectivamente y PP= 1 en el análisis Bayesiano). La red de haplotipos (Fig. 2.13) mostró que los 3 haplotipos encontrados estuvieron muy alejados entre sí, y fueron compartidos entre los sitios de muestreo (Hap I entre Low45, Low46 y Decepción, Hap II entre Caleta Potter, Melchior y Palmer, Hap III entre Low45, Low46, Caleta Potter y Decepción). Sólo el Hap I fue compartido entre los dos morfotipos, mientras que el Hap II y el Hap III fueron exclusivos del morfotipo NA. El haplotipo I resultó ser el más frecuente (observado en el 38,03% de los individuos) y compartido entre el morfo VA de Low46, Low45, y el morfo NA de Decepción. El segundo haplotipo más frecuente fue el haplotipo III, exclusivo del morfo NA, y el más ampliamente distribuido ya que estuvo presente en la mayoría de los sitios de muestreo estudiados (ausente en Melchior y Palmer). El haplotipo II presentó una distribución menor (Caleta Potter, Palmer y Melchior) y una menor frecuencia que los otros dos haplotipos.

2.3.6. Gen Citb: Análisis demográfico

Los análisis F_s de Fu, los análisis de distribución de diferencias de a pares entre individuos, y la estimación del tiempo desde el último evento de expansión demográfica no se llevaron a cabo para el gen Citb debido al bajo número de haplotipos encontrados.

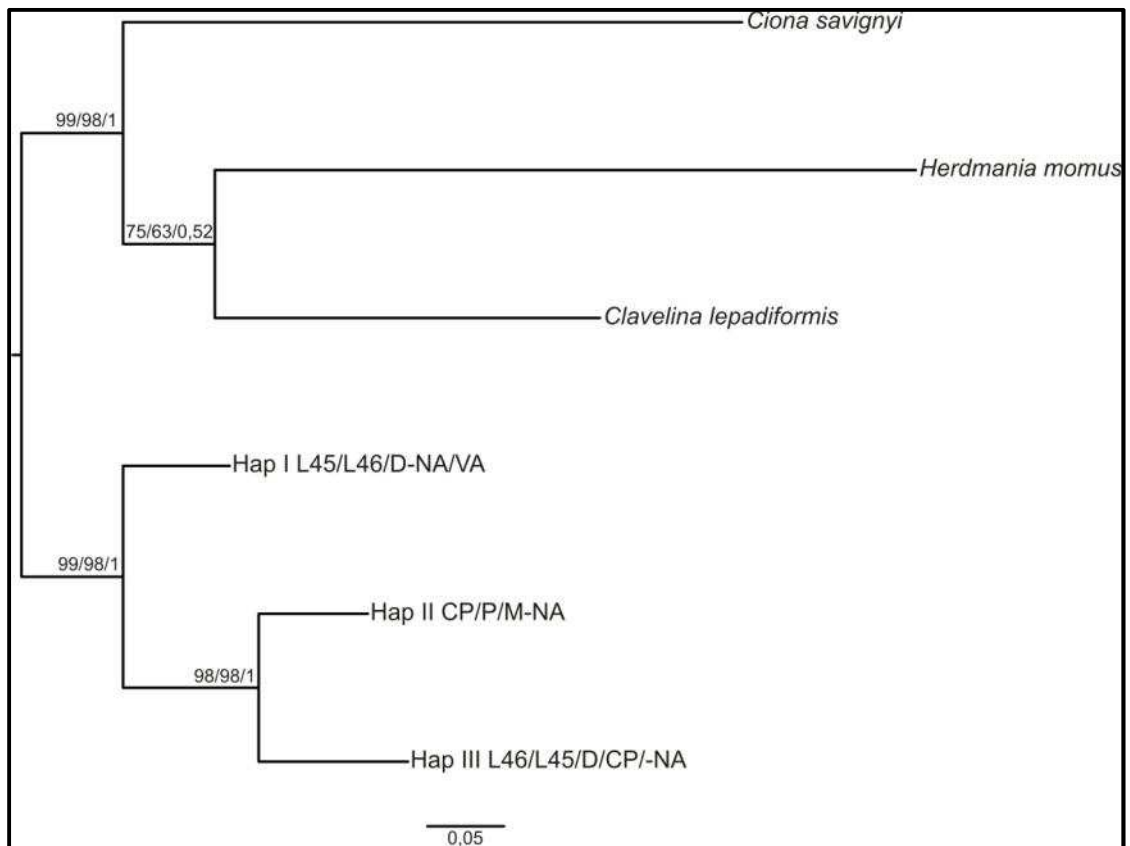


Figura 2.12. Relaciones filogenéticas entre los haplotipos del gen mitocondrial *Citb* de *S. adareanum*. La topología de los árboles de Inferencia Bayesiana, Máxima Parsimonia y de “Neighbor-joining” fueron idénticas, aquí representamos el árbol obtenido a partir de Inferencia Bayesiana. Los valores de bootstrap después de 1000 repeticiones para los métodos de MP, NJ y las probabilidades posteriores resultantes del árbol Bayesiano, se muestran por encima de las ramas en ese orden. Los haplotipos están representados con números romanos. NA: morfotipo naranja-amarillento, VA: morfotipo verde-amarillento, D: Decepción, PC: Caleta Potter, L45: Low45, L46: Low46, P: Palmer, M: Melchior. Las especies *Clavelina lepadiformis*, *Herdmania momus* y *Ciona intestinalis* fueron utilizadas como extragrupos

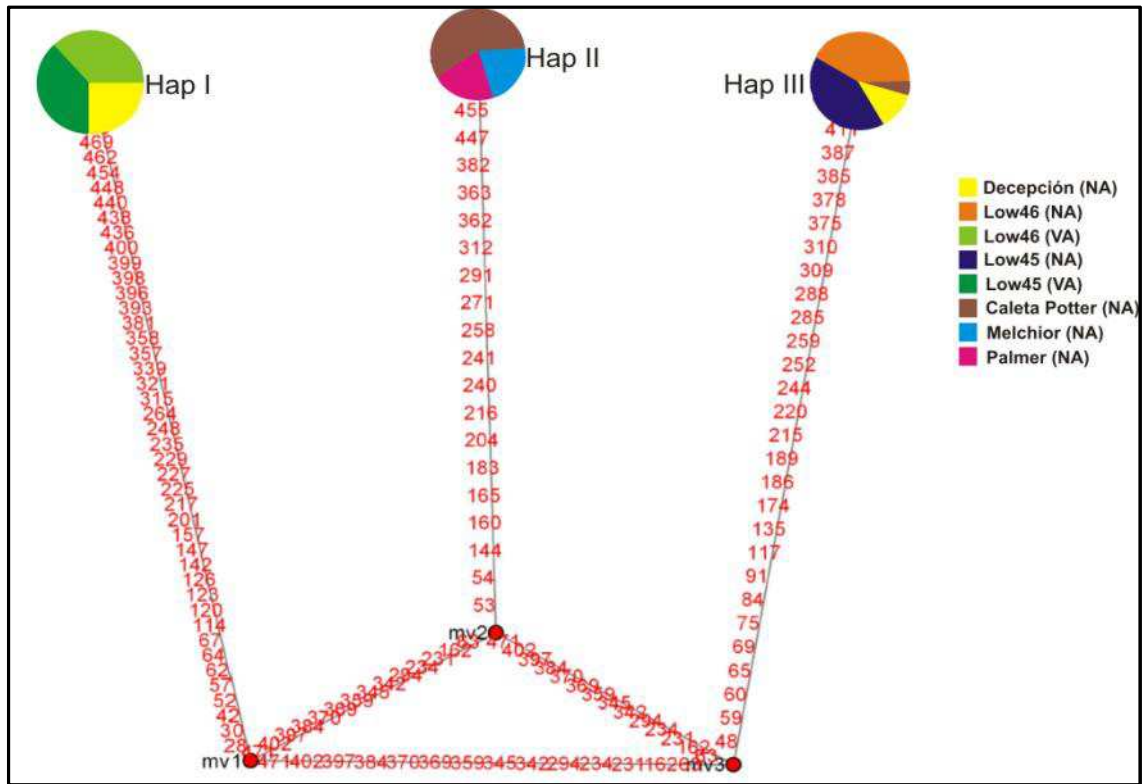


Figura 2.13. Red de haplotipos del gen *Citb* obtenida mediante el programa Network. Los círculos representan a los haplotipos y la superficie del círculo es proporcional a su frecuencia. Cada haplotipo está representado por la abreviatura Hap y un número romano. Los círculos rojos representan a los haplotipos intermedios inferidos por el programa. Los números de color rojo por encima de las ramas indican las posiciones de los sitios variables

2.3.7. Estimación de tiempos de divergencia

A partir de la combinación de los genes mitocondriales COI y *Citb*, se identificaron 24 haplotipos diferentes. El detalle de los haplotipos encontrados en cada colonia individual se presenta en la Tabla 2.11.

Tabla 2.11. Descripción de los sitios de muestreo, morfotipos, y haplotipos encontrados en cada colonia analizada

POBLACIÓN	MORFOTIPO	COLONIA	HAPLOTIPO
Caleta Potter	NA	1	XII
Caleta Potter	NA	2	XII
Caleta Potter	NA	3	XVI

POBLACIÓN	MORFOTIPO	COLONIA	HAPLOTIPO
Caleta Potter	NA	4	XIII
Caleta Potter	NA	5	X
Caleta Potter	NA	6	VIII
Caleta Potter	NA	7	X
Caleta Potter	NA	8	IX
Caleta Potter	NA	9	VIII
Caleta Potter	NA	10	VIII
Caleta Potter	NA	11	XI
Caleta Potter	NA	12	VIII
Caleta Potter	NA	13	VIII
Low45	VA	140	I
Low45	VA	141	I
Low45	VA	142	II
Low45	VA	143	V
Low45	VA	144	I
Low45	VA	145	I
Low45	VA	146	I
Low45	VA	147	I
Low45	VA	148	I
Low45	VA	149	I
Low45	NA	150	XVII
Low45	NA	151	XXII
Low45	NA	152	XIV
Low45	NA	153	XIV
Low45	NA	154	XVII
Low45	NA	155	XIV
Low45	NA	156	XIX
Low45	NA	157	XIV
Low45	NA	158	XIV
Low45	NA	159	XIV
Low46	VA	90	I
Low46	VA	91	I
Low46	VA	92	I
Low46	VA	93	I
Low46	VA	94	I
Low46	VA	95	II
Low46	VA	96	II
Low46	VA	97	IV
Low46	VA	98	I
Low46	VA	99	I
Low46	NA	110	XXIV
Low46	NA	111	XX
Low46	NA	112	XXIII
Low46	NA	113	XXIV
Low46	NA	114	XXIII

POBLACIÓN	MORFOTIPO	COLONIA	HAPLOTIPO
Low46	NA	115	XXIV
Low46	NA	116	XVIII
Low46	NA	117	XXIV
Low46	NA	118	XXIV
Low46	NA	119	XXIV
Decepción	NA	41	XV
Decepción	NA	42	I
Decepción	NA	43	VI
Decepción	NA	44	I
Decepción	NA	45	XXIII
Decepción	NA	46	VII
Decepción	NA	47	I
Decepción	NA	48	XXI
Decepción	NA	49	III
Decepción	NA	50	II
Melchior	NA	A	VIII
Melchior	NA	B	VIII
Melchior	NA	C	VIII
Melchior	NA	D	VIII
Palmer	NA	1	VIII
Palmer	NA	2	VIII
Palmer	NA	3	VIII
Palmer	NA	4	VIII

Tabla 2.11, continuación

2.3.7.1. Análisis Interespecífico

Las estimaciones de divergencia obtenidas con el programa BEAST a partir de los haplotipos combinados de los genes COI y Citb (Fig. 2.14) indican que la divergencia entre el orden Aplousobranchia y el género *Ciona* (Phlebobranchia “sensu” Van Name 1945, Millar 1966, Monniot y Monniot 1972; Aplousobranchia “sensu” Kott 1969, 1990) habría ocurrido hace aproximadamente unos 470 MA. Dentro del orden Aplousobranchia encontramos que la familia Clavelinidae (representada por *C. lepadimorfis*) se habría separado de la familia Polyclinidae hace aproximadamente unos 355 MA. A su vez, dentro de los policlinidos, la separación entre el género *Aplidium* (representado por *A. conicum*) y el género *Synoicum* habría tenido lugar hace aproximadamente unos 218 MA. Finalmente dentro del género *Synoicum*, la divergencia entre las especies *S. castellatum* y *S. adareanum* habría ocurrido hace aproximadamente unos 204 MA, y entre dos haplotipos

de la especie *S. adareanum* (de individuos obtenidos en extremos muy alejados del Continente Antártico), hace unos 126 MA.

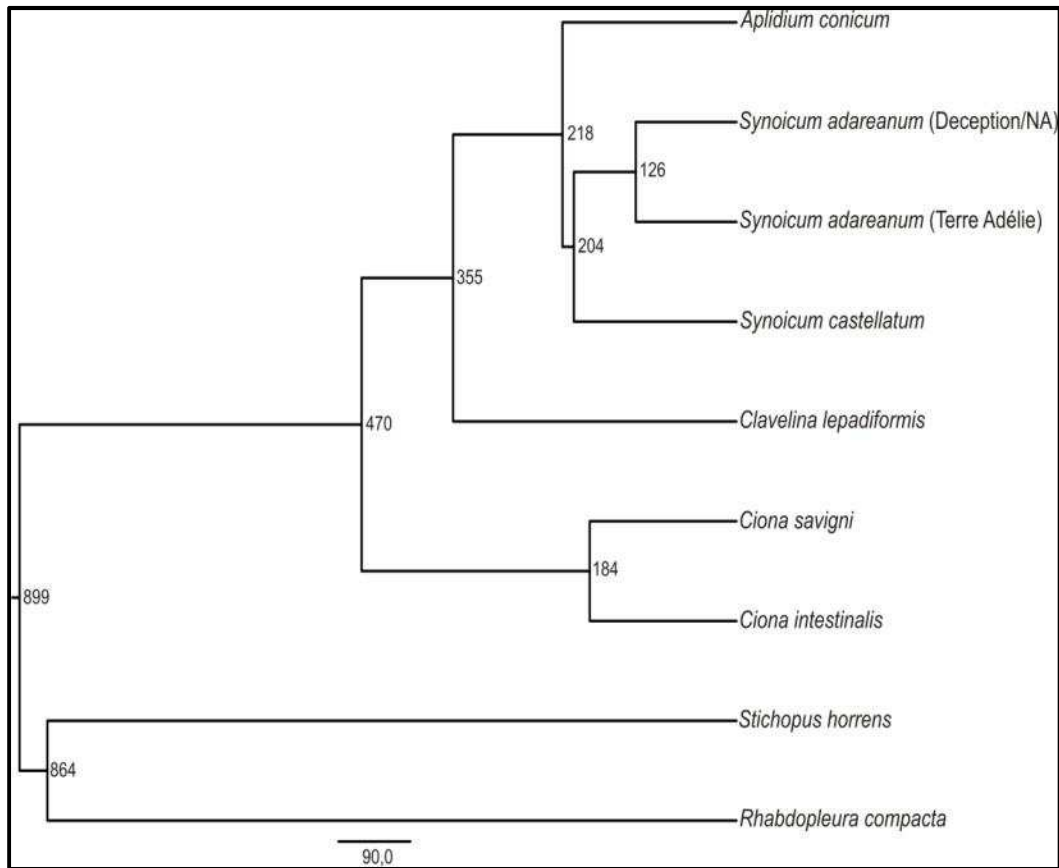


Figura 2.14. Árbol filogenético Bayesiano obtenido a partir de los haplotipos combinados de los genes mitocondriales COI y Cytb. Los números que se encuentran en los nodos representan el tiempo de divergencia entre los organismos (en millones de años), estimados utilizando el programa BEAST (Drummond y col. 2005). NA: morfotipo naranja-amarillento. *Stichopus horrens* y *Rhabdopleura compacta* fueron utilizados como extragrupos

2.3.7.2. Análisis Intraespecífico

El árbol resultante del análisis con los dos genes combinados (Fig. 2.15) mostró que el clado monofilético que contiene a los haplotipos exclusivos del morfo VA, a los haplotipos compartidos entre ambos morfos y a tres haplotipos exclusivos del morfo NA (clado A), se separó hace aproximadamente 22 MA del clado B (constituido por haplotipos

exclusivos del morfo NA). A su vez, los clados B1 y B2 divergieron entre si hace unos 18 MA aproximadamente. Dentro del clado A, los haplotipos compartidos entre ambos morfos, un haplotipo exclusivo del morfo NA y los dos exclusivos del morfo VA, divergieron del grupo constituido por dos haplotipos exclusivos del morfo NA, hace unos 13 MA.

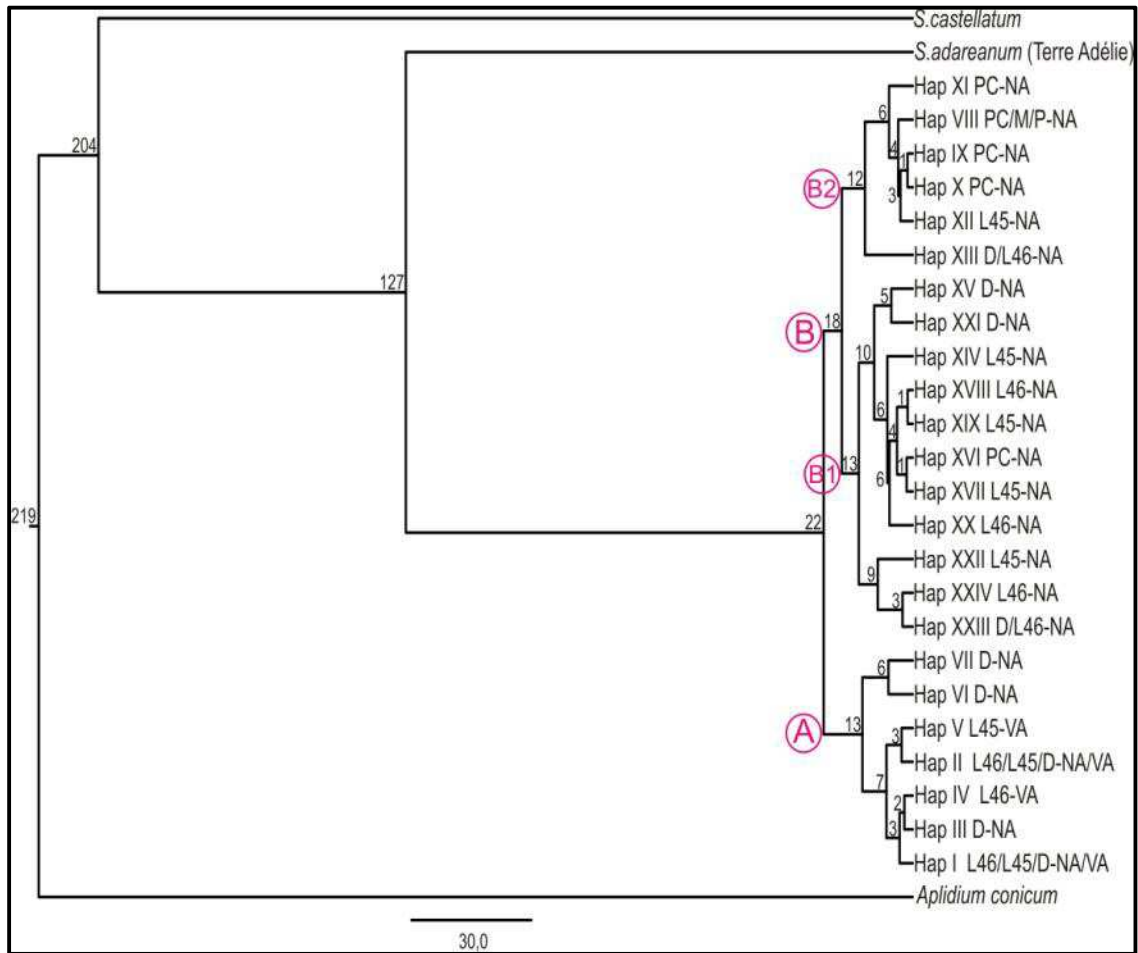


Figura 2.15. Árbol filogenético Bayesiano obtenido a partir de los haplotipos combinados de los genes mitocondriales COI y Citb. Los números que se encuentran en los nodos representan el tiempo de divergencia entre los organismos (millones de años). Las letras dentro de los círculos representan cada clado. Los haplotipos están representados con números romanos. D: Decepción, L45: Low45, L46: Low46, PC: Caleta Potter, M: Melchior, P: Palmer; NA: morfotipo naranja-amarillento, VA: morfotipo verde-amarillento. *Synoicum adareanum*, representa al haplotipo de Tierra Adelia. *Aplidium conicum*, y *Synoicum castellatum* fueron utilizados como extragrupos

2.4. Discusión

2.4.1. Observaciones morfológicas

El análisis morfológico mostró que cada morfotipo podría corresponder a una especie diferente de acuerdo con Monniot y Monniot (1983). Las características taxonómicas que caracterizan a los zooides NA fueron consistentes con aquellas que definen a *Synoicum adarenum*, mientras que aquellas que caracterizan a los zooides VA fueron consistentes con las que definen a *Synoicum ostentor*. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los análisis realizados con los genes mitocondriales, entre las dos formas que viven en simpatría (Tabla 2.8) y por lo tanto, en los párrafos siguientes las colonias continuarán siendo nombradas como morfotipos NA y VA.

2.4.2. Análisis genéticos poblacionales

Este estudio presenta el primer análisis de la estructura genética poblacional que utiliza marcadores de ADN mitocondrial en una especie de ascidia con distribución Antártica y Sub-Antártica. Además, se combinó este análisis con observaciones morfológicas, para tratar de aclarar si los dos morfotipos de *S. adarenum* encontrados en las Islas Shetland del Sur corresponderían a polimorfismos intra-específicos o si bien, se tratarían de especies diferentes.

El análisis genético poblacional se realizó con los fragmentos de dos genes mitocondriales (COI y el Citb), los cuales lograron ser amplificados luego de superar numerosas dificultades técnicas.

Entre las dificultades que encontramos estuvo el hecho de que los primeros cebadores que se utilizaron para amplificar los genes mitocondriales COI y Citb de ascidias amplificaron secuencias que presentaron una alta homología con genes COI y Citb bacterianos, por lo que se tuvieron que diseñar cebadores específicos para amplificar los genes mitocondriales de las ascidias aquí estudiadas.

Por otro lado, en la mayoría de las muestras, el deslizamiento de la replicación durante la PCR sobre un tramo de 11 poli-T (comenzando en la posición 93 del fragmento amplificado del gen COI, una vez alineado), causó una degradación en la calidad de la lectura de la secuencia después de la misma (Fig. 2.16). Una situación similar fue reportada recientemente por Monniot y col. (2011) en un estudio con especímenes de la clase Ascidiacea que fueron capturados durante el CEAMARAC. En dicho trabajo intentaron amplificar un fragmento del gen COI para utilizar como “barcoding”, y al menos dos productos de PCR por muestra debieron ser secuenciados en ambas direcciones antes de obtener secuencias fiables. Monniot y col. (2011) sugirieron que estas dificultades técnicas podrían generar importantes problemas en el uso del gen COI para el “barcoding” de la clase Ascidiacea. Los resultados obtenidos en nuestro estudio apoyan esta sugerencia.



Figura 2.16. Imágenes de la secuencia nucleotídica del gen COI del morfotipo naranja-amarillento de *Synoicum* donde se indica la secuencia poli-T. **A)** Ejemplo de una secuencia con una buena calidad post poli-T, indicada con un rectángulo azul. **B)** Ejemplo de una secuencia en la cual la presencia de la poli-T (rectángulo púrpura) generó una degradación en la calidad de la lectura de la secuencia

Otra de las dificultades encontradas en nuestro trabajo, tanto para el gen COI como para el gen Citb, radicó en la composición de bases fuertemente sesgada hacia las bases T y A (al igual que en las muestras de la clase Ascidiacea reportadas por Monniot y col. 2011). El valor promedio de la composición de bases sobre todas las secuencias se calculó con el programa MEGA versión 5 (Tamura y col. 2011) y fue para COI y Citb respectivamente de T= 43,69%-50,43%, A= 25,83%-24,35%, G= 16,26%-14,89%, C= 14,21%-10,33%. Esto nos explicaría la necesidad de emplear una temperatura de hibridación tan baja (40°C-COI y 43°C-Citb) para obtener PCR exitosas.

Para el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I se obtuvieron 17 haplotipos de los 53 individuos secuenciados, mientras que para el gen mitocondrial Citocromo b se obtuvieron 3 haplotipos de los 71 individuos secuenciados. Los niveles de diversidad haplotípica para el gen COI de las muestras de *S. adareanum* ($Hd= 0,558$ a $0,929$) estuvieron en el rango encontrado en otras especies de ascidias coloniales, por ejemplo *Botryllus schlosseri* ($Hd= 0,153$ a $0,700$; López-Legentil y col. 2006), *Cystodytes dellechiajei* ($Hd= 0,600$ a $0,933$; López-Legentil y Turon 2006), y *Pycnoclavella communis* ($Hd= 0,248$ a $0,903$; Pérez-Portela y Turon 2008). Estos estudios fueron realizados sobre especies del Mar Mediterráneo; estudios genéticos poblacionales referidos a los niveles de variabilidad de poblaciones de especies coloniales de otros Océanos, son lamentablemente escasos. Los niveles de diversidad haplotípica para el gen Citb de las muestras de *S. adareanum* se presentaron en un rango de $0,000$ a $0,526$. Estos valores no pudieron ser comparados con los de otras ascidias, debido a la ausencia de trabajos que utilicen este gen para estudios genéticos poblacionales. En el gen COI, la diversidad nucleotídica de las muestras de *S. adareanum* fue generalmente menor ($\pi= 0,004$ a $0,012$) en comparación con otras especies coloniales (*B. schlosseri*: $\pi= 0,008$ a $0,079$, op. cit.; *C. dellechiajei*: $\pi= 0,006$ a $0,081$, op. cit.; *P. communis*: $\pi= 0,0004$ a $0,0445$, op. cit.; *Pseudodistoma crucigaster*: $\pi= 0,000$ a $0,011$, Tarjuelo y col. 2004). Goodall-Copestake y col. (2012) identificaron dos fuentes de sesgo cuando se comparan medidas de variabilidad entre estudios: el bajo tamaño muestral utilizado y el empleo de posiciones que no son estrictamente homólogas para el cálculo de los índices, debido a la utilización de fragmentos de diferentes longitudes y de diferentes partes del gen COI. En cuanto a la primera cuestión, los autores demostraron, mediante análisis de submuestreos, que muestras con un $N > 5$ fueron suficientes para discriminar

extremos de diversidad altos y bajos del gen COI, mientras que para lograr una mayor precisión en las estimaciones, se necesita que el muestreo sea mayor a 25. Por lo tanto, dado que los tamaños de muestreo en nuestro campo de trabajo se encuentran en un rango de 8 a 20 (Tabla 2.5) deberíamos ser capaces de discriminar si las poblaciones de *S. adareanum* presentaron niveles de variabilidad mayores o menores que los de poblaciones de otras especies ascidias. En cuanto a la segunda cuestión, Goodall-Copestake y col. (2012) recomiendan volver a reunir los datos de la literatura, con el fin de comparar los sitios estrictamente homólogos. Debido a las dificultades técnicas mencionadas anteriormente, en nuestro trabajo se calcularon los niveles de variabilidad en un fragmento del gen COI inusualmente corto. Por lo tanto, se seleccionaron aquellos trabajos que publicaron el conjunto de datos completo, se alinearon las secuencias con las nuestras y se recalcularon los índices Hd y π . Se encontraron sólo dos de estas publicaciones de ascidias, la de Tarjuelo y col. (2004) sobre *Pseudodistoma crucigaster* y la de Pérez-Portela y Turon (2008) sobre *Pycnoclavella communis*. Los resultados del nuevo análisis se muestran en la Tabla 2.12. La Hd permaneció en el rango de la de *S. adareanum*, mientras que π fue menor en *P. crucigaster*, y similar en *P. communis*. Por lo tanto, podemos suponer razonablemente que los niveles de variabilidad en las poblaciones de *S. adareanum* estarían en el rango en el que se encuentran las especies de ascidias coloniales de aguas templadas.

Tabla 2.12. Diversidad nucleotídica (π) y diversidad haplotípica (Hd) en (a) ocho poblaciones de *Pycnoclavella communis* y (b) en siete poblaciones de *Pseudodistoma crucigaster*. Los índices fueron recalculados a partir de los datos publicados en Pérez-Portela y Turon (2008) y Tarjuelo y col. (2004) respectivamente, considerando sólo los sitios homólogos a la secuencia de 304 pb del gen COI utilizada en *S. adareanum*

a)

POBLACIÓN	π	Hd
Carboneras	0,00361 (SD= 0,0011)	0,366 (SD= 0,112)
Aguamarga	0,0024 (SD= 0,0013)	0,248 (SD= 0,131)
Cabo de Palos	0,001 (SD= 0,0006)	0,295 (SD= 0,156)
Pta de la Mona	0,0014 (SD= 0,0012)	0,105 (SD= 0,092)
Cerro Gordo	0,0134 (SD= 0,0043)	0,433 (SD= 0,117)
Blanes	0,0022 (SD= 0,0006)	0,592 (SD= 0,122)
Tossa	0,0030 (SD= 0,0005)	0,717 (SD= 0,071)
Palamós	0,0045 (SD= 0,0006)	0,649 (SD= 0,085)
Mean	0,0464 (SD= 0,0022)	0,868 (SD= 0,014)

b)

POBLACIÓN Y MORFOTIPO	π	Hd
Tossa Mar-Naranja	0	0
Cala Ratjada-Naranja	0,0031 (SD= 0,0011)	0,476 (SD= 0,171)
Cap Catalunya-Naranja	0	0
Blanes-Amarillo	0,0185 (SD= 0,0028)	0,636 (SD= 0,128)
Cadaqués-Amarillo	0	0
Illa Imperial-Amarillo	0	0
Cap Llebeig-Gris	0,0026 (SD= 0,0016)	0,400 (SD= 0,237)

Rogers (2007) y Allcock y Strugnell (2012) realizaron una revisión de estudios sobre la estructura genética de organismos del Océano Antártico. Ellos identificaron dos patrones generales: aquellos organismos que podrían haber sobrevivido a las glaciaciones en refugios en la plataforma continental o retirándose hacia las islas sub-Antárticas, presentarían una baja variabilidad genética debido a los cuellos de botella y a efectos

fundadores, mientras que las especies euribáticas que se refugiaron en el talud continental podrían presentar niveles mayores de variabilidad, dado que habrían sido capaces de mantener mayores tamaños poblacionales. Estos autores sostienen que gran parte de la fauna del Océano Austral podría haber sobrevivido “in situ” las glaciaciones del Cuaternario. Los elevados niveles de variabilidad obtenidos de los análisis con el gen COI, apuntan a que *S. adareanum* podría haber persistido en el talud continental.

De acuerdo a Goodall-Copestake y col. (2012) otra fuente de sesgo en el cálculo Hd y π es la inclusión de especies crípticas en muestras de una sola especie, lo que aumentaría las estimaciones. En nuestro conjunto de datos, esto podría ocurrir en las estimaciones de las muestras de Low45 y Low46 que incluyeron a los dos morfotipos. Los dos genes estudiados presentaron resultados diferentes. Para el gen COI, estas localidades presentaron los valores de S y π más bajos, mientras que para Citb, presentaron los valores más elevados.

Los altos valores de diversidad genética encontrados en estas muestras podría deberse al bajo número de haplotipos encontrados, o bien a otra fuente de sesgo. El gen Citb ha sido muy utilizado en estudios con animales para evaluar las relaciones existentes entre poblaciones, y entre diferentes niveles taxonómicos (Meyer 1993; Farias y col. 2001; Gray y col. 2006; Tang y col. 2006; Carnaval y Bates 2007; Betancur-R y Armbruster 2009; Larmuseau y col. 2009; Lee y Boulding 2009; Trucchi y Sbordoni 2009; Qi y Qian 2011). A su vez, el Citb contiene posiciones de codones que evolucionan rápidamente y otras que evolucionan lentamente, como así también regiones más variables y regiones más conservadas. Por lo tanto este gen ha sido utilizado para tratar de responder a diversas preguntas sistemáticas, que van desde filogenias profundas (Neyer y Wilson 1990; Irwin y col. 1991; Normark y col. 1991; Cantatore y col. 1994; Lydeard y Roe 1997; Kumazawa y Nishida 2000) a niveles poblacionales y de divergencia recientes (Sturmbauer y Meyer 1992; Rocha-Olivares y col. 1999; Kirchman y col. 2001; Lovejoy y de Araújo 2000). Sin embargo, algunos autores en estudios con mamíferos (Honeycutt y col. 1995) y con peces (Farias y col. 2001), han citado inconvenientes al emplear este gen como marcador filogenético. Por ejemplo, se han encontrado sesgos en la composición de bases, variación de la tasa entre linajes, saturación en la tercera posición del codón, y una variación limitada en la primera y segunda posición del codón, resultando en información filogenética limitada

para preguntas evolutivas profundas, o pocos sitios informativos para la tercer posición del codón en estudios a nivel de población (Meyer 1994). Por lo que la utilidad de este gen como marcador filogenético ha sido puesta en duda por algunos autores (Hillis y Huelsenbeck 1992; Meyer 1994; Honeycutt y col. 1995).

En el análisis con el gen COI, los valores de S y π de Low45 y Low46 fueron los más bajos. En aguas poco profundas de la Antártida, el hielo actúa como un factor perturbador regional de alto impacto. A lo largo de la Península Antártica y las Islas Shetland del Sur, los “icebergs” pueden impactar en el fondo hasta 150-200 m de profundidad y son un factor importante en la conformación del sistema bentónico de la plataforma Antártica (Gutt 2000; Dowdeswell y Bamber 2007). En la ascidia colonial Antártica *Aplidium falklandicum*, Demarchi y col. (2010) encontraron que las poblaciones muestreadas a una profundidad mayor de 200 m mostraron una variabilidad significativamente mayor que aquellas muestreadas a una profundidad menor de 200 m, que coincidió con el límite de la perturbación por el efecto abrasivo de los témpanos. Los autores propusieron que el hielo afectaría la diversidad genética mediante la eliminación de una cantidad considerable de biomasa con la consiguiente pérdida de individuos y de alelos. Las cuatro muestras geográficas de *S. adareanum* analizadas se obtuvieron a profundidades de entre 20 m y 215 m, y podrían verse afectadas por la acción del hielo causando fluctuaciones en el tamaño efectivo de la población. Pero además, las estaciones de Low45 y Low46 se encuentran mucho más expuestas a la CCA y a la corriente discontinua dirigida por el viento hacia el este, que las otras estaciones. Esto podría tener un efecto doble sobre las poblaciones bentónicas: por una parte, las corrientes mencionadas podrían separar a las larvas de las poblaciones parentales más eficientemente en las estaciones de Low, y por otro lado, podrían conducir los “icebergs” y aumentar su frecuencia en comparación con las otras estaciones muestreadas que están más protegidas. Entonces, estos factores de perturbación podrían contribuir a las fluctuaciones en el tamaño efectivo de la población y a la disminución de los niveles de variabilidad genética hallados en las estaciones de Low45 y Low46. Por otro lado, Caleta Potter se encuentra en una zona más protegida, donde los efectos de estas perturbaciones serían probablemente menores, lo que explicaría en el análisis con el gen COI, la mayor variabilidad genética encontrada en esta estación.

En este trabajo, los niveles de diferenciación genética entre las muestras geográficas y los morfotipos y su correlación con la distancia geográfica (patrón de aislamiento por distancia) indican que la deriva y el flujo génico están en equilibrio. Para que este tipo de patrón se establezca es necesaria la existencia de flujo génico entre poblaciones durante un número elevado de generaciones. Los patrones de la estructura genética y la extensión del flujo de genes en organismos bentónicos podrían ser el resultado de la interacción entre el desarrollo larval, el potencial de dispersión y un reclutamiento local, junto con características oceanográficas, tales como la circulación de las masas de agua, (Palumbi 1994; Grosberg y Cunningham 2001; Wares y col. 2001). Teniendo en cuenta que el estadio larval es el responsable de la dispersión del organismo y que las larvas de ascidias coloniales son de corta duración (de unos minutos a horas; Svane y Young 1989), sería de esperar una fuerte estructuración genética en nuestra especie (Thatje 2012). Sin embargo, aquí encontramos haplotipos compartidos y un cierto grado de conectividad entre las localidades del área de estudio. Es posible que el potencial de dispersión de las larvas de esta especie se vea favorecido por diferentes corrientes marinas que ocurren sobre la Península Antártica Occidental (Fig. 2.17).

El transporte pasivo por las corrientes oceánicas ha sido propuesto como un mecanismo para explicar el flujo de genes en especies Antárticas con bajo potencial de dispersión. Zane y Patarnello (2000) encontraron que poblaciones de *Euphausia superba* (krill) distribuidas ampliamente alrededor del Continente Antártico presentaron una débil diferenciación genética. Ellos consideraron que las fuertes corrientes circum-Antárticas del Océano Austral proporcionan una mezcla intensa de aguas que podrían impedir una divergencia poblacional de *E. superba*. Matschiner y col. (2009) encontraron que en diferentes localidades alrededor del Mar de Escocia, la CCA impediría la diferenciación genética del nototénido bentónico *Gobionotothen gibberifrons* facilitando el flujo génico de sus larvas pelágicas. Una situación similar encontraron Strugnell y col. (2012) en el octópodo bentónico *Pareledone turqueti* que tiene una distribución circumpolar y también está presente alrededor de las islas de la región en profundidades que van desde menos de 100 m hasta 1000 m. Ellos encontraron flujo génico entre poblaciones de *P. turqueti* presentes en las Islas Shetland del Sur y en las Islas Georgias del Sur/Rocas Cormorán. Consideraron que esto podría deberse a las características oceanográficas, ya que existen

evidencias de que la CCA conecta la Península Antártica con las Islas Georgias del Sur/Rocas Cormorán (Matschiner y col. 2009).

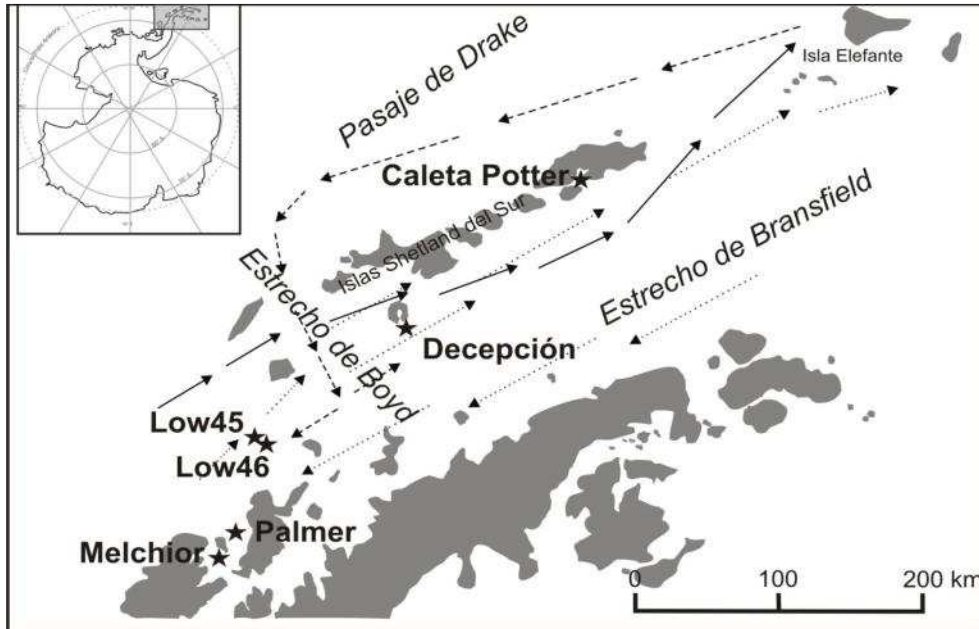


Figura 2.17. Mapa del área de estudio que muestra la ubicación de los sitios de muestreo (estrellas). Las flechas indican la dirección de las corrientes principales de agua, dibujadas de acuerdo con la descripción de Savidge y Amft (2009). Línea recta: Corriente jet de las Islas Shetland del Sur; línea discontinua: Corriente Polar Superficial; línea de puntos: Circulación ciclónica del Estrecho de Bransfield

Las redes obtenidas mediante el algoritmo de “median joining” mostraron que los haplotipos compartidos entre morfotipos (Hap VII y Hap VIII en el gen COI, y Hap I en el gen Citb) fueron los más frecuentes y estuvieron ampliamente distribuidos. En el caso del gen COI, los haplotipos VII y VIII fueron compartidos entre los miembros del morfo VA de Low45 y Low46 y los integrantes del morfo NA de Low46 y Decepción, mientras que en el gen Citb, el haplotipo I, fue compartido entre los miembros del morfo VA de Low45 y Low46 y los integrantes del morfo NA de Decepción. En la red de haplotipos resultante del gen Citb, los dos haplotipos exclusivos del morfo NA estuvieron presentes en más de dos sitios de muestreo, a diferencia de la red de haplotipos del gen COI, donde la mayoría de los haplotipos exclusivos de NA y VA estuvieron presentes en un solo sitio de muestreo.

El tipo de red encontrada para el gen COI ha sido llamada por Allcock y Strugnell (2012) “localista”. Según estos autores, esta red se encuentra en organismos Antárticos que durante las glaciaciones del Pleistoceno persistieron en grandes áreas de refugios y, por lo tanto, mantuvieron su diversidad genética ya que no sufrieron grandes cuellos de botella. Si, luego de las glaciaciones, se produjo una expansión poblacional a partir de múltiples refugios antes de la adquisición de aislamiento reproductivo, podría haber ocurrido contacto secundario. Hemery y col. (2012) estudiaron varios filogrupos del crinoideo *Promachocrinus kerguelensis* de distribución Antártica. Estos filogrupos presentaron una distribución geográfica diversa, y consideraron que esto podría ser el resultado de poblaciones aisladas en diferentes refugios durante eventos glaciales pasados, seguidas de dispersión, colonización y contacto secundario durante los períodos interglaciales. En nuestro estudio, el contacto secundario habría dado la oportunidad para cruzamientos entre las dos formas incipientes, dando origen a la presencia de haplotipos compartidos. Las pruebas de distribución de diferencias de a pares y del estadístico F_s revelaron indicios de una posible expansión poblacional reciente en *S. adareanum*. Los valores negativos y significativos de la prueba F_s , junto con los valores no significativos del índice de irregularidad y de SSD y la forma de la red de haplotipos, apoyan la idea de una expansión demográfica. La distribución observada de las diferencias de a pares mostró un patrón bimodal, que se observa generalmente cuando dos (o más) grupos de haplotipos divergentes son incluidos en el análisis, ya sea porque hay una estructura genética fuerte, ha ocurrido un contacto secundario entre formas divergentes, o una expansión espacial seguida de bajos niveles de flujo génico (Ray y col. 2003; Excoffier y col. 2009). Aunque el número de muestras analizadas en este trabajo no nos permite discriminar entre estas opciones, cabe destacar que el patrón observado podría resultar de una combinación de los tres factores. Por un lado, el análisis de AMOVA presentó valores significativos, indicando una estructuración genética de las poblaciones. Por otro lado, las distancias genéticas de Tamura-Nei mostraron que la divergencia de secuencia entre los haplotipos NA y entre ellos y los haplotipos compartidos o haplotipos VA fue mayor que entre los haplotipos VA, lo que indicaría que los haplotipos NA serían más antiguos que los de VA, ya que requieren más tiempo para acumular diferencias. Además, los valores de t (tiempo, en años, desde el último evento de expansión demográfica) obtenidos de las pruebas de distribución de

diferencias de a pares, apoyan la idea de que la expansión del morfotipo NA podría ser más antigua que la del morfotipo VA.

A pesar de que los árboles filogenéticos obtenidos en el análisis con el gen COI no lograron resolver la mayor parte de las relaciones entre los haplotipos, el haplotipo de *S. adareanum* de Tierra Adelia se encontró en una posición basal, seguido del Hap VII y del Hap VIII, todos ellos con un soporte alto. Estos resultados sugieren que los haplotipos compartidos entre morfos (Hap VII y Hap VIII) son los más cercanos al ancestro común. Esto último también estaría soportado por los árboles filogenéticos obtenidos en el análisis con el gen Citb, donde el haplotipo compartido entre morfos (Hap I), se encontró en la posición basal.

Los resultados moleculares obtenidos sugieren un contacto secundario entre formas diferenciadas en alopatría durante un corto tiempo, pero que todavía pertenecen a la misma especie biológica. Además, si consideramos que el haplotipo de Tierra Adelia es basal, y que los haplotipos VII y VIII son los más cercanos filogenéticamente a él y son los más abundantes y ampliamente distribuidos, no deberíamos descartar la posibilidad de la existencia de una retención de polimorfismos ancestrales (asignación incompleta de linajes) entre los haplotipos NA y VA. En diversos estudios llevados a cabo tanto en organismos terrestres como marinos se han reportado retenciones de polimorfismos ancestrales, al encontrar polimorfismos compartidos entre especies diferentes (Moran y Kornfield 1993; Donnelly y col. 2004; Near y col. 2006).

2.4.3. Análisis demográfico

La sucesión de glaciaciones durante millones de años afectó a todo el planeta. El Océano Austral presentó grandes extensiones de capas de hielo asentadas en la plataforma continental Antártica, seguido de retrocesos asincrónicos (Clarke y Crame 1992; Thatje y col. 2005). Se piensa que esta sucesión es la respuesta climática a la variabilidad cíclica de

Milankovitch¹, produciendo quizás la fuerza evolutiva más fuerte para la flora y la fauna terrestres y marinas de la Antártida, donde los efectos de los períodos glaciales e interglaciales no fueron homogéneos, y permitieron el desarrollo de refugios y de áreas geográficas con diferentes grados de afectación (Clarke y Crame 1992).

El Pleistoceno corresponde a la época geológica que comenzó hace aproximadamente 2,59 millones de años y finalizó aproximadamente 11,700 años antes del presente. Durante esta época hubo grandes cambios en el nivel del mar y en el volumen del hielo Antártico (Pollard y DeConto 2009). Los efectos de los ciclos glaciales e interglaciales del Pleistoceno en la fragmentación de poblaciones de plantas terrestres en refugios relativamente pequeños y una posterior expansión poblacional, han tenido una influencia significativa sobre la estructura genética poblacional de invertebrados terrestres y de agua dulce en zonas templadas, subtropicales y tropicales (Hugall y col. 2002; Garrick y col. 2004; Hewitt 2004; Ribera y Vogler 2004). Rogers (2007) consideró que la fauna Antártica hace aproximadamente 1 MA habría experimentado expansiones poblacionales dinámicas y contracciones en refugios, por ejemplo, el foraminífero *Neogloboquadrina pachyderma* habría experimentado una expansión poblacional hace aproximadamente 1 millón de años atrás (Darling y col. 2004), como así también existe evidencia basada en datos de secuencia de ADN mitocondrial (COI) de que en ese momento, colémbolos (*Cryptopygus spp.*) habrían experimentado dispersiones entre las islas Sub-Antárticas (Stevens y col. 2006; Hughes y col. 2006).

Los análisis de distribución de diferencias de a pares efectuados con el gen COI indicaron la existencia de expansiones demográficas durante el Pleistoceno. El primer análisis de distribución de diferencias de a pares tuvo en cuenta a los haplotipos propios del morfo NA y a los compartidos entre el morfo NA y el morfo VA, e indicó que hace aproximadamente 848 mil años habría ocurrido una expansión demográfica, mientras que para el análisis con los haplotipos exclusivos del morfo NA la expansión habría ocurrido hace aproximadamente 711 mil años. Estas dataciones coinciden aproximadamente con el

¹ Los ciclos de Milankovitch se basan en los cambios en la órbita de la Tierra, la variación del eje terrestre y la precesión de los equinoccios. Estos han dirigido el clima de los últimos millones de años, caracterizado por épocas de glaciaciones e interglaciaciones

período interglacial Günz-Mindel o también llamado Cromeriense que comenzó hace unos 866,000 años y terminó hace unos 478,000 años (Lisiecki y Raymo 2005). Para el análisis donde se tuvieron en cuenta a los haplotipos propios del morfo VA, la expansión podría haber ocurrido hace 82 mil años, la cual es en forma aproximada el comienzo de la glaciación de Wisconsin que empezó hace unos 110,000 años y tuvo un colapso hace unos 10,000 años (Clayton y col. 2002).

Hace unos 866,000 años habría comenzado el período interglacial Cromeriense, en el que el hielo retrocedió, y el nivel del mar fue más alto, lo que habría facilitado la disponibilidad de hábitats y rutas marítimas posiblemente alteradas durante las glaciaciones, favoreciendo la dispersión, (re-) colonización y expansión de diversos organismos que estuvieron protegidos en refugios durante los períodos glaciales, contribuyendo al contacto secundario entre poblaciones o entre especies hermanas, y a la radiación de clados.

Durante el Pleistoceno tardío (sus límites cronométricos se sitúan entre 126,000 y 11,700 años, Walker y col. 2009), la capa de hielo en la Antártida Occidental fue afectada por los cambios en el nivel del mar debidos a fluctuaciones glaciales e interglaciales, que provocaron grandes movimientos de las líneas de conexión a través de la plataforma continental (Hollin 1962). Además, se ha propuesto que en el último interglacial Riss-Würm (ocurrido hace aproximadamente 125,000 años atrás), la capa de hielo en la Antártida Occidental habría sido afectada de manera breve pero drástica por el cambio climático: en este período, el calentamiento por encima del nivel crítico de 0°C para mediados de verano habría destruido las plataformas de hielo, y por lo tanto, causado la desaparición de todo el hielo ubicado por debajo del nivel del mar.

La extensión de las capas de hielo generada por la glaciación de Wisconsin podría haber limitado la cantidad de hábitats bentónicos disponibles en la plataforma continental, incrementando las posibilidades de extinción de numerosos taxa y afectado la dispersión de diversos organismos. Sin embargo, Thatje y col. (2005, 2008) hipotetizaron que numerosas poblaciones de organismos persistieron dentro de múltiples refugios marinos o refugios glaciales sobre la plataforma continental Antártica. Se piensa que la fauna bentónica Antártica actual es el resultado de la migración y vicariancia, como consecuencia de la llamada bomba de biodiversidad Antártica (Clarke y Crame 1992). Durante los tiempos de

retrocesos de las plataformas de hielo, las barreras para el flujo génico fueron removidas permitiendo el contacto secundario entre varios linajes vicariantes (Thatje y col. 2005, 2008; Thornhill y col. 2008; Heimeier y col. 2010; Havermans y col. 2011).

Los repetidos ciclos glaciales/interglaciales parecen haber impulsado la diversificación y especiación en un gran número de taxa Antárticos (Clarke y Crame 1989; Clarke y Crame 1992; Strugnell y col. 2012). En el caso de *S. adareanum*, los períodos interglaciales habrían contribuido en la dispersión y expansión poblacional de ambos morfotipos. Por otro lado, al tratarse de una especie euribática (Kott 1969; Monniot y Monniot 1983), tanto las aguas profundas, como las plataformas continentales podrían haber sido empleadas por estos organismos como refugios para sobrevivir durante las glaciaciones. Si bien Barnes y Hillenbrand (2010) encontraron que durante el último máximo glacial (ocurrido hace aproximadamente 25-19 mil años), el Suroeste del Mar de Ross, la Bahía de Prydz y partes profundas del Estrecho de Bransfield (entre el Noroeste de la Península Antártica y las Islas Shetland del Sur), estuvieron probablemente libres de hielo, mientras que las capas de hielo se acercaron al borde de la plataforma en torno a la mayor parte de la Antártida, una situación similar podría haber ocurrido durante la glaciación de Wisconsin, permitiendo la dispersión y expansión poblacional de *S. adareanum*. Varios casos de expansión poblacional se han reportado para taxa Antárticos. Por ejemplo, Pastene y col. (2007) a partir de secuencias nucleotídicas de la región control del ADN mitocondrial, encontraron que poblaciones de la ballena *Balaenoptera acutorostrata* experimentaron expansiones demográficas significativas hace unos 1,5 millones de años, coincidiendo con un período de calentamiento global. Matschiner y col. (2009) empleando secuencias de la región control del ADN mitocondrial, hallaron en seis poblaciones del pez nototénido bentónico *Gobionotothen gibberifrons*, expansiones poblacionales que habrían ocurrido cerca de la altura de la última edad de hielo, y consideraron que probablemente la capa de hielo de la Antártida se extendió hasta llegar a la plataforma en los ciclos glaciales (Thatje y col. 2008), y habría arrasado la fauna, empujando a los sobrevivientes hacia el talud continental (Barnes y Conlan 2007). Wilson y col. (2009) utilizando fragmentos del gen mitocondrial COI, examinaron poblaciones de la babosa de mar *Doris kerguelenensis* a lo largo del Pasaje de Drake, y encontraron que habrían experimentado una expansión poblacional hace unos 1,8 a 2,4 millones de años

atrás, durante los eventos de glaciación ocurridos en el Plioceno-Pleistoceno. Ellos consideraron que los eventos de glaciación podrían haber contribuido a que la plataforma continental Antártica permanezca inhabitable durante varias ocasiones, desplazando aquellos organismos bentónicos que usualmente viven en la plataforma hacia el Norte, a una serie de refugios de mar abierto (Thatje y col. 2008), incrementando probablemente la dispersión a través del Pasaje de Drake. Raupach y col. (2010), empleando fragmentos del gen mitocondrial COI, encontraron señales de expansión demográfica en poblaciones del camarón de aguas poco profundas *Chorismus antarcticus*. El tiempo de la expansión demográfica fue de aproximadamente 85,000 años, coincidiendo con un período post-glacial del Pleistoceno Tardío, que habría permitido la dispersión, la (re-) colonización y expansión demográfica de esta especie en respuesta a la oscilación climática. Esta datación es muy similar a la obtenida en este trabajo para los haplotipos VA de *S. adareanum*. Strugnell y col. (2012) utilizando secuencias parciales del gen COI y estudiando poblaciones del octópodo *Pareledone turqueti* encontraron que en varias de ellas, habían señales de expansión demográfica. Las poblaciones muestreadas en las Rocas Cormorán presentaron una expansión demográfica de hace unos 183,000 años y las poblaciones muestreadas en las Georgias del Sur una expansión poblacional de hace 110,000 años. Sugirieron que estas expansiones demográficas habrían sido seguidas por cuellos de botella causados por las condiciones extremas y los hábitat reducidos durante el máximo glacial.

A pesar de que el área geográfica examinada en este trabajo es pequeña, coincide con una de las zonas de refugio glacial propuesta por Rogers (2007), donde indica que las Islas Shetland del Sur podrían haber sido utilizadas como refugios durante el último máximo glacial. Nuestros análisis señalan la existencia de una expansión demográfica de ambos morfotipos en una gran porción que abarca parte de las Islas Shetland de Sur.

2.4.4. Estimación de tiempos de divergencia

2.4.4.1. Análisis Interespecífico

Debido a la escasa información (datos moleculares y/o fósiles) en lo que respecta a estimaciones de tiempo de divergencia entre especies de ascidias, en nuestro trabajo

tuvimos en cuenta el único tiempo de divergencia existente entre dos especies de ascidias del género *Ciona*. Este tiempo de divergencia fue estimado en unos 180 MA (millones de años) por Berná y col. (2009) a partir de datos moleculares y registros fósiles.

Evidencias fósiles indican que los tunicados existirían ya desde el período Ordovícico. Palmer y Wilson (1988) encontraron en Ohio, EE.UU un encostramiento de un tunicado (*Catellocaula vallata*) en el esqueleto de un briozoo (*Amplexopora persimilis*) del Ordovícico Superior. Nuestros resultados (Fig. 2.14) muestran que la divergencia entre los aplousobranquios y los organismos del género *Ciona* (Phlebobranchia “sensu” Van Name 1945, Millar 1966, Monniot y Monniot 1972; Aplousobranchia “sensu” Kott 1969, 1990) habría ocurrido durante el Ordovícico medio (Edad Dapingiense), que se caracterizó por una gran diversificación de invertebrados en nuevas formas. La fauna marina estuvo dominada por comunidades de suspensívoros, hecho sumamente importante, que junto con el encostramiento encontrado de un tunicado en el esqueleto de un briozoo del Ordovícico superior, nos estarían indicando que las ascidias probablemente ya existían en este período. A su vez, los tunicados podrían haber surgido mucho antes, aunque los datos anteriores al Cámbrico inferior son controvertidos. Shu y col. (2001) encontraron un fósil de un posible tunicado del Cámbrico temprano en China al que denominaron *Cheungkongella ancestralis*. Este organismo se asemeja a uno de los géneros existentes dentro de las ascidias actuales (*Styela*), cuya morfología podría ser útil para entender el origen de los vertebrados. Sin embargo, Chen y col. (2003) indicaron que la supuesta faringe del fósil *C. ancestralis* contiene a todo el intestino, y que este animal posee tentáculos largos, una característica clara de que no se trataría de un tunicado. Dominguez y col. (2002) hicieron una nueva descripción de *Jaekelocarpus oklahomensis* del Carbonífero Superior de Oklahoma, EE.UU, que tradicionalmente fue ubicado dentro del orden de equinodermos extintos Mitrata (Período Ordovícico a Carbonífero 530- 280 MA). Mediante el empleo de microtomografía de rayos X lograron describir en mayor detalle la anatomía de *J. oklahomensis*, y revelaron evidencia de la existencia de pares de hendiduras branquiales internas e interpretaron su anatomía funcional. En base a sus resultados, sugieren posicionar filogenéticamente a *J. oklahomensis* dentro de los deuterostomados. A pesar de estos resultados, Chen y col. (2003) consideraron que identificar como un tunicado al fósil *J. oklahomensis* sería improbable dado que su cuerpo está cubierto por grandes placas de

calcita en lugar de una túnica, y sus supuestas hendiduras branquiales tienen una orientación coronal inusual. El fósil tunicado más antiguo sobre el que no hay controversias hasta la fecha tiene una edad de aproximadamente 520 MA, fue descrito por Chen y col. (2003) y denominado *Shankouclava shankouense*. *S. shankouense* es del Cámbrico Inferior y fue encontrado en el Sur de China. Este organismo posee una canasta branquial grande y perforada, un atrio, un sifón oral con aparentes tentáculos orales en el extremo basal de la cámara sifonal, quizás un poro atrial dorsal y un endostilo alargado ubicado en la mitad ventral del suelo de la faringe. También encontraron que el intestino de este organismo es simple y tiene forma de “U” como en los tunicados actuales, y está conectado con el extremo posterior de la faringe en un extremo, y con el sifón atrial en el otro, el extremo anal. Al igual que algunos tunicados modernos como *Clavelina*, *S. shankouense* tuvo estolones en el extremo proximal, lo que indicó que este organismo fue sésil y que por medio de estas estructuras de fijación estuvo enraizado en el fondo del Océano. A su vez, los zooides de *S. shankouense* presentaron una gran similitud con los zooides individuales de los tunicados aplousobranquios coloniales modernos, tales como *Clavelina* y *Amarocium* (Barrington 1965; Burighel y Cloney 1997). Sin embargo, *S. shankouense* difiere de los aplousobranquios en que el poro atrial se abre más posteriormente en el techo de la faringe. Estos indicios, junto con los obtenidos a partir de estudios filogenéticos empleando secuencias de 18S ARNr (Stach y Turbeville 2002), nos estarían indicando por un lado que el orden Aplousobranchia se encuentra cerca o en la base de todos los tunicados y por otro, que en más de 500 MA el conjunto de las características morfológicas de las especies de ascidias, parece haber sido poco afectado (Berná y col. 2009). Nuestros resultados, por lo tanto, estarían soportando y complementando el hecho de que los tunicados ya estaban presentes en el Ordovícico.

Durante el Carbonífero los cambios en la distribución biogeográfica de las placas tectónicas influyeron en la distribución de los invertebrados marinos bentónicos, como así también en su respuesta a los cambios paleogeográficos físicos y variaciones climáticas (Ross y Ross 1985). Justamente, la separación de los policlínidos y los clavelínidos habría ocurrido durante el Carbonífero inferior (Edad Tournaisiense), período en el que ocurre la colisión entre Laurasia y Gondwana a lo largo de la actual línea este de Norteamérica, para formar al Supercontinente Pangea. La divergencia entre estos tunicados, su dispersión y

sus tendencias de evolución adaptativa podrían haber sido afectadas por la intensa actividad orogénica, la sedimentación cíclica, las transgresiones y regresiones, y por eventos climáticos tales como grandes glaciaciones.

Por otro lado, durante el Triásico Superior, habría ocurrido la divergencia de los miembros de la familia Polyclinidae y de las dos especies del género *Synoicum* (edad Rhaetiense). Todos los sedimentos del Océano profundo depositados durante este período han desaparecido a través de la subducción de las placas oceánicas, por lo que se sabe muy poco del Océano abierto durante el Triásico. En la edad Norriense del Triásico Superior, el Supercontinente Pangea intensificó su separación, y el Microcontinente Cimmeria se separó de la parte interior del brazo Sur de Pangea, lo que conllevó a la formación del Océano Neo-Tetis. A medida que este Océano se iba ampliando, Cimmeria fue desplazándose al Norte hacia Laurasia, y el océano Paleo-Tetis fue disminuyendo. En base a estos desplazamientos continentales, a los intensos cambios biológicos como la formación de este nuevo Océano y los cambios en el nivel del mar, podríamos suponer que en cierta forma estos eventos pudieron haber contribuido en la separación de los policlínidos, como así también en la divergencia entre las dos especies del género *Synoicum*.

Finalmente, en el Cretácico Inferior, la expansión de mares poco profundos habría contribuido al desarrollo de nuevos hábitats para los organismos marinos de aguas poco profundas. Además, un sistema de corrientes principales rodeaban a la tierra a través del mar de Tetis y el Océano Pacífico. Gordon (1973) sostuvo que la circulación oceánica de la superficie del Hemisferio Sur debe haber incluido un giro en sentido antihorario en el Pacífico Sur, y presumiblemente también una Corriente Circumpolar Antártica. De acuerdo a la dirección de estas corrientes, las mismas también habrían contribuido en la divergencia de los haplotipos de Tierra Adelia y de la Península Antártica, ya que dichas corrientes tenían una dirección de Oeste a Este, favoreciendo así al desplazamiento de las larvas pelágicas de vida libre desde un sector estrecho de la Antártida Oriental (Tierra Adelia), hacia la Península. Esto último a su vez, estaría soportando nuestro resultado de que el haplotipo de *S. adareanum* de Tierra Adelia, sería el más basal.

2.4.4.2. Análisis Intraespecífico

Los tiempos de divergencia estimados a partir de los genes combinados (COI+Citb) mostraron que la divergencia entre el clado A y el clado B de *S. adareanum* (Fig. 2.15), coincidió con el segundo episodio glacial “Melville”, ocurrido en la región de la Antártida Occidental y Península Antártica (Troedson y Riding 2002) durante el Mioceno Temprano (22-23 MA). Estudios geológicos y biológicos han soportado la existencia de refugios en la plataforma continental de la Antártida durante períodos glaciales (Newman y col. 2009), por lo que es probable que estas ascidias Antárticas hayan tolerado dicha glaciación en refugios aislados geográficamente y desarrollados en la plataforma continental, que habrían estado libres de hielo. Habrían permanecido en dichos refugios hasta la llegada del período interglacial durante el cual el retroceso del hielo le habría permitido a *S. adareanum* expandir su rango.

Por otro lado, después de la apertura del Pasaje de Drake (hace unos 25-22 MA, considerando los estudios llevados a cabo por Bargelloni y col. 2000), la Antártida se aisló definitivamente del resto de los Continentes y las profundidades oceánicas alcanzaron sus valores actuales (Barker y Burrell 1977; Kennett 1977, 1980). Las condiciones de aguas profundas entre América del Sur y el Continente Antártico condujeron al establecimiento completo del Frente Polar Antártico (FPA, Kennett 1982), ocurrido hace 25-22 MA (Bargelloni y col. 2000). Esta barrera hidrográfica está formada por la convergencia de agua Antártica fría con agua Sub-Antártica cálida. Al Sur del Frente Polar, un sistema complejo de corrientes, particularmente la Corriente Circumpolar Antártica (CCA) en sentido horario, ayuda a la dispersión pasiva de diversos organismos. Por lo que la CCA al ser impulsada por el cinturón de vientos del Oeste y fluir de Oeste a Este a través del Pasaje de Drake, podría haber contribuido a la dispersión y a la división de la población ancestral que dio origen a los dos clados de *S. adareanum*.

La divergencia entre los subclados (B1 y B2) del clado B habría ocurrido hace unos 18 MA aproximadamente. Esta estimación se encuentra próxima a un período en el que la Antártida experimentó una disminución del volumen de hielo (17-15 MA), de manera que habría habido un incremento en el nivel del mar, lo cual junto con la CCA podrían haber colaborado en la dispersión y la separación de los dos subclados.

Por otro lado, la diversificación de los haplotipos del clado A, y la de los haplotipos del subclado B1 habría ocurrido hace unos 13 MA, mientras que la del subclado B2 hace unos 12 MA. Estas diversificaciones habrían ocurrido dentro del lapso en el que hubo un aumento gradual del volumen de hielo, por lo que es probable que aquí también se hayan desarrollado refugios en la plataforma continental para estos organismos, hasta la ocurrencia de un período más cálido, contribuyendo en la dispersión y en la separación de estos organismos.

Por último, las divergencias ocurridas entre los haplotipos del clado A y entre los haplotipos dentro de los subclados B1 y B2 respectivamente, ocurrieron en el rango de entre 10 a 1 MA. Hace aproximadamente 4 MA las Islas Shetland del Sur se separaron de la Península Antártica Norte debido a la presunta difusión del arco posterior que formó el Estrecho de Bransfield (Barker 1982; Barker y Dalziel 1983; Yi y col. 2005), por lo que es probable que el Estrecho de Bransfield haya contribuido en la divergencia de los haplotipos. A su vez, Roger (2007) sostuvo que la fauna Antártica, hace aproximadamente 1 MA, habría experimentado un período de expansiones poblacionales y contracciones en refugios. Por otro lado, Wilson y col. (2009), consideraron que la acción repetida de los ciclos glaciales e interglaciales podría haber contribuido en la diversificación de taxa Antárticos, por lo que podrían haber favorecido la diversificación de los haplotipos más recientes de las muestras de *S. adareanum*. Además, dado que se ha hipotetizado que las poblaciones Antárticas persistieron en refugios de aguas profundas o refugios glaciales en la plataforma durante los máximos glaciales (Thatje y col. 2005), y dado que *S. adareanum* es una especie euribática (Kott 1969; Monniot y Monniot 1983), es probable que ambas posibilidades hayan sido factibles para que los individuos de *S. adareanum* sobrevivieran los máximos glaciales. El grado en que las poblaciones contemporáneas conservan la señal genética de estos eventos históricos es poco claro, ya que los estudios intraespecíficos de los invertebrados del Océano Austral, llevados a cabo a gran escala, son escasos debido a los costos y las dificultades logísticas para poder obtener suficientes muestras.

CAPÍTULO 3:
RELACIONES FILOGENÉTICAS DE
LOS TUNICADOS Y DE LAS
FAMILIAS DEL ORDEN
APLOUSOBRANCHIA

3.1. Introducción

Recientemente, análisis moleculares han brindado información sobre las relaciones filogenéticas dentro de los deuterostomados (Cameron y col. 2000; Turbeville y col. 1994; Swalla y col. 2000; Swalla 2001) y dentro de la clase Ascidiacea (Wada y col. 1992; Wada 1998; Stach y Turbeville 2002; Turon y López-Legentil 2004). La ubicación de los tunicados dentro de los deuterostomados ha sido bastante problemática (Winchell y col. 2002; Blair y Hedges 2005; Zeng y Swalla 2005; Delsuc y col. 2006), incluso varios estudios han soportado la monofilia de los tunicados, pero no de la clase Ascidiacea (Tabla 3.1; Christen y Braconnot 1998; Swalla y col. 2000; Stach y Turbeville 2002; Winchell y col. 2002). Por ejemplo, análisis basados en secuencias del gen 18S rDNA indicaron que el orden Phlebobranchia se encuentra más cercanamente relacionado a la clase Thaliacea que a Stolidobranchia (Wada y col. 1992; Wada 1998; Swalla y col. 2000; Stach y Turbeville 2002; Zeng y col. 2006; Stach 2009; Stach y Kirbach 2009), lo que implicaría que Ascidiacea por sí misma no es monofilética. Esta cercana relación entre Phlebobranchia y Thaliacea (Zeng y Swalla 2005; Yokobori y col. 2005; Swalla y Smith 2008), también fue demostrada en los estudios llevados a cabo por Singh y col. (2009), Stach y col. (2010) y Perseke y col. (2013), utilizando genes que codifican para proteínas. A su vez, Stach y col. (2010) y Perseke y col. (2013), encontraron que Stolidobranchia fue el taxón hermano del resto de los tunicados, relación también soportada por análisis llevados a cabo con secuencias nucleares, pero que no fue sostenida cuando se realizaron estudios cladísticos basados en caracteres morfológicos (Hawkins y col. 1983; Stach y Turbeville 2002; Stach 2008, 2009; Stach y Kirbach 2009). Por otro lado, en el análisis llevado a cabo por Tsagkogeorga y col. (2009) empleando 35 genes “house-keeping”, en el cual no tuvieron en cuenta a ningún organismo del orden Thaliacea, se encontró que Aplousobranchia fue un grupo hermano de Phlebobranchia, y que Stolidobranchia fue el taxón hermano de ese clado (Aplousobranchia + Phlebobranchia). Los estudios llevados a cabo por Stach y Turbeville (2002) combinando datos moleculares (18S rDNA) y caracteres morfológicos, sugirieron que el orden Aplousobranchia sería un grupo hermano de la clase Appendicularia y que juntos ocuparían la posición más basal entre los tunicados. Por otro lado, Turon y López-Legentil (2004), empleando secuencias de COI parciales de 28 especies de ascidias, reconstruyeron la filogenia del orden Aplousobranchia, y encontraron

que este grupo es monofilético y presenta una relación incierta con los otros dos órdenes. Además sugirieron la existencia de una afinidad cercana de Aplousobranchia con las familias Cionidae y Diazonidae (Phlebobranchia), soportada también por caracteres morfológicos (Kott 1990). Yokobori y col. (2006) han demostrado que la relación entre Aplousobranchia y Appendicularia, propuesta por Stach y Turbeville (2002), ha sido producto de la contaminación de las secuencias de 18S ARNr de aplousobranquios con protistas simbioses. Por otro lado, análisis efectuados con secuencias auténticas de 18S ARNr de aplousobranquios, han agrupado a Aplousobranchia con Thaliacea (Swalla y col. 2000; Stach y Turbeville 2002; Zeng y Swalla 2005; Yokobori y col. 2006). A su vez, el trabajo de Tsagkogeorga y col. (2009), también llevado a cabo con secuencias del gen 18S rDNA, demostró una relación cercana entre Aplousobranchia, Phlebobranchia y Thaliacea.

Tabla 3.1. Clasificación de los Tunicados

Clasificación de los Tunicados
Superreino: Eukaryota
Reino: Animalia
Superfilo: Deuterostomia
Filo: Chordata
Subfilo: Urochordata/Tunicata
Clases:
Asciacea: órdenes (Clasificación según estructura y desarrollo de la faringe) Aplousobranchia, Phlebobranchia, Stolidobranchia)
Thaliacea: órdenes: Pyrosomida, Salpida, Doliolida
Appendicularia: familias: Fritillariidae, Kowalwvskiidae, Oikopleuridae

La posición de la clase Appendicularia ha sido bastante inestable dentro de los tunicados, y continúa en controversia (Swalla y col. 2000; Stach y Kirbach 2009). Mientras que los primeros estudios donde se empleó al gen 18S rDNA indicaron que Appendicularia surgió primero entre los tunicados (Wada 1998; Swalla y col. 2000), análisis más recientes sugieren una relación de grupo hermano con Stolidobranchia (Zeng y col. 2006). Delsuc y col. (2006; 2008) soportaron fuertemente la posición basal de Appendicularia dentro de los tunicados.

En base a las investigaciones publicadas hasta el momento, Zeng y col. (2006) propusieron tres hipótesis de evolución de los tunicados (Fig. 3.1). La primera hipótesis (Fig. 3.1-a) sugiere que Appendicularia y Aplousobranchia se agrupan juntas como grupo hermano del resto de los tunicados, lo cual está soportado por los estudios efectuados por Stach y Turbeville (2002) en base al gen nuclear 18S. Sin embargo esta relación es sospechosa debido a la atracción de ramas largas de Appendicularia y Aplousobranchia. La segunda hipótesis (Fig. 3.1-b), estaría apoyada por los análisis efectuados con el gen mitocondrial COI por Turon y López-Legentil (2004), y sugiere que Aplousobranchia es grupo hermano de Stolidobranchia, mientras que Phlebobranchia y Thaliacea son grupos hermanos de ellos. Sin embargo, debe aclararse que estos análisis no incluyeron a ningún miembro de Appendicularia, y su posición en la filogenia fue sugerida por Zeng y col. (2006). La tercera hipótesis (Fig. 3.1-c) propone que Aplousobranchia se agrupa con Thaliacea y luego con Phlebobranchia, los cuales colectivamente constituyen un grupo hermano de Stolidobranchia y Appendicularia. Esta hipótesis está apoyada por los estudios efectuados por Yokobori y col. (2006) y Zeng y col. (2006), utilizando el gen nuclear 18S rDNA. Una cuarta hipótesis (Fig. 3.1-d) fue propuesta por Tsagkogeorga y col. (2009) en base a filogenias estimadas utilizando el gen 18S rRNA; es similar a la tercera hipótesis, pero establece que existe una politomía en el clado conformado por Phlebobranchia + Thaliacea + Aplousobranchia, el cual a su vez, es un grupo hermano del clado constituido por Appendicularia + Stolidobranchia.

Las relaciones entre los miembros de Aplousobranchia no son del todo claras (Kott 1990); no sólo ha sido motivo de debate conocer qué familias se encuentran dentro del orden, sino que también hay poco acuerdo en lo que respecta a las relaciones filogenéticas entre las mismas (Kott 1990; Monniot y col. 1991).

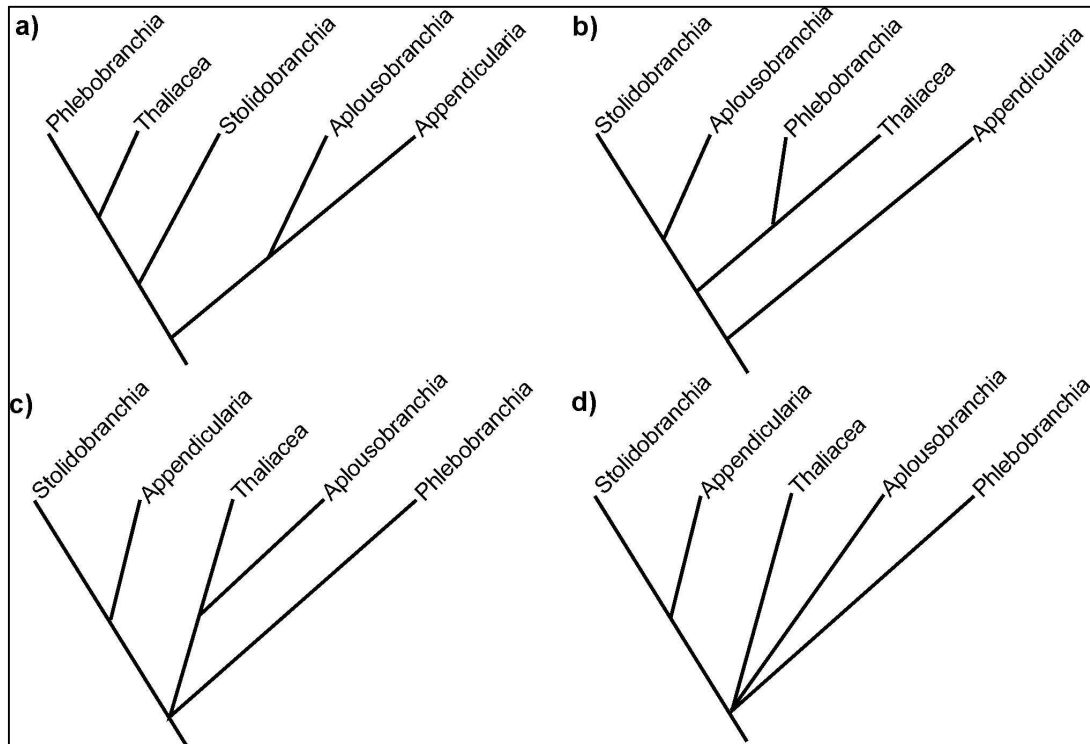


Figura 3.1. Hipótesis propuestas para explicar la evolución de los Tunicados. **a)** Stach y Turbeville (2002) basada en el gen ribosomal 18S. **b)** Turon y López-Legentil (2004) utilizando secuencias parciales del gen mitocondrial COI. **c)** Zeng y col. (2006) empleando el gen 18S. **d)** Tsagkogeorga y col. (2009) utilizando secuencias del gen 18S

El orden Aplousobranchia está conformado por ascidias coloniales que poseen tentáculos orales simples y una faringe sin pliegues ni vasos longitudinales internos (Van Name 1945). Su cuerpo está dividido en dos o tres partes (tórax, abdomen, y en algunos casos, abdomen posterior). En una revisión exhaustiva de géneros de ascidias de todo el mundo, Monniot y Monniot (1972) reconocieron 46 géneros de aplousobranquios en sólo tres familias: Polyclinidae, Polycitoridae y Didemnidae. Más tarde, dos nuevas familias fueron aceptadas e incorporadas, Clavelinidae y Holozoidae (Monniot y Monniot 2001). Kott (1969, 1985, 1990, 1992, 2001) basándose en estudios efectuados con ascidias de Australia y la Antártida, propuso modificaciones importantes en la clasificación tradicional de los aplousobranquios. Siguiendo su clasificación, que se basa en el proceso de replicación, aspectos de la colonia y de los zooides, y la morfología de la larva, Aplousobranchia incluye 14 familias (Tabla 3.2). Kott (1990) redistribuyó los géneros y especies de Polycitoridae en cinco familias. A su vez, Kott (1992) redefinió a Polyclinidae

restringiéndola a los géneros incluidos previamente en la subfamilia Polyclininae, y sugirió cinco nuevas familias. Didemnidae, sin embargo, permaneció estable en varias clasificaciones debido al tamaño corto de los zooides con cuatro o tres hileras de estigmas, pocos folículos testiculares y larvas grandes incubadas dentro de la túnica (Lafargue 1983; Lafargue y Wahl 1987; Kott 1962, 2001), lo que sugiere que esta familia es de hecho un grupo natural, y su monofilia ha sido demostrada recientemente en estudios donde se han empleado marcadores moleculares (Stach y Turbeville 2002; Turon y López-Legentil 2004; Yokobori y col. 2006).

Tabla 3.2. Clasificación tradicional de las familias y géneros en el orden Aplousobranchia según Monniot y Monniot (1972), Monniot y col. (1991) y Kott (1990, 1992, 2001). Las familias se indican en negrita y los géneros en cursiva

Monniot y Monniot (1972); Monniot y col. (1991)	Kott (1990, 1992, 2001)
Polyclinidae Milne-Edwards, 1841	Polyclinidae Milne-Edwards, 1841
<i>Polyclinum</i> Savigny, 1816	<i>Polyclinum</i> Savigny, 1816
<i>Synoicum</i> Phipps, 1774	<i>Synoicum</i> Phipps, 1774
<i>Aplidium</i> Savigny, 1816	<i>Aplidium</i> Savigny, 1816
<i>Aplidiopsis</i> Lahille, 1890	<i>Aplidiopsis</i> Lahille, 1890
<i>Sidneiodes</i> Kesteven, 1909	<i>Sidneiodes</i> Kesteven, 1909
<i>Sidnyum</i> Savigny, 1816	<i>Morchellium</i> Giard, 1872
<i>Atopogaster</i> Herdman, 1886	Placentelidae Kott, 1992
<i>Placentela</i> Redikorzev, 1913	<i>Placentela</i> Redikorzev, 1913
<i>Homoeodistoma</i> Redikorzev, 1913	Ritterellidae Kott, 1992
<i>Ritterella</i> Harant, 1931	<i>Ritterella</i> Harant, 1931
<i>Dumus</i> Brewin, 1952	<i>Dumus</i> Brewin, 1952
<i>Pharyngodictyon</i> Herdman, 1886	Euherdmaniidae Ritter, 1904
<i>Euherdmania</i> Ritter, 1904	<i>Euhermania</i> Ritter 1904
<i>Polyclinella</i> Harant, 1930	Pseudodistomidae Kott, 1992
<i>Pseudodistoma</i> Michaelsen, 1924	<i>Pseudodistoma</i> Michaelsen, 1924
<i>Protopolyclinum</i> Millar, 1960	<i>Anadistoma</i> Kott, 1992
<i>Citorclinum</i> Monniot y Millar, 1988	Protopolyclinidae Kott, 1992

Monniot y Monniot (1972); Monniot y col. Kott (1990, 1992, 2001) (1991)

Didemindae Verrill, 1871	<i>Monniotus</i> Millar, 1988
<i>Echinoclinum</i> Van Name, 1902	<i>Condominium</i> Kott, 1992
<i>Askonides</i> Kott, 1962	Didemnidae Giard, 1872
<i>Didemnum</i> Savigny, 1816	<i>Didemnum</i> Savigny, 1816
<i>Trididemnum</i> Della Valle, 1881	<i>Trididemnum</i> Della Valle, 1881
<i>Polysyncraton</i> Nott, 1892	<i>Polysyncraton</i> Nott, 1892
<i>Leptoclinides</i> Bjerkan, 1905	<i>Leptoclinides</i> Bjerkan, 1905
<i>Lissoclinum</i> Verrill, 1871	<i>Lissoclinum</i> Verrill, 1871
<i>Diplosoma</i> Macdonald, 1859	<i>Diplosoma</i> Macdonald, 1859
<i>Atriolum</i> Kott, 1983	<i>Atriolum</i> Kott, 1983
<i>Botrydemnum</i> Oka, 1933	<i>Clitella</i> Kott, 2001
<i>Coelocormus</i> Herdman, 1886	
<i>Sinecloaca</i> Michaelsen, 1904	Polycitoridae Michaelsen, 1904
Polycitoridae Michaelsen, 1904	<i>Exostoma</i> Kott, 1990
<i>Polycitor</i> Renier, 1804	<i>Polycitor</i> Renier, 1804
<i>Polycitorella</i> Michaelsen, 1924	<i>Polycitorella</i> Michaelsen, 1924
<i>Eudistoma</i> Caullery, 1909	<i>Eudistoma</i> Caullery, 1909
<i>Cystodytes</i> Drasche, 1884	<i>Cystodytes</i> Drasche, 1884
<i>Tetrazona</i> Michaelsen, 1930	<i>Brevicollus</i> Kott, 1990
<i>Protoholozoa</i> Kott, 1969	Clavelinidae Forbes y Hanley, 1848
<i>Atapozoa</i> Brewin, 1956	<i>Nephtheis</i> Drasche, 1882
<i>Clavelina</i> Savigny, 1816	<i>Clavelina</i> Savigny, 1816
<i>Oxycorynia</i> Drasche, 1882	Pycnoclavellidae Kott, 1990
<i>Podoclavella</i> Herdman, 1890	<i>Euclavella</i> Kott, 1990
<i>Pycnoclavella</i> Garstang, 1891	<i>Pycnoclavella</i> Garstang, 1891
<i>Archidistoma</i> Garstang, 1891	Holozoidae Berrill, 1950
<i>Archascidia</i> Julin, 1904	<i>Polydistoma</i> Kott, 1990
<i>Distaplia</i> Della Valle, 1881	<i>Distaplia</i> Della Valle, 1881
<i>Cyathocormus</i> Oka, 1912	<i>Sigillina</i> Savigny, 1816
<i>Hypodistoma</i> Tokioka, 1967	<i>Hypodistoma</i> Tokioka, 1967
<i>Dimorpha</i> Pérès, 1946	<i>Neodistoma</i> Kott, 1990
<i>Hypsistozoa</i> Brewin, 1953	<i>Hypsistozoa</i> Brewin, 1953

Monniot y Monniot (1972); Monniot y col. (1991)		Kott (1990, 1992, 2001)	
<i>Sycozoa</i> Lesson, 1830		<i>Sycozoa</i> Lesson, 1830	
<i>Millarus</i> Monniot y Monniot 1987		Stomozoidae Kott, 1990	
<i>Stomozoa</i> Kott, 1957		<i>Stomozoa</i> Kott, 1957	

Orden Phlebobranchia			
Cionidae Lahille, 1887		Cionidae Lahille, 1887	
		<i>Ciona</i> Fleming, 1822	
		<i>Rhopalaea</i> Philippi, 1843	
		<i>Pseudodiazona</i> Millar, 1963	

Tabla 3.2, continuación

Objetivo a desarrollar en el capítulo:

- Contribuir al conocimiento de las relaciones filogenéticas existentes entre los órdenes del subfilum Tunicata y entre familias del orden Aplousobranchia, según la clasificación propuesta por Kott, utilizando los genes mitocondriales COI y Citb

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Análisis filogenético del Subfilo Urochordata/Tunicata

Se utilizó el gen COI en conjunto con el gen Citb para evaluar las relaciones filogenéticas existentes entre los tunicados. Para ello, se buscaron en repositorios públicos (Banco de Genes y Sistema BOLD) representantes de cada taxón involucrado que tuvieran secuenciados los dos genes, excepto para la clase Appendicularia, donde sólo contamos con la secuencia del gen COI. De los 24 individuos incluidos en los análisis, 17 representaron a la clase Ascidiacea (5 representaron al orden Aplousobranchia “sensu” Kott 1990, 2 al orden Phlebobranchia, 10 al orden Stolidobranchia), 1 a la clase Thaliacea y 1 a la clase Appendicularia. Por último, incorporamos al análisis 5 secuencias de cefalocordados que

fueron empleadas como extragrupos (*Branchiostoma lanceolatum*, *Branchiostoma floridae*, *Asymmetron lucayanum*, *Asymmetron sp.*, *Epigonichthys maldivensis*). Las especies utilizadas en este estudio, junto con sus números de acceso, se muestran en la Tabla 3.3.

Los análisis se realizaron empleando tanto secuencias nucleotídicas como secuencias de aminoácidos traducidas y aplicando dos métodos de construcción de árboles, uno basado en Inferencia Bayesiana y el otro en Máxima Verosimilitud. Para los dos métodos de construcción de árboles empleando secuencias nucleotídicas, los mejores modelos de sustitución que se ajustaron a nuestros datos fueron seleccionados por comparación estadística de 56 modelos de evolución diferentes empleando el programa Modeltest 3.0 (Posada y Crandall 1998) y utilizando el criterio de información de Akaike (AIC). Los modelos de sustitución nucleotídica seleccionados fueron GTR+G para COI y GTR+I+G para Citb. El árbol filogenético con la mayor probabilidad posterior (PP) según estos modelos, se estimó utilizando el programa MrBayes (Ronquist y Huelsenbeck 2003), para lo cual se corrieron 4 cadenas de Markov con 1 millón de generaciones cada una y considerando un período de calentamiento “burn-in” de 2.500 generaciones. El árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud se estimó empleando el programa MEGA versión 5 (Tamura y col. 2011) y se emplearon 1.000 replicaciones de “bootstrap” para evaluar la robustez de cada topología, la estabilidad de los nodos y construir un árbol consenso de mayoría. Los árboles obtenidos en ambos análisis se graficaron utilizando el software TreeView (Page 1996).

Por otro lado, para los dos métodos de construcción de árboles empleando secuencias aminoacídicas, el mejor modelo de evolución de proteínas que se ajustó a nuestros datos se determinó empleando el programa ProtTest 2.4 (Abascal y col. 2005), utilizando el criterio de información de Akaike. El modelo elegido fue el modelo MtREV para ambos genes mitocondriales. El árbol filogenético con la mayor probabilidad posterior según el modelo MtREV se estimó utilizando el programa MrBayes (Ronquist y Huelsenbeck 2003); se corrieron 4 cadenas de Markov con 1 millón de generaciones cada una y considerando un período de calentamiento “burn-in” de 2.500 generaciones. El árbol filogenético obtenido a partir del método de Máxima Verosimilitud se estimó empleando el programa MEGA versión 5 (Tamura y col. 2011) y se emplearon 1.000 replicaciones de “bootstrap” para evaluar la robustez de cada topología, la estabilidad de los nodos y

construir un árbol consenso de mayoría. Los árboles obtenidos en ambos análisis, se graficaron utilizando el software TreeView (Page 1996).

Tabla 3.3. Especies, familias, genes utilizados y números de acceso al Banco de Genes y Sistema BOLD, empleados en los estudios filogenéticos de los tunicados

ESPECIE	FAMILIA	GEN	N° ACCESO
<i>Styela plicata</i>	Styelidae	COI	NC_013565.1
<i>Styela plicata</i>	Styelidae	Citb	NC_013565.1
<i>Styela montereyensis</i>	Styelidae	COI	FJ528638.1
<i>Styela montereyensis</i>	Styelidae	Citb	DQ345920.1
<i>Styela gibbsii</i>	Styelidae	COI	FJ528637.1
<i>Styela gibbsii</i>	Styelidae	Citb	DQ345919.1
<i>Dendrodoa grosularia</i>	Styelidae	COI	FJ528649.1
<i>Dendrodoa grosularia</i>	Styelidae	Citb	DQ345912.1
<i>Polycarpa pomaria</i>	Styelidae	COI	AY600984.1
<i>Polycarpa pomaria</i>	Styelidae	Citb	DQ345917.1
<i>Botryllus schlosseri</i>	Styelidae	COI	AY600987.1
<i>Botryllus schlosseri</i>	Styelidae	Citb	DQ345910.1
<i>Botrylloides violaceus</i>	Styelidae	COI	GU220387.1
<i>Botrylloides violaceus</i>	Styelidae	Citb	DQ345909.1
<i>Halocynthia roretzi</i>	Pyuridae	COI	AB024528.1
<i>Halocynthia roretzi</i>	Pyuridae	Citb	AB024528.1
<i>Microcosmus sulcatus</i>	Pyuridae	COI	NC_013752.1
<i>Microcosmus sulcatus</i>	Pyuridae	Citb	NC_013752.1
<i>Herdmania momus</i>	Pyuridae	COI	NC_013561.1
<i>Herdmania momus</i>	Pyuridae	Citb	NC_013561.1
<i>Phallusia fumigata</i>	Ascidiidae	COI	NC_009834.1

ESPECIE	FAMILIA	GEN	N° ACCESO
<i>Phallusia fumigata</i>	Ascidiidae	Citb	NC_009834.1
<i>Phallusia mammillata</i>	Ascidiidae	COI	NC_009833.1
<i>Phallusia mammillata</i>	Ascidiidae	CIItb	NC_009833.1
<i>Ciona intestinalis</i>	Cionidae	COI	NC_004447.2
<i>Ciona intestinalis</i>	Cionidae	Citb	NC_004447.2
<i>Ciona savignyi</i>	Cionidae	COI	AB079784.1
<i>Ciona savignyi</i>	Cionidae	Citb	AB079784.1
<i>Clavelina lepadiformis</i>	Clavelinidae	COI	NC_012887.1
<i>Clavelina lepadiformis</i>	Clavelinidae	Citb	NC_012887.1
<i>Diplosoma listerianum</i>	Didemnidae	COI	NC_013556.1
<i>Diplosoma listerianum</i>	Didemnidae	Citb	NC_013556.1
<i>Synoicum adareanum</i>	Polyclinidae	COI	ASCAN011-10
<i>Aplidium conicum</i>	Polyclinidae	COI	NC_013584.1
<i>Aplidium conicum</i>	Polyclinidae	Citb	NC_013584.1
<i>Doliolum nationalis</i>	Doliolida	COI	AB176541.1
<i>Doliolum nationalis</i>	Doliolida	Citb	AB176541.1
<i>Branchiostoma floridae</i>	Branchiostomidae	COI	NC_000834.1
<i>Branchiostoma floridae</i>	Branchiostomidae	Citb	NC_000834.1
<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	Branchiostomidae	COI	NC_001912.1
<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	Branchiostomidae	Citb	NC_001912.1
<i>Asymmetron lucayanum</i>	Epigonichthyidae	COI	NC_006464.1
<i>Asymmetron lucayanum</i>	Epigonichthyidae	Citb	NC_006464.1
<i>Asymmetron sp.</i>	Epigonichthyidae	COI	NC_009775.1
<i>Asymmetron sp.</i>	Epigonichthyidae	Citb	NC_009775.1
<i>Epigonichthys maldivensis</i>	Epigonichthyidae	COI	AB110093.1

ESPECIE	FAMILIA	GEN	N° ACCESO
<i>Epigonichthys maldivensis</i>	Epigonichthyidae	Citb	AB110093.1

Tabla 3.3, continuación

3.2.2. Relaciones filogenéticas entre familias del orden Aplousobranchia

En este análisis utilizamos el gen COI para evaluar las relaciones filogenéticas existentes entre las familias del orden Aplousobranchia “sensu” Kott (1990). Decidimos utilizar solamente este gen y no en combinación con el Citb, ya que son muy pocos los representantes de las familias de los aplousobranquios que poseen secuenciado el gen mitocondrial Citocromo b. A diferencia de trabajos anteriores (Stach y Turbeville 2002; Turon y López-Legentil 2004; Tsagkogeorga y col. 2009) donde se incluyeron pocos representantes de las familias del orden y/o de los géneros que conforman las familias, en nuestros análisis incluimos un número mayor de representantes de familias y géneros que hasta la fecha poseen secuenciado el gen COI más los 17 haplotipos de *S. adareanum* obtenidos en este trabajo. Se emplearon tres secuencias de cefalocordados (*Branchiostoma lanceolatum*, *Asymmetron lucayanum*, *Epigonichthys maldivensis*) como extragrupos. Todas las secuencias empleadas en este estudio, a excepción de los 17 haplotipos de *S. adareanum*, fueron tomadas del Banco de Genes y del Systema BOLD, y se muestran en la Tabla 3.4. El análisis se realizó empleando secuencias nucleotídicas y secuencias de aminoácidos traducidas de todos los individuos.

Aplicamos dos métodos de construcción de árboles: uno basado en Inferencia Bayesiana y el otro en Máxima Verosimilitud. Para las secuencias nucleotídicas, el mejor modelo de sustitución que se ajustó a nuestros datos fue seleccionado por comparación estadística de 56 modelos de evolución diferentes empleando el programa Modeltest 3.0 (Posada y Crandall 1998) y utilizando el criterio de información de Akaike. Para el caso de las secuencias nucleotídicas sin particionar por codón, el modelo seleccionado fue GTR+I+G, mientras que para las secuencias nucleotídicas particionadas por codón, los modelos seleccionados fueron GTR+G para la primera y segunda posición, y HKY+G para

la tercera posición. El árbol filogenético con la mayor probabilidad posterior según estos modelos, se estimó utilizando el programa MrBayes (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Para el set de datos no particionado se utilizaron 4 cadenas de Markov con 5 millones de generaciones cada una y considerando un período de calentamiento “burn-in” de 1.250 generaciones. Para las secuencias nucleotídicas particionadas por codón, las topologías se evaluaron utilizando 4 cadenas de Markov con 3 millones de generaciones cada una y considerando un período de calentamiento “burn-in” de 7.500 generaciones. El árbol filogenético resultante del método de Máxima Verosimilitud se obtuvo solamente a partir del set de datos no particionado empleando el programa MEGA versión 5 (Tamura y col. 2011). Se emplearon 1.000 replicaciones de “bootstrap” para evaluar la robustez de cada topología, la estabilidad de los nodos y construir un árbol consenso de mayoría. Los árboles obtenidos en ambos análisis se graficaron utilizando el software TreeView (Page 1996).

Por otro lado, para los dos métodos de construcción de árboles empleando secuencias aminoacídicas, se estimó que el modelo de evolución de proteínas que mejor se ajustó a nuestros datos fue el modelo Dayhoff, empleando el programa ProtTest 2.4 (Abascal y col. 2005) y utilizando el criterio de información de Akaike. El árbol filogenético con la mayor probabilidad posterior según el modelo Dayhoff, se estimó utilizando el programa MrBayes (Ronquist y Huelsenbeck 2003) con 4 cadenas de Markov con 2 millones de generaciones cada una y considerando un período de calentamiento “burn-in” de 5.000 generaciones. El árbol filogenético obtenido a partir del método de Máxima Verosimilitud se estimó empleando el programa MEGA versión 5 (Tamura y col. 2011) y se emplearon 1.000 replicaciones de “bootstrap” para evaluar la robustez de cada topología, la estabilidad de los nodos y construir un árbol consenso de mayoría. Los árboles obtenidos en ambos análisis, se graficaron utilizando el software TreeView (Page 1996).

Tabla 3.4. Especies, familias, y números de acceso al Banco de Genes y del sistema BOLD, empleados en los estudios filogenéticos de las familias del orden Aplousobranchia según la clasificación propuesta por Kott

ESPECIE	FAMILIA	Nº ACCESO
<i>Synoicum adareanum</i>	Polyclinidae	KC017441.1
<i>Synoicum castellatum</i>	Polyclinidae	ASCAN011-10
<i>Amaroucium stellatum</i>	Polyclinidae	AY116595.1
<i>Aplidium fuscum</i>	Polyclinidae	GBGC0973-06
<i>Aplidium elegans</i>	Polyclinidae	AY600971.1
<i>Aplidium conicum</i>	Polyclinidae	NC_013584.1
<i>Pseudodistoma crucigaster</i>	Pseudodistomidae	AY600979.1
<i>Pseudodistoma cyrnusense</i>	Pseudodistomidae	AY600970.1
<i>Diplosoma listerianum</i>	Didemnidae	NC_013556.1
<i>Diplosoma virens</i>	Didemnidae	AB433974.1
<i>Diplosoma simileguwa</i>	Didemnidae	AB486000.1
<i>Diplosoma ooru</i>	Didemnidae	AB485999.1
<i>Lissoclinum timorensense</i>	Didemnidae	AB499982.1
<i>Lissoclinum punctatum</i>	Didemnidae	AB433976.1
<i>Trididemnum paracyclops</i>	Didemnidae	AB499974.1
<i>Didemnum molle</i>	Didemnidae	AB557717.1
<i>Cystodytes dellechiaiei</i>	Polycitoridae	AY523072.1
<i>Cystodytes sp. SLL-2005</i>	Polycitoridae	AY821784.1
<i>Polycitorella coronaria</i>	Polycitoridae	AM709504.1
<i>Eudistoma planum</i>	Polycitoridae	AY600977.1
<i>Polycitor adriaticum</i>	Polycitoridae	AY600982.1
<i>Eudistoma plumbeum</i>	Polycitoridae	AY600978.1
<i>Polycitor giganteus</i>	Polycitoridae	KC017429.1

ESPECIE	FAMILIA	N° ACCESO
<i>Eudistoma banyulensis</i>	Polycitoridae	AY600973.1
<i>Clavelina lepadiformis</i>	Clavelinidae	AY603104.1
<i>Clavelina picta</i>	Clavelinidae	JN703740.1
<i>Clavelina oblonga</i>	Clavelinidae	JN703738.1
<i>Clavelina delavallei</i>	Clavelinidae	AY603105.1
<i>Clavelina moluccensis</i>	Clavelinidae	AM706472.1
<i>Clavelina gemmae</i>	Clavelinidae	AJ884573.1
<i>Clavelina australis</i>	Clavelinidae	AM706464.1
<i>Pycnoclavella diminuta</i>	Pycnoclavellidae	KC017435.1
<i>Pycnoclavella martae</i>	Pycnoclavellidae	AM706481.1
<i>Pycnoclavella detorta</i>	Pycnoclavellidae	AM706473.1
<i>Pycnoclavella communis</i>	Pycnoclavellidae	AM746368.1
<i>Pycnoclavella nana</i>	Pycnoclavellidae	AM403699.1
<i>Pycnoclavella aurilucens</i>	Pycnoclavellidae	AM403691.1
<i>Pycnoclavella brava</i>	Pycnoclavellidae	AM403687.1
<i>Pycnoclavella atlantica</i>	Pycnoclavellidae	AM403685.1
<i>Ciona intestinalis</i>	Cionidae	NC_004447.2
<i>Ciona savignyi</i>	Cionidae	AB079784.1
<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	Branchiostomidae	NC_001912.1
<i>Asymmetron lucayanum</i>	Branchiostomidae	NC_006464.1
<i>Epigonichthys maldivensis</i>	Epigonichthyidae	AB110093.1

Tabla 3.4, continuación

3.3. Resultados

3.3.1. Análisis filogenético del subfilo Urochordata/Tunicata

Los resultados del análisis Bayesiano y del método de Máxima Verosimilitud empleando secuencias nucleotídicas no permitieron establecer una relación filogenética clara entre los miembros de este subfilo. En el caso de Inferencia Bayesiana (Fig. 3.2) obtuvimos politomías entre los órdenes, y en el método de Máxima Verosimilitud politomías y valores de soporte de rama bajos (valores de “bootstrap” < 50%). Por el contrario, los resultados obtenidos a partir de secuencias aminoacídicas brindaron una mejor resolución en ambos métodos de construcción de árboles filogenéticos que presentaron topologías similares.

Los órdenes Aplousobranchia “sensu” Kott (1990), Phlebobranchia “sensu” Kott (1985), Stolidobranchia y Doliolida, presentaron valores de soporte de rama elevados en el análisis de Inferencia Bayesiana, mientras que en el método de Máxima Verosimilitud presentaron valores de bootstrap moderados (Fig. 3.3). El orden Aplousobranchia aparece como el orden más derivado con respecto a los extragrupos. Es de destacar que las dos especies de *Ciona*, representantes de la familia Cionidae, se encontraron en la base de este orden.

Por otro lado, en lo que respecta a las relaciones dentro de los tunicados, se encontró que Aplousobranchia se agrupó con Thaliacea y luego éstos se agruparon con Phlebobranchia, los cuales colectivamente constituyeron un grupo hermano de Stolidobranchia. Dichas agrupaciones estuvieron soportadas por valores de soporte de rama máximos en el análisis de Inferencia Bayesiana, y por valores moderados en el método de Máxima Verosimilitud (Fig. 3.3).

Por último, en ambos métodos de análisis se encontró a la clase Appendicularia en una posición basal (Fig. 3.3) como el grupo hermano del clado conformado por el resto de los tunicados, coincidiendo con los resultados obtenidos por Wada (1998), Swalla y col. (2000), Kurabayashi y col. (2003); Delsuc y col. (2006, 2008). Esta posición de Appendicularia con una longitud de rama tan larga, probablemente se deba a la alta tasa de evolución característica de su genoma (Delsuc y col. 2006, 2008).

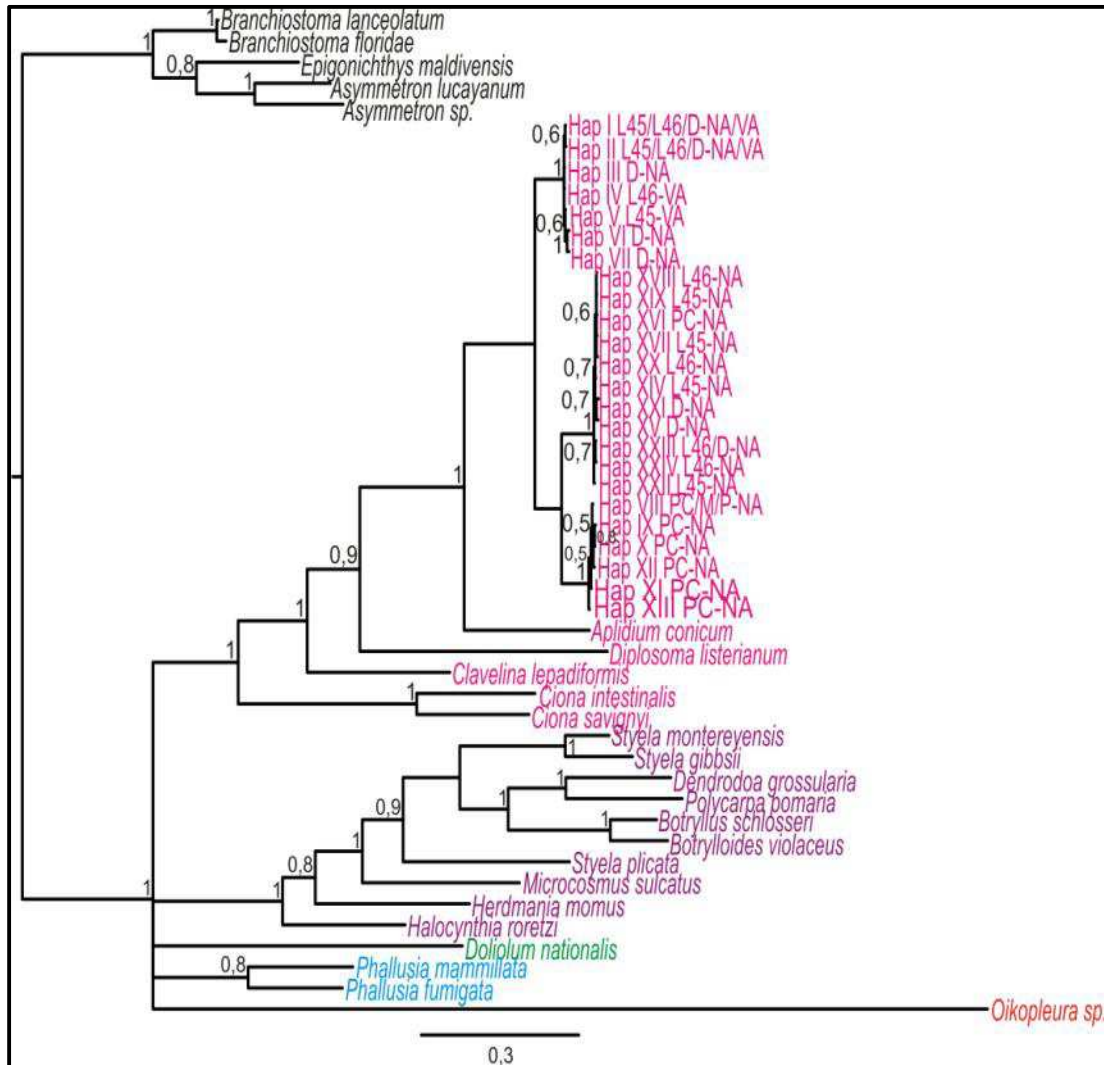


Figura 3.2. Árbol obtenido a partir de secuencias nucleotídicas de ambos genes combinados (COI+Citb). Los valores que se encuentran cercanos a los nodos representan las probabilidades posteriores > 50% resultantes del análisis Bayesiano. Los haplotipos de *Synoicum adareanum* se representan con la abreviación Hap, seguida del número de haplotipo, del sitio de muestreo y del morfotipo, D: Decepción, PC: Caleta Potter, L45: Low45, L46: Low46, M: Melchior, P: Palmer, NA: morfotipo naranja-amarillento, VA: morfotipo verde-amarillento. Los distintos colores indican los ordenes dentro de los Tunicados: Rosado: Aplousobranchia, Verde oscuro: Doliolida (clase Thaliacea), Celeste: Phlebobranchia, Morado: Stolidobranchia, Rojo: Appendicularia (clase Appendicularia). *Branchiostoma lanceolatum*, *Branchiostoma floridae*, *Asymmetron lucayanum*, *Asymmetron sp.* y *Epigonichthys maldivensis* fueron utilizados como extragrupos

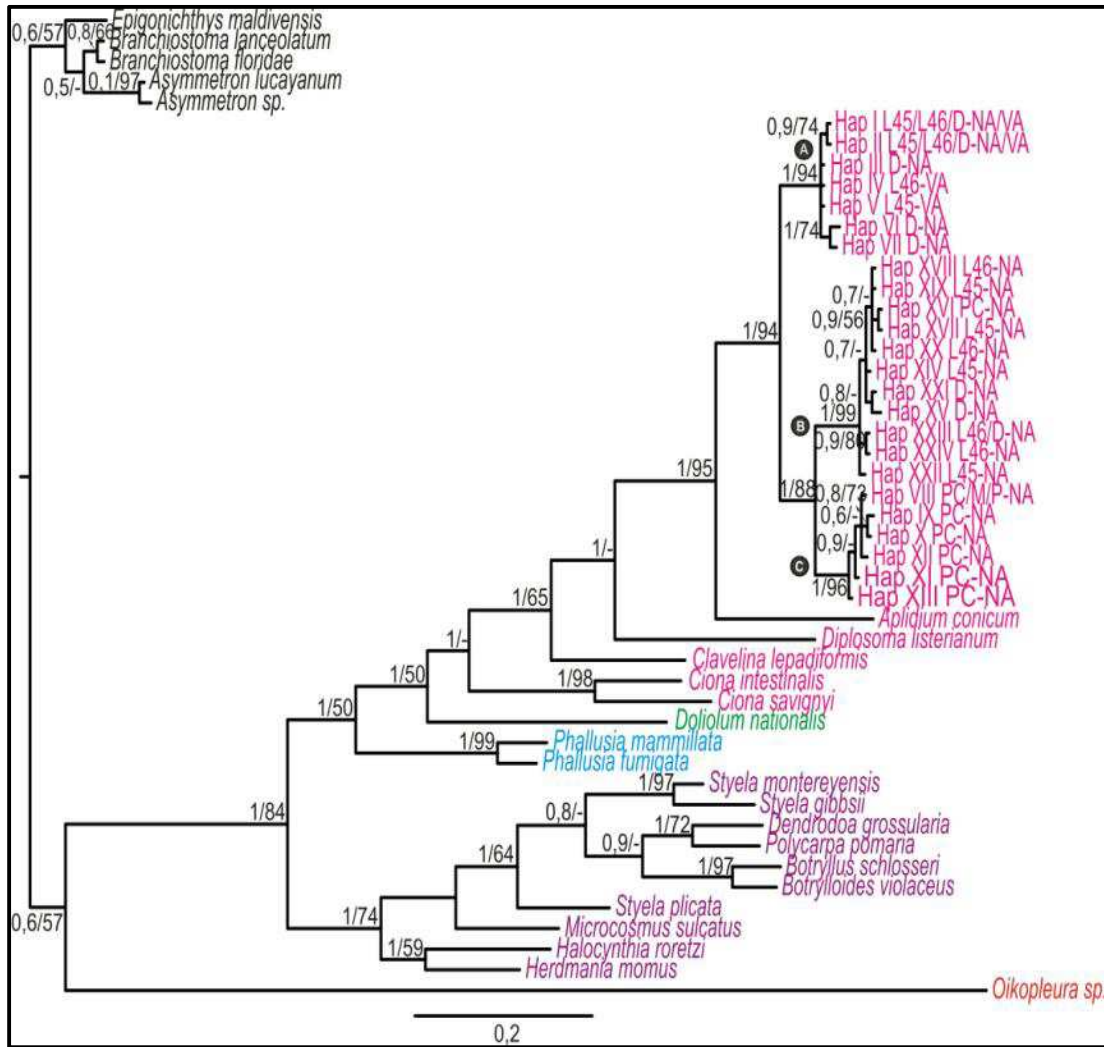


Figura 3.3. Árbol obtenido a partir de secuencias de aminoácidos traducidas de ambos genes combinados (COI+Citb). Los valores que se encuentran cercanos a los nodos, delante de la barra, representan las probabilidades posteriores > 50% resultantes del análisis Bayesiano, y aquellos que se encuentran detrás de la barra, indican los valores de “bootstrap” > 50% obtenidos del análisis de Máxima Verosimilitud. Las letras dentro de los círculos indican los clados considerados en el análisis (ver texto). Los haplotipos de *Synoicum adareanum* se representan con la abreviación Hap, seguida del número de haplotipo, del sitio de muestreo y del morfotipo, D: Decepción, PC: Caleta Potter, L45: Low45, L46: Low46, M: Melchior, P: Palmer, NA: morfotipo naranja-amarillento, VA: morfotipo verde-amarillento. Los distintos colores indican los ordenes dentro de los Tunicados: Rosado: Aplousobranchia, Verde oscuro: Doliolida (clase Thaliacea), Celeste: Phlebobranchia, Morado: Stolidobranchia, Rojo: Appendicularia (clase Appendicularia). *Branchiostoma lanceolatum*, *Branchiostoma floridae*, *Asymmetron lucayanum*, *Asymmetron sp.* y *Epigonichthys maldivensis* fueron utilizados como extragrupos

3.3.2. Relaciones filogenéticas entre familias del orden Aplousobranchia

Los resultados del análisis Bayesiano y del método de Máxima Verosimilitud empleando secuencias nucleotídicas, no permitieron establecer una relación filogenética clara entre los miembros de las familias del orden Aplousobranchia. En el caso de Inferencia Bayesiana la mayoría de las familias resultaron ser parafiléticas, y en el método de Máxima Verosimilitud se obtuvieron valores de soporte de rama bajos (valores de “bootstrap” < 50%). Los resultados obtenidos a partir de secuencias aminoacídicas fueron similares a los anteriores, ya que el árbol resultante del método de Máxima Verosimilitud también presentó valores de “bootstrap” bajos, y el árbol obtenido a partir de Inferencia Bayesiana presentó familias parafiléticas.

Sin embargo, cuando particionamos al gen COI por codón, obtuvimos mejores resultados, con valores de soporte de rama elevados y clados definidos. El método de construcción de árboles empleado fue el de Inferencia Bayesiana (Fig. 3.4). En el árbol obtenido, se encontró que la familia Polyclinidae fue monofilética y tuvo un soporte de rama alto (PP= 0,9). Esta familia fue un grupo hermano del clado constituido por la familia Polycitoridae (parafilética, con un valor de soporte de rama moderado, PP= 0,7) y la familia Pseudodistomidae (monofilética, con una PP= 0,7). A su vez, el clado constituido por las familias Polyclinidae, Polycitoridae y Pseudodistomidae, fue un grupo hermano del clado conformado por las familia Clavelinidae (cuyos miembros comparten un ancestro en común pero no necesariamente forman un grupo monofilético), la familia Didemnidae (monofilética, con un valor de PP= 1,0), y la familia Pycnoclavellidae (monofilética, con una PP= 0,9). Finalmente encontramos que la familia Cionidae, la más basal, apareció como un grupo hermano del resto de los aplousobranquios (PP= 1,0).

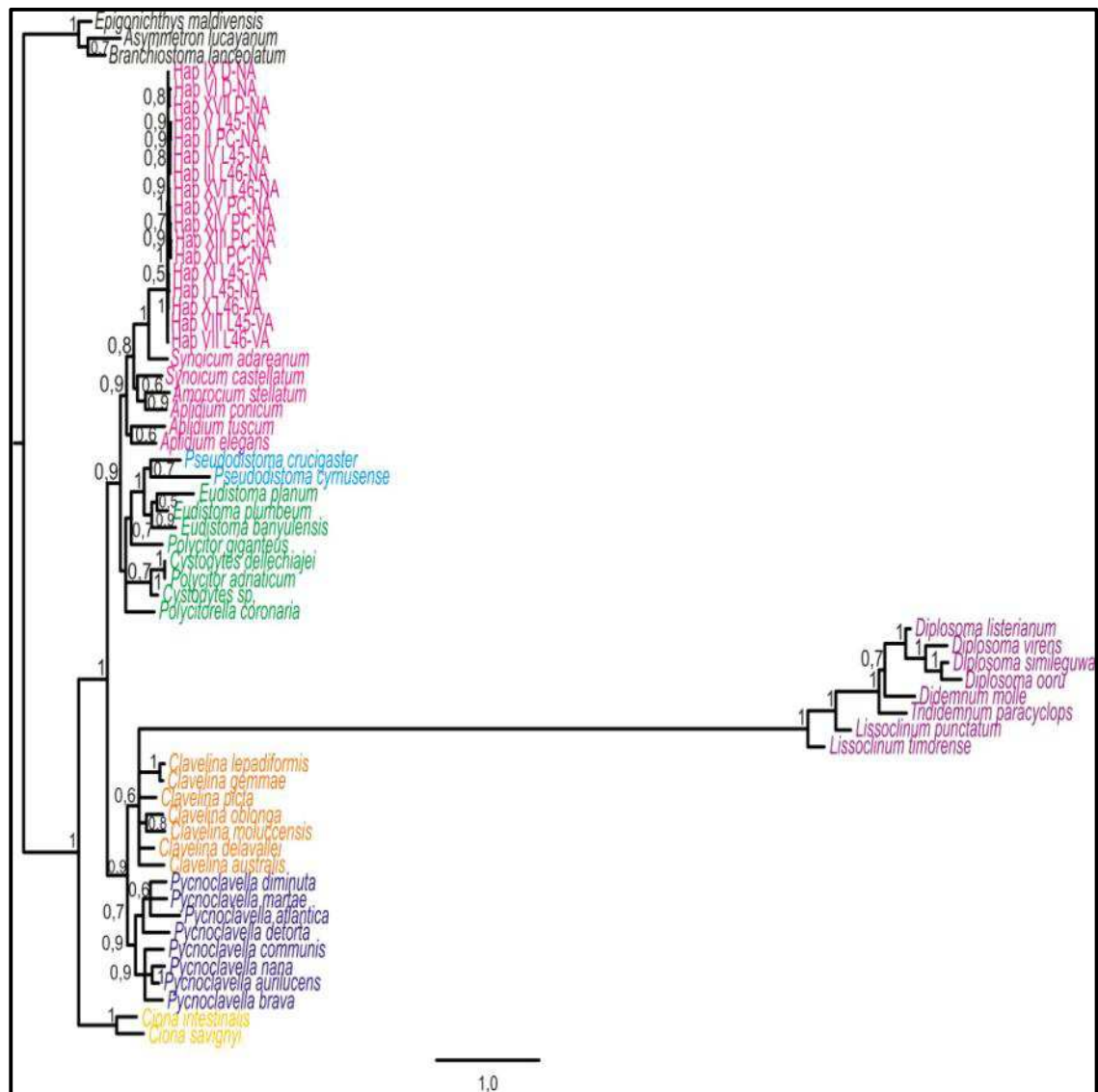


Figura 3.4. Árbol obtenido mediante Inferencia Bayesiana utilizando secuencias nucleotídicas del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) particionadas por codón. Los números que se encuentran cercanos a los nodos indican las probabilidades posteriores (cuando PP > 50%). Los haplotipos de *Synoicum adareanum* se representan con la abreviación Hap, seguida del número de haplotipo, del sitio de muestreo y del tipo de morfotipo, D: Decepción, PC: Caleta Potter, L45: Low45, L46: Low46, M: Melchior, P: Palmer, NA: morfotipo naranja-amarillento, VA: morfotipo verde-amarillento. Los distintos colores indican las familias dentro del orden Aplousobranchia, Rosado: Polyclinidae, Celeste: Pseudodistomidae, Verde: Polycitoridae, Morado: Didemnidae, Naranja: Clavelinidae, Violeta: Pycnoclavellidae, Amarillo: Cionidae. *Epigonichthys maldivensis*, *Branchiostoma lanceolatum* y *Asymmetron lucayanum* fueron utilizados como extragrupos

3.4. Discusión

3.4.1. Análisis filogenético del subfilo Urochordata/Tunicata

En general, nuestros resultados confirmaron que Ascidiacea, tal como se define en la actualidad, es un grupo parafilético que incluye a Thaliacea (Wada 1998; Stach y Turbeville 2002; Zeng y Swalla 2005). El análisis Bayesiano proveyó un soporte de rama máximo para cada uno de los respectivos grupos monofiléticos (Aplousobranchia, Thaliacea, Phlebobranchia y Stolidobranchia), excepto para Appendicularia, cuyo soporte de rama fue de PP= 0,6, mientras que el método de Máxima Verosimilitud presentó valores moderados para dichas relaciones.

Si bien los resultados aquí encontrados no coinciden completamente con ninguna de las cuatro hipótesis propuestas para explicar la relación entre las clases y órdenes de tunicados, encontramos que nuestros resultados apoyan parcialmente la tercera hipótesis de evolución de los tunicados (Fig. 3.1-c Yokobori y col. 2006; Zeng y col. 2006), donde Aplousobranchia es grupo hermano de Thaliacea, y éstos a su vez constituyen un grupo hermano de Phlebobranchia. Sin embargo, en nuestro caso, encontramos que la relación entre Aplousobranchia y Thaliacea se encontró en una posición más bien terminal, los flebobranquios en una posición central, y los apendicularios se encontraron en una posición basal. Los aplousobranquios aparecieron siempre como el grupo más derivado. Estos resultados nos estarían sugiriendo una nueva posible hipótesis de evolución de los tunicados. Resultados similares a los nuestros fueron encontrados por Tsagkogeorga y col. (2009) y Govindarajan y col. (2011), empleando secuencias del gen nuclear 18S rDNA. En ambos trabajos Thaliacea, Phlebobranchia y Aplousobranchia constituyeron un clado, aunque en el trabajo de Govindarajan y col. (2011) Thaliacea fue el grupo hermano del clado Aplousobranchia + Phlebobranchia, mientras que en el trabajo de Tsagkogeorga y col. (2009) los tres constituyeron una tricotomía. Si bien, en ambos estudios, la relación filogenética exacta de Aplousobranchia con respecto al resto de los miembros del clado no estuvo bien soportada, quedó claro que Ascidiacea es un grupo parafilético, en concordancia con nuestros resultados en base a dos genes mitocondriales. Govindarajan y col. (2011) consideraron que un posible motivo por el cual no pudieron establecer la relación exacta de los aplousobranquios podría ser que algunas de las secuencias de

aplousobranquios publicadas por Stach y Turbeville (2002), que incluyeron en sus análisis, podrían representar a contaminantes microbianos (Yokobori y col. 2006).

Por otro lado, al igual que Moreno y Rocha (2008), no pudimos confirmar el clado Enterogona (en el sentido de Garstang 1928; agrupando a Aplousobranchia con Phlebobranchia), pero sí descartar la primera, la segunda y la cuarta hipótesis de evolución de los tunicados (Fig. 3.1-a, 3.1-b, 3.1-d).

3.4.2. Relaciones filogenéticas entre familias del orden Aplousobranchia

En nuestro trabajo, el orden Aplousobranchia “sensu” Kott (1969, 1990, 1992, 2001) representado por seis familias, fue monofilético, encontrándose ambas especies de *Ciona* en la base del grupo (Fig. 3.2 y 3.3), a pesar de que tradicionalmente *Ciona* ha sido considerada como un género del orden Phlebobranchia (Tabla 3.2; Van Name 1945; Millar 1966; Monniot y Monniot 1972). La inclusión de *Ciona*, junto con otros géneros dentro de Aplousobranchia fue propuesto por Kott (1969, 1990, 1992, 2001), apoyado por los estudios de Hawkins y col. (1983) quienes observaron que *Ciona*, *Rhopalaea*, *Diazona* y *Tylobranchion* presentan el mismo estado de oxidación del vanadio (IV) que los aplousobranquios. Estudios basados en secuencias parciales del gen COI sugirieron también una relación cercana entre *Ciona* y Aplousobranchia (Turon y López-Legentil 2004).

La mayoría de las relaciones entre las especies dentro de Aplousobranchia sugirieron grupos monofiléticos con altos valores de soporte de ramas (con la única excepción de Clavelinidae) que pueden ser usados para organizar la disposición del nivel de familias de este orden (Fig. 3.4). A pesar de que en un comienzo las secuencias nucleotídicas y secuencias aminoacídicas empleadas para este análisis no nos permitieron establecer una relación filogenética clara entre los miembros de las familias del orden Aplousobranchia, la partición por codón del gen COI sí nos lo permitió. Por ello, a diferencia de estudios previos como el de Turon y López-Legentil (2004), quienes obtuvieron familias parafiléticas (Polyclinidae y Polycitoridae) y valores de soporte de

rama moderados, y los trabajos de Stach y Turbeville (2002) y de Tsagkogeorga y col. (2009), que emplearon pocos representantes de las familias del orden Aplousobranchia, nuestros estudios permitieron obtener una mejor aproximación de las posibles relaciones filogenéticas existentes entre las familias dentro de este orden.

En nuestro análisis, las especies de la familia Pycnoclavellidae formaron un clado monofilético y constituyeron el grupo hermano de Clavelinidae, lo cual apoya la clasificación efectuada por Kott (1990). Esta autora definió a la familia Pycnoclavellidae y la separó de Clavelinidae según el patrón de brotación: división abdominal en Pycnoclavellidae versus brotación estolónica terminal en Clavelinidae (Kott 1990). Al igual que en el trabajo de Turon y col. (2003), las especies de *Eudistoma* estuvieron cercanamente relacionadas con las del género *Pseudodistoma*, apoyando las observaciones efectuadas por Millar (1966) y Kott (1992), quienes sostuvieron que ambos géneros estaban relacionados ya que presentaban tres filas de estigmas branquiales, con la primera fila desviada en sentido anterior. En nuestro análisis, la familia Polycitoridae redefinida por Kott (1990) fue parafilética, ya que los miembros de *Eudistoma* estuvieron cercanamente relacionados con los representantes de la familia Pseudodistomidae, al compartir un ancestro en común.

Turon y col. (2003) encontraron que la familia Didemnidae, representada en su trabajo sólo por dos especies de los géneros *Diplosoma* y *Polysyncraton*, se ramificaron luego de Cionidae, cerca de la base de los aplousobranquios. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que Didemnidae, aquí representada por ocho especies y cuatro géneros (cuatro correspondieron al género *Diplosoma*, una al género *Didemnum*, una al género *Trididemnum*, y dos al género *Lissoclinum*), estuvo más cercanamente relacionada con la familia Clavelinidae. Además, en nuestro trabajo, Didemnidae se caracterizó por presentar una longitud de rama muy larga, tal como se ha reportado en trabajos previos. Yokobori y col. (2006) y Tsagkogeorga y col. (2009) han sugerido que esto podría deberse a que las secuencias del gen COI de los didémnidos evolucionarían a tasas extremadamente altas, produciendo ramas considerablemente largas en los árboles filogenéticos inferidos.

A diferencia de los resultados encontrados en los análisis de Turon y col. (2003), la inclusión de tres géneros y seis especies de la familia Polyclinidae permitió una mejor resolución de las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos de dicha familia. Turon y col. (2003) utilizaron seis especies del género *Aplidium*, que se ensamblaron mayormente de manera parafilética. Por otro lado, Moreno y Rocha (2008), utilizando datos morfológicos encontraron que *Aplidium* se encontraba en una rama aislada en el cladograma, por lo que propusieron la designación de una nueva familia para incluir a las especies de este género, denominada Aplidiidae. Sin embargo, nuestros resultados no justificarían esta nueva clasificación, ya que tanto *Synoicum* + *Amorocium* + *Aplidium* (fam. Polyclinidae según otros autores, ver Tabla 3.2) conformaron un mismo clado.

Por último, los miembros de la familia Cionidae se caracterizaron por presentar una posición cercana al resto de los aplousobranquios (como grupos hermanos) al igual que los resultados obtenidos por Turon y López-Legentil (2004), apoyando la clasificación propuesta por Kott (1969), en la que la familia Cionidae se encuentra dentro del orden Aplousobranchia.

CAPÍTULO 4:
ESTUDIO DE POSIBLES
ENDOSIMBIONTES DE *SYNOICUM*
ADAREANUM

4.1. Introducción

Los organismos sésiles como las esponjas, corales y ascidias, entre otros invertebrados marinos, dependen en gran medida de la producción de productos químicos como una forma de defensa contra enemigos naturales (competidores, depredadores; Taylor y col. 2007). Se han propuesto diversos papeles ecológicos para estos compuestos, incluyendo la defensa contra los depredadores (Pawlik y col. 1995; Chanas y col. 1997; Becerro y col. 2003), los competidores (Turon y col. 1996; Thacker y col. 1998; Engel y Pawlik 2000), organismos incrustantes (Sears y col. 1990; Willemsen 1994), y los microbios (Becerro y col. 1994; Newbold y col. 1999; Thakur y col. 2003). Hasta la fecha se han descrito por lo menos 200 metabolitos secundarios² diferentes a partir de organismos Antárticos (Amsler y col. 2001). A su vez, es probable que estos compuestos bioactivos sean utilizados por las especies Antárticas en una gran variedad de funciones ya que son importantes en la estructuración de las interacciones tanto a nivel individual, poblacional y de comunidad (McClintock y Baker 1997, 1998). Hoy en día se sabe que algunos de estos compuestos son producidos por bacterias simbiotes (Piel 2006).

Las asociaciones entre las bacterias y los invertebrados se extienden en un rango que va desde una simbiosis obligada y persistente a asociaciones ocasionales y transitorias (Hentschel y col. 2002; Taylory col. 2005; Enticknap y col. 2006). En algunas de estas relaciones se ha demostrado que las bacterias producen compuestos y/o metabolitos secundarios que son de gran utilidad para los anfitriones. Existen bacterias que producen enzimas hidrolíticas extracelulares que están involucradas en la degradación de sustratos orgánicos complejos, facilitándole numerosos nutrientes al hospedador. Un ejemplo de esta relación está dada por bacterias aeróbicas y heterotróficas del género *Endozoicomonas* y el gusano de aguas profundas *Osedax* (Goffredi y col. 2007). Quévrain y col. (2009) encontraron que bacterias marinas del género *Microbulbifer* asociadas con la esponja *Leuconia nivea* son capaces de generar parabenos naturales. Consideraron que estos parabenos podrían estar involucrados en las interacciones entre las bacterias asociadas

² Compuestos químicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en la reproducción o crecimiento del mismo. intervienen en las interacciones ecológicas entre el organismo y su ambiente

dentro de su anfitrión y/o podrían contribuir en la defensa química de las esponjas. Entre los productos naturales bioactivos (Blunt y col. 2007) generados por invertebrados marinos, se encuentra una gran variedad de compuestos con propiedades contra el cáncer, algunos de los cuales son utilizados en ensayos clínicos o preclínicos (Salomon y col. 2004). A partir del tunicado Antártico *S. adareanum*, por ejemplo, se han aislado y caracterizado varias clases de compuestos con actividad citotóxica, incluyendo los Ecdisteroides y Poliquétidos de tipo Macrólido (Diyabalanage y col. 2006; Miyata y col. 2007; Riesenfeld y col. 2008).

Los Ecdisteroides, identificados originalmente como hormonas de muda de artrópodos, han sido encontrados en una gran variedad de plantas y animales (Lafont y Horn 1989; Lafont y Mathieu 2007). Se cree que en las plantas, los Ecdisteroides desempeñan un papel de agente protector contra los insectos fitófagos, ya que se sabe que poseen actividades insecticidas (Slama y Lafont 1995; Adler y Grebenok 1999). A su vez, se ha demostrado que producen efectos fisiológicos y farmacológicos en los vertebrados (Bathori 2002). Aunque los Ecdisteroides son metabolitos que también están presentes en los invertebrados marinos (Kerr y Baker 1991), el número de estos compuestos que ha logrado ser aislado a partir de estos organismos es relativamente pequeño (Lafont y Mathieu 2007). Sin embargo, los pocos Ecdisteroides marinos reportados, se encuentran expandidos en un amplio rango taxonómico, incluyendo esponjas (Aiello y col. 1991; Costantino y col. 2000), corales (Su y col. 1985), nudibranchios (Williams y col. 1986), etc. Diabalanage y col. (2006) aislaron del tunicado *S. adareanum* el Ecdisteroide Dialusterol B. A su vez, Miyata y col. (2007) también aislaron de *S. adareanum* cinco nuevos Ecdisteroides (Hyousterones A, B, C, D y Abeohyousterone). La flora bentónica y la fauna de invertebrados en las comunidades de la Península Antártica Occidental al parecer son depredadas por crustáceos, especialmente por anfípodos. En consecuencia, se cree que los Ecdisteroides generados por *S. adareanum* podrían funcionar como defensa química contra los crustáceos predadores (Miyata y col. 2007).

Dentro de los Poliquétidos (compuestos fenólicos derivados de acetatos) de tipo Macrólido, se encuentra el Palmerólido A, el cual es un producto natural que posee notables propiedades biológicas, incluyendo una actividad selectiva y potente contra la línea celular de cáncer de melanoma UACC-62 (Nicolaou y col. 2007). Primariamente, posee una

potente acción inhibitoria de ciertas bombas de protones como la ATPasa vacuolar (V-ATPasa; Xie y col. 2004; Diyabalanage y col. 2006; Jiang y col. 2007). Recientemente Noguez y col. (2011) han aislado de *S. adareanum* cuatro nuevos Macrólidos bioactivos (Palmerólidos D, E, F y G), los cuales están estrechamente relacionados con el Palmerólido A. Riesenfeld y col. (2008) hipotetizaron que la biosíntesis del Palmerólido A se produce por una vía híbrida poliquétido sintetasa (PKS) / sintetasa peptídica no ribosomal (NRPS) en las bacterias que viven en asociación con *S. adareanum*. A su vez, las observaciones microscópicas que realizaron, revelaron una densa comunidad microbiana dentro de *S. adareanum*. Las clases Alfa y Gamma de proteobacterias representaron aproximadamente el 75% de los genes 16S ARNr aislados, y la mayoría de estas secuencias estuvieron relacionadas con los géneros *Pseudovibrio* y *Microbulbifer*. El 25% restante estuvo representando por bacterias de las clases Betaproteobacteria, Flavobacteria y Actinobacteria, y del filo Verrucomicrobia. Realizaron una búsqueda “Blast” en el Banco de Genes y encontraron que las bacterias asociadas a *S. adareanum* estuvieron más estrechamente relacionadas con bacterias de los ambientes marinos, incluyendo bacterias que se sabe que asocian con tunicados y esponjas. Si bien Riesenfeld y col. (2008) identificaron las comunidades bacterianas asociadas a *S. adareanum*, no tuvieron en cuenta cuál sería la función de cada una de las bacterias identificadas en relación a su asociación con *S. adareanum*.

El ARNr 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas (Brinkmeyer y col. 2003; Rodicio y Mendoza 2004; Taylor y col. 2007; Riesenfeld y col. 2008). Presenta una serie de características que hicieron que Woese (1987) la considerara como un cronómetro molecular definitivo: Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas (Rodicio y Mendoza 2004). El gen 16S ha sido empleado en el estudio de comunidades bacterianas de la Antártida (Saul y col. 2005; Aislabie y col. 2006;

Aislable y col. 2008-a; Aislable y col. 2008-b), como así también en el estudio de comunidades bacterianas en organismos marinos (Moran y col. 2005).

Objetivo que se abordará en el capítulo:

- Caracterizar la presencia de posibles endosimbiontes en los dos morfotipos de *S. adareanum* utilizando el gen 16S como marcador molecular

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

Se trabajó con el ADN genómico ya extraído de los ejemplares de *S. adareanum* estudiados en el Capítulo 2. Se utilizaron dos extracciones por morfotipo y localidad geográfica muestreada (un total de 16 extracciones).

Con el objetivo de evaluar la posible presencia de cianobacterias endosimbióticas en asociación con *S. adareanum*, se amplificó por PCR el gen ribosomal 16S, utilizando el set de cebadores específicos de cianobacterias 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 809R 5'-GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA-3' (Jungblut y col. 2005).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 50µl. Además de incluir el ADN molde de cada ejemplar (1µl de ADN sin diluir), cada reacción de PCR incluyó 5µl del "buffer" 10x de reacción [750mM Tris-HCl pH 8,8, 200mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween-20], 2,5µl MgCl₂ 25mM, 0,75µl de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; stock 20mM), 1,5µl de cada cebador (stock 10mM), 0,3µl de la Taq ADN Polimerasa (stock 5 U/µL; "Thermo Scientific" EP0402, Brasil) y ddH₂O para completar el volumen final. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Px2, "Thermo ELECTRON CORPORATION", con un programa de ciclado consistente en: 4 min a 94°C, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 seg, unión del cebador a 50°C por 30 seg, y extensión a 72°C por 50 seg, seguidos de un post-tratamiento de 7 min a 72°C, y un enfriamiento a 4°C). En cada reacción de PCR incluimos un control negativo para detectar posible

contaminación. Debido a que no se lograron amplificaciones exitosas con la reacción de amplificación anteriormente descrita, se hicieron modificaciones en la misma: se probaron distintas concentraciones de ADN (0,5 a 5µl), concentraciones de MgCl₂ (2,5 a 4µl), se varió el número de ciclos de reacción (28 a 34), y la temperatura de unión del cebador (45 a 55°C).

Por otro lado, para evaluar la presencia de otros posibles endosimbiontes bacterianos en *S. adareanum*, se utilizó un segundo set de cebadores para el gen ribosomal 16S, PB36 5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y PB38 5'-GKTACCTTGTTACGACTT-3' correspondientes a las posiciones 8-27 y 1492-1509 de *Escherichia coli* (Brosius y col. 1981). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 50µl. Además de incluir el ADN molde de cada ejemplar (1µl de ADN sin diluir), cada reacción de PCR incluyó 5µl del "buffer" 10x de reacción [750mM Tris-HCl pH 8,8, 200mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween-20], 2µl MgCl₂ 25mM, 0,75µl de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; stock 20mM), 1,5µl de cada cebador (stock 10mM), 0,3µl de la Taq ADN Polimerasa (stock 5 U/ µL; "Thermo Scientific" EP0402, Brasil) y ddH₂O para completar el volumen final. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Px2, "Thermo ELECTRON CORPORATION" con el siguiente programa de amplificación: 2 min a 94°C, 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 45 seg, unión del cebador a 55°C por 30 seg, y extensión a 72°C por 90 seg, seguido de un post-tratamiento de 7 min a 72°C, y un enfriamiento a 4°C. En cada reacción de PCR incluimos un control negativo para detectar posible contaminación.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1% P/V en "buffer" TBE 0,5x con 0,005µg/ml de bromuro de etidio) a un voltaje constante de 100V durante 2 horas, se visualizaron bajo UV y se fotografiaron. Luego, los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por "Macrogen" Inc. (Corea), empleando los mismos cebadores que se utilizaron para la reacción de PCR. Con el fin de descartar la amplificación de secuencias que no se correspondieran con bacterias, se secuenciaron ambas hebras y se compararon con secuencias del Banco de Genes utilizando la herramienta de búsqueda "Blast". Las secuencias se analizaron con el programa CHROMAS version 2.23 (McCarthy 1998) y fueron editadas manualmente. Posteriormente, se alinearon utilizando el programa MEGA versión 5 (Tamura y col.

2011). Una vez realizado el alineamiento, las secuencias de todos los individuos se colapsaron en haplotipos.

4.2.2. Análisis de datos

Los haplotipos obtenidos a partir del gen ribosomal 16S se compararon con las secuencias depositadas en el Banco de Genes, utilizando la herramienta de búsqueda “Blast”. Además, los haplotipos obtenidos se incluyeron en un árbol filogenético construido utilizando secuencias de bacterias previamente aisladas de *S. adareanum*, bacterias aisladas de otros invertebrados marinos, y bacterias presentes en ambientes marinos con el objetivo de inferir su ubicación taxonómica. Este análisis se realizó empleando secuencias nucleotídicas. Aplicamos dos métodos de construcción de árboles, uno basado en Inferencia Bayesiana y el otro en Máxima Verosimilitud. En los análisis incluimos 40 individuos con sus respectivas secuencias, de los cuales 24 representaron al filo Proteobacteria (10 a la clase Gammaproteobacteria, 10 a la clase Alphaproteobacteria y 4 a la clase Betaproteobacteria), 8 al filo Bacteroidetes, 2 al filo Actinobacteria, y 6 al filo Verrucomicrobia. Dentro de los 40 individuos, también incluimos a clones de bacterias no cultivables aisladas de *S. adareanum* por Riesenfeld y col. (2008), a pesar de que no indicaron la coloración o morfotipo de las colonias de *S. adareanum* con las que trabajaron. Por último, incorporamos 3 extragrupos: *Aquifex aeolicus*, *Aquifex pyrophilus* y *Thermus thermophilus*. Las secuencias para este estudio fueron tomadas del Banco de Genes (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Especies y Clones utilizados para los estudios filogenéticos, con sus respectivos números de acceso al Banco de Genes

ESPECIE / CLON	N° ACCESO
<i>Endozoicomonas elysicola</i> MKT110	NR_041264.1
<i>Endozoicomonas</i> sp. Ez289	HE818335.1
<i>Microbulbifer</i> sp. A4B17	AB243106.1
<i>Microbulbifer cystodytense</i>	AJ620879.1

ESPECIE / CLON	N° ACCESO
Clon Tun3b.A10	FJ169190.1
Gammaproteobacteria marina HTCC2143	AY386333.1
Clon Tun3b.B6	FJ169197.1
Clon Tun3b.F5	FJ169216.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WSM3457	JF423119.1
<i>Pseudomonas</i> sp.	AY277555.1
<i>Litoreibacter meonggei</i> MA1-1	JN021667.1
Clon JSS_12_567	JQ256805.1
Alfaproteobacteria clon L38	DQ860068.1
Alfaproteobacteria clon L48	DQ860067.1
Clon Tun3b.E2	FJ169210.1
Alfaproteobacteria HRG2	AY372909.1
<i>Pseudovibrio</i> sp. MKT94	AB112827.1
Alfaproteobacteria MBIC3368	AF218241.1
Clon Tun3b.A11	FJ169191.1
Clon Tun3b.D6	FJ169206.1
Clon SSW84Ap	EU592359.1
Clon 87 T0h-oil	FM242253.1
Clon Tun3b.G11	FJ169217.1
<i>Nitrosomonas</i> sp.BF16c57	AF386746.1
Clon B276_B9	EF092242.1
Clon C319a-R8C-A1	AY678503.1
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	AB078057.1
<i>Polaribacter</i> sp.Arctic97A-15	AF354620.1
Clon Tun3b.A1	FJ169189.1
<i>Reichenbachia agariperforans</i>	AB058919.1
Clon Tun3b.D1	FJ169200.1
Clon Tun3b.B4	FJ169196.1
Clon Tun3b.H11	FJ169219.1
Clon NH10_01	DQ372838.1
Clon Tun3b.F1	FJ169213.1
Clon Tun3b.A3	FJ169192.1
Clon I1ANG45	AJ633978.1

ESPECIE / CLON	N° ACCESO
<i>Diplosphaera colitermitum</i> TAV2	AY587232.1
Clon HG-B02178	JN409238.1
<i>Methylacidiphilum infernorum</i> V4	NR_074583.1
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5	NR_075056.1
<i>Aquifex pyrophilus</i> Kol5a	NR_029172.1
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	NR_037066.1

Tabla 4.1, continuación

4.3. Resultados

4.3.1. Análisis de datos

A pesar de las diversas variaciones efectuadas en las reacciones de amplificación para evaluar la presencia de cianobacterias endosimbióticas en asociación con *S. adareanum*, no logramos obtener amplificación alguna con el set de cebadores específico para estos organismos.

Por otro lado, a partir del segundo set de cebadores utilizados, logramos la amplificación de un total de 16 secuencias para el gen ribosomal 16S (16S ARNr) obtenidas de seis poblaciones de la región Antártica. La longitud final del fragmento luego del alineamiento fue de 1218 pares de bases (Fig. 4.1), teniendo en cuenta los gaps originados en el alineamiento. Se obtuvo un total de 14 haplotipos (Tabla 4.2), dos de los cuales fueron compartidos entre miembros del mismo morfotipo y localidad (Hap III y Hap IV).

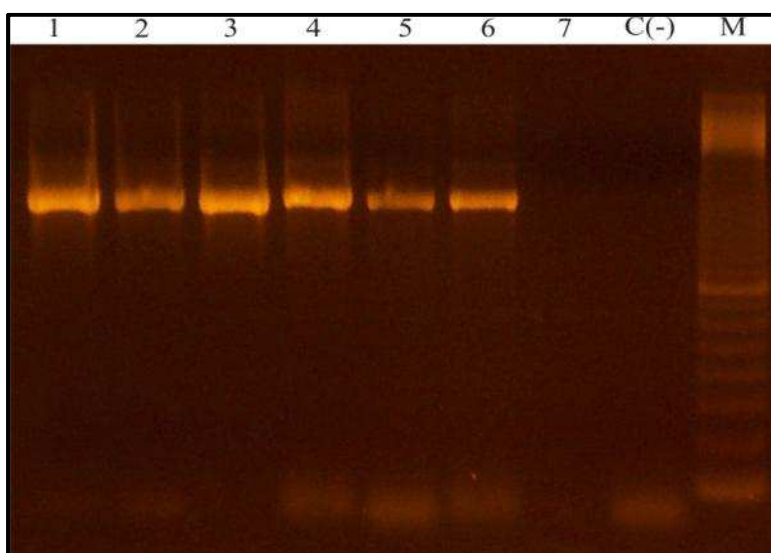


Figura 4.1. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa del fragmento de 1218 pb amplificado por PCR del gen ARNr 16S bacteriano (calles 1-7). En la calle 7 no se obtuvo amplificación; control negativo C(-); marcador de 100 pares de bases (M)

Tabla 4.2. Individuos, morfotipos y localidades de las colonias de *S. adareanum* a partir de las cuales fueron secuenciadas las bacterias aquí estudiadas. Los haplotipos identificados, secuencias vecinas más cercanas, filo o clase de la secuencia vecina más cercana y el porcentaje de identidad de las secuencias de 16S ARNr de las bacterias asociadas a *S. adareanum*. VA: morfotipo verde-amarillento, NA: naranja-amarillento. L46: Low46, L45: Low45, D: Decepción, PC: Caleta Potter, M: Melchior, P: Palmer

Individuo	Morfotipo	Localidad	Haplotipo	Secuencia vecina más cercana	Filo o Clase de la secuencia vecina más cercana	% de identidad
92	VA	L46	Hap I	<i>Endozoicomonas</i> sp. Ez289 partial 16S rRNA gene, isolate Ez289. AB196667.1	Gammaproteobacteria	97%
94	VA	L46	Hap II	<i>Endozoicomonas</i> sp. Ez289 partial 16S rRNA gene, isolate Ez289. AB196667.1	Gammaproteobacteria	97%
142	VA	L45	Hap III	<i>Endozoicomonas</i> sp. Ez289 partial 16S rRNA gene, isolate Ez289. AB196667.1	Gammaproteobacteria	97%
147	VA	L45	Hap III	<i>Endozoicomonas</i> sp. Ez289 partial 16S rRNA gene, isolate Ez289. AB196667.1	Gammaproteobacteria	97%
157	NA	L45	Hap IV	<i>Litoreibacter meonggei</i> strain	Alfaproteobacteria	97%

Individuo	Morfotipo	Localidad	Haplotipo	Secuencia vecina más cercana	Filo o Clase de la secuencia vecina más cercana	% de identidad
				MA1-1 16S ribosomal RNA, partial sequence. JN021667.1		
159	NA	L45	Hap IV	<i>Litoreibacter meonggei</i> strain MA1-1 16S ribosomal RNA, partial sequence. JN021667.1	Alfaproteobacteria	97%
46	NA	D	Hap V	<i>Litoreibacter meonggei</i> strain MA1-1 16S ribosomal RNA, partial sequence. JN021667.1	Alfaproteobacteria	96%
47	NA	D	Hap VI	<i>Litoreibacter meonggei</i> strain MA1-1 16S ribosomal RNA, partial sequence. JN021667.1	Alfaproteobacteria	96%
114	NA	L46	Hap VII	<i>Litoreibacter meonggei</i> strain MA1-1 16S ribosomal RNA, partial sequence. JN021667.1	Alfaproteobacteria	97%
118	NA	L46	Hap VIII	<i>Litoreibacter meonggei</i> strain MA1-1 16S ribosomal RNA, partial sequence. JN021667.1	Alfaproteobacteria	97%
2	NA	PC	Hap IX	Uncultured bacterium clone SSW84Ap 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. EU592359.1	Betaproteobacteria	93%
4	NA	PC	Hap X	Uncultured bacterium clone SSW84Ap 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. EU592359.1	Betaproteobacteria	93%
Mel-1	NA	M	Hap XI	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone B276_B9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. EF092242.1	Bacteroidetes	95%
Mel-2	NA	M	Hap XII	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone B276_B9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. EF092242.1	Bacteroidetes	95%

Individuo	Morfotipo	Localidad	Haplotipo	Secuencia vecina más cercana	Filo o Clase de la secuencia vecina más cercana	% de identidad
Pal-1	NA	P	Hap XIII	Uncultured bacterium clone Tun3b.F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. FJ169213.1	Verrucomicrobia	99%
Pal-2	NA	P	Hap XIV	Uncultured bacterium clone Tun3b.F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. FJ169213.1	Verrucomicrobia	99%

Tabla 4.2, continuación

Luego de realizar una búsqueda con la herramienta “Blast” en el Banco de Genes, encontramos que el 75% de las secuencias obtenidas en este estudio presentó un porcentaje de identidad elevado con el filo Proteobacteria, dentro del cual el 37,5% se relacionó con la clase Alfaproteobacteria, el 25% con la clase Gammaproteobacteria y el 12,5% con la clase Betaproteobacteria. Del 25% restante, el 12,5% se vinculó con el filo Bacteroidetes (clase Flavobacteria y Cytophagia) y el 12,5% con el filo Verrucomicrobia.

Por otro lado, la búsqueda “Blast” reveló que las bacterias asociadas a los dos morfotipos de *S. adareanum* presentaron una similitud de secuencia elevada con bacterias presentes en ambientes marinos, incluyendo aquellas que se sabe que se encuentran asociadas a tunicados y esponjas, entre otros invertebrados marinos. A su vez, varios miembros de la comunidad microbiana de los ejemplares de *S. adareanum* analizados en este trabajo se vincularon con cepas bacterianas (por ejemplo *Endozoicomonas elysicola* y *Litoreaibacter meonggei*) que ya han sido aisladas y caracterizadas en cultivos puros. Mientras que las bacterias asociadas a *S. adareanum* que se relacionaron con linajes representados principalmente por secuencias ambientales, fueron escasas (Tabla 4.2).

Los resultados obtenidos a partir de los métodos de Máxima Verosimilitud y de Inferencia Bayesiana mostraron que las bacterias asociadas con *S. adareanum* se agruparon en seis clados diferentes, todos con soportes de rama elevados (Fig. 4.2).

El clado A (Fig. 4.2, color rosado), representado por bacterias de la clase Gammaproteobacteria, estuvo soportado por valores de soporte de rama elevados (Probabilidad Posterior= 1 y “bootstrap”= 97%). Este clado consiste en dos subclados. En

uno de ellos se encuentran las bacterias asociadas al morfo verde amarillento de *S. adareanum*, correspondientes a las localidades de Low45 y Low46 (Hap I, Hap II y Hap III) y miembros del género *Endozoicomonas* (*Endozoicomonas elysicola* y *Endozoicomonas sp.*), que suelen encontrarse en asociación con invertebrados marinos (Zielinski y col. 2009; Jensen y col. 2010), formaron un subclado sostenido por valores de soporte de rama elevados (PP= 1 y “bootstrap”= 100%). El otro subclado, que presentó un soporte de rama moderado (PP= 0,9 y “bootstrap”= 58%), estuvo conformado por microorganismos asociados a invertebrados marinos del género *Microbulbifer* (*Microbulbifer sp.* y *Microbulbifer cystodytense*; Peng y col. 2006; Quévrain y col. 2009), dos miembros del género *Pseudomonas*, *Pseudomonas sp.* y *Pseudomonas fluorescens*, que suelen asociarse a esponjas (Santos y col. 2010), una Gammaproteobacteria (HTCC2143) hallada en ambientes marinos (Cho y Giovannoni 2004), y tres clones (Tun3b.A10, Tun3b.B6 y Tun3b.F5) de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum* previamente descritas por Riesenfeld y col. (2008).

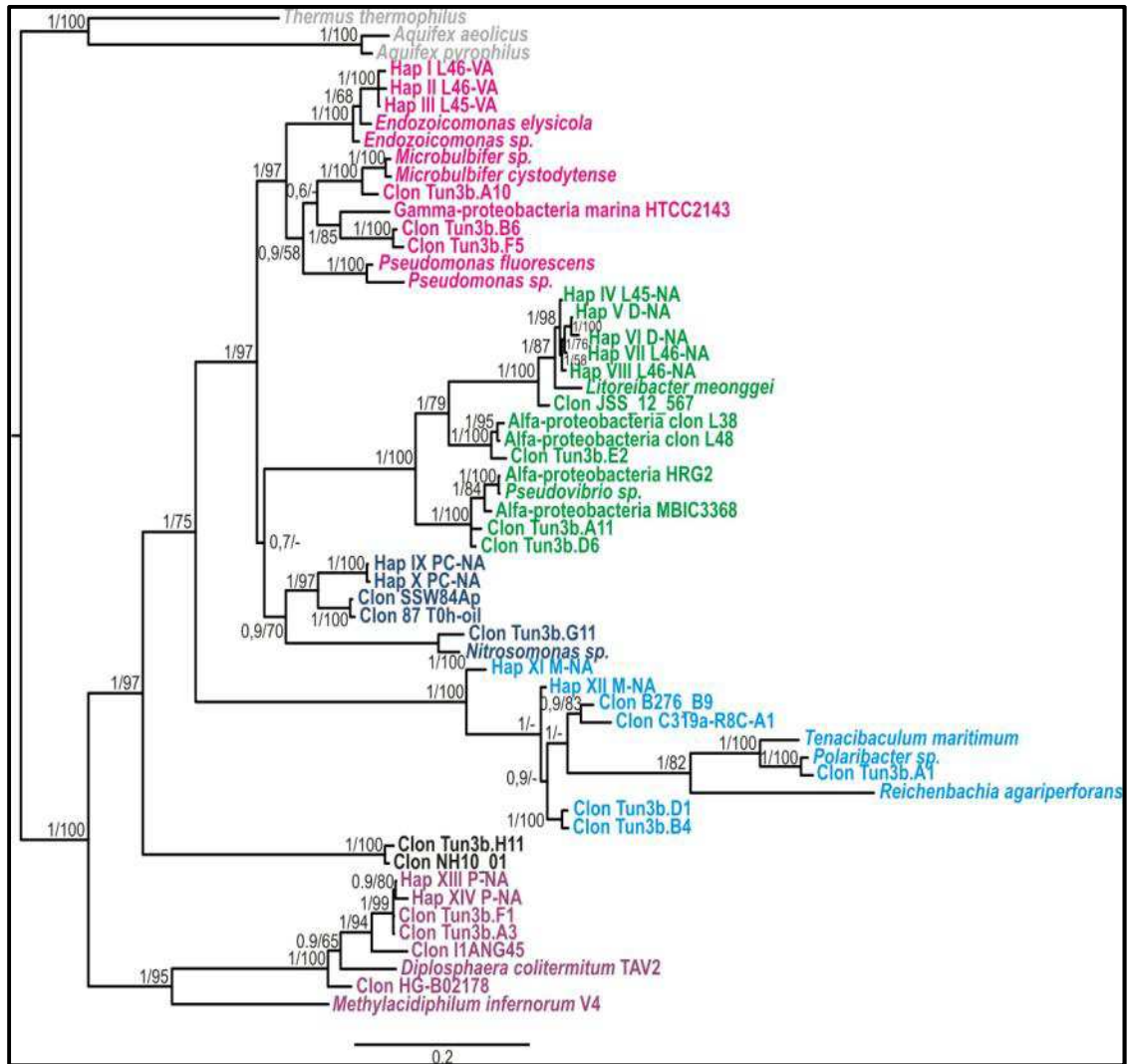


Figura 4.2. Árbol filogenético obtenido a partir de secuencias nucleotídicas del gen ribosomal 16S. Los valores que se encuentran cercanos a los nodos, delante de la barra, representan las probabilidades posteriores > 50% resultantes del análisis Bayesiano, y aquellos que se encuentra detrás de la barra, indican los valores de “bootstrap” > 50% obtenidos del análisis de Máxima Verosimilitud. Los haplotipos de las bacterias asociadas con *Synoicum adareanum* se representan con la abreviación Hap, seguida del número de haplotipo, del sitio de muestreo y del morfotipo, D: Decepción, PC: Caleta Potter, L45: Low45, L46: Low46, M: Melchior, P: Palmer, NA: morfotipo naranja-amarillento, VA: morfotipo verde-amarillento. Los distintos colores indican diferentes clados: Rosado: clado A (clase Gammaproteobacteria), Verde: clado B (clase Alfabroteobacteria), Azul: clado C (clase Betaproteobacteria), Celeste: clado D (filo Bacteroidetes), Negro: clado E (filo Actinobacteria), Morado: clado F (filo Verrucomicrobia). *Thermus thermophilus*, *Aquifex aeolicus* y *Aquifex pyrophilus* fueron utilizados como extragrupos

El clado B (Fig. 4.2, color verde), conformado por bacterias de la clase Alfaproteobacteria, estuvo soportado por valores de soporte de rama elevados (Probabilidad Posterior= 1 y “bootstrap”= 100%). Dentro de este clado encontramos tres subclados. Las bacterias asociadas con el morfo naranja-amarillento de *S. adareanum*, correspondientes a las localidades de Low45, Low46 y Decepción (Hap IV, Hap V, Hap VI, Hap VII y Hap VIII), la especie *Litoreibacter meonggei*, que ha sido encontrada y aislada previamente de la ascidia *Halocynthia roretzi* (Kim y col. 2009; Kim y col. 2012), y un clon (JSS_12_567) de una bacteria no cultivable que suele encontrarse en ambientes marinos (Lenk y col. 2012), formaron uno, asociado a otro subgrupo que estuvo conformado por dos clones de bacterias no cultivables asociadas al tunicado *Cystodytes dellechiaiei* (L38 y L48; Martínez-García y col. 2007) y el clon Tun3b.E2 de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008). Ambos subgrupos, a su vez, se relacionaron con otro subclado que estuvo constituido por dos clones de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum* (Tun3b.D6 y Tun3b.A11; Riesenfeld y col. 2008), dos Alfaproteobacterias (MBIC3368 y HRG2) aisladas de las esponjas *Aplysina aerophoba* y *Rhabdastrella globostellata* (Hentschel y col. 2001; Lafi y col. 2005) y un miembro del género *Pseudovibrio*. Los integrantes de este género generalmente se asocian con invertebrados marinos, incluyendo tunicados (Fukunaga y col. 2006; Sertan-de Guzman y col. 2007; Riesenfeld y col. 2008), esponjas (Hentschel y col. 2001; Lafi y col. 2005; Enticknap y col. 2006; Wichels y col. 2006; O’Halloran y col. 2011; O’Halloran y col. 2013) y corales (Koren y Rosenberg 2006; Radjasa y col. 2007), aunque varios estudios también han reportado la presencia de estas bacterias en el mar (Shieh y col. 2004; Agogué y col. 2005; Hosoya y Yokota 2007). La relación entre ambos subclados estuvo fuertemente soportada (PP= 1 y “bootstrap”= 100%).

El clado C (Fig. 4.2, color azul), constituido por bacterias de la clase Betaproteobacteria, estuvo soportado por valores de soporte de rama moderados (PP= 0,9 y “bootstrap”= 70%). Este clado estuvo conformado por dos secuencias de 16S de bacterias asociadas al morfo naranja-amarillento de *S. adareanum* de la localidad de Caleta Potter (Hap IX y Hap X), junto con el clon SSW84Ap de una bacteria no cultivable presente en ambientes marinos (Dillon y col. 2009) y el clon T0h-oil de una proteobacteria no cultivable también presente en ambientes marinos (Païssé y col. 2010) (PP= 1 y

“bootstrap”= 97%). Este subclado, a su vez, fue un grupo hermano del subclado constituido por el clon Tun3b.G11 de bacterias no cultivables de *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008) y un miembro de la especie *Nitrosomonas sp.*, el cual ha sido aislado y detectado a partir de aguas superficiales y de sedimentos de los sistemas marinos (Purkhold y col. 2003; O'Mullan y Ward 2005; Ward y col. 2007).

El clado D (Fig. 4.2, color celeste), representado por bacterias del filo Bacteroidetes, estuvo soportado por valores de soporte de rama máximos (PP= 1 y “bootstrap”= 100%). Este clado estuvo conformado por el clon C319a-R8C-A1 de una bacteria no cultivable aislada de sedimentos de estuarios (Nielsen y col. 2004), el clon B276_B9 de una bacteria no cultivable asociada a la esponja *Axinella corrugata* (sin publicar), un miembro de la especie *Tenacibaculum maritimum*, la cual ha sido encontrada en erizos de mar (Tajima y col. 1997; Balakirev y col. 2008) como así también en numerosos teleósteos marinos (Bernardet y col. 1990; Cepeda y Santos 2002; Toranzo y col. 2005; El-Galil y Hashem 2012), un miembro de *Polaribacter sp.* no cultivable aislado del bacterioplancton del Océano Ártico (*Polaribacter Arctic97A-15*; Bano y Hollibaugh 2002), un clon (Tun3b.A1) de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008) y un miembro de la especie *Reichenbachia agariperforans* (Nedashkovskaya y col. 2003), el cual ha sido aislado de una muestra de agua marina recolectada en la Bahía Amursky del Golfo de Pedro el Grye, en el mar del Japón. Mientras que el otro subclado estuvo constituido por los clones Tun3b.D1 y Tun3b.B4 de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008). Dos secuencias del gen 16S obtenidas de dos bacterias aisladas del morfo naranja-amarillento de *S. adareanum* de la localidad de Melchior (Hap XI y Hap XII) se unieron en la base de este clado.

El clado E (Fig. 4.2, color negro), presentó un valor máximo de soporte de rama tanto en el análisis Bayesiano como en el de Máxima Verosimilitud (PP= 1 y “bootstrap”= 100%), y estuvo conformado por un miembro del filo Actinobacteria (el clon NH10_01 de una bacteria no cultivable aislada del Océano Pacífico Oriental; Morris y col. 2006) y por el clon Tun3b.H11 de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008). Ninguna de las secuencias descriptas en este trabajo se asoció a este grupo.

El clado F (Fig. 4.2, color morado), conformado por bacterias del filo Verrucomicrobia, estuvo soportado por valores de soporte de rama elevados (PP= 1 y “bootstrap”= 95%). Dentro de este clado se agruparon dos secuencias del gen 16S obtenidas de dos bacterias aisladas del morfo naranja-amarillento de *S. adareanum* de la localidad de Palmer (Hap XIII y Hap XIV), estrechamente asociadas a dos clones (Tun3b.F1 y Tun3b.A3) de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008), el clon IIANG45 de una bacteria no cultivable que fue aislada del interior de las glándulas accesorias nidamentales del calamar *Idiosepius pygmaeus* (Pichon y col. 2005), un integrante de la cepa TAV2 de la especie *Diplosphaera colitermitum*, la cual ha sido encontrada en el interior de los intestinos de termitas comedoras de madera (Stevenson y col. 2004), el clon HG-B02178 de una bacteria no cultivable encontrada en el suelo de la rizosfera de pepinos (sin publicar) y un integrante de la cepa V4 de la especie *Methylokorus infernorum*, la cual fue aislada de una muestra de suelo de un campo geotérmico que emite metano en la Isla Norte de Nueva Zelanda (Hou y col. 2008). Las relaciones dentro del clado presentaron soportes de rama moderados, con valores de PP > 0,9 en el análisis Bayesiano, y valores de “bootstrap” > 65% en el análisis de Máxima Verosimilitud.

4.4. Discusión

Los 14 haplotipos bacterianos encontrados para el gen 16S, asociados a *S. adareanum*, no correspondieron a un único tipo de bacteria. Estos haplotipos pudieron identificarse como cercanamente relacionados a especies de 4 filos bacterianos diferentes.

Las bacterias asociadas al morfo verde-amarillento de *S. adareanum* de las localidades Low45 y Low46, estuvieron estrechamente relacionadas con *Endozoicomonas* sp. y *Endozoicomonas elysicola*, dentro del clado conformado por bacterias de la clase Gammaproteobacteria. Esta cercanía filogenética nos estaría indicando que probablemente las bacterias asociadas al morfo verde-amarillento de *S. adareanum* corresponderían, al igual que los miembros del género *Endozoicomonas*, al orden Oceanospirillales y a la familia Hahellaceae. La mayoría de las bacterias de esta familia se encuentran asociadas

con invertebrados marinos (Zielinski y col. 2009; Jensen y col. 2010), por ejemplo con gorgonias tanto del Ártico como del Caribe (*Alcyonium antarcticum* y *Gorgonia ventalina* respectivamente; Webster y Bourne 2007; Sunagawa y col. 2010). Los integrantes del orden Oceanospirillales se caracterizan por producir enzimas hidrolíticas extracelulares que están involucradas en la degradación de varios sustratos orgánicos complejos, que proporcionan una potente integración nutricional con el hospedador. Un ejemplo de esto es la relación de bacterias aeróbicas y heterotróficas del género *Endozoicomonas* y el gusano de aguas profundas *Osedax* (Goffredi y col. 2007). Este gusano, excava en los huesos de los cadáveres de ballenas grises (*Eschrichtius robustus*) para llegar a la médula de la que se alimenta. Se cree que las bacterias descomponen los compuestos orgánicos en el hueso de la ballena, proveyendo nutrientes al gusano (Rouse y col. 2004; Brenner y col. 2005). Microorganismos del género *Endozoicomonas* también han sido encontrados en esponjas (muchas veces bajo el nombre de *Spongiobacter*; Thiel y col. 2007; Mohamed y col. 2008; Nishijima y col. 2013), en bivalvos (Zielinski y col. 2009; Jensen y col. 2010), ascidias (Martínez-García y col. 2007), un nudibranquio (Kurahashi y Yokota 2007), poliquetos (Goffredi y col. 2007), anémonas de mar (Schuett y col. 2007; Du y col. 2010), estrellas de mar (Choi y col. 2010), corales escleractínidos (Bourne y Munn 2005; Bourne y col. 2008; Hansson y col. 2009; Littman y col. 2009; Raina y col. 2009; Sunagawa y col. 2010, Yang y col. 2010; Speck y Donachie 2012), diferentes gorgonias tropicales y otros corales blandos (Webster y Bourne 2007; Sunagawa y col. 2010). En el caso de las bacterias asociadas a corales, se infiere que la heterotrofia de Hahellaceae ayudaría al hospedador con el suministro de nutrientes macromoleculares que no son directamente asimilables bajo una forma compleja. A su vez, la identificación de agregados de Gammaproteobacterias en la capa de tejido gastrodérmico en la cavidad digestiva de varios corales formadores de arrecifes sugiere que estas bacterias podrían desempeñar un papel importante en la dieta del coral (Ainsworth y Hoegh-Guldberg 2009). De esta manera, considerando que las bacterias asociadas al morfo verde-amarillento de *S. adareanum* se encontrarían dentro del orden Oceanospirillales, se podría inferir que estas bacterias participarían en el proceso metabólico de compuestos orgánicos complejos de *S. adareanum*, facilitándole el suministro de nutrientes macromoleculares (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Morfotipo y localidades de las colonias de *S. adareanum* a partir de las cuales fueron secuenciadas las bacterias aquí estudiadas y/o clones de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum*. Identificación de filo o clase a la que estas bacterias podrían corresponder y sus posibles funciones. VA: verde-amarillento, NA: naranja-amarillento. L46: Low46, L45: Low45, D: Decepción, PC: Caleta Potter, M: Melchior, P: Palmer

MORFOTIPO, LOCALIDAD Y/O CLONES	FILO O CLASE	FUNCIONES
VA (L45 y L46)	Gammaproteobacteria	Metabolizar compuestos orgánicos complejos
Tun3b.A10	Gammaproteobacteria	Celulolíticos, defensa química <i>S. adareanum</i> y síntesis de metabolitos secundarios bioactivos
Tun3b.B6 y Tun3b.F5	Gammaproteobacteria	Síntesis de metabolitos secundarios bioactivos
NA (L45, L46 y Decepción)	Alfaproteobacteria	Síntesis de metabolitos secundarios bioactivos
Tun3b.A11 y Tun3b.D6	Alfaproteobacteria	Defensa química de <i>S. adareanum</i>
NA (CP) y Tun3b.G11	Betaproteobacteria	Proceso de nitrificación de <i>S. adareanum</i>
NA(M), Tun3b.A1, Tun3b.D1 y Tun3b.B4	Bacteroidetes	Síntesis de metabolitos secundarios bioactivos y actividad antioxidante
Tun3b.H11	Actinobacteria	Síntesis de metabolitos secundarios bioactivos
NA(P), Tun3b.F1 y Tun3b.A3	Verrucomicrobia	Proceso digestivo y defensa química de <i>S. adareanum</i>

Dentro del clado A también se situó la secuencia bacteriana Tun3b.A10 aislada de *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008), la cual estuvo cercanamente relacionada a dos miembros del género *Microbulbifer*. Los integrantes del género *Microbulbifer* tienden a ser moderadamente halófilos, a menudo son aislados de muestras de agua de mar (Yoon y col. 2003, 2004) y ocasionalmente de invertebrados marinos (Peng y col. 2006). *Microbulbifer* sp. fue descubierta originalmente en cultivos de enriquecimiento realizados a partir de efluentes de plantas de celulosa volcados al Océano y es capaz de hidrolizar polisacáridos complejos (González y col. 1997). Una posible justificación de la estrecha relación existente entre las dos especies de *Microbulbifer* y el clon Tun3b.A10 estaría dada por el

hecho de que *S. adareanum* se encuentra cubierta externamente por una túnica constituida principalmente por tunicina un polisacárido muy similar a la celulosa (Matthysse y col. 2004) y, algunos miembros del linaje *Microbulbifer* son celulolíticos (González y col. 1997; Ekborg y col. 2005) (Tabla 4.3). Por otro lado, Quévrain y col. (2009) encontraron que las bacterias marinas del género *Microbulbifer* asociadas a la esponja calcárea *Leuconia nivea*, son capaces de producir parabenos naturales. Estos parabenos podrían desempeñar un papel importante en las interacciones entre las bacterias asociadas dentro de su anfitrión (la esponja) y/o podrían contribuir en la estrategia de defensa química de las esponjas contra las bacterias ambientales Gram+ oportunistas. Si bien los estudios llevados a cabo hasta la fecha indican que microorganismos del género *Microbulbifer* producen parabenos en esponjas, no deberíamos descartar la posibilidad de que los mismos puedan ser generados también en *S. adareanum*, contribuyendo así en el proceso de defensa química de esta ascidia (Tabla 4.3).

Otro microorganismo que se situó dentro del clado A, y se relacionó con dos clones de bacterias no cultivables de *S. adareanum* (Tun3b.B6 y Tun3b.F5; Riesenfeld y col. 2008), fue un miembro de la cepa HTCC2143 del grupo de Gammaproteobacterias marinas oligotróficas, que en su genoma presenta genes para los módulos de poliquétido sintasa y proteínas relacionadas. Esta relación estaría apoyando la hipótesis propuesta por Riesenfeld y col. (2008) de que la biosíntesis del Palmerólido A se produce por una vía híbrida poliquétido sintesasa (PKS) / sintetasa peptídica no ribosomal (NRPS) en las bacterias que viven en asociación con *S. adareanum*. Es decir que es posible que parte de las bacterias involucradas en la síntesis directa de los Palmerólidos pertenezcan a la clase Gammaproteobacteria (Tabla 4.3).

Las bacterias asociadas al morfo naranja-amarillento de *S. adareanum* de las localidades de Low45, Low46 y Decepción estuvieron estrechamente relacionadas con *Litoreibacter meonggei* (Clado B), por lo que se encontrarían, al igual que esta especie, dentro de la familia Rhodobacteraceae. Esta familia se caracteriza por tener un estilo de vida generalista (Moran y col. 2004) y una gran versatilidad metabólica, siendo capaces de utilizar recursos variados y de responder a incrementos en la concentración de nutrientes, como así también están involucrados en la producción de carbono marino y en procesos biogeoquímicos. Estas características explican su abundancia en las zonas costeras, y su

asociación con *blooms* de algas (Buchan y col. 2005). A su vez, los integrantes de esta familia han sido encontrados en aguas costeras y/o polares, especialmente en simbiosis con algas, tapetes microbianos, en sedimentos o junto con vertebrados e invertebrados (Buchan y col. 2005; Wagner-Döbler y Biebl 2006; Riedel y col. 2013). Otra característica interesante de las bacterias de este grupo es que pueden producir antibióticos o metabolitos secundarios bioactivos, que pueden estar involucrados en efectos patogénicos o probióticos (Wagner-Döbler y Biebl 2006; Seyedsayamdost y col. 2011). La especie *L. meonggei* también ha sido encontrada en la ascidia *Halocynthia roretzi*. Considerando las características que presenta la familia Rhodobacteraceae, podríamos conjeturar que las bacterias asociadas a *S. adareanum* también participarían en la síntesis de metabolitos secundarios bioactivos.

Los clones Tun3b.A11 y Tun3b.D6 de bacterias no cultivables de *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008) se relacionaron filogenéticamente con *Pseudovibrio sp.* MKT94 y las Alfaproteobacterias MBIC3368 y HRG2. Hentschel y col. (2001) y Lafi y col. (2005) encontraron que estas Alfaproteobacterias se caracterizaron por brindar actividad antimicrobiana a las esponjas. A su vez, Santos y col. (2010) encontraron que miembros de *Pseudovibrio sp.*, aislados de diferentes esponjas, también presentaron actividades antimicrobianas estables. Evidencia reciente sugiere que en las esponjas, las células de *Pseudovibrio* se transmiten verticalmente entre las generaciones a través de la larva de la esponja (Enticknap y col. 2006), aunque la naturaleza de la relación simbiótica aún no se conoce. En el caso de los tunicados, Riesenfeld y col. (2008) encontraron que las secuencias relacionadas con *Pseudovibrio* constituyeron una gran proporción (aproximadamente el 43%) de la biblioteca de clones de 16S ARNr de *S. adareanum*, sugiriendo un potente enriquecimiento selectivo de estas bacterias en el ambiente interno de *S. adareanum*. De esta manera, considerando que miembros de *Pseudovibrio sp.* y las dos Alfaproteobacterias mencionadas se caracterizan por brindarle protección a su hospedador contra microorganismos patógenos, podríamos inferir que los clones Tun3b.A11 y Tun3b.D6 colaborarían en la defensa de *S. adareanum* (Tabla 4.3).

Dos secuencias de bacterias asociadas al morfo naranja-amarillento de *S. adareanum* de la localidad de Caleta Potter y el clon Tun3b.G11 de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008), estuvieron relacionadas

filogenéticamente con un miembro de *Nitrosomonas sp.* Las especies del género *Nitrosomonas* se distribuyen generalmente en diferentes entornos (Koops y Pommerening-Roser 2001). Las características ambientales cruciales incluyen salinidad, concentración de amoníaco, y el pH. Estos microorganismos pueden encontrarse en agua dulce, estuarios, ambientes terrestres y marinos (Engel y Alexander 1958; Völsch y col. 1990; Speksnijder y col. 1998; Coci y col. 2005, 2008; Fierer y col. 2009; Norton 2011), como así también en asociación con esponjas de manglares (Diaz y col. 2004) colaborando en su proceso de nitrificación (Hentschel y col. 2006). La nitrificación describe la catalización de amoníaco a nitrito por las ABO (Bacterias Amonio-Oxidantes) y posteriormente a nitrato por las NBO (Bacterias Nitrito-Oxidantes) para fines energéticos. *Nitrosomonas* es uno de los géneros actualmente aceptados dentro de las Betaproteobacterias ABO. Dado que *Nitrosomonas sp.* se relacionó con secuencias de bacterias asociadas a *S. adareanum*, podríamos pensar que éstas colaborarían en la primer etapa del proceso de nitrificación de *S. adareanum*.

Dentro del clado constituido por microorganismos del filo Bacteroidetes, los haplotipos XI y XII de bacterias asociadas al morfo naranja-amarillento de *S. adareanum* de la localidad de Melchior y tres clones de bacterias no cultivables Tun3b.A1, Tun3b.D1 y Tun3b.B4 asociadas a *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008), se relacionaron filogenéticamente con cinco secuencias de la agrupación Cytophaga-Flavobacterium (CFB). Cuatro de estas secuencias (el clon C319a-R8C-A1, el clon B276_B9, un miembro de *Tenacibaculum maritimum* y el clon *Polaribacter* Arctic97A-15) se ubicaron dentro del orden Flavobacteriales y de la familia Flavobacteriaceae y un representante de la especie *Reichenbachia agariperforans* dentro del orden Cytophagales y de la familia Flammeovirgaceae. Los miembros de la agrupación CFB constituyen uno de los grupos de bacterias dominantes en el medio marino (Bowman y col. 1997; Pinhassi y col. 1997; Nielsen y col. 2004). Se los conoce como descomponedores de macromoléculas como la celulosa, agar y quitina. Estas habilidades hacen que el grupo CFB juegue un papel importante en el ciclo del carbono en el ambiente marino. Algunas de las bacterias de esta agrupación han sido también reportadas como patógenas de peces (Bernardet 1998), alguicidas (Maeda y col. 1998), se han encontrado adjuntas a algas (Shiba y Taga 1980; Bolinches y col. 1988) y como inductoras de la morfogénesis en macro-algas (Nakanishi y

col. 1996). Dentro del grupo CFB, los miembros del género *Tenacibaculum*, son capaces de hidrolizar varios compuestos poliméricos como la caseína, colágeno, celulosa, almidón, entre otros (Frette y col. 2004), y han sido encontrados en el alga *Centroceras clavulatum*, como así también asociados con la ascidia colonial *Cystodytes dellechiajei* (Martínez-García y col. 2007), con esponjas y con algas productoras de metabolitos secundarios en las Islas Palau (Suzuki y col. 2001). Por otro lado, los miembros del género *Polaribacter* han sido encontrados en asociación con esponjas Antárticas (Webster y col. 2004) y del Mar Mediterráneo (Wichels y col. 2006; Dupont y col. 2013). Dupont y col. (2013) en sus trabajos encontraron que *Polaribacter sp.* manifestó actividad antioxidante en la esponja *Asbestopluma hipogea*. Considerando las características de los miembros del grupo CFB anteriormente descritas, se podría inferir que las dos secuencias aisladas del morfo naranja-amarillento de *S. adareanum* de la localidad de Melchior y los tres clones Tun3b.A1, Tun3b.D1 y Tun3b.B4 de *S. adareanum*, se encontrarían vinculadas en la producción de metabolitos secundarios como antioxidantes.

El clon Tun3b.H11 de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008) estuvo estrechamente relacionado con un miembro del filo Actinobacteria (el clon NH10_01 de una bacteria no cultivable). Los integrantes de este filo han sido aislados a partir de ambientes marinos (Fiedler y col. 2005; Maldonado y col. 2005; Lee 2006; Zhang y col. 2006; Bredholdt y col. 2007; Cabaj y Kosakowska 2007; Farris y Olson 2007; Kageyama y col. 2007; De y col. 2008; Pimentel-Elardo y col. 2008; Zhang y col. 2008; Dastager y col. 2009; Kim y col. 2009), como así también han sido encontrados en asociación con erizos de mar (Meziti y col. 2007), con ascidias, algas y esponjas (Meziti y col. 2007; Menezes y col. 2010). A pesar de que estos organismos han sido estudiados en mayor detalle que los miembros de otros grupos de procariotas debido a su importancia biotecnológica, actualmente se sabe muy poco acerca de la diversidad de Actinobacteria en hábitats marinos en comparación con el rango diverso aislado de ambientes terrestres. Los miembros de la clase Actinobacteria tienen un valor considerable como productores de metabolitos secundarios biológicamente activos, tales como los antibióticos y otros compuestos terapéuticos, además de vitaminas y enzimas (Mincer y col. 2005; Jensen y col. 2010). Teniendo en cuenta esto, es posible que el clon Tun3b.H11, esté implicado en la producción de metabolitos secundarios (Tabla 4.3).

Dentro del clado F, cuatro microorganismos del filo Verrucomicrobia se relacionaron con dos secuencias de bacterias aisladas del morfo naranja-amarillento de *S. adareanum* de la localidad de Palmer, y con los clones Tun3b.F1 y Tun3b.A3 de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum* (Riesenfeld y col. 2008). Los integrantes del filo Verrucomicrobia han sido aislados a partir de animales y plantas marinas (Weidner y col. 2000; Alain y col. 2002; Bowman y Nowak 2004), de bacterioplancton (Bano y Hollibaugh 2002; Harris y col. 2004; O'Sullivan y col. 2004), de sedimentos Antárticos costeros (Bowman y col. 2000; Bowman y McCuaig 2003; Powell y col. 2003) y del agua de mar (Schäfer y col. 2000; Madrid y col. 2001; Suzuki y col. 2001; Bano y Hollibaugh 2002; O'Sullivan y col. 2004). Además, varios estudios han reportado que miembros de este filo viven en asociación con eucariotas (Petroni y col. 2000; Vandekerckhove y col. 2000). Por ejemplo, diversos Verrucomicrobios ectosimbióticos intervienen en la defensa del ciliado marino *Euplotidium* (Petroni y col. 2000), y miembros del género *Xiphinematobacter* pueblan el epitelio intestinal de los gusanos nematodos juveniles (Vandekerckhove y col. 2002). A su vez, Verrucomicrobios recientemente descubiertos, han sido aislados del interior de las glándulas accesorias nidamentales del calamar *Idiosepius pygmaeus* (Pichon y col. 2005), del intestino humano (Derrien y col. 2004), del intestino de pepinos de mar (Sakai y col. 2003), de erizos de mar (Meziti y col. 2007), de esponjas marinas (Scheuermayer y col. 2006), del tracto digestivo del gusano de almeja “clamworm” (Choo y col. 2007) como así también de los intestinos de termitas comedoras de madera (Stevenson y col. 2004). Una de las cepas que se encuentra en los intestinos de estas últimas, se corresponde con la TAV2 de la especie *Diplosphaera colitermitum*. Los integrantes de esta cepa contribuyen en la nutrición de las termitas digiriendo por ejemplo la celulosa y la hemicelulosa (Wertz y col. 2012). Considerando las características de los integrantes del filo Verrucomicrobia anteriormente descritos, podría inferirse que las bacterias aisladas del morfo naranja-amarillento de *S. adareanum* de la localidad de Palmer, y los clones Tun3b.F1 y Tun3b.A3 participarían en el proceso digestivo y/o contribuirían en la defensa de dicha ascidia (Tabla 4.3).

Los resultados discutidos en los párrafos anteriores, podrían permitirnos inferir los posibles morfotipos de *S. adareanum* a partir de los cuales Riesenfeld y col. (2008) podrían haber aislado las bacterias que utilizaron en sus estudios. Los clones Tun3bA10, Tun3bB6

y Tun3bF5, al encontrarse dentro del clado A, junto con los Hap I L46-VA, Hap II L46-VA y Hap III L45-VA, podrían haber sido aislados a partir del morfotipo verde-amarillento de *S. adareanum*. Mientras que los clones Tun3bE2, Tun3bA11, Tun3bD6, Tun3bG11, Tun3bA1, Tun3bD1, Tun3bB4, Tun3bF1 y Tun3bA3, al encontrarse distribuidos dentro de los otros clados donde se ubicaron los haplotipos de bacterias aisladas a partir de colonias correspondientes al morfotipo naranja-amarillento de *S. adareanum*, podrían haber sido aislados de individuos del morfotipo NA.

Lafi y col. (2005) en sus estudios con esponjas sostuvieron que el término "simbionte" se utiliza a menudo para estos organismos como un término de conveniencia, ya que los beneficios para las esponjas, resultantes de la relación entre la esponja y los procariotas asociados con sus tejidos, no son del todo claros. De acuerdo con la definición de Munn (2004), la simbiosis es "la relación cercana y permanente entre dos o más organismos diferentes". Nuestro trabajo aporta nuevos datos para el estudio de una posible endosimbiosis del tipo mutualista entre *S. adareanum* y sus bacterias hospedadas, donde se beneficiarían tanto la bacteria (al utilizar el abdomen posterior de la ascidia como su hábitat), como la ascidia. De esta manera, con la ayuda del marcador molecular 16S, logramos detectar y caracterizar a estos posibles endosimbiontes.

CAPÍTULO 5:

CONCLUSIONES

Objetivo específico n°1: Caracterizar morfológicamente a los individuos de dos morfotipos de la ascidia colonial *Synoicum adareanum* que se encuentran a lo largo de diferentes localidades de la Península Antártica

El análisis morfológico indicó que ambos morfotipos de *S. adareanum*, hallados a lo largo de las Islas Shetland del Sur, se correspondieron con especies diferentes del mismo género, de acuerdo con las descripciones de Monniot y Monniot (1983) y Monniot y col. (2011). Las características taxonómicas que caracterizaron a los zooides NA (morfotipo naranja-amarillento) fueron consistentes con aquellas que definen a *Synoicum adareanum*, mientras que las que caracterizaron a los zooides VA (morfotipo verde-amarillento) fueron consistentes con las que definen a *Synoicum ostentor*.

Objetivo específico n°2: Evaluar el grado de diferenciación genética de los morfotipos, a fin de establecer si la variabilidad morfológica se corresponde con un polimorfismo intraespecífico o bien, si se trataría de especies diferentes

Los resultados parecen indicar que habría flujo génico actual o reciente entre los morfotipos de *S. adareanum*, lo cual sugiere que la divergencia alcanzada no es suficiente como para considerarlos especies diferentes. Teniendo en cuenta los numerosos casos reportados en todo el mundo y especialmente en la Antártida, donde las aproximaciones moleculares fueron capaces de resolver especies crípticas, que la taxonomía basada en la morfología no pudo (Bernardi y Goswami 1997; Held 2003; Raupach y Wägele 2006; Bickford y col. 2007; Allcock y col. 2011), los resultados obtenidos en este trabajo fueron ciertamente inesperados, indicando que la variabilidad morfológica entre ambos morfotipos se correspondería con un polimorfismo intraespecífico. Estos resultados son

relevantes no sólo por la importancia ecológica de *S. adareanum* en las comunidades bentónicas Antárticas, sino también por su potencial bioquímico. Teniendo en cuenta la existencia de cierta diferencia genética entre ambas formas, no deberíamos descartar la posibilidad de que puedan producir metabolitos secundarios diferentes. Dado que la variación química relacionada con el color y el genotipo ya ha sido reportada en otras ascidias coloniales (López-Legentil y Turon 2005), trabajos futuros también deberían tener en cuenta las descripciones morfológicas, moleculares y químicas a la hora de realizar la identificación de las especies de ascidias estudiadas.

Objetivo específico n°3: Inferir los procesos demográficos y factores biogeográficos involucrados en la determinación de la estructura genética y posibles eventos de especiación en *S. adareanum*

En este trabajo, los niveles de diferenciación genética entre las muestras geográficas y los morfotipos y su correlación con la distancia geográfica indican que el flujo génico y la deriva genética están en equilibrio. A pesar del bajo potencial de dispersión de las larvas de ascidias, se observa un importante flujo génico, facilitado probablemente por diferentes corrientes marinas sobre la Península Antártica Occidental. Esto explicaría la presencia de haplotipos compartidos. Los análisis efectuados permitieron inferir que *S. adareanum*, al tratarse de una especie euribática (Kott 1969; Monniot y Monniot 1983), habría empleado tanto las aguas profundas, como las plataformas continentales como refugios para sobrevivir durante el máximo glacial. La posterior expansión post-glacial se habría producido a partir de múltiples refugios antes de la adquisición de aislamiento reproductivo, contribuyendo al desarrollo de contacto secundario. El contacto secundario habría dado la oportunidad para cruzamientos entre las dos formas incipientes, dando origen a la presencia de haplotipos compartidos. Cabe destacar que los resultados obtenidos también permiten inferir que la expansión del morfotipo NA podría ser más antigua que la del morfotipo VA. Por lo tanto, hasta ahora la evidencia apunta a un contacto secundario entre las formas diferenciadas en alopatria, pero que todavía pertenecen a la misma especie biológica. Sin

embargo, dado que los haplotipos más ampliamente distribuidos son también los más basales, no debe descartarse la presencia de polimorfismos ancestrales. Para discernir este punto se requieren ampliar los estudios presentados en esta tesis.

Objetivo específico n°4: Contribuir al conocimiento de las relaciones filogenéticas existentes entre los órdenes del subfilum Tunicata y entre familias del orden Aplousobranchia, según la clasificación propuesta por Kott, utilizando los genes mitocondriales COI y Citb

En este trabajo encontramos a Aplousobranchia como grupo hermano de Thaliacea, y éstos a su vez constituyen un grupo hermano de Phlebobranchia, apoyando parcialmente la tercera hipótesis de evolución de los tunicados (Fig. 3.1-c, Yokobori y col. 2006; Zeng y col. 2006). Sin embargo, también encontramos que Aplousobranchia y Thaliacea se encontraban en una posición más bien terminal, los flebobranquios en una posición central, y los apendicularios en una posición basal, lo que nos estaría sugiriendo una nueva posible hipótesis de evolución de los tunicados.

Por otro lado, nuestros resultados confirmaron que Ascidiacea, tal como se define en la actualidad, es un grupo parafilético que incluye a Thaliacea (Wada 1998; Stach y Turbeville 2002; Zeng y Swalla 2005), y al igual que Moreno y Rocha (2008), no pudimos confirmar el clado Enterogona (en el sentido de Garstang 1928; agrupando a Aplousobranchia con Phlebobranchia), pero sí descartar la primera, la segunda y la cuarta hipótesis de evolución de los tunicados (Fig. 3.1-a, 3.1-b y 3.1-d).

El orden Aplousobranchia “sensu” Kott (1969, 1990, 1992, 2001) representado en nuestro estudio por seis familias, fue monofilético. A su vez, nuestros resultados permitieron obtener una mejor aproximación de las posibles relaciones filogenéticas existentes entre las familias dentro de este orden:

- ✓ Las especies de la familia Pycnoclavellidae formaron un clado monofilético y constituyeron el grupo hermano de la familia Clavelinidae, apoyando la clasificación efectuada por Kott (1990)
- ✓ La familia Polycitoridae redefinida por Kott (1990), fue parafilética ya que los miembros de *Eudistoma* estuvieron cercanamente relacionados con los representantes de la familia Pseudodistomidae, al compartir un ancestro en común. Estos resultados apoyaron las observaciones efectuadas por Millar (1966) y Kott (1992), quienes sostuvieron que los géneros *Eudistoma* y *Pseudodistoma* estaban relacionados
- ✓ La familia Didemnidae estuvo cercanamente relacionada con la familia Clavelinidae. Didemnidae se caracterizó por presentar una longitud de rama muy larga, lo cual podría deberse a que las secuencias del gen COI de los didémnidos evolucionarían a tasas extremadamente altas (Tsagkogeorga y col. 2009)
- ✓ La inclusión de tres géneros y seis especies de la familia Polyclinidae permitió una mejor resolución de las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos de dicha familia
- ✓ Por último, los miembros de la familia Cionidae se caracterizaron por presentar una posición cercana al resto de los aplousobranquios (como grupos hermanos) al igual que los resultados obtenidos por Turon y López-Legentil (2004), apoyando en conjunto la clasificación propuesta por Kott (1969), en la que la familia Cionidae se encuentra dentro del orden Aplousobranchia

Objetivo específico n°5: Caracterizar la presencia de posibles endosimbiontes en los dos morfotipos de *S. adareanum* utilizando el gen 16S como marcador molecular

Utilizando los cebadores PB36 y PB38 logramos detectar posibles endosimbiontes bacterianos en ambos morfotipos de *S. adareanum*. Los resultados aquí obtenidos aportan

al estudio de una posible endosimbiosis del tipo mutualista entre *S. adareanum* y sus bacterias hospedadas, donde se beneficiarían tanto la ascidia como la bacteria (al utilizar el abdomen posterior de la ascidia como su hábitat). El 75% de las secuencias amplificadas presentó un porcentaje de identidad elevado con el filo Proteobacteria, dentro del cual el 37,5% se relacionó con la clase Alphaproteobacteria, el 25% con la clase Gammaproteobacteria y el 12,5% con la clase Betaproteobacteria. Del 25% de las secuencias amplificadas restante, el 12,5% se vinculó con el filo Bacteroidetes (clase Flavobacteria y clase Cytophagia) y el 12,5% con el filo Verrucomicrobia.

A partir del análisis de las relaciones de los endosimbiontes con otros organismos, intentamos caracterizar a los endosimbiontes de *S. adareanum* infiriendo sus posibles funciones:

- ✓ Las bacterias asociadas al morfo VA de *S. adareanum* participarían en el metabolismo celular de esta ascidia Antártica, al intervenir en el catabolismo de compuestos orgánicos complejos
- ✓ Las bacterias asociadas al morfo NA de *S. adareanum*, junto con los clones de bacterias no cultivables asociadas a *S. adareanum*, además de colaborar en el metabolismo celular de la ascidia, también estarían involucradas en procesos celulolíticos, de defensa química contra enemigos naturales (competidores, depredadores), en la síntesis de metabolitos secundarios bioactivos, etc.
- ✓ Los clones de bacterias no cultivables aislados por Riesenfeld y col. (2008): Tun3bA10, Tun3bB6 y Tun3bF5, al encontrarse dentro del clado A, junto con los Hap I L46-VA, Hap II L46-VA y Hap III L45-VA, podrían haber sido aislados a partir del morfotipo verde-amarillento de *S. adareanum*
- ✓ Los clones de bacterias no cultivables aislados por Riesenfeld y col. (2008): Tun3bE2, Tun3bA11, Tun3bD6, Tun3bG11, Tun3bA1, Tun3bD1, Tun3bB4, Tun3bF1 y Tun3bA3, al encontrarse distribuidos dentro de los clados donde se ubicaron los haplotipos de bacterias aisladas a partir de colonias correspondientes al morfotipo naranja-amarillento de *S.*

adareanum, podrían haber sido aislados de individuos del morfo naranja-amarillento

BIBLIOGRAFÍA

- Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21:2104-2105
- Adler JH, Grebenok RJ (1999) Occurrence, biosynthesis, and putative role of ecdysteroids in plants. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 34:253-264
- Agogué H, Casamayor EO, Bourrain M, Obernosterer I, Joux F, Herndl GJ, Lebaron P (2005) A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* 54:269-280
- Aiello A, Fattorusso E, Magno S, Menna M, Pansini M (1991) Steroids of the marine sponge *Cinachyra tarentina*: Isolation of cholest-4-ene-3, 6-dione and (24R)-24-ethylcholest-4-ene-3, 6-dione. *J Nat Prod* 54:281-285
- Ainsworth TD, Hoegh-Guldberg O (2009) Bacterial communities closely associated with coral tissues vary under experimental and natural reef conditions and thermal stress. *Aquat Biol* 4:289-296
- Aislabie JM, Jordan, S, Barker GM (2008)a Relation between soil classification and bacterial diversity in soils of the Ross Sea region, Antarctica. *Geoderma* 144:9-20
- Aislabie JM, Ryburn J, Sarmah A (2008)b Hexadecane mineralization activity in ornithogenic soil from Seabee Hook, Cape Hallett, Antarctica. *Polar Biol* 31:421-428
- Aislabie JM, Saul DJ, Foght JM (2006) Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 10:171-179
- Alain K, Olagnon M, Desbruyères D, Page A, Barbier G, Juniper SK, Quérellou J, Cambon-Bonavita MA (2002) Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol Ecol* 42:463-476
- Allcock AL, Barratt I, Eléaume M, Linse K, Norman MD, Smith PJ, Steinke D, Stevens DW, Strugnell JM (2011) Cryptic speciation and the circumpolarity debate: a case study on endemic Southern Ocean octopuses using the COI barcode of life. *Deep Sea Res II* 58:242-249
- Allcock AL, Strugnell JM (2012) Southern Ocean diversity: new paradigms from molecular ecology. *Trends Ecol Evol* 27:520-528

- Allendorf FW and Luikart G (2007) Units of conservation. In: Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, Oxford, pp 380-420
- Amos W, Harwood J (1998) Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Phil Trans R Soc B* 353:177-186
- Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2001) Secondary metabolites as mediators of trophic interactions among Antarctic marine organisms. *Am Zool* 41:17-26
- Arnaud P, López CM, Olaso I, Ramil F, Ramos-Esplá AA, Ramos A (1998) Semiquantitative study of macrobenthic fauna in the region of the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Biol* 19:160-166
- Balakirev ES, Pavlyuchkov VA, Ayala FJ (2008) DNA variation and symbiotic associations in phenotypically diverse sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16218-16223
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48
- Bano N, Hollibaugh JT (2002) Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 68:505-518
- Barber PH, Palumbi SR, Erdmann MV, Moosa MK (2002) Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: patterns, causes, and consequences. *Mol Ecol* 11:659-674
- Bargelloni L, Zane L, Derome N, Lecointre G, Patarnello T (2000) Molecular zoogeography of Antarctic euphausiids and notothenioids: from species phylogenies to intraspecific patterns of genetic variation. *Antarct Sci* 12:259-268
- Bargues MD, Mas-Coma S (1997) Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Mol Biol Evol* 14:569-577
- Barker PF (1982) The Cenozoic subduction history of the Pacific margin of the Antarctic Peninsula: ridge crest-trench interaction. *J Geol Soc London* 139:787-802
- Barker PF (2001) Scotia Sea regional tectonic evolution: implications for mantle flow and palaeocirculation. *Earth Sci Rev* 55:1-39

- Barker PF, Burrell J (1977) The opening of Drake Passage. *Mar Geol* 25:15-34
- Barker PF, Dalziel IWD (1983) Progress in geodynamics in the Scotia Arc region. In: Cabre R (ed) *Geodynamics of the Eastern Pacific Region, Caribbean and Scotia Arcs*. *Geodyn Ser* Washington, DC, 9:137-170
- Barker PF, Thomas E (2004) Origin, signature and palaeoclimatic influence of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth-Sci Rev* 66:143-162
- Barnes DKA, Conlan KE (2007) Disturbance, colonization and development of Antarctic benthic communities. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 362:11-38
- Barnes DKA, Hillenbrand C-D (2010) Faunal evidence for a later quaternary trans-Antarctic seaway. *Glob Chan Biol* 16:3297-3303
- 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
- Barrington EJW (1965) *The Biology of Hemichordata and Protochordata* (Freeman, San Francisco) London p 176
- Bathori M (2002) Phytoecdysteroids effects on mammals, isolation and analysis. *Mini-Rev Med Chem* 2:285-293
- Becerro MA, Lopez NI, Turon X, Uriz MJ (1994) Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J Exp Mar Biol Ecol* 179:195-205
- Becerro MA, Thacker RW, Turon X, Uriz MJ, Paul VJ (2003) Biogeography of sponge chemical ecology: comparisons of tropical and temperate defenses. *Oecologia* 135:91-101
- 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
- Berná L, Alvarez-Valin F, D'Onofrio G (2009) How fast is the sessile *Ciona*? *Comp Funct Genomics* 2009: 875901
- Bernardet JF (1998) *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* and *Chryseobacterium* infections in cultured marine fish. *Fish Pathol* 33:229-238

- Bernardet JF, Campbell AC, Buswell JA (1990) *Flexibacter maritimus* is the agent of “black patch necrosis” in Dove; sole in Scotland. *Dis Aquat Org* 8:233-237
- Bernardi G, Goswami U (1997) Molecular evidence for cryptic species among the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* and *Trematomus hansonii*. *Antarct Sci* 9:381-385
- Berrill NJ (1950) *The Tunicata with an Account of the British Species*. Ray Society, London, UK
- Betancur-R R, Armbruster JW (2009) Molecular clocks provide new insights into the evolutionary history of galeichthyine sea catfishes. *Evolution* 63:1232-1243
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22:148-155
- Bjerkan P (1905) Ascidien von dem norwegischen Fischereidampfer “Michael Sars” in den Jahren 1900-1904 gesammelt. In: *Bergens Mus Arbog Afhandlingar og Arsberetning* 5:1-29
- Blair JE, Hedges SB (2005) Molecular Phylogeny and Divergence Times of Deuterostome Animals. *Mol Biol Evol* 22:2275-2284
- Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR (2007) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 24:31-86
- Boas NF (1953) Method for the determination of hexosamine. *J Biol Chem* 204:553-563
- Bolinches J, Romalde JL, Toranzo AE (1988) Evaluation of selective media for isolation and enumeration of vibrios from estuarine waters. *J Microbiol Methods* 8:151-160
- Bonn A, Gaston KJ (2005) Capturing biodiversity: selecting priority areas for conservation using different criteria. *Biodiversity & Conservation* 14:1083-1100
- Bourne D, Iida Y, Uthicke S, Smith-Keune C (2008) Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *ISME J* 2:350-363
- Bourne DG, Munn CB (2005) Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Env Microbiol* 7:1162-1174
- Bowman JP, McCammon SA, Brown MV, Nichols DS, McMeekin TA (1997) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol* 63:3068-3078

- Bowman JP, McCuaig RD (2003) Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Environ Microbiol* 69:2463-2483
- Bowman JP, Nowak B (2004) Salmonid gill bacteria and their relationship to amoebic gill disease. *J Fish Dis* 27:483-492
- Bowman JP, Rea SM, McCammon SA, McMeekin TA (2000) Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, Eastern Antarctica. *Env Microbiol* 2:227-237
- Bredholdt H, Galatenko OA, Engelhardt K, Fjaervik E, Terekhova LP, Zotchev SB (2007) Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol* 9:2756-2764
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (2005) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Proteobacteria. East Lansing, USA, p 183
- Brewin IB (1952) Ascidians of New Zealand. Part VII-Ascidians of Otago coastal waters. *Trans Proc R Soc N Z* 79: 452-458
- Brewin IB (1953) Australian ascidians of the sub-family Holozoinae and a review of the sub-family. *Trans Proc R Soc NZ* 81:53-64
- Brewin IB (1956) The growth and development of a viviparous compound ascidian *Hypsistozoa fasmariana*. *Quart J micr Sci* 97:435-454
- Brinkmeyer R, Knittel K, Jürgens J, Weyland H, Amann R, Helmke E (2003) Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Appl Environ Microbiol* 69:6610-6619
- Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 148:107-127
- Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, pp 225-269
- Buchan A, González JM, Moran MA (2005) Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl Environ Microbiol* 71:5665-5677

- Burighel P, Cloney RA (1997) Urochordata: Ascidiacea. In: Harison FW, Ruppert EE (eds) Microscopic Anatomy of Invertebrates. Hemichordata, Chaetognatha, and the Invertebrate Chordates. Willey-Liss, New York, 15:221-347
- Cabaj A, Kosakowska A (2007) Iron-dependent growth of and siderophore production by two heterotrophic bacteria isolated from brackish water of the southern Baltic Sea. *Microbiol Res* 164:570-577
- Cameron CB, Garey JR, Swalla BJ (2000) Evolution of the chordate body plan: new insights from phylogenetic analyses of deuterostome phyla. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4469-4474
- Cantatore P, Roberti M, Pesole G, Ludovico A, Milella F, Gadaletta MN, Saccone C (1994) Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J Mol Evol* 39:589-597
- Carnaval AC, Bates JM (2007) Amphibian DNA shows marked genetic structure and tracks Pleistocene climate change in northeastern Brazil. *Evolution* 61:2942-2957
- Cassista MC, Hart MW (2007) Spatial and temporal genetic homogeneity in the Arctic surfclam (*Mactromeris polynyma*). *Mar Biol* 152:569-579
- Castro ALF, Stewart BS, Wilson SG, Hueter RE, Meekan MG, Motta PJ, Bowen BW, Karl SA (2007) Population genetic structure of earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Mol Ecol* 16:5183-5192
- Casu M, Maltagliati F, Cossu P, Lai T, Galletti MC, Castelli A, Commito JA (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
- Caullery M (1909) Recherches sur la famille des Distomidae. *Bull Biol Fr Belg* 42:1-59
- Cepeda C, Santos Y (2002) First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 22:388-392
- Chanas B, Pawlik JR, Lindel T, Fenical W (1997) Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). *J Exp Mar Biol Ecol* 208:185-196
- Chen JY, Huang DY, Peng QQ, Chi HM, Wang XQ, Feng M (2003) The first tunicate from the Early Cambrian of South China. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8314-8318

- Cho JC, Giovannoni SJ (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Appl Environ* 70:432-440
- Choi EJ, Kwon HC, Koh HY, Kim YS, Yang HO (2010) *Colwellia asteriadis* sp. nov., a marine bacterium isolated from the starfish *Asterias amurensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1952-1957
- Choo YJ, Lee K, Song J, Cho JC (2007) *Puniceicoccus vermicola* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium, and description of *Puniceicoccaceae* fam. nov., *Puniceicoccales* ord. nov., *Opitutaceae* fam. nov., *Opitutaes* ord. nov. and *Opitutae* classis nov. in the phylum 'Verrucomicrobia'. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:532-537
- Christen R, Braconnot JC (1998) Molecular phylogeny of tunicates. A preliminary study using 28S ribosomal RNA partial sequences: implications in terms of evolution and ecology. In: Bone Q (ed) *The Biology of the Pelagic Tunicates*. Oxford, pp 65-271
- Clarke A (1996) The distribution of Antarctic marine benthic communities. *Antarct Res Ser* 70:219-230
- Clarke A, Barnes DKA, Hodgson DA (2005) How isolated is Antarctica? *Trends Ecol Evol* 20:1-3
- Clarke A, Crame JA (1989) The origin of the southern ocean marine fauna. In: Crame JA (ed) *Origins and evolution of the Antarctic Biota*. Geol Soc Lon pp 253-268
- Clarke A, Crame JA (1992) Evolution of Antarctic benthos. *Phil Trans Roy Soc London Ser B Biol Sci* 338:299-309
- Clarke A, Johnston NM (2003) Antarctic marine benthic diversity. *Oceanogr Mar Biol* 41:47-114
- Clayton L, Attig J, Mickelson D, Johnson M, Syverson K (2002) *Glaciation of Wisconsin*. Wisconsin Geological and Natural History Survey, 3rd edn. Educational Series 36
- Cloney RA, Young CM, Svane I (2002) Phylum Chordata: Urochordata. In: Young CM et al. (eds) *Atlas of marine invertebrates larvae*. Academic Press, London, pp 565-593
- Coci M, Bodelier PLE, Laanbroek HJ (2008) Epiphyton as a niche for ammonia-oxidizing bacteria: detailed comparison with benthic and pelagic compartments in shallow freshwater lakes. *Appl Environ Microbiol* 74:1963-1971

- Coci M, Riechmann D, Bodelier PL, Stefani S, Zwart G, Laanbroek, H J (2005) Effect of salinity on temporal and spatial dynamics of ammonia-oxidising bacteria from intertidal freshwater sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 53:359-368
- Costantino V, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Mangoni A (2000) Ecdysteroids from the Caribbean sponge *Iotrochota birotulata*. *Steroids* 65:138-142
- Cruzan MB (2001) Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae). *Evolution* 55:1569-1580
- Darling KF, Kucera M, Pudsey CJ, Wade CM (2004) Molecular evidence links cryptic diversification in polar planktonic protists to Quaternary climate dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7657-7662
- Dastager SG, Lee J, Ju Y, Park D, Kim C (2009) *Nocardioides sediminis* sp. nov., isolated from a sediment sample. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:280-284
- Dayton PK (1990) Polar benthos. In: Smith W (ed) *Polar oceanography*. Academic Press, New York, pp 631-685
- De J, Ramaiah N, Vardanyan L (2008) Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Mar Biotechnol* 10:471-477
- Deacon GER (1937) The hydrology of the Southern Ocean. *Discov Rep* 15:1-24
- Della Valle A (1881) Nuove contribuzioni alla storia naturale delle ascidie composte del Golfo di Napoli. *Atti Acc Lincei Mem (Ser 3)* 10:431-498
- Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H (2006) Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439:965-968
- Delsuc F, Tsagkogeorga G, Lartillot N, Philippe H (2008) Additional molecular support for the new chordate phylogeny. *Genesis* 46:592-604
- 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 Biol* 33:1567-1576

- Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM (2004) *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1469-1476
- Dias MG, Duarte LFL, Solferini VN (2006) Low genetic differentiation between isolated populations of the colonial ascidian *Symplesma rubra* Monniot, C. 1972. *Mar Biol* 148:807-815
- Diaz MC, Akob D, Cary CS (2004) Denaturing gradient gel electrophoresis of nitrifying microbes associated with tropical sponges. In: Pansini M, Pronzato R, Bavestrello G, Manconi R (eds) *Sponge science in the new millennium*. *Boll Mus Ist Biol Univ Genova* 68:279-289
- Diester-Haass L, Zahn R (1996) Eocene- Oligocene transition in the southern ocean: history of water mass circulation and biological productivity. *Geology* 24:163-166
- Dillon JG, Miller S, Bebout B, Hullar M, Pinel N, Stahl DA (2009) Spatial and temporal variability in a stratified hypersaline microbial mat community. *FEMS Microbiol Ecol* 68:46-58
- Diyabalanage T, Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2006) Palmerolide A, a Cytotoxic Macrolide from the Antarctic Tunicate *Synoicum adareanum*. *J Am Chem Soc* 128:5630-5631
- Dominguez P, Jacobson AG, Jefferies RPS (2002) Paired gill slits in a fossil with a calcite skeleton *Nature* 417:841-844
- Donnelly MJ, Pinto J, Girod R, Besansky NJ, Lehmann T (2004) Revisiting the role of introgression vs shared ancestral polymorphisms as key processes shaping genetic diversity in the recently separated sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Heredity* 92:61-68
- 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
- Drasche RV (1882) *Oxycorynia*, eine neue Synascidien-Gattung. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft Wien Österreich* 32:175-178
- Drasche RV (1884) Ueber einige neue und weniger gekannte aussereuropäische einfache Ascidien. *Denkschriften. Akad d Wiss* 48:369-387

- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22:1185-1192
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29:1969-1973
- Du Z, Zhang W, Xia H, Lü G, Chen G (2010) Isolation and diversity analysis of heterotrophic bacteria associated with sea anemones. *Acta Oceanol Sin* 29:62-69
- Dupont S, Corre E, Li Y, Vacelet J, Bourguet-Kondracki ML (2013) First insights into the microbiome of a carnivorous sponge. *FEMS Microbiol Ecol* 86:520-531
- Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X (2007) *Ecología molecular*. SEMARNAT, CONABIO, Instituto de Ecología. UNAM, México DF, pp 1-608
- Ekborg NA, González JM, Howard MB, Taylor LE, Hutcheson SW, Weiner RM (2005) *Saccharophagus degradans* gen. nov., sp. nov., a versatile marine degrader of complex polysaccharides. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1545-1549
- El-Galil MAA, Hashem M (2012) Epidemiological and bacteriological studies on tenacibaculosis in some Red Sea fishes, Egypt. *IJESE* 3:25-32
- Engel S, Pawlik JR (2000) Allelopathic activities of sponge extracts. *Mar Ecol Prog Ser* 07:273-281
- Engel, MS, Alexander M (1958) Growth and autotrophic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 76:217-222
- Enticknap JJ, Kelly M, Peraud O, Hill RT (2006) Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. *Appl Environ Microbiol* 72:3724-3732
- Esposti MD, De Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, Meyer A (1993) Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1143:243-271
- Excoffier L, Foll M, Petit RJ (2009) Genetic consequences of range expansions. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:481-501
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform* 1:47-50

- Excoffier L, Schneider S (1999) Why hunter-gatherer populations do not show signs of Pleistocene demographic expansions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10597-10602
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491
- Farias I P, Ortí G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A (2001) The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *J Mol Evol* 53:89-103
- Farris MH, Olson JB (2007) Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Lett Appl Microbiol* 45:376-381
- Fiedler HP, Bruntner C, Bull AT, Ward AC, Goodfellow M, Mihm G (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:37-42
- Fierer N, Carney KM, Horner-Devine MC, Megonigal JP (2009) The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. *Microb Ecol* 58:435-445
- Fleming J (1822) *The Philosophy of Zoology*. Edinburgh and London, pp 508-518
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294-299
- Forbes E, Hanley SCT (1848) A History of British Mollusca and Their Shells (Tunicates 1848). In: *Archiv fur Naturgeschichte* (Wiegmann 1849) 15:106
- Frette L, Jørgensen NO, Irming H, Kroer N (2004) *Tenacibaculum skagerrakense* sp. nov., a marine bacterium isolated from the pelagic zone in Skagerrak, Denmark. *Int J Sys Evol Microbiol* 54:519-524
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925
- Fu YX (2001) Variation: Measures. *Encyclopedia of life science*. Wiley J and Sons, Chichester, DOI: 10.1038/npg.els.0001743

- Fukunaga Y, Kurahashi M, Tanaka K, Yanagi K, Yokota A, Harayama S (2006) *Pseudovibrio ascidiaceicola* sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). *Int J Syst Evol Microbiol* 56:343-347
- Futuyma DJ (1986) *Evolutionary biology* 2nd edn. New Jersey: Sinauer
- Galéron JO, 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 Biol* 12:283-290
- Gallardo VA (1987) The sublittoral macrofaunal benthos of the Antarctic shelf. *Environ Int* 13:71-81
- Garrick RC, Sands CJ, Rowell DM, Tait NN, Greenslade P, Sunnucks P (2004) Phylogeography recapitulates topography: very fine-scale local endemism of saproxylic 'giant' springtail at Tallaganda in the Great Dividing Range of south-east Australia. *Mol Ecol* 13:3329-3344
- Garstang W (1891) Report on the tunicata of Plymouth. *J Mar Biol Assoc* 2:47-67
- Garstang W (1928) The morphology of the Tunicata, and its bearings on the phylogeny of the Chordata. *Q J Microsc Sci* 72:51-187
- Gerdes D, Klages M, Arntz WE, Herman RL, Galéron J, Hain S (1992) Quantitative investigations on macrobenthos communities of the southeastern Weddell Sea shelf based on multi box corer samples. *Pol Biol* 12:291-301
- Giard AM (1872) Recherches sur les ascidies composees ou synascidies. *Arch Zool Exp Gén* 1:501-704
- 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
- Gili JM, Coma R, Orejas C, López-González PJ, Zabala M (2001) Are Antarctica suspension-feeding communities different from those elsewhere in the world?. *Polar Biol* 24:473-485
- Gille ST (1994) Mean sea surface height of the Antarctic Circumpolar Current from Geosat data: method and application. *J Geophys Res* 99:18255-18273

- Goffredi SK, Johnson SB, Vrijenhoek RC (2007) Genetic diversity and potential function of microbial symbionts associated with newly discovered species of *Osedax* polychaete worms. *Appl Environ Microbiol* 73:2314-2323
- Goldstien SJ, Schiel DR, Gemmell NJ (2010) Regional connectivity and coastal expansion: differentiating pre-border and post-border vectors for the invasive tunicate *Styela clava*. *Mol Ecol* 19:874-885
- González JM, Mayer F, Moran MA, Hodson RE, Whitman WB (1997) *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov., and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., two marine bacteria from a lignin-rich pulp mill waste enrichment community. *Int J Syst Evol Microbiol* 47:369-376
- Goodall-Copestake WP, Tarling GA, Murphy EJ (2012) On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity* 109:50-56
- Gordon WA (1973) Marine life and ocean surface currents in the Cretaceous. *J Geol* 81:269-284
- Govindarajan AF, Bucklin A, Madin LP (2011) A molecular phylogeny of the Thaliacea. *J Plankton Res* 33:843-853
- Gray DA, Barnfield P, Seifried M, Richards MH (2006) Molecular divergence between *Gryllus rubens* and *Gryllus texensis*, sister species of field crickets (Orthoptera: Gryllidae). *Can Entomol* 138:305-313
- Graybeal A (1993) The phylogenetic utility of cytochrome b: lessons from bufonid frogs. *Mol Phylogenet Evol* 2:256-269
- Grosberg RK, Cunningham CW (2001) Genetic structure in the sea from populations to communities. In: Bertness MD, Hay ME, Gaines SD (eds) *Marine community ecology*. Sinauer, Sunderland, MA, pp 61-84
- Gutt J (2000) Some “driving forces” structuring communities of the sublittoral Antarctic macrobenthos. *Antarct Sci* 12:297-313
- Hamilton MB (2009) *Population genetics*. Wiley-Blackwell, pp 424, ISBN 978-1-4051-3277-0

- Hansson L, Agis M, Maier C, Weinbauer MG (2009) Community composition of bacteria associated with cold-water coral *Madrepora oculata*: within and between colony variability. *Mar Ecol Prog Ser* 397:89-102
- Harant H (1930) Liste des Ascidiées de Banyuls. *Arch Zool expér gén* 70:15-22
- Harant H (1931) Contribution à l'histoire naturelle des ascidiées et leurs parasites. *Ann Inst Oceanogr Monaco* 8:229-389
- Harant H, Vernières P (1933) Tuniciers. *Faune de France* 27:1-93
- Harpending RC (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum Biol* 66:591-600
- Harris JK, Kelley ST, Pace NR (2004) New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl Environ Microbiol* 70:845-849
- Hartl DL (2000) A primer of population genetics 3rd edn. Sinauer, Sunderland, Mass, EUA
- 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 Res II* 58: 230–241
- Hawkins CJ, Kott P, Parry DL, Swinehart JH (1983) Vanadium content and oxidation state related to ascidian phylogeny. *Comp Biochem Physiol* 76B:555-558
- Haydar D, Hoarau G, Olsen JL, Stam WT, Wolff WJ (2011) Introduced or glacial relict? Phylogeography of the cryptogenic tunicate *Molgula manhattensis* (Ascidiacea, Pleurogona). *Divers Distrib* 17:68-80
- Hedrick PW (2009) Genetics of populations. Jones and Bartlett. Sudbury, Massachusetts, p 737
- Hedrick PW (2011) Genetics of populations. Jones and Bartlett. Estados Unidos, p 659
- Heimeier D, Lavery S, Sewell MA (2010) Molecular species identification of *Astrotoma agassizii* from planktonic embryos: further evidence for a cryptic species complex. *J Hered* 101: 775-779
- Held C (2003) Molecular evidence for cryptic speciation within the widespread Antarctic crustacean *Ceratoserolis trilobitoides* (Crustacea, Isopoda). In: Huiskes AH, Gieskes WW,

- Rozema J, Schorno RM, van der Vies SM, Wolff WJ (eds) Antarctic biology in a global context. Backhuys, Leiden, pp 135-139
- Hellberg ME, Burton RS, Neigel JE, Palumbi SR (2002) Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bull Mar Sci* 70:273-290
- Hemery LG, Eléaume M, Roussel V, Améziane N, Gallut C, Steinke D, Cruaud C, Couloux A, Wilson NG (2012) Comprehensive sampling reveals circumpolarity and sympatry in seven mitochondrial lineages of the Southern Ocean crinoid species *Promachocrinus kerguelensis* (Echinodermata). *Mol Ecol* 21:2502-2518
- Hentschel U, Hopke J, Horn M, Friedrich AB, Wagner M, Hacker J, Moore BS (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol* 68:4431-4440
- Hentschel U, Schmid M, Wagner M, Fieseler L, Gernert C, Hacker J (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol Ecol* 35:305-312
- Hentschel U, Usher KM, Taylor MW (2006) Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol* 55:167-177
- Herdman WA (1886) Report on the Tunicata collected during the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873-1876. Part II - Ascidiæ compositæ. Report on the Scientific Results of the Voyage of HMS Challenger 14:1-399
- Herdman WA (1890) On the genus *Ecteinascidia* and its relations; with descriptions of two new species, and a classification of the family Clavelinidae. *Proceedings and Transactions of the Liverpool Biological Society* 5:144-163
- Herdman WA (1902) Tunicata. In: Report on the collections of natural history made in the Antarctic regions during the voyage of the ‘‘Southern Cross’’, London, pp 190-200
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil Trans R Soc B* 359:183-195
- Hillis DM, Huelsenbeck JP (1992) Signal, noise, and reliability in molecular evolutionary analyses. *J Hered* 83:189-195

- Hirose E, Oka AT, Hirose M (2009) Two new species of photosymbiotic ascidians of the genus *Diplosoma* from the Ryukyu Archipelago, with partial sequences of the COI gene. *Zool Sci* 26:362-368
- Hirose M, Nozawa Y, Hirose E (2010) Genetic isolation among Morphotypes in the Photosymbiotic Didemnid *Didemnum molle* (Asciacea, Tunicata) from the Ryukyus and Taiwan. *Zool Sci* 27:959-964
- Hollin JT (1962) On the glacial history of Antarctica. *J of Glaciol* 4:172-195
- Holmes SP, Dekker R, Williams ID (2004) Populations dynamics and genetic differentiation in the bivalve mollusc *Abra tenuis*: aplanic dispersal. *Mar Ecol Prog Ser* 268:131-140
- Honeycutt RL, Nedbal MA, Adkins RM, Janecek LL (1995) Mammalian mitochondrial DNA evolution: a comparison of the cytochrome b and cytochrome c oxidase II genes. *J Mol Evol* 40:260-272
- Hosoya S, Yokota A (2007) *Pseudovibrio japonicus* sp. nov., isolated from coastal seawater in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1952-1955
- Hou S, Makarova KS, Saw JHW, Senin P, Ly BV, Zhou Z, Ren Y, Wang J, Galperin MY, Omelchenko MV, Wolf YI, Yutin N, Koonin EV, Stott MB, Mountain BW, Crowe MA, Smirnova AV, Dunfield PF, Feng L, Wang L, Alam, M. (2008). Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, *Methylacidiphilum infernorum*, a representative of the bacterial phylum Verrucomicrobia. *Biol Direct* 3:26
- Hugall A, Moritz C, Moussalli A, Stanisic J (2002) Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier, 1875). *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6112-6117
- Hughes KA, Ott S, Bölter M, Convey P (2006) Colonisation processes. Trends in Antarctic terrestrial and limnetic ecosystems: Antarctica as a global indicator. In: Bergstrom DM, Convey P, Huiskes AHL (eds) Springer. Berlin, pp 35-54
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol* 32:128-144

- Jazdzewski K, Jurasz W, Kittel W, Pressler P, Sicinski J (1986) Abundance and biomass estimates of benthic fauna in Admiralty bay, King George Island, South Shetlands Islands. *Pol Biol* 6:5-16
- Jeffrey B, Hale P, Degnan BM, Degnan SM (2007) Pleistocene isolation and recent gene flow in *Haliotis asinina*, an Indo-pacific vetigastropod with limited dispersal capacity. *Mol Ecol* 16:289-304
- Jensen S, Duperron S, Birkeland NK, Hovland M (2010) Intracellular Oceanospirillales bacteria inhabit gills of *Acesta* bivalves. *FEMS Microbiol Ecol* 74:523-533
- Jiang X, Liu B, Lebreton S, De Brabander JK (2007) Total synthesis and structure revision of the marine metabolite palmerolide A. *J Am Chem Soc* 129:6386-6387
- Julin C (1904) Recherches sur la phylogénèse des Tuniciers *Archiascidia neapolitana* nov. gen. *Mitt Zool Stn Neapel* 16:489-552
- Jungblut AD, Hawes I, Mountfort D, Hitzfeld B, Dietrich DR, Burns BP, Neilan BA (2005) Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Env Microbiol* 7:519-529
- Kageyama A, Takahashi Y, Yasumoto-Hirose M, Kasai H, Shizuri Y, Omura S (2007) *Janibacter corallicola* sp. nov., isolated from coral in Palau. *J Gen Appl Microbiol* 53:185-189
- Kenchington EL, Patwary MU, Zouros E, Bird CJ (2006) Genetic differentiation in relation to marine landscape in a broadcast-spawning bivalve (*Placopecten magellanicus*). *Mol Ecol* 15:1781-1796
- Kennett JP (1977) Cenozoic evolution of Antarctic glaciation, the circum-Antarctic Ocean, and their impact on global paleoceanography. *J geophys res* 82:3843-3860
- Kennett JP (1980) Paleooceanographic and biogeographic evolution of the southern oceans during the Cenozoic, and Cenozoic microfossil datums. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 31:123-152
- Kennett JP (1982) *Marine Geology*. Prentice-Hall, New Jersey, p 813
- Kerr RG, Baker BJ (1991) Marine sterols. *Nat Prod Rep* 8:465-497
- Kesteven HL (1909) Studies on Tunicata 1. *Proc Linn Soc NSW* 34:276-295

- Kim BY, Weon HY, Son JA, Lee CM, Hong SB, Jeon YA, Koo BS, Kwon SW (2009) *Thalassobacter arenae* sp. nov, isolated from sea sand in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:487-490
- Kim YO, Park S, Nam BH, Kang SJ, Hur YB, Kim DG, Oh TK, Yoon JH (2012) Description of *Litoreibacter meonggei* sp. nov., isolated from the sea squirt *Halocynthia roretzi*, reclassification of *Thalassobacter arenae* as *Litoreibacter arenae* comb. nov. and emended description of the genus *Litoreibacter* Romanenko et al. 2011. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1825-1831
- Kirchman JJ, Hackett SJ, Goodman SM, Bates JM (2001) Phylogeny and systematics of ground rollers (Brachypteraciidae) of Madagascar. *Auk* 118:849-863
- Kirkwood JM, Burton HR (1988) Macrobenthic species assemblages in Ellis Fjord, Vestfold Hills, Antarctica. *Mar Biol* 97:445-457
- Koops HP, Pommerening-Röser A (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol Ecol* 37:1-9
- Koplovitz G, McClintock JB, Amsler CD, Baker BJ (2011) A comprehensive evaluation of the potential chemical defenses of Antarctic ascidians against sympatric fouling microorganisms. *Mar Biol* 158:2661-2671
- Koren O, Rosenberg E (2006) Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. *Appl Environ Microbiol* 72:5254-5259
- Kott P (1957) The ascidians of Australia. II. Aplousobranchiata Lahille: Clavelinidae Forbes & Hanley and Polyclinidae Verrill. *Aust J Mar Fresh Res* 8:64-110
- Kott P (1962) The ascidians of Australia. III. Aplousobranchiata Lahille: Didemnidae Giard. *Aust J Mar Fresh Res* 13:265-334
- Kott P (1969) Antarctic Ascidiacea. *Antarctic Res Ser* 13:1-239
- Kott P (1983) Two new genera of didemnid ascidians from tropical Australian waters. *Beagle* 1:13-19
- Kott P (1985) The Australian Ascidiacea. Part 1. Phlebobranquiata and Stolidobranquiata. *Mem Queensl Mus* 23:1-438

- Kott P (1990) The Australian Ascidiacea. Part 2, Aplousobranchia (1). Mem Queensl Mus 29:1-266
- Kott P (1992) The Australian Ascidiacea. Part 3, Aplousobranchia (2). Mem Qld Mus 32:375-620
- Kott P (2001) The Australian Ascidiacea. Part 4, Aplousobranchia (3), Didemnidae. Mem Qld Mus.
- Kowalke J (1999) Filtration in antarctic ascidians-striking a balance. J Exp Mar Biol Ecol 242:233-244
- Kowalke J, Arntz W, Tatián M, Sahade R (2001) Production and respiration of Antarctic ascidians. Polar Biol 24:663-669
- Kumazawa Y, Nishida M (2000) Molecular phylogeny of osteoglossoids: a new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. Mol Biol Evol 17:1869-1878
- Kurabayashi A, Okuyama M, Ogawa M, Takeuchi A, Jing Z, Naganuma T, Saito Y (2003) Phylogenetic position of a deep-sea ascidian, *Megalodicopia hians*, inferred from the molecular data. Zool Sci 20:1243-1247
- Kurahashi M, Yokota A (2007) *Endozoicomonas elysicola* gen. nov., sp. nov., a γ -proteobacterium isolated from the sea slug *Elysia ornata*. Syst Appl Microbiol 30:202-206
- Kyle CJ, Boulding EG (2000) Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina spp.*) with and without pelagic larval dispersal. Mar Biol 139:835-845
- Lafargue F (1983) Evolution des ascidies Didemnidae I: cas des espèces françaises. Vie et Milieu 33:1-15
- Lafargue F, Wahl M (1987) The didemnid ascidian fauna of France. Ann Inst Océanogr 63:1-46
- Lafi FF, Garson MJ, Fuerst JA (2005) Culturable bacterial symbionts isolated from two distinct sponge species (*Pseudoceratina clavata* and *Rhabdastrella globostellata*) from the Great Barrier Reef display similar phylogenetic diversity. Microb Ecol 50:213-220
- Lafont R, Horn DHS (1989) Phytoecdysteroids: Structures and occurrence. In: Koolman H (ed) Thieme Medical Publisher. New York, pp 39-64
- Lafont R, Mathieu M (2007) Steroids in aquatic invertebrates. Ecotoxicology 16:109-130
- Lahille MF (1886) Sur la classification des Tuniciers. C R Acad Sci Paris 102:1573-1575

- Lahille MF (1887) Étude systématique des Tuniciers. C R Assoc Fr Adv Sci 16:667-677
- Lahille MF (1890) Recherches sur les Tuniciers. Ph.D. Thesis Fac. Sciences Paris. Toulouse
- Lamb T, Lydeard C, Walker RB, Gibbons JW (1994) Molecular systematics of map turtles (*Graptemys*): a comparison of mitochondrial restriction site versus sequence data. Syst Biol 43:543-559
- Larmuseau MH, Van Houdt JK, Guelinckx J, Hellemans B, Volckaert FA (2009) Distributional and demographic consequences of Pleistocene climate fluctuations for a marine demersal fish in the north-eastern Atlantic. J biogeogr 36:1138-1151
- Lawver LA, Gahagan LM (2003) Evolution of Cenozoic seaways in the circum-Antarctic region. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol 198:11-38
- Lawver LA, Gahagan LM, Dalziel IWD (2011) A different look at gateways: drake passage and Australia/Antarctica. In: Anderson JB, Wellner JS (eds) Tectonic, climatic, and cryospheric evolution of the Antarctic Peninsula. Special Publications 63:5-33
- Lee HJ, Boulding 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. Mol Ecol 18:2165-2184
- Lee SD (2006) *Kineococcus marinus* sp. nov., isolated from marine sediment of the coast of Jeju. Korea Int J Syst Evol Microbiol 56:279-283
- Lenk S, Moraru C, Hahnke S, Arnds J, Richter M, Kube M, Reinhardt R, Brinkhoff T, Harder J, Amann R, Mußmann M (2012) *Roseobacter* clade bacteria are abundant in coastal sediments and encode a novel combination of sulfur oxidation genes. ISME J 6:2178-2187
- Lesson RP (1830) Zoologie. In: Voyage autour du monde sur la corvette La Coquille pendant 1881-1825, Paris 2:1-471
- Letelier AM (2007) Tamaño efectivo de la población. Ecología molecular. SEMARNAT. UNAM, Mexico DF, pp 63-86
- Li WH (1997) Molecular Evolution. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp 215-219
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25:1451-1452

- Lisiecki LE, Raymo ME (2005) A Pliocene-Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic $\delta^{18}\text{O}$ records. *Paleoceanography* 20:1003
- Littman RA, Willis BL, Pfeffer C, Bourne DG (2009) Diversities of coral-associated bacteria differ with location, but not species, for three acroporid corals on the Great Barrier Reef. *FEMS Microbiol Ecol* 68:152-163
- López-Legentil S, Dieckmann R, Bontemps-Subielos N, Turon X, Banaigs B (2005) Qualitative variation of alkaloids in color morphs of *Cystodytes* (Asciadiacea). *Biochem Syst Ecol* 33:1107-1119
- López-Legentil S, Turon X (2005) How do morphotypes and chemotypes relate to genotypes? The colonial ascidian *Cystodytes* (Polycitoridae). *Zool Scr* 34:3-14
- López-Legentil S, Turon X (2006) Population genetics, phylogeography and speciation of *Cystodytes* (Asciadiacea) in the western Mediterranean Sea. *Biol J Linn Soc* 88:203-214
- López-Legentil S, Turon X, Planes S (2006) Genetic structure of the star sea squirt, *Botryllus schlosseri*, introduced in southern European harbours. *Mol Ecol* 15:3957-3967
- López-Legentil S, Turon X, Planes S (2006) Genetic structure of the star sea squirt, *Botryllus schlosseri*, introduced in southern European harbours. *Mol Ecol* 15:3957-3967
- Lovejoy NR, de Araújo MLG (2000) Molecular systematics, biogeography, and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Mol Ecol* 9:259-268
- Lydeard C, Roe KJ (1997) The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. In: Kocher TD, Stepien CA (eds) *Molecular systematics of fishes*. Academic Press, New York, pp 285-303
- Lynch M, Crease TJ (1990) The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol Biol Evol* 7:377-394
- MacDonald JD (1859) On the Anatomical Characters of Three Australian Species of Tunicata Referable to Savigny's Subgenus *Caesira*. *Trans Linn Soc London* 22:367-371
- Madrid VM, Taylor GT, Scranton MI, Chistoserdov AY (2001) Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities in the anoxic zone of the Cariaco Basin. *Appl Environ Microbiol* 67:1663-1674

- Maeda T, Murakami M, Ohsugi SY, Furushita M, Mitsutani A, Shiba T (1998) Perspectives of the development of 16S rDNA probes specific for algicidal and/or algal-lytic gliding bacteria. *Fish Sci* 64:861-865
- Maldonado LA, Stach JE, Pathom-aree W, Ward AC, Bull AT, Goodfellow M (2005) Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:11-18
- 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. *Mol Ecol* 13:597-611
- Martínez-García M, Díaz-Valdés M, Ramos-Esplá A, Salvador N, Lopez P, Larriba E, Antón J (2007) Cytotoxicity of the ascidian *Cystodytes dellechiaiei* against tumor cells and study of the involvement of associated microbiota in the production of cytotoxic compounds. *Mar Drugs* 5:52-70
- Matschiner M, Hanel R, Salzburger W (2009) Gene flow by larval dispersal in the Antarctic notothenioid fish *Gobionotothen gibberifrons*. *Mol Ecol* 18:2574-2587
- Matsuda T, Morishita M, Hinomoto N, Gotoh T (2014) Phylogenetic Analysis of the Spider Mite Sub-Family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae) Based on the Mitochondrial COI Gene and the 18S and the 5' End of the 28S rRNA Genes Indicates That Several Genera Are Polyphyletic. *PloS one* 9(10), e108672
- Matthysse AG, Deschet K, Williams M, Marry M, White AR, Smith WC (2004) A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:986-991
- McCarthy C (1998) Chromas ver. 1.45. School of Health Science, Griffith University, Queensland, Australia. <http://www.techne-lysium.com.au/chromas.html>
- McClintock JB, Baker BJ (1997) A review of the chemical ecology of Antarctic marine invertebrates. *Am Zool* 37:329-342
- McClintock JB, Baker BJ (1998) Chemical ecology in Antarctic seas. *Am Sci* 86:254-263
- Menezes C, Bonugli-Santos RC, Miquelatto PB, Passarini MR, Silva CH, Justo MR, Leal RR, Fantinatti-Garboggini F, Oliveira VM, Berlinck GSR, Sette LD (2010) Microbial diversity

- associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol Res* 165:466-482
- Meyer A (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes* 2:1-38
- Meyer A (1994) Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trend Ecol Evol* 9:278-280
- Meziti A, Kormas KA, Pancucci-Papadopoulou MA, Thessalou-Legaki M (2007) Bacterial phylotypes associated with the digestive tract of the sea urchin *Paracentrotus lividus* and the ascidian *Microcosmus sp.* *Russ J Mar Biol* 33:84-91
- Michaelsen W (1904) Revision der compositen Styeliden oder Polyzoinen. *Mitteil Naturhist Mus Hamburg* 21:1-24
- Michaelsen W (1924) Ascidae Krikobranchiae von Neuseeland, den Chatham und den Auckland Inseln. *Vidensk Meddel Dansk Natur Foren* 77:263-434
- Michaelsen W (1930) Ascidae Krikobranchiae. *Fauna Südwest-Australiens* 5:463-558
- Millar RH (1960) Ascidiacea. *Disc Rep* 30:1-160
- Millar RH (1963) Australian ascidians in the British Museum (Natural History). *Proc Zool Soc Lond* 141:689-746
- Millar RH (1966) Tunicata-Ascidiacea. *Marine invertebrates of Scandinavia* 1:1-123
- Millar RH (1970) British Ascidiacea. *Synopses of the British Fauna (New Series) n°1*. Linnean Society, Academic Press, London, p 92
- Millar RH (1988) Ascidiacea collected during the International Indian Ocean Expedition. *J Nat Hist* 22:823-848
- Milne-Edwards H (1841) Observations sur les ascidies composées des côtes de la Manche. *Mém Acad Sci Inst France* 18:217-326
- Mincer TJ, Fenical W, Jensen PR (2005) Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol* 71:7019-7028

- Miyata Y, Diyabalanage T, Amsler CD, McClintock JB, Valeriotte FA, Baker BJ (2007) Ecdysteroids from the antarctic tunicate *Synoicum adareanum*. J Nat Prod 70:1859-1864
- Mohamed NM, Colman AS, Tal Y, Hill RT (2008) Diversity and expression of nitrogen fixation genes in bacterial symbionts of marine sponges. Env Microbiol 10:2910-2921
- Monniot C, Monniot F (1972) Clé mondiale des genres d'ascidies. Arch Zool expér gén 113:311-367
- Monniot C, Monniot F (1983) Ascidies antarctiques et sub-antarctiques: morphologie et biogéographie. Mem Mus Nat Hist Nat Nouv Ser A 125:1-168
- Monniot C, Monniot F (1987). Some bathyal ascidians from the New Zealand area NZ J Zool 14:399-407
- Monniot C, Monniot F, Laboute P (1991) Coral Reef Ascidiaceans of New Caledonia. Orstom, Paris , p 247
- Monniot F, 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 F, Millar RH (1988) A new genus and species of an aplousobranchiate ascidian (Tunicata, Ascidiacea) from New Caledonia, of uncertain systematic position. Indo-Mal Zool 5:321-327
- Monniot F, Monniot C (2001) Ascidiaceans from the tropical western Pacific. Zoosystema 23:201-388
- Moore WS, DeFilippis VR (1997) The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial cytochrome b. In: Mindell DP (ed) Avian molecular evolution and systematic. Academic Press, San Diego, CA pp 83-119
- Moran MA, Buchan A, González JM, Heidelberg JF and others (2004) Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. Nature 432:910-913
- Moran NA, Degnan PH, Santos SR, Dunbar HE, Ochman H (2005) The players in a mutualistic symbiosis: insects, bacteria, viruses, and virulence genes. Proc Natl Acad Sci USA 102:16919-16926
- Moran P, Kornfield I (1993) Retention of an ancestral polymorphism in the Mbuna species flock (Teleostei: Cichlidae) of Lake Malawi. Mol Biol Evol 10:1015-1015

- Moreno TR, Rocha RM (2008) Phylogeny of the Aplousobranchia (Tunicata: Ascidiacea). *Rev Bras Zool* 25:269-298
- Morita T (1999) Molecular phylogenetic relationships of the deep sea fish genus *Coryphaenoides* (Gadiformes: Macrouridae) based on mitochondrial DNA. *Mol Phylogenet Evol* 13:447-454
- Morris RM, Longnecker K, Giovannoni SJ (2006) *Pirellula* and OM43 are among the dominant lineages identified in an Oregon coast diatom bloom. *Env Microbiol* 8:1361-1370
- Mühlenhardt-Siegel U (1988) Some results on quantitative investigations of macrozoobenthos in the Scotia Arct (Antarctica). *Pol Biol* 8:241-248
- Munn CB (2004) Symbiotic associations. In: Watts A (ed) *Marine Microbiology*. Trowbridge, UK: Cromwell Press, pp 167-181
- Nakanishi K, Nishijima M, Nishimura M, Kuwano S, Saga N (1996) Bacteria that induce morphogenesis in *Ulva pertusa* (Chlorophyta) grown under axenic conditions. *J Phycol* 32:479-482
- Near TJ, Parker SK, Detrich HW (2006) A genomic fossil reveals key steps in hemoglobin loss by the antarctic icefishes. *Mol Biol Evol* 23:2008-2016
- Nedashkovskaya OI, Suzuki M, Vysotskii MV, Mikhailov VV (2003) *Reichenbachia agariperforans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium in the phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:81-85
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York
- Newbold RW, Jensen PR, Fenical W, Pawlik JR (1999) Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquat Microb Ecol* 19:279-284
- Newman L, Convey P, Gibson JAE, Linse K (2009) Antarctic paleobiology: glacial refugia and constraints on past ice-sheet reconstructions. *PAGES News* 17:22-24
- Nicolaou KC, Guduru R, Sun Y-P, Banerji B, Chen DY-K (2007) Total synthesis of the originally proposed and revised structures of Palmerolide A. *Angew Chem Int Ed* 46:5896-5900

- Nielsen JL, Schramm A, Bernhard AE, Van Den Engh G J, Stahl DA (2004) Flow cytometry-assisted cloning of specific sequence motifs from complex 16S rRNA gene libraries. *Appl Environ Microbiol* 70:7550-7554
- Nishijima M, Adachi K, Katsuta A, Shizuri Y, Yamasato K (2013) *Endozoicomonas numazuensis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from marine sponges, and emended description of the genus *Endozoicomonas* Kurahashi and Yokota 2007. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:709-714
- Noguez JH, Diyabalanage TKK, Miyata Y, Xie XS, Valeriote FA, Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2011) Palmerolide macrolides from the Antarctic tunicate *Synoicum adareanum*. *Bioorg Med Chem* 19:6608-6614
- Nong GT, Najjar RG, Seidov D, Peterson WH (2000) Simulation of ocean temperature change due to the opening of Drake Passage. *Geophys Res Lett* 27:2689-2692
- Normark BB, McCune AR, Harrison RG (1991) Phylogenetic relationships of neopterygian fishes, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Biol Evol* 8:819-834
- Norton JM (2011) Diversity and environmental distribution of ammonia-oxidizing bacteria. In: Ward BB, Klotz MG, Arp DJ (eds) *Nitrification*. ASM Press, Washington, DC, pp 39-55
- Noss RF (1990) Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conserv Biol* 4:355-364
- Nott JT (1892) On the composite ascidians of the Noth Shore Reef. *Trans NZ Inst* 24: 305-334
- Nowlin Jr.WD, Klinck, JM (1986) The physics of the Antarctic Circumpolar Current. *Rev Geophys* 24:469-491
- Nunn GB, Stanley SE (1998) Body size effects and rates of cytochrome b evolution in tube-nosed seabirds. *Mol Biol Evol* 15:1360-1371
- O'Halloran JA, Barbosa TM, Morrissey JP, Kennedy J, Dobson AD, O'Gara F (2013) *Pseudovibrio axinellae* sp. nov., isolated from an Irish marine sponge. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:141-145
- O'Halloran JA, Barbosa TM, Morrissey JP, Kennedy J, O'Gara F, Dobson ADW (2011) Diversity and antimicrobial activity of *Pseudovibrio* spp. from Irish marine sponges *J Appl Microbiol* 110:1495-1508

- Oka A (1912) On *Cyathocormus mirabilis* n.gen., sp. nov., the type of a new family of compound ascidians from Japan. J Coll Sci Imp Univ Tokyo 32:1-30
- Oka A (1933) Ein Fall von KolonialKnospung bei einer Synascidie. Proc Imp Acad Japan 9:436-438
- O'Mullan GD, Ward BB (2005) Relationship of temporal and spatial variabilities of ammonia-oxidizing bacteria to nitrification rates in Monterey Bay, California. Appl Environ Microbiol 71:697-705
- O'Sullivan LA, Fuller KE, Thomas EM, Turley CM, Fry JC, Weightman AJ (2004) Distribution and culturability of the uncultivated 'AGG58 cluster' of the Bacteroidetes phylum in aquatic environments. FEMS Microbiol Ecol 47:359-370
- Page RDM (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comp Appl Biosci 12:357-358
- Païssé S, Goñi-Urriza M, Coulon F, Duran R (2010) How a bacterial community originating from a contaminated coastal sediment responds to an oil input. Microb Ecol 60:394-405
- Palmer TJ, Wilson MA (1988) Parasitism of Ordovician bryozoans and the origin of pseudoborings. Palaeontology 31:939-949
- Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. Annu Rev Ecol Syst 25:547-572
- Pastene LA, Goto M, Kanda N, Zerbini AN, Kerem D, Watanabe K, Bessho Y, Hasegawa M, Nielsen R, Larsen F, Palsboll PJ (2007) Radiation and speciation of pelagic organisms during periods of global warming: the case of the common minke whale, *Balaenoptera acutorostrata*. Mol Ecol 16:1481-1495
- Pawlik JR, Chanas B, Toonen RJ, Fenical W (1995) Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. Mar Ecol Prog Ser 127:183-194
- Peng X, Adachi K, Chen C, Kasai H, Kanoh K, Shizuri Y, Misawa N (2006) Discovery of a marine bacterium producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl esters, parabens. Appl Environ Microbiol 72:5556-5561
- Pérès JM (1946) Remarques sur le polymorphisme des ascidies. Compte-rendu de la Société de Biogéographie XXI

- Pérez-Portela R, Turon X (2008) Phylogenetic relationships of the Clavelinidae and Pycnoclavellidae (Ascidiacea) inferred from mtDNA data. *Invertebr Biol* 127:108-120
- Perrier E (1898) Note sur la Classification des Tuniciers. *C R Acad Sci Paris* 126:1-5
- Perseke M, Golombek A, Schlegel M, Struck TH (2013) The Impact of Mitochondrial Genome Analyses on the Understanding of Deuterostome Phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* 66:898-905
- Petroni G, Spring S, Schleifer KH, Verni F, Rosati G (2000) Defensive extrusive ectosymbionts of *Euplotidium* (Ciliophora) that contain microtubule-like structures are bacteria related to *Verrucomicrobia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1813-1817
- Philippi RA (1843) *Rhopalaea* ein neues Genus der einfachen Ascidien. *Archiv für Anatomie und Physiologie* 1:45-47
- Phipps CJ (1774) Voyage au pôle boréale. Appendix 194. London
- Pichon D, Gaia V, Norman MD, Boucher-Rodoni R (2005) Phylogenetic diversity of epibiotic bacteria in the accessory nidamental glands of squids (Cephalopoda: Loliginidae and Idiosepiidae). *Mar Biol* 147:1323-1332
- Piel J (2006) Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr Med Chem* 13:39-50
- Pimentel-Elardo SM, Tiro LP, Grozdanov L, Hentschel U (2008) *Saccharopolyspora cebuensis* sp.nov., a novel actinomycete isolated from a Philippine sponge (Porifera). *Int J Syst Evol Microbiol* 58:628-632
- Pineda MC, López-Legentil S, Turon X (2011) The Whereabouts of an Ancient Wanderer: global Phylogeography of the Solitary Ascidian *Styela plicata*. *PlosONE* 6:e25495
- Piñero D, Barahona A, Eguiarte L, Olivares AR, Lizana RS (2008) La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. En: *Capital natural de México*. CONABIO, México, 1:415-435
- Pinhassi J, Zweifel UL, Hagstroëm A (1997) Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:3359-3366

- Pollard D, DeConto RM (2009) Modelling West Antarctic ice sheet growth and collapse through the past five million years. *Nature* 458:329-333
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818
- Powell SM, Bowman JP, Snape I, Stark JS (2003) Microbial community variation in pristine and polluted nearshore Antarctic sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 45:135-145
- Purkhold U, Wagner M, Timmermann G, Pommerening-Röser A, Koops HP (2003) 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1485-1494
- Qi Z, Qian Z (2011) Taxonomic and genetic status of lancelet in Weihai coastal waters based on mitochondrial DNA sequence. *Chin J Oceanol Limnol* 29:623-632
- Quévrain E, Domart-Coulon I, Pernice M, Bourguet-Kondracki ML (2009) Novel natural parabens produced by a *Microbulbifer* bacterium in its calcareous sponge host *Leuconia nivea*. *Env Microbiol* 11:1527-1539
- Radjasa OK, Sabdono A, Zocchi J, Zocchi E (2007) Richness of Secondary Metabolite-Producing Marine Bacteria Associated with Sponge *Haliclona sp.* *I J Pharmacol* 3:275-279
- Raina JB, Tapiolas D, Willis BL, Bourne DG (2009) Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. *Appl Environ Microbiol* 75:3492-3501
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.5. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>
- Raupach MJ, Thatje S, Dambach J, Rehm P, Misof B, Leese F (2010) Genetic homogeneity and circum-Antarctic distribution of two benthic shrimp species of the Southern Ocean, *Chorismus antarcticus* and *Nematocarcinus lanceopes*. *Mar Biol* 157:1783-1797
- Raupach MJ, Wägele JW (2006) Distinguishing cryptic species in Antarctic Asellota (Crustacea: Isopoda)-a preliminary study of mitochondrial DNA in *Acanthaspidia drygalskii*. *Antarct Sci* 18:191-198
- Ray N, Currat M, Excoffier L (2003) Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Mol Biol Evol* 20:76-86

- Redikorzev V (1913) Neue Ascidien. *Zool Anz* 43:204-213
- Renier SA (1804) Prospetto della classe dei vermi. In: *Tavola Alfabetica delle Conchiglie Adriatiche*. Padua, pp 15-27
- Ribera I, Vogler AP (2004) Speciation of Iberian diving beetles in Pleistocene refugia (Coleoptera, Dytiscidae). *Mol Ecol* 13:179-193
- Riedel T, Teshima H, Petersen J, Fiebig A, Davenport K, Daligault H, et al (2013) Genome sequence of the *Leisingera aquimarina* type strain (DSM 24565T), a member of the marine *Roseobacter* clade rich in extrachromosomal elements. *Stand Genomic Sci* 8:389-402
- Riesenfeld CS, Murray AE, Baker BJ (2008) Characterization of the microbial community and polyketide biosynthetic potential in the palmerolide-producing tunicate *Synoicum adareanum*. *J Nat Prod* 71:1812-1818
- Ritter WE (1904) *Euherdmania* vs. *Herdmania* Preoccupied. *Zool Anz* 27:650-651
- Rocha-Olivares A, Rosenblatt RH, Vetter RD (1999) Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the rockfish subgenus *Sebastomus* (Sebastes, Scorpaenidae) based on mitochondrial cytochrome b and control region sequences. *Mol Phy Evol* 11:441-458
- Rodicio MR, Mendoza MC (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microb Clin* 22:238-245
- Rogers AD (2007) Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Phil Trans R Soc B* 362:2191-2214
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552-569
- Romanenko LA, Tanaka N, Frolova GM, Svetashev V I, Mikhailov VV (2011) *Litoreibacter albidus* gen. nov., sp. nov. and . nov., members of the class Alphaproteobacteria isolated from the seashore. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:148-154
- Ronquist F, Huelsenbeck J (2003) MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574
- Ross CA, Ross JR (1985) Carboniferous and early Permian biogeography. *Geology* 13:27-30

- Rouse GW, Goffredi SK, Vrijenhoek RC (2004) *Osedax*: bone-eating marine worms with dwarf males. *Science* 305:668-671
- Rozen ST, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA pp 365-386
- Sabbadin A (1982) Formal genetics of ascidians. *Am Zool* 22:765-773
- Sahade R, Tatián M, Kowalke J, Kühne S, Esnal G (1998) Benthic faunal associations on soft substrates at Potter Cove, King George Island, Antarctica. *Polar Biol* 19:85-9147:1-410
- Sáiz-Salinas JI, Ramos A, García FJ, Troncoso JS, San Martín G, Sanz C, Palacin C (1997) Quantitative analysis of macrobenthic soft-bottom assemblages in South Shetland waters (Antarctica). *Polar Biol* 17:393-400
- Sakai T, Ishizuka K, Kato I (2003) Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterium. *Mar Biotechnol* 5:409-416
- Salomon CE, Magarvey NA, Sherman DH (2004) Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat prod rep* 21:105-121
- Santos O, Pontes PV, Santos JF, Muricy G, Giambiagi-deMarval M, Laport MS (2010) Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities
- Saul DJ, Aislabie JM, Brown CE, Harris L, Foght JM (2005) Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* 53:141-155
- Savidge DK, Amft JA (2009) Circulation on the West Antarctic Peninsula derived from 6 years of shipboard ADCP transects. *Deep Sea Res Part I* 56:1633–1655
- Savigny JC (1816) Recherches anatomiques sur les ascidies composées et les ascidies simples. Système de la classe des ascidies. In: *Mémoires sur les animaux sans vertèbres*. Paris, G. Dufour, part 2 p 239
- Schäfer H, Servais P, Muyzer G (2000) Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. *Arch Microbiol* 173:138-145

- Scheuermayer M, Gulder TA, Bringmann G, Hentschel U (2006) *Rubritalea marina* gen. nov., sp. nov., a marine representative of the phylum 'Verrucomicrobia', isolated from a sponge (Porifera). *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2119-2124
- Schuett C, Doepke H, Grathoff A, Gedde M (2007) Bacterial aggregates in the tentacles of the sea anemone *Metridium senile*. *Helgol Mar Res* 61:211-216
- Sears MA, Gerhart DJ, Rittschof D (1990) Antifouling agents from marine sponge *Lissodendoryx isodictyalis*. *Carter J Chem Ecol* 16:791-800
- Seeliger O (1885) Die Entwicklungsgeschichte der socialen Ascidien. *Jenaische Zeitschrift fur Naturwissenschaften* 18:45-120
- Sertan-de Guzman AA, Predicala RZ, Bernardo EB, Neilan BA, Elardo SP, Mangalindan GC, Tasdemir D, Ireland CM, Barraquio WL, Concepcion GP (2007) *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. *FEMS Microbiol Lett* 277:188-196
- Seyedsayamdost MR, Case RJ, Kolter R, Clardy J (2011) The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nat Chem* 3:331-335
- Shiba T, Taga N (1980) Heterotrophic bacteria attached to seaweeds. *J Exp Mar Biol Ecol* 47:251-258
- Shieh WY, Lin YT, Jean WD (2004) *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2307-2312
- Shu DG, Chen L, Zhang XL (2001) An early Cambrian tunicate from China. *Nature* 411:472-473
- Singh TR, Tsagkogeorga G, Delsuc F, Blanquart S, Shenkar N, Loya Y, Douzery EJ, Huchon D (2009) Tunicate mitogenomics and phylogenetics: peculiarities of the *Herdmania momus* mitochondrial genome and support for the new chordate phylogeny. *BMC Genomics*
- Slama K, Lafont R (1995) Insect hormones-ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur J Entomol* 92:355-355
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annu Rev Ecol System* 16:393-430

- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792
- Slatkin M, Barton NH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349-1368
- Sommerfeld AD, Bishop JDD (1999) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis reveals extensive natural chimerism in a marine protochordate. *Mol Ecol* 8:885-890
- Speck MD, Donachie SP (2012) Widespread Oceanospirillaceae Bacteria in *Porites spp.* *J Mar Biol* doi:10.1155/2012/746720
- Speksnijder AG, Kowalchuk GA, Roest K, Laanbroek HJ (1998) Recovery of a *Nitrosomonas*-like 16S rDNA Sequence Group from Freshwater Habitats. *Syst Appl Microbio* 21:321-330
- Stach T (2008) Chordate phylogeny and evolution: a not so simple three-taxon problem. *J Zool* 276:117-141
- Stach T (2009) Anatomy of the trunk mesoderm in tunicates: homology considerations and phylogenetic interpretation. *Zoomorphology* 128: 97-109
- Stach T, Braband A, Podsiadlowski L (2010) Erosion of phylogenetic signal in tunicate mitochondrial genomes on different levels of analysis. *Mol Phylogenet Evol* 55:860-870
- Stach T, Kirbach A (2009) Larval convergence in a colonial tunicate: the organization of the sarcotubular complex in *Ecteinascidia turbinata* (Perophoridae, Phlebobranchiata, Tunicata, Chordata). *Zoomorphology* 128:1-11
- Stach T, Turbeville JM (2002) Phylogeny of Tunicata inferred from molecular and morphological characters. *Mol Phylogenet Evol* 25:408-428
- Stevens MI, Greenslade P, Hogg ID, Sunnucks P (2006) Examining Southern Hemisphere springtails: could any have survived glaciation of Antarctica? *Mol Biol Evol* 23:874-882
- Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM, Breznak J A (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol* 70:4748-4755

- Stoner DS, Weissman IL (1996) Somatic and germ cell parasitism in a colonial ascidian: possible role for a highly polymorphic allorecognition system. *Evolution* 93:15254-15259
- Strugnell JM, Watts PC, Smith PJ, Allcock AL (2012) Persistent genetic signatures of historic climatic events in an Antarctic octopus. *Mol Ecol* 21:2775-2787
- Sturmbauer C, Meyer A (1992) Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of African cichlid fishes. *Nature* 358:578-581
- Su JY, Peng TS, Long KH, Zeng LM (1985) 24xi-Methyl 5 alpha-cholestane-3 alpha, 6 beta, 9 alpha, 25-tetrol 24-monoacetate, a novel polyhydroxylated steroid from the soft coral *Sarcophyton tortuosum*. *Steroids* 48:233-238
- Sunagawa S, Woodley CM, Medina M (2010) Threatened corals provide underexplored microbial habitats. *PLoS One* 5:e9554
- Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S, Yamamoto S (2001) Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *Int J Sys Evol Microbiol* 51:1639-1652
- Svane I, Young CM (1989) The ecology and behaviour of ascidian larvae. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 27:45-90
- Swalla BJ (2001) Phylogeny of the Urochordates: implications for Chordate Evolution. In: Sawada H, Yokosawa H, Lambert CC (eds) *The Biology of Ascidiaceans*. Tokyo, pp 219-224
- Swalla BJ, Cameron CB, Corley LS, Garey JR (2000) Urochordates are monophyletic within the deuterostomes. *Syst Biol* 49:52-64
- Swalla BJ, Smith AB (2008) Deciphering deuterostome phylogeny: molecular, morphological and palaeontological perspectives. *Phil Trans R Soc B* 363:1557-1568
- Swofford DL (2001) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Tajima K, Hirano T, Nakano K, Ezura Y (1997) Taxonomical study on the causative bacterium of spotting disease of sea urchin. *Strongylocentrotus intermedius*. *Fish Sci* 63:897-900

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739
- Tang Q, Liu H, Mayden R, Xiong B (2006) Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome b gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). *Mol Phylogenet Evol* 39:347-357
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall KA, Pascual M, Turon X (2001) Cryptic species of *Clavelina* (Asciacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean. *Mar Biol* 130:455-462
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall KA, Pascual M, Turon X (2004) Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. *Mol Ecol* 13:3125-3136
- Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:295-347
- Taylor MW, Schupp PJ, de Nys R, Kjelleberg S, Steinberg PD (2005) Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*. *Env Microbiol* 7:419-433
- Thacker RW, Becerro MA, Lumbang WA, Paul VJ (1998) Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef. *Ecology* 79:1740-1750
- Thakur NL, Hentschel U, Krasko A, Pabel CT, Anil AC, Müller WEG (2003) Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for epibacterial chemical defense. *Aquat Microb Ecol* 31:77-83
- Thatje S (2012) Effects of capability for dispersal on the evolution of diversity in antarctic benthos. *Integr Comp Biol* 52:470-482
- Thatje S, Hillenbrand C-D, Larter R (2005) On the origin of Antarctic marine benthic community structure. *Trends Ecol Evol* 20:534-540
- Thatje S, Hillenbrand CD, Mackensen A, Larter R (2008) Life hung by a thread: endurance of Antarctic fauna in glacial periods. *Ecology* 89:682-692
- Thiel V, Neulinger SC, Staufenberg T, Schmaljohann R, Imhoff JF (2007) Spatial distribution of sponge-associated bacteria in the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*. *FEMS Microbiol Ecol* 59:47-63

- 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). *Mol Ecol* 17:5104-5117
- Toggweiler JR, Bjornsson H (1999) Drake Passage and paleoclimate. *J Quat Sci* 15:319-328
- Tokioka T (1967) Pacific Tunicata of the United States National Museum. *Bull US Nat Mus* 251:1-242
- Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37-61
- Troedson AL, Riding JB (2002) Upper Oligocene to Lowermost Miocene Strata of King George Island, South Shetland Islands, Antarctica: Stratigraphy, Facies Analysis and Implications for the Glacial History of the Antarctic Peninsula. *J Sediment Res* 72:510-523
- Trucchi E, Sbordoni V (2009) Unveiling an ancient biological invasion: molecular analysis of an old European alien, the crested porcupine (*Hystrix cristata*). *BMC Evol Biol* 9:109
- Tsagkogeorga G, Turon X, Hopcroft RR, Tilak MK, Feldstein T, Shenkar N, Loya Y, Huchon D, Douzery EJ, Delsuc F (2009) An updated 18S rRNA phylogeny of tunicates based on mixture and secondary structure models. *BMC Evol Biol* 9:187
- Turbeville JM, Schulz JR, Raff RA (1994) Deuterostom phylogeny and the sister group of the chordates: evidence from molecules and morphology. *Mol Biol Evol* 11:648-655
- Turon X (1988) The ascidians of Tossa de Mar (NE Spain) 2. Biological cycles of the colonial species. *Cah Biol Mar* 29:407-418
- Turon X, Becerro MA, Uriz MJ, Llopis J (1996) Small-scale association measures in epibenthic communities as a clue for allelochemical interactions. *Oecologia* 108:351-360
- Turon X, López-Legentil S (2004) Ascidian molecular phylogeny inferred from mtDNA data with emphasis on the Aplousobranchiata. *Mol Phylogenet Evol* 33:309-320
- Turon X, Tarjuelo I, Duran S, Pascual M (2003) Characterising invasion processes with genetic data: an Atlantic clade of *Clavelina lepadiformis* (Asciacea) introduced into Mediterranean harbors. *Hydrobiologia* 503:29-35

- Van Name WG (1902) The ascidians of the Bermuda Islands Trans Conn Acad Arts Sci 11:325-412
- Van Name WG (1945) The North and South American ascidians. Bull Am Mus Nat Hist 84:1-476
- Vandekerckhove TT, Coomans A, Cornelis K, Baert P, Gillis M (2002) Use of the *Verrucomicrobia*-specific probe EUB338-III and fluorescent in situ hybridization for detection of “*Candidatus xiphinematobacter*” cells in nematode hosts. Appl Environ Microbiol 68:3121-3125
- Vandekerckhove TT, Willems A, Gillis M, Coomans A (2000) Occurrence of novel verrucomicrobial species, endosymbiotic and associated with parthenogenesis in *Xiphinema americanum*-group species (Nematoda, Longidoridae). Int J Syst Evol Microbiol 50:2197-2205
- Verrill AE (1871) Descriptions of Some Imperfectly Known and New Ascidians from New England. Am J Sci 1:54-58, 93-100, 211-212, 288-294, 443-446
- Völsch A, Nader WF, Geiss HK, Nebe G, Birr C (1990) Detection and analysis of two serotypes of ammonia-oxidizing bacteria in sewage plants by flow cytometry. Appl Environ Microbiol 56:2430-2435
- VOß J (1988) Zoogeographie und Gemeinschaftsanalyse des Makrozoobenthos des Weddellmeeres (Antarktis). Ber Polarforsch 45:1-145
- Wada H (1998) Evolutionary history of free-swimming and sessile lifestyles in urochordates as deduced from 18S rDNA molecular phylogeny. Mol Biol Evol 15:1189-1194
- Wada H, Makabe KW, Nakauchi M, Satoh N (1992) Phylogenetic relationships between solitary and colonial ascidians, as inferred from the sequence of the central region of their respective 18S rDNAs. Biol Bull 183:448-455
- Wagner-Döbler I, Biebl H (2006) Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. Annu Rev Microbiol 60:255-280
- Wahl M (1995) Bacterial epibiosis on Bahamian and Pacific ascidians. J Exp Mar Biol Ecol 191:239-255

- Walker M, Johnsen S, Rasmussen SO, Popp T, Steffensen JP, et al. (2009) Formal definition and dating of the GSSP (Global Stratotype Section and Point) for the base of the Holocene using the Greenland NGRIP ice core, and selected auxiliary records. *J Quat Sci* 24:3-17
- Ward BB, Eveillard D, Kirshtein JD, Nelson JD, Voytek MA, Jackson GA (2007) Ammonia-oxidizing bacterial community composition in estuarine and oceanic environments assessed using a functional gene microarray. *Env Microbiol* 9:2522-2538
- Wares JP, Gaines SD, Cunningham CW (2001) A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution* 55:295-306
- Webster NS, Bourne D (2007) Bacterial community structure associated with the Antarctic soft coral, *Alcyonium antarcticum*. *FEMS Microbiol Ecol* 59:81-94
- Webster NS, Negri AP, Munro MM, Battershill CN (2004) Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environ Microbiol* 6:288-300
- Weidner S, Arnold W, Stackebrandt E, Pühler A (2000) Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with leaves of the seagrass *Halophila stipulacea* by a culture-independent small-subunit rRNA gene approach. *Microb Ecol* 39:22-31
- Wertz JT, Kim E, Breznak JA, Schmidt TM, Rodrigues JL (2012) Genomic and physiological characterization of the Verrucomicrobia isolate *Diplosphaera colitermitum* gen. nov., sp. nov., reveals microaerophily and nitrogen fixation genes. *Appl Environ Microbiol* 78:1544-1555
- Wichels A, Würtz S, Döpke H, Schütt C, Gerds G (2006) Bacterial diversity in the breadcrumb sponge *Halichondria panicea* (Pallas). *FEMS Microbiol Ecol* 56:102-118
- Willemsen PR (1994) The screening of sponge extracts for antifouling activity using a bioassay with laboratory-reared cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Int Biodeterior Biodegrad* 34:361-373
- Williams DE, Ayer SW, Andersen R J (1986) Diaulusterols A and B from the skin extracts of the dorid nudibranch *Diaulula sandiegensis*. *Canad J Chem* 64:1527-1529
- Wilson NG, Schrödl M, Halanych KM (2009) Ocean barriers and glaciation: evidence for explosive radiation of mitochondrial lineages in the Antarctic sea slug *Doris kerguelenensis* (Mollusca, Nudibranchia). *Mol Ecol* 18:965-984

- Winchell CJ, Sullivan J, Cameron CB, Swalla BJ, Mallatt J (2002) Evaluating hypotheses of deuterostome phylogeny and chordate evolution with new LSU and SSU ribosomal DNA data. *Mol Biol Evol* 19:762-776
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271
- Wright S (1969) Evolution and the genetics of populations. The theory of gene frequencies, vol 2. University of Chicago Press, Chicago, IL
- Xie XS, Padron D, Liao X, Wang J, Roth MG, De Brabander JK (2004) Salicylilalamide A Inhibits the V₀ Sector of the V-ATPase through a Mechanism Distinct from Bafilomycin A₁. *J Biol Chem* 279:19755-19763
- Yang CS, Chen MH, Arun AB, Chen CA, Wang JT, Chen WM (2010) *Endozoicomonas montiporae* sp. nov., isolated from the encrusting pore coral *Montipora aequituberculata*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1158-1162
- Yi S, Batten DJ, Lee SJ (2005) Provenance of recycled palynomorph assemblages recovered from surficial glaciomarine sediments in Bransfield Strait, offshore Antarctic Peninsula. *Cret Res* 26:906-919
- Yokobori S, Kurabayashi A, Neilan BA, Maruyama T, Hirose E (2006) Multiple origins of the ascidian-Prochloron symbiosis: molecular phylogeny of photosymbiotic and non-symbiotic colonial ascidians inferred from 18S rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 40:8-19
- Yokobori S, Oshima T, Wada H (2005) Complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *Doliolum nationalis* with implications for evolution of urochordates. *Mol Phylogenet Evol* 34:273-283
- Yoon JH, Kim IG, Oh TK, Park YH (2004) *Microbulbifer maritimus* sp. nov., isolated from an intertidal sediment from the Yellow Sea, Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1111-1116
- Yoon JH, Kim IG, Shin DY, Kang KH, Park Y H (2003) *Microbulbifer salipaludis* sp. nov., a moderate halophile isolated from a Korean salt marsh. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:53-57
- Yu DH, Chu KH (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 PO, O'Neil PG (2000) Microgeographic genetic differentiation in a colonial ascidian (*Botryllus schlosseri*) population. *Mar Biol* 137:583-588

- Zachos J, Pagani M, Sloan L, Thomas E, Billups K (2001) Trends, rhythms and aberrations in global climate, 65 Ma to present. *Science* 292:686-693
- Zane L, Patarnello T (2000) Krill: a possible model for investigating the effects of ocean currents on the genetic structure of a pelagic invertebrate. *Can J Fish Aquat Sci* 5:16-23
- Zeng L, Jacobs M, Swalla B (2006) Coloniality has evolved once in Stolidobranch ascidians. *Integr Comp Biol* 46:255-268
- Zeng L, Swalla B (2005) Molecular phylogeny of the protochordates: chordate evolution. *J Zool* 83:24-33
- Zhang H, Lee YK, Zhang W, Lee HK (2006) Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* 90:159-169
- Zhang H, Zhang W, Jin Y, Jin M, Yu X (2008) A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:241-248
- Zielinski FU, Pernthaler A, Duperron S, Raggi L, Giere O, Borowski C, Dubilier N (2009) Widespread occurrence of an intranuclear bacterial parasite in vent and seep bathymodiolin mussels. *Env Microbiol* 11:1150-1167

APÉNDICE

El contenido de la Tabla se basa en la escala de tiempo geológico de la Comisión Internacional de Estratigrafía (2009)

Era Eratema	Periodo	Época	Edad	Inicio, en millones de años
Cenozoico	Cuaternario	Holoceno	Cron: Preboreal, Boreal, Atlántico, Subboreal y Subatlántico	0,0117
		Pleistoceno	Superior / Tardío (Tarantiense)	0,126
			Medio (Ioniense)	0,781
			Calabriense	1,80
			Gelasiense	2,58
	Neógeno	Plioceno	Piacenziense	3,600
			Zancliense	5,333
		Mioceno	Messiniense	7,246
			Tortonense	11,62
			Serravalliense	13,82
			Langhiense	15,97
			Burdigaliense	20,44
			Aquitaniense	23,03
	Paleógeno	Oligoceno	Chattiense	28,1
			Rupeliense	33,9
		Eoceno	Priaboniense	38,0
			Bartoniense	41,3
			Luteciense	47,8
			Ypresiense	56,0
		Paleoceno	Thanetiense	59,2
Selandiense			~61,6	
Daniense			66,0	
Mesozoico	Cretácico	Superior / Tardío	Maastrichtiense	72,1±0,2
			Campaniense	83,6±0,2
			Santoniense	86,3±0,5
			Coniaciense	89,8±0,3
			Turoniense	93,9
			Cenomaniense	100,5
		Inferior / Temprano	Albiense	~113,0
			Aptiense	~125,0
			Barremiense	~129,4
			Hauteriviense	~132,9
	Jurásico	Superior / Tardío	Valanginiense	~139,8
			Berriasiense	~145,0
			Titoniense	152,1±0,9
		Medio	Kimmeridgiense	157,3±1,0
Oxfordiense	163,5±1,0			
Calloviense	166,1±1,2			

Era Eratema	Periodo	Época	Edad	Inicio, en millones de años	
			Bathonense	168,3±1,3	
			Bajociense	170,3±1,4	
			Aaleniense	174,1±1,0	
		Inferior / Temprano	Toarciense	182,7±0,7	
			Pliensbachense	190,8±1,0	
			Sinemuriense	199,3±0,3	
	Hettangiense		201,3±0,2		
	Triásico	Superior / Tardío	Rhaetiense	~208,5	
			Noriense	~228	
			Carniense	~235	
		Medio	Ladiniense	~242	
			Anisiense	247,2	
		Inferior / Temprano	Olenekiense	251,2	
	Induense		252,2±0,5		
Paleozoico	Pérmico	Lopingiense	Changhsingiense	254,2±0,1	
			Wuchiapingiense	259,9±0,4	
		Guadalupiense	Capitaniense	265,1±0,4	
			Wordiense	268,8±0,5	
			Roadiense	272,3±0,5	
		Cisuraliense	Kunguriense	279,3±0,6	
			Artinskiense	290,1±0,1	
			Sakmariense	295,5±0,4	
			Asseliense	298,9±0,2	
		Carbonífero	Pensilvánico	Gzheliense	303,7±0,1
				Kasimoviense	307,0 ±0,1
				Moscoviense	315,2±0,2
	Bashkiriense			323,2±0,4	
	Misisípico		Serpukhoviense	330,9±0,2	
			Viseense	346,7±0,4	
			Tournaisiense	358,9±0,4	
	Devónico	Superior / Tardío	Fameniense	372,2±1,6	
			Frasniense	382,7±1,6	
		Medio	Givetiense	387,7±0,8	
			Eifeliense	393,3±1,2	
		Inferior / Temprano	Emsiense	407,6±2,6	
			Pragiense	410,8±2,8	
	Silúrico		Lochkoviense	419,2±3,2	
			Prídoli	423,0±2,3	
			Ludlow	Ludfordiense	425,6±0,9

Era Eratema	Periodo	Época	Edad	Inicio, en millones de años
		Wenlock	Gorstiense	427,4±0,5
			Homeriense	430,5±0,7
			Sheinwoodiense	433,4±0,8
		Llandovery	Telychiense	438,5±1,1
			Aeroniense	440,8±1,2
			Rhuddaniense	443,4±1,5
	Ordovícico	Superior / Tardío	Hirnantiense	445,2±1,4
			Katiense	453,0±0,7
			Sandbiense	458,4±0,9
		Medio	Darriwiliense	467,3±1,1
			Dapingiense	470,0±1,4
		Inferior / Temprano	Floiense	477,7±1,4
	Tremadociense		485,4±1,9	
	Cámbrico	Furongiense	Piso / Edad 10	~489,5
			Jiangshaniense	~494
			Paibiense	~497
		Serie / Época 3	Guzhangense	~500,5
			Drumiense	~504,5
			Piso / Edad 5	~509
		Serie / Época 2	Piso / Edad 4	~514
Piso / Edad 3			~521	
Terreneuviense		Piso / Edad 2	~529	
		Fortuniense	541,0±1,0	

**COPIA DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA
TESIS**

*Genetic variability and differentiation
among polymorphic populations of the
genus Synoicum (Tunicata, Ascidiacea)
from the South Shetland Islands*

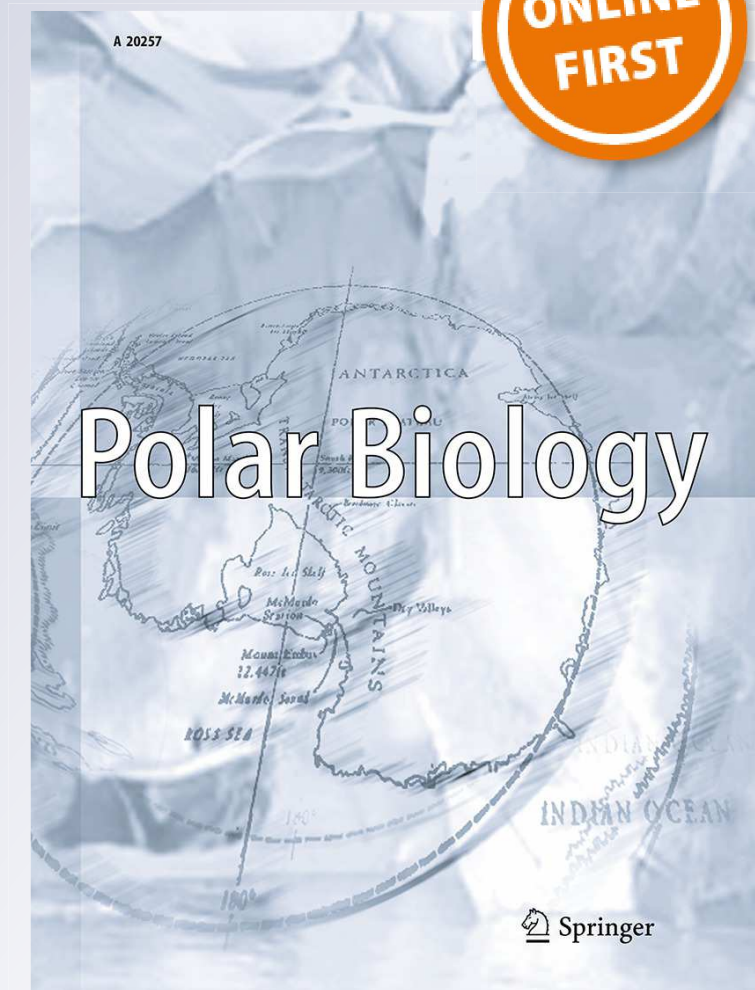
**M. Paula Wiernes, Ricardo Sahade,
Marcos Tatián & Marina B. Chiappero**

Polar Biology

ISSN 0722-4060

Polar Biol

DOI 10.1007/s00300-013-1312-x



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Genetic variability and differentiation among polymorphic populations of the genus *Synoicum* (Tunicata, Ascidiacea) from the South Shetland Islands

M. Paula Wiernes · Ricardo Sahade ·
Marcos Tatián · Marina B. Chiappero

Received: 24 July 2012 / Revised: 28 February 2013 / Accepted: 4 March 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract In Antarctica, ascidians are among the most conspicuous and abundant organisms in benthic ecosystems and many species present wide distribution patterns. Two similar forms of ascidians of the colonial genus *Synoicum* were sampled along the South Shetland Islands, one greenish-yellow with elongated colony stalks and the other yellow-orange with shorter stalks and more rounded colony bodies. The taxonomic analyses indicated that the greenish-yellow form corresponded to the description of the species *S. ostentor* and the yellow-orange form to that of *S. adareanum*. However, molecular analyses using the cytochrome oxidase I gene did not detect clear differences between both forms. The frequency and geographic distribution of haplotypes indicate that some degree of gene flow may be occurring, strongly suggesting that both morphotypes did not achieve a complete reproductive isolation yet, that they can still interbreed and should

therefore be considered as a single species. Surprisingly, these results are not in line with recent studies of Antarctic fauna using a similar approach, which revealed several cases of morphologically indistinguishable but genetically distinct species.

Keywords *Synoicum* · COI · Morphotypes · Genetic differentiation

Introduction

The Antarctic Ocean has unique characteristics, mostly because unlike the other major oceans, it became isolated about 30 million years ago in the Eocene, with the establishment of the Antarctic Circumpolar Current (ACC) and its associated fronts (Lawver et al. 2011). The ACC acts as a barrier to a free north–south exchange of water, isolating Antarctic shelf communities geographically, climatically, thermally and oceanographically, therefore forming an important biogeographic boundary (Clarke and Crame 1989; Clarke et al. 2005; Barnes et al. 2006). It now displays a unique shelf biota, with ascidians among the most important taxa in the benthic communities (Dayton 1990; Clarke 1996; Clarke and Johnston 2003; Gili et al. 2006).

Synoicum adareanum (Herdman 1902; family Polyclinidae) is a colonial ascidian commonly reported on hard substrates in shallow Antarctic waters. Its wide distribution extends from some subantarctic islands, throughout the Scotia Arc into the Antarctic Peninsula and all along the Continental Antarctic coastline. The clearly visible zooids are clonemates arranged in the tunic forming a circle around a common cloaca that is shared by 6 to 10 zooids (Kott 1969). A similar species, *Synoicum ostentor* Monniot and Monniot 1983, shares some characteristics with the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00300-013-1312-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. P. Wiernes (✉) · R. Sahade · M. Tatián · M. B. Chiappero
Instituto de Diversidad y Ecología Animal (CONICET/UNC),
Avenida Vélez Sarsfield 299, 5000 Córdoba, Argentina
e-mail: paulawiernes@hotmail.com

R. Sahade
e-mail: rsahade@efn.uncor.edu

M. P. Wiernes · R. Sahade · M. Tatián
Ecología Marina, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y
Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba,
Argentina

M. B. Chiappero
Genética de Poblaciones y Evolución, Facultad de Ciencias
Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba,
Córdoba, Argentina

former such as similar colony shape and arrangement of the zooids. *S. ostentor* has been found in areas quite distant from each other: it has been reported at the South Orkney Islands, Balleny Island and Wilkes Land, and its presence is not common (Monniot and Monniot 1983; Monniot et al. 2011). According to Monniot and Monniot (1983), the diagnostic features of both species are as follows: the number of stigmata rows, the number of stigmata per half-row and the position of the ovary. *S. ostentor* may have been misidentified and confused with *S. adareanum* in many ecological and biochemical studies, because the differences between both species are noticeable only after inspection of the zooids at microscopic level. The in vivo coloration in both species is not mentioned, probably because determinations have been made on formaldehyde fixed material (Kott 1969; Monniot and Monniot 1983; Monniot et al. 2011). Kott (1969), however, mentions one collector who observed that living colonies of *S. adareanum* were orange. Recently, Koplovitz et al. (2011) found that *Synoicum adareanum* from the area of the US Palmer Station (Anvers Island, Western Antarctic Peninsula) differing in the form of the colonies, showed marked differences in the anti-diatom activity of secondary metabolites. No reference of the color of the colonies was made. At the South Shetland Islands, two similar forms of *Synoicum* are common: one greenish-yellow with elongated colony stalks and other yellow-orange with shorter colony stalks and more rounded heads (Tatián, personal observation). It is probable that previous taxonomists considered both forms as *S. adareanum* since most of the descriptions (Herdman 1902; Van Name 1945; Millar 1960; Kott 1969; and others) included under *S. adareanum* the whole range of the 3 differential features of the zooids used by Monniot and Monniot (1983) to separate the species. Since these color differences have not been reported in the previous descriptions for either species, the question arises if these two forms correspond to intra-specific polymorphisms within a single species, or to different species.

Besides morphological analyses, in recent years, molecular markers have made it possible to distinguish intraspecific polymorphisms from phenotypic traits that characterized different species in ascidians. For example, color differences in populations of *Botryllus schlosseri* have been found to be determined by several Mendelian loci, and therefore, differences in coloration are an intraspecific polymorphism (Sabbadin 1982; Yund and O'Neil 2000). On the other hand, a correlation between external shape and coloration with the presence of different species has been reported for the colonial ascidians *Pseudodistoma crucigaster* (Tarjuelo et al. 2004), species of *Cystodytes* (López-Legentil et al. 2005) and of *Pycnoclavella* (Pérez-Portela et al. 2007) from the Mediterranean Sea, and *Didemnum molle* from the Ryukyu Islands in Japan (Hirose et al. 2010).

In Polyclinidae, sexual reproduction occurs when sperm released by a hermaphroditic zooid enters through the oral siphon of another zooid from the same or another colony and fertilizes oocytes in the atrium, self-fertilization being a possible trait in this family. The embryonic stage consists of a pelagic tadpole larva with a tail that allows some movements, and it can be easily driven by currents. Given that the larval stage is responsible for dispersion in sessile organisms, species with short-lived larvae or direct development are, in general, expected to have low dispersal potential and therefore to show a strong genetic structure (reviewed in Thatje 2012 for Antarctic invertebrates). All ascidian larvae are lecithotrophic, that is, they do not feed while in the water column and depend on the yolk reserves. Therefore, their life spans are short when compared with other taxa; in colonial ascidians, the free swimming time of larvae ranges from a few minutes to several hours (Svane and Young 1989). When the larva disperses from a mother colony, it rapidly settles down and metamorphoses into a founder individual (oozooid) that, like other clonal invertebrates, grows through asexual reproduction into a multi-individual colony composed of genetically identical zooids (Stoner and Weissman 1996). Demarchi et al. (2010) found a highly significant genetic differentiation among populations of the polyclinid *Aplidium falklandicum* from Low and Livingston Islands. Therefore, it can be expected that *Synoicum* will also present highly differentiated populations at the same geographic scale.

Mitochondrial DNA, and specifically the COI gene, has been used successfully to address speciation and species boundaries problems in several ascidian species and in phylogenetic and phylogeographic studies of this group (Tarjuelo et al. 2001, 2004; Turon et al. 2003; López-Legentil and Turon 2006; López-Legentil et al. 2006; Pérez-Portela and Turon 2008; Hirose et al. 2009; Goldstien et al. 2010; Haydar et al. 2011; Pineda et al. 2011). In the present study, we used morphological analyses and molecular markers (cytochrome oxidase subunit I gene, COI) to evaluate the genetic structuring of four *Synoicum* populations from the Bransfield Strait (Western Antarctic Peninsula) and assess whether the different morphotypes observed in *Synoicum* ascidians along the South Shetland Islands correspond to different or to a single species.

Materials and methods

Sample collection

A total of 53 colonies of *Synoicum* were collected from the South Shetland Islands during the BENTART-06 Antarctic Project of the "BIO Hespérides" in January and February 2006, and during the summer campaign of the Argentine

Antarctic Institute at Potter Cove, in January 2009. One sampling station was located at Deception Island (63°01'S, 60°32'W; 215 m depth; $n = 11$), at which all individuals belonged to the yellow-orange morphotype (YO from now on). Another two stations were sampled at Low Island: Low 45 (63°43'S, 62°21'W; 86 m depth; $n = 14$), where 10 individuals belonged to the greenish-yellow (YG) morphotype and 4 individuals to the YO morphotype and Low 46 (63°43'S, 62°24'W; 97 m depth; $n = 20$), where 10 individuals were YG and the other 10, YO. The last station was sampled at King George (25 de Mayo) Island (Potter Cove; 62°13'S, 58°42'W; 20 m depth; $n = 8$), where all individuals were YO. Samples from Deception, Low 45 and Low 46 were collected with an Agassiz trawl, while samples from Potter Cove were obtained by SCUBA diving. Colonies from Deception, Low 45 and Low 46 sampling stations were photographed immediately after collection. Sampling by SCUBA diving at Potter Cove allowed in situ observations of the colonies and underwater pictures. Sampling locations are shown in Fig. 1 and photographs of the colonies showing the in vivo color are presented in Online Resource 1. Once they were collected, colonies were relaxed by submerging them for several hours in sea water with menthol crystals. Then, a small portion of each colony was dissected, fixed in ethanol 95 % and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until genetic analysis. Zooids of each ethanol-preserved colony were separated using histological instruments under a binocular microscope and processed by removing the tunic, gut and larvae, if any, to avoid amplification from possible contaminants like commensal organisms and gut contents. The bulk of the colonies were fixed in 2.5 % formaldehyde in sea water, to allow the examination of zooids and morphological analysis.

Morphological observations

Morphological characters that differentiate *S. adareanum* from *S. ostentor* according to Monniot and Monniot (1983): number of stigmata rows, number of stigmata per half-row and position of the ovary were analyzed under a stereoscope from material fixed in formaldehyde. Three colonies and 10 zooids per colony of each morphotype were examined per sampling location.

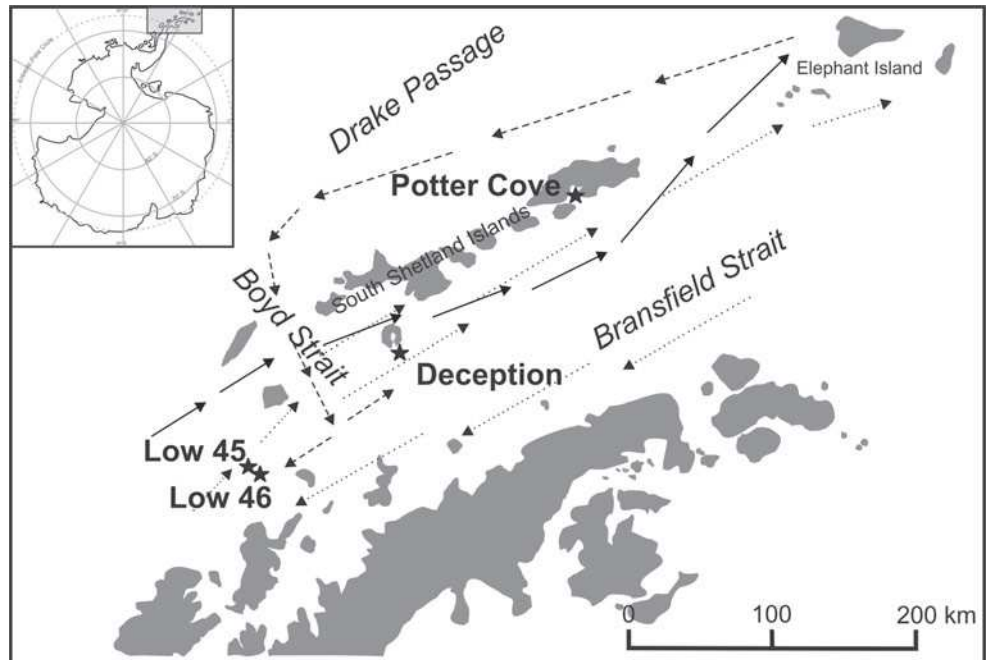
DNA extraction, amplification and sequencing

Total genomic DNA was extracted from the post-abdomen of an individual zooid per colony using the salt purification method described in protocol 1 of Bruford et al. (1992), followed by ethanol precipitation. Once extracted, DNA was stored in double-distilled water at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until PCR amplification. Double-stranded products for the mitochondrial

cytochrome oxidase I gene (COI) were amplified via the polymerase chain reaction (PCR) using the universal primers of Folmer et al. (1994), and purified and sequenced in both directions at MacroGen (USA). However, only four of the fifteen haplotypes found among the 53 zooids sequenced, showed high homology with COI sequences of other species of the family Polyclinidae, after a BLAST search in GenBank. The remaining haplotypes showed high homology with bacterial COI genes and may belong to endosymbionts (Riesenfeld et al. 2008). Therefore, specific primers were designed starting from the consensus COI sequence for species of the family Polyclinidae obtained from GenBank and those sequences of *Synoicum* obtained with the universal primers that showed high homology with them. Designed primer sequences and names were as follows: PolCOI-F (5'-TTGATCTGCTCCTHCTTAGA-3') and PolCOI-R (5'-CCACTAGARTGTGCTAARCC-3'). The expected size of the amplicon is 351 bp.

Polymerase chain reactions were carried out in 50 μl volumes. In addition to the DNA template from each specimen (1 μl from the undiluted DNA), PCR included 5 μl 10 \times reaction buffer [750 mM Tris-HCl pH 8.8, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 % Tween-20], 5 μl MgCl_2 25 mM, 0.75 μl of a 20 mM stock of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1.5 μl of a 10 mM stock of each PolCOI-F and PolCOI-R primers, 0.3 μl of recombinant Taq DNA Polymerase (5 U/ μl stock; Thermo Scientific EP0402, Brazil) and ddH_2O to final volume. PCR amplification was performed in a Px2 Thermal Cycler, Thermo ELECTRON CORPORATION, for 3 min at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 35 cycles of denaturation at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, annealing at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min and extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min. A post-treatment of 7 min at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a final cooling at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ were performed. Negative controls for each primer were included in the amplifications in order to detect bands caused by contamination. PCR products were visualized on 1 % agarose gels stained with ethidium bromide, visualized under UV and photographed. The double-stranded PCR products were purified and sequenced by MacroGen Inc. (USA) using the same primers as for the PCR. Sequences were analyzed using the program CHROMAS version 2.23 (McCarthy 1998) and manually edited. In order to rule out the amplification of non-ascidian sequences, both strands were sequenced and a BLAST search on each haplotype was performed. Sequences were aligned with CLUSTAL X (Thompson et al. 1997) and confirmed by eye. No gap was needed in the alignment, and all sequences were able to be translated into amino acid sequences without stop codons. The final sequence length after alignment and trimming was 304 pb. Once aligned, sequences for all individuals were collapsed into haplotypes.

Fig. 1 Map of the study area showing the location of the sampling sites (stars). The arrows indicate the direction of the major water currents, drawn according to the description in Savidge and Amft (2009). *Straight line*: South Shetland Islands Jet, *dashed line*: Shallow Polar Slope Current, *dotted line*: cyclonic circulation of Bransfield Strait



Population genetic analyses

Using the DNASP 5.10 program (Librado and Rozas 2009), several indices of genetic diversity within sampling stations were estimated: nucleotide diversity (π), the number of polymorphic sites (S ; Nei 1987; Lynch and Crease 1990), haplotype diversity (Hd ; Nei 1987) and the average number of nucleotide differences.

Pairwise genetic distances were calculated between haplotypes under the Tamura-Nei (TrN) model of nucleotide substitution with a gamma parameter value of 0.032, using the ARLEQUIN 3.11 program (Excoffier et al. 2005). The TrN distance was selected according to the best-fit model of nucleotide substitution for our data (GTR+G) by statistical comparisons of the likelihood scores for 56 different models of evolution with the Akaike information criterion, as implemented in Modeltest 3.0 (Posada and Crandall 1998). This distance matrix was used to perform an analysis of molecular variance (AMOVA) and to calculate differentiation between pairs of samples with the Φ_{ST} index. Φ_{ST} is analogous to Wright's (1969) measure of variance in allelic frequencies among populations (F_{ST}), but also takes into account the mutational differences among haplotypes (Excoffier et al. 1992). AMOVA and Φ_{ST} were calculated considering geographic location, and geographic location and morphotype. Significance of all indices was tested through 10,000 permutations. The Arlequin program was used for these calculations. The correlation of pairwise Φ_{ST} values and geographic distance was assessed by means of a Mantel test, performed with Arlequin.

The relationships among haplotypes were estimated using different approaches. First, phylogenetic trees were obtained using maximum parsimony (MP) and neighbor-joining (NJ) with PAUP 4.0b10 (Swofford 2001), and Bayesian analysis (BA) with MrBayes 2.1.3 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). The MP tree was estimated by performing a heuristic search with 1,000 replicates of random stepwise additions of taxa and a tree bisection reconnection branch swapping. The NJ tree was constructed on the basis of TrN distances among haplotypes. In both cases, 1,000 bootstrap replications were performed to construct a 50 % majority rule consensus tree, to evaluate the stability of the nodes. The BA was performed by partitioning the data set by codon position. Models of nucleotide evolution selected by MrModeltest 2.3 (Nylander 2004), according to the Akaike criterion were: GTR for the first, F81+I for the second and HKY for the third codon positions. Four chains of the Markov chain Monte Carlo algorithm were run simultaneously for 5 million generations, on two independent runs. Trees were sampled every 1,000 generations and the first 25 % of them were discarded as burn in. For this analysis, we also included a COI sequence of *S. adareanum* from Terre Adelie (BoLD Database ASCAN011-10) and used *Ciona intestinalis*, *Clavelina lepadimorfis* and *Herdmania momus* as outgroups (GenBank accession numbers NC_004447.2, NC_012887.1 and NC_013561.1, respectively). Second, a haplotype network was obtained using the NETWORK program (Bandelt et al. 1999), which implements the Median Joining Network algorithm to estimate relationships among haplotypes without assuming bifurcating relationships.

Fu's F_s (Fu 1997) was used to test for selective neutrality of the mutations using ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al. 2005). To evaluate a possible historical population expansion event, the distribution of the frequencies of pairwise differences between individuals was compared with the expected distribution of a model of population expansion as implemented in ARLEQUIN (Mismatch distribution, Rogers and Harpending 1992; Excoffier and Schneider 1999). The validity of the estimated demographic model was tested through the statistical distribution of SSD (sum of squared differences) with parametric bootstrap (Excoffier and Schneider 1999). The raggedness index (Harpending 1994) was estimated to test the deviation from unimodal mismatch distribution. Several F_s values and mismatch distributions were calculated considering: the whole data set, haplotypes found only in YO individuals, haplotypes found only in YO individuals plus shared haplotypes between the two morphotypes, and finally considering YG haplotypes and shared haplotypes between both morphotypes.

Results

Morphological observations

The zooids exhibited constant differences in the two morphotypes.

YO morphotype: orange-yellow colonies with short stalks and rounded heads. The thoraces were long, with 14–16 stigmata rows in the branchial sac. Stigmata per half-row varied from 24 to 26. The ovary was situated in the upper part of the post-abdomen, close below the intestine (abdomen).

YG morphotype: greenish-yellow colonies with elongated stalks and no rounded heads. The thoraces showed 21–22 stigmata rows in the branchial sac. Stigmata per half-row were from 31 to 34. The ovary was situated at a half way through the post-abdomen, far below the intestine (abdomen).

Population genetic analyses

A total of 53 sequences were obtained for the COI mitochondrial gene. The final length after alignment and trimming was of 304 base pairs (bp) and free of gaps. Seventeen different haplotypes were identified (Table 1) with 11 polymorphic sites. All unique haplotypes have been deposited in Genbank (accession numbers JX121258 to JX121274). The detail of the haplotypes found in each single colony is presented in Online Resource 2.

The number of haplotypes found in each sampling station, the number of polymorphic sites (S) and values of

nucleotide diversity are shown in Table 1. The haplotype frequencies per sampling station are also presented in Online Resource 3. Nucleotide diversity over all samples is 0.009. Haplotype diversity is 0.763 ± 0.058 (mean \pm SD), and the average number of nucleotide differences is 2.938. Potter Cove and Deception Island present the highest values of nucleotide diversity as well as of haplotype diversity. Only two haplotypes are shared between the two morphotypes (Hap VII and Hap VIII). The YO morphotype presents thirteen exclusive haplotypes, and the YG, two (Hap X and XI). From the fifteen haplotypes present in the YO form (thirteen exclusive, and two shared with YG), eleven polymorphic sites were found. The YG morphotype features two polymorphic sites that coincided with two of the eleven polymorphic sites from YO. Of the seventeen haplotypes found, only four are shared among sampling sites (Hap I, Hap II, Hap VII, Hap VIII), and the percentage of singletons (haplotypes represented by a single member in the data set) is 52.94 %. The most frequent haplotype (Hap VIII, observed in 47.17 % of the individuals and shared between YO and YG forms in Low 46) is broadly distributed, occurring at most localities within the study area (Low 46, Low 45 and Deception). The second most frequent haplotype (Hap VII) presents similar characteristics as Haplotype VIII. Deception presents three exclusive haplotypes (Hap VI, Hap IX and Hap XVII), as do Low 45 (Hap IV, Hap VI and Hap XI) and Low 46 (Hap III, Hap X and Hap XVI), while Potter Cove has four exclusive haplotypes (Hap XII, Hap XIII, Hap XIV and Hap XV).

Results of the AMOVA show that a significant part of the total variability can be assigned to the “among sampling sites” component, no matter the structure tested (Table 2). However, despite 16.5 % of the total variation corresponding to differences between groups of samples of different morphotypes, this value is not statistically significant (Table 2). Pairwise Φ_{ST} values are presented in Table 3; a significant correlation was found between genetic differentiation and genetic distance when morphotype was not considered ($r = 0.813$; $p = 0.041$; Online Resource 4a). Potter Cove was the most differentiated sample. Deception showed a significant genetic differentiation with Low 45 but not with Low 46, while there was no differentiation between sampling sites in Low Island (Table 3a). If morphotypes are taken into account, samples of the YG morphotype showed no genetic differentiation and the YO morphotype of Low 46 was less differentiated from YG samples than from the YO sample of Low 45 station (Table 3b). Indeed, separating sampling stations by morphotype yielded a non-significant correlation between Φ_{ST} and geographic distance ($r = 0.193$; $p = 0.245$; Online Resource 4b), which became significant when YO samples from Low 45 were eliminated from the analysis ($r = 0.906$; $p = 0.041$; Online Resource 4c). This is

Table 1 Number of haplotypes, nucleotide diversity (π), haplotype diversity (Hd) and number of polymorphic sites (S) found in *Synoicum* from four geographic locations at the South Shetland Islands. Haplotypes shared by YO and YG morphotypes are underlined

Sampling site	Haplotypes																	Total	π	Hd	S
	I	II	III	IV	V	VI	<u>VII</u>	<u>VIII</u>	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII				
Deception	–	1	–	–	–	2	2	4	1	–	–	–	–	–	–	–	1	11	0.012	0.855	10
Low 46	–	–	1	–	–	–	4	13	–	1	–	–	–	–	–	1	–	20	0.004	0.558	5
Low 45	1	–	–	1	2	–	1	8	–	–	1	–	–	–	–	–	–	14	0.008	0.681	7
Potter Cove	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	1	1	2	–	–	8	0.011	0.929	9
Total																		53	0.009	0.763	

Table 2 Analysis of molecular variance (AMOVA) for *Synoicum* samples, testing alternative spatial structures

Structure tested	Source of variation	Percentage of variation	F statistics	Probability
Sampling site (not considering morphotype)	Among sampling site	28.87	$F_{ST} = 0.289$	0
	Within sampling site	71.13		
Sampling site and morphotype	Among populations	43.18	$F_{ST} = 0.432$	0
	Within populations	56.82		
Two groups: YO sites versus YG sites	Among groups	16.52	$F_{CT} = 0.165$	0.133
	Among sampling sites within groups	30.68	$F_{SC} = 0.367$	0
	Within sampling sites	52.80	$F_{ST} = 0.472$	0

Table 3 Φ_{ST} values between (a) sampling stations of *Synoicum*, and (b) sampling stations considering morphotype. YO: yellow-orange morphotype, YG: yellow-green morphotype

(a)	Potter Cove	Deception	Low 45	Low 46		
Potter Cove	–					
Deception	0.358**	–				
Low 45	0.659***	0.119*	–			
Low 46	0.409***	–0.042	0.046	–		
(b)	Potter Cove (YO)	Deception (YO)	Low 45 (YO)	Low 46 (YO)	Low 45 (YG)	Low 46 (YG)
Potter Cove (YO)	–					
Deception (YO)	0.334***	–				
Low 45 (YO)	0.226	0.281*	–			
Low 46 (YO)	0.513***	0.023	0.550**	–		
Low 45 (YG)	0.673***	0.146	0.779**	0.008	–	
Low 46 (YG)	0.673***	0.146	0.779***	0.008	–0.111	–

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

because haplotypes VII and VIII (shared between morphotypes) were found in YO and YG individuals in Low 46, while in Low 45, they were found only in YG individuals, probably due to the low number of YO individuals that could be successfully sequenced in that station (only four).

In the two sampling sites where both morphotypes were found in sympatry, Tamura-Nei pairwise genetic distances between haplotypes (Table 4) showed that the highest genetic distances were those between YO haplotypes and haplotypes VII and VIII (between 3 and 6 % of sequence divergence). Genetic distances between exclusive YO

haplotypes, and those between YO haplotypes and YG exclusive haplotypes (Hap X and Hap XI), presented intermediate values (between 2 and 4 % of sequence divergence). The lowest distances were found between Haplotypes VII and VIII and between these and the YG haplotypes (1–2 % of sequence divergence).

Bayesian analyses placed haplotypes VII and VIII in the basal position (posterior probability 0.87). However, this was not supported by MP and neighbor-joining analyses (Fig. 2). These haplotypes were widely distributed in most

sampling stations (Low 45, Low 46 and Deception), and in both morphotypes. Most of the remaining nodes showed low support in the three analyses. The haplotype network (Fig. 3) showed that Haplotypes VII and VIII, shared between morphotypes and widely distributed, are closely related, as they are separated by only one synonymous substitution from each other. The other two haplotypes shared among sampling sites were present in two YO samples (Hap I present in Low 45 and Potter Cove, and Hap II in Deception and Potter Cove) and were more distantly related between each other and with haplotypes VII and VIII. Relationships among exclusive haplotypes from Low 45, Low 46 and Deception showed no relationship with geographic location, while Potter Cove's exclusive haplotypes were grouped together and located at the edge of the network.

According to Fu (1997), F_s should be regarded as significant if $p < 0.02$. Therefore, significant and negative estimates for Fu's F_s were obtained for the whole data set ($F_s = -6.029$, $p = 0.012$) and for YO haplotypes ($F_s = -5.587$, $p = 0.004$), while F_s yielded marginally non-significant values when calculated for YO plus shared haplotypes ($F_s = -4.423$, $p = 0.035$), or YG plus shared haplotypes ($F_s = -1.450$, $p = 0.050$). A significant negative value of F_s is evidence for an excess number of alleles, as would be expected from recent population expansion or from genetic hitchhiking. The mismatch distribution analysis obtained for all analyses showed non-significant values of raggedness index and SSD (Fig. 4), supporting the hypothesis of demographic expansion. However, it is worth noting that the observed distribution of pairwise differences for all haplotypes, although not

Table 4 Tamura-Nei genetic distances between haplotypes (Hap) from Low 45 and Low 46. Bold letters indicate haplotypes found exclusively in YO individuals and italics indicate those found in the YG morphotype. Underlined haplotypes were shared between both populations and were found in individuals from both morphotypes in Low 46, and only in YG individuals, in Low 45

Low 45	Hap I	Hap IV	Hap V	<u>Hap VII</u>	<u>Hap VIII</u>	<i>Hap XI</i>
Hap I	–					
Hap IV	4.079	–				
Hap V	3.039	3.041	–			
<u>Hap VII</u>	3.076	5.105	4.065	–		
<u>Hap VIII</u>	4.084	6.161	5.105	1.008	–	
<i>Hap XI</i>	2.034	4.079	3.039	1.008	2.016	–

Low 46	<u>Hap VIII</u>	<u>Hap VII</u>	<i>Hap X</i>	Hap XVI	Hap III
<u>Hap VIII</u>	–				
<u>Hap VII</u>	1.008	–			
<i>Hap X</i>	1.008	2.016	–		
Hap XVI	3.039	4.079	2.031	–	
Hap III	5.135	4.079	4.127	2.031	–

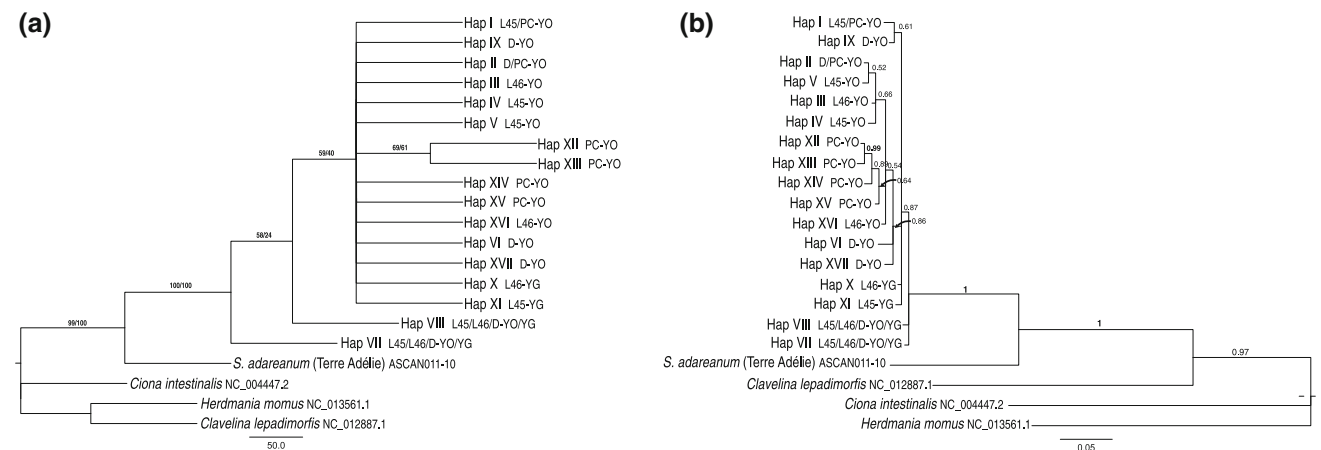


Fig. 2 Phylogenetic relationships among *Synoicum* haplotypes. (a) Neighbor-joining tree from Tamura-Nei genetic distances. The topology of a maximum parsimony tree was identical. Bootstrap values after 1,000 replications for both methods are shown above the branches: before the slash are values for the neighbor-joining tree and after the slash those for the maximum parsimony tree. (b) Bayesian

tree, the posterior probabilities of each branch are shown above the branches are. *Clavelina lepadimorfis*, *Herdmania momus* and *Ciona intestinalis* were used as outgroups. YO: yellow-orange morphotype, YG: yellow-green morphotype, D: Deception, PC: Potter Cove, L45: Low 45, L46: Low 46

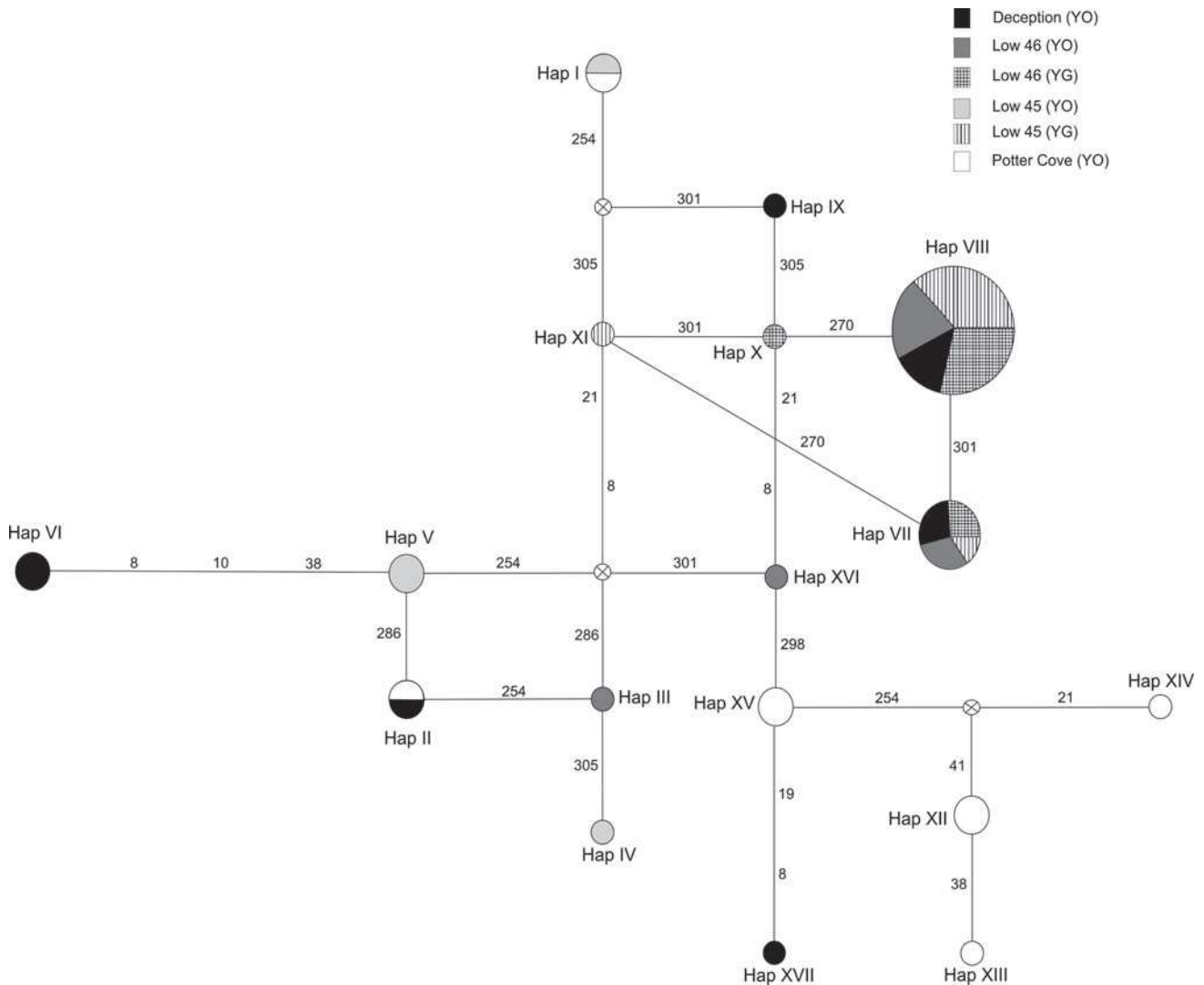


Fig. 3 Haplotype network of COI mitochondrial DNA sequence data. Circles represent haplotypes and circle diameter is proportional to haplotype frequency. Each haplotype is represented by the abbreviation Hap and a roman number. Numbers above white circles

with a cross in the center show intermediate haplotypes not found in the study. Numbers above the branches are the positions of the mutated sites

significantly different from that expected under a population expansion, showed a bimodal shape, indicating the presence of two (or more) groups of divergent lineages. The parameter τ showed different values, being 5.824 for all haplotypes, 5.103 for YO plus shared haplotypes, 4.281 for YO haplotypes and 0.492 for YG plus shared haplotypes. These results indicate that time since the last demographic expansion event was longer for YO haplotypes than for YG ones, and the population expansion of YO morphotype would be more ancient.

Discussion

This study presents the first analysis of population genetic structure using a mitochondrial DNA marker in an ascidian

species with an Antarctic and Sub-Antarctic distribution. Besides that, combined with morphological observations, it tries to clarify if the two morphotypes of *Synoicum* found at the South Shetland Islands correspond to different species or to intra-specific polymorphisms.

The morphological analysis showed that each morphotype may correspond to a different species according to Monniot and Monniot (1983). The taxonomic features that characterize YO zooids were consistent with those that define *Synoicum adareanum*, while those that characterized YG zooids were consistent with the features that define *Synoicum ostentor*. However, there were no significant differences in the COI gene between both forms living in sympatry (Table 3), and therefore, in the next paragraphs, the colonies will continue to be named as YG and YO morphotypes.

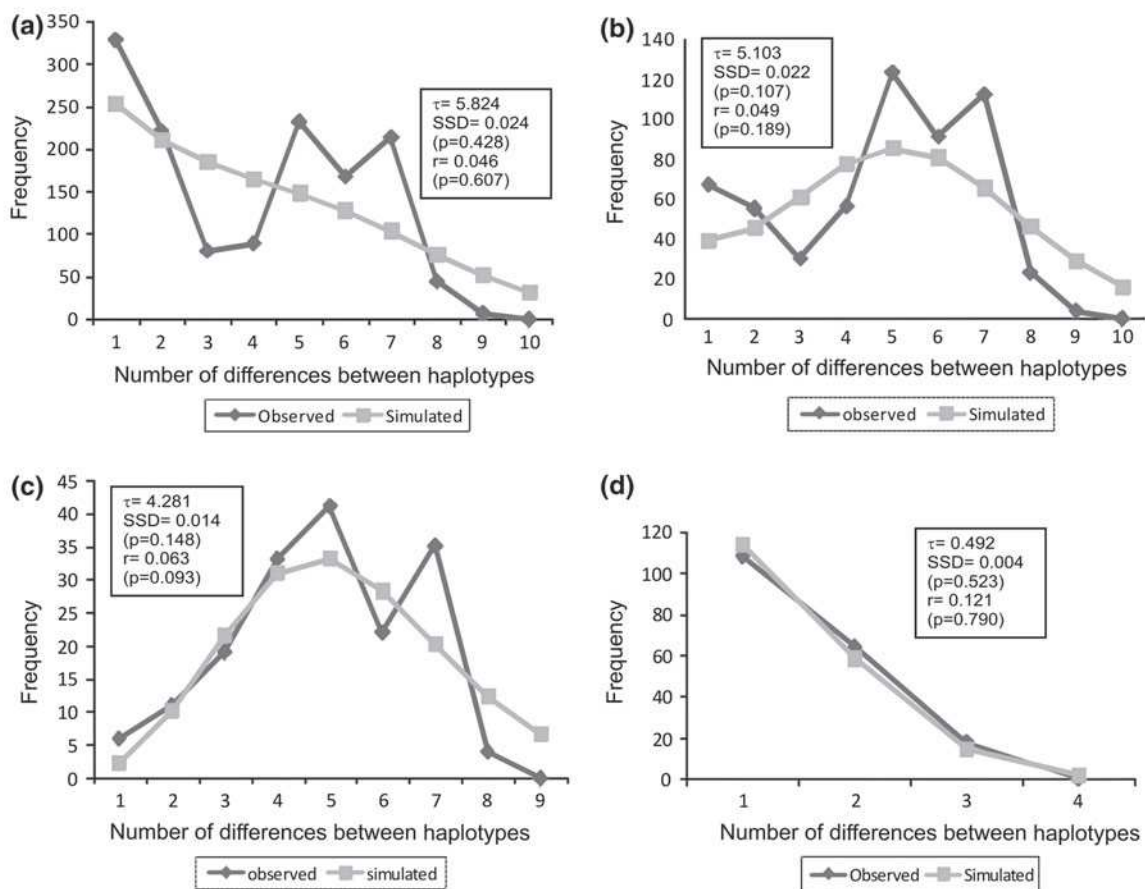


Fig. 4 Predicted patterns of mismatch distribution for (a) all haplotypes, (b) YO haplotypes and shared haplotypes between the two morphotypes, (c) YO haplotypes and (d) YG haplotypes and shared

haplotypes between morphotypes. τ : time in generations since the last demographic expansion; SSD: sum of squared differences; r : raggedness index. P -values of SSD and of r are indicated in brackets

Seventeen haplotypes were found out of 53 individuals sequenced. Levels of haplotype diversity in the COI gene of *Synoicum* samples ($Hd = 0.558\text{--}0.929$) were in the range found in other colonial ascidian species, for example, *Botryllus schlosseri* ($Hd = 0.153\text{--}0.700$; López-Legentil et al. 2006), *Cystodytes dellechiaiei* ($Hd = 0.600\text{--}0.933$; López-Legentil and Turon 2006) and *Pycnoclavella communis* ($Hd = 0.248\text{--}0.903$; Pérez-Portela and Turon 2008). These studies were all performed on species from the Mediterranean Sea; population genetic studies about levels of variability from populations of colonial species from other oceans, are unfortunately scarce. Nucleotide diversity was generally smaller in *Synoicum* samples ($\pi = 0.004\text{--}0.012$) compared to other colonial species (*B. schlosseri*: $\pi = 0.008\text{--}0.079$, op. cit.; *C. dellechiaiei*: $\pi = 0.006\text{--}0.081$, op. cit.; *P. communis*: $\pi = 0.0004\text{--}0.0445$, op. cit.; *Pseudodistoma crucigaster*: $\pi = 0.000\text{--}0.011$, Tarjuelo et al. 2004). Goodall-Copestake et al. (2012) identified two sources of bias when comparing variability measures using

COI: low sample sizes and not using strictly homologous positions because, usually, fragments of different lengths and of different parts of the COI gene are used. Regarding the first issue, the authors demonstrated by using subsampling analyses that samples of $N > 5$ were enough to discriminate extremes of high and low COI diversity, while samples bigger than 25 were required for greater accuracy. Therefore, given that sample sizes in our work range from 8 to 20 (Table 1), we should be able to discriminate whether *Synoicum* populations show higher or lower variability levels than other ascidians. Regarding the second issue, Goodall-Copestake et al. (2012) recommend re-assembling data in the literature, in order to compare strictly homologous sites. In our work, levels of variability were calculated on an unusually short fragment of COI gene. Therefore, we selected those papers that published the complete data set (or information to re-assemble it), aligned sequences with ours and recalculated Hd and π . We found only two such ascidian publications, those of

Tarjuelo et al. (2004) on *Pseudodistoma crucigaster*, and of Pérez-Portela and Turon (2008) on *Pycnoclavella communis*. Results of the re-analysis are shown in Online Resource 5. Hd remained in the range of that of *Synoicum*, while π was smaller in *P. crucigaster*, and similar in *P. communis*. Therefore, we can reasonably assume that variability levels in *Synoicum* populations are in the range of that found in colonial ascidian species of temperate waters.

Rogers (2007) and Allcock and Strugnell (2012) reviewed studies on genetic structure in organisms from the Southern Ocean and pointed out that much of Southern Ocean fauna would have survived the Quaternary Glaciations in situ. They identified two general patterns: organisms which might have survived glaciations in refuge on the continental shelf, or by retreating to sub-Antarctic islands, are likely to show low genetic variability due to bottlenecks and founder effects, while those eurybathic species that took refuge on the continental slope are likely to show higher levels of variability, because they would have been able to maintain higher population sizes. The levels of variability found in *Synoicum* samples point to persistence on the continental slope for this species.

According to Goodall-Copestake et al. (2012), another source of bias in the calculation of Hd and π is the inclusion of cryptic species in single species samples, which would increase the estimates. In our data set, this could occur in estimates of Low 45 and Low 46 samples, which included both morphotypes (Table 1). However, Hd and π were the lowest in these samples. In shallow Antarctic waters, ice acts as a regional disturbing factor of high impact; along the Antarctic Peninsula and the South Shetland Islands, icebergs can impact the bottom up to 150–200 m depth and are an important factor in shaping the benthic system on the Antarctic shelf (Gutt 2000; Dowdeswell and Bamber 2007). In the Antarctic colonial ascidian *Aplidium falklandicum*, Demarchi et al. (2010) found that populations sampled at more than 200 m depth showed significantly more variability than those sampled at less than 200 m, which coincided with the limit of disturbance by ice scouring. The authors proposed that ice affected genetic diversity by removing a considerable amount of biomass with the consequent loss of individuals and alleles. The four geographic samples analyzed for *Synoicum* were obtained at depths of 200 m or less, and therefore, they may be affected by ice action that could cause fluctuations in the population effective size. But additionally, Low 45 and Low 46 stations are much more exposed to the ACC than the other stations (Fig. 1). This can have a double effect on benthic populations: on the one hand, the ACC would sweep away larvae from parent populations more efficiently in Low stations, and on the other hand, it would drive icebergs and increase its frequency compared to the other sampled stations that are

more sheltered. Then, these disturbance factors could contribute to fluctuations in the population's effective size and the decreased levels of genetic variability found in the Low stations. On the other hand, Potter Cove is located in a more protected area, where the effects of these disturbances are probably lower, which would explain the higher genetic variability found at this station.

Patterns of genetic structure and the extent of gene flow in benthic organisms could be the result of the interaction between the larval development, dispersal potential and local recruitment, coupled with oceanographic features such as the circulation of the water masses (Palumbi 1994; Grosberg and Cunningham 2001; Wares et al. 2001). Taking into account that the larval stage is responsible for organism dispersal and, in colonial ascidians, larvae are short-lived (from few minutes to hours; Svane and Young 1989), a strong genetic structure due to very low levels of gene flow is expected in these species (Thatje 2012). In this work, the levels of genetic differentiation among geographic samples and morphotypes and their correlation with geographic distance indicate that gene flow among populations has been sufficient for a long enough time to establish isolation by distance pattern. Despite the low dispersal potential of ascidian larvae, gene flow exists, probably facilitated by different marine currents over the West Antarctic Peninsula (Fig. 1), which would explain the presence of shared haplotypes as well as some degree of connectivity between separate locations within the study area. Passive transport by ocean currents has been proposed as a mechanism to explain gene flow in Antarctic species with low dispersal potential as the brooding brittle star *Astrotothia agassizii* (Hunter and Halanych 2008), the benthic notothenioid fish *Gobionotothen gibberifrons* (Matschiner et al. 2009) and the amphipod *Eusirus perdentatus* (Baird et al. 2011).

The haplotype network showed that the shared haplotypes (Hap VII and Hap VIII) were also the most frequent and widely distributed and that most haplotypes were present in a single sampling site. This type of haplotype network has been named "parochial" by Allcock and Strugnell (2012). According to these authors, it is found in Antarctic organisms that during the Pleistocene glaciations persisted in large refugial areas and therefore maintained their genetic diversity because they did not suffer major bottlenecks. If post-glacial expansion occurred from multiple refugia before the acquirement of reproductive isolation, secondary contact would result. Hints of a recent population expansion in *Synoicum* were revealed by F_s and the Mismatch distribution test. The negative and significant values of the F_u 's F_s test, along with non-significant values of raggedness index and SSD and the shape of the haplotype network, support the idea of a demographic expansion. The observed distribution of pairwise differences

obtained from the Mismatch distribution showed a bimodal distribution, which is usually observed when two (or more) groups of divergent haplotypes are included in the analysis, either because there is a strong genetic structure, a secondary contact between divergent forms has occurred, or when a spatial expansion followed by low levels of gene flow occurred (Ray et al. 2003; Excoffier et al. 2009). Although the number of samples analyzed in this work does not allow us to discriminate among these options, it should be noted that τ values (time in generations since the last demographic expansion) obtained from the Mismatch distribution analysis support the idea that the expansion of YO morphotype may be more ancient than that of the YG morphotype ($\tau = 4.281$ and $\tau = 0.492$, respectively). Also, Tamura-Nei genetic distances showed that sequence divergence between YO haplotypes and between them and shared or YG haplotypes was higher than among YG haplotypes, indicating that YO haplotypes are more ancient than YG ones, since they required more time to accumulate differences. Therefore, evidence so far points to a secondary contact among forms differentiated in allopatry, but still pertaining to the same biological species. Even though the phylogenetic trees failed to resolve most of the relationships among haplotypes, the haplotype of *S. adareanum* from Terre Adelie was in a basal position, followed by Hap VII and VIII, all with high support (Fig. 2, BA). These results suggest that shared haplotypes VII and VIII are those closer to the common ancestor.

In conclusion, morphological and genetic analyses were not consistent in separating the two forms at the species level. The morphological approach indicated that both morphotypes of *Synoicum* found along the South Shetland Islands corresponded to a different species of the same genus: the YO morphotype to *S. adareanum* and the YG morphotype to *S. ostentor*, according to the previous descriptions (Monniot and Monniot 1983; Monniot et al. 2011). However, the COI gene showed no differences at interspecific level. Considering the biological definition of species, each morphotype would not correspond to a full species, because the analyses presented in this work indicate that both morphotypes did not achieve a complete reproductive isolation yet, can still interbreed and that some degree of gene flow is still occurring. This was certainly unexpected given the numerous reported cases worldwide and especially in Antarctica, where molecular approaches were able to resolve several cryptic species, that morphology-based taxonomy could not (Bernardi and Goswami 1997; Held 2003; Raupach and Wägele 2006; Bickford et al. 2007; Allcock et al. 2011). These results are relevant not only due to the ecological importance of *Synoicum* in Antarctic benthic communities, but also for its biochemical potential. As reported by Koplovitz et al. (2011), *S. adareanum* from the Western Antarctic

Peninsula differing in the form of the colonies showed marked differences in the anti-diatom activity of secondary metabolites. Besides, a secondary metabolite, Palmerolide A, which has an important cytotoxic activity against certain types of melanoma, was obtained from *S. adareanum* (Diyabalange et al. 2006; Jiang et al. 2007; Nicolaou et al. 2007; Riesenfeld et al. 2008). However, these authors did not mention any color differences in the sampled colonies, and therefore, it is possible that both or only one form was studied. Considering that there is some genetic difference between the forms, it is also possible that these forms produce different secondary metabolites. As chemical variation related to color and genotype has been previously reported in other colonial ascidians (López-Legentil and Turon 2005), future work should consider proper identification of the ascidian species using molecular, chemical and morphological descriptions.

Acknowledgments We thank the crew and participants of the BENTART-06 (BIO Hespérides) for their help and assistance and Ana Ramos for her support. We are grateful to Milagros Demarchi and Cristian Lagerer who helped in collecting part of the samples. Financial and logistic supports were provided by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto Antártico Argentino (IAA), Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) and the National University of Córdoba.

References

- Allcock AL, Strugnell JM (2012) Southern Ocean diversity: new paradigms from molecular ecology. *Trends Ecol Evol* 27:520–528
- Allcock AL, Barratt I, Eléaume M, Linse K, Norman MD, Smith PJ, Steinke D, Stevens DW, Strugnell JM (2011) Cryptic speciation and the circumpolarity debate: a case study on endemic Southern Ocean octopuses using the COI barcode of life. *Deep Sea Res II* 58:242–249
- Baird HP, Miller KJ, Stark JS (2011) Evidence of hidden biodiversity, ongoing speciation and diverse patterns of genetic structure in giant Antarctic amphipods. *Mol Ecol* 20:3439–3454
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48
- Barnes DKA, Hodgson DA, Convey P, Allen CS, Clarke A (2006) Incurion and excursion of Antarctic biota: past, present and future. *Global Ecol Biogeogr* 15:121–142
- Bernardi G, Goswami U (1997) Molecular evidence for cryptic species among the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* and *Trematomus hansonii*. *Antarct Sci* 9:381–385
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22:148–155
- Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, pp 225–269
- Clarke A (1996) The distribution of Antarctic marine benthic communities. In: Hofmann EE, Ross RM, Quetin LB (eds) *Foundations for ecological research west of the Antarctic Peninsula*. *Antarct Res Ser*, AGU, Washington, DC, pp 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, 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
- 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 Biol* 33:1567–1576
- Diyabalange T, Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2006) Palmerolide A, a Cytotoxic Macrolide from the Antarctic Tunicate *Synoicum adareanum*. *J Am Chem Soc* 128:5630–5631
- 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, Schneider S (1999) Why hunter-gatherer populations do not show signs of Pleistocene demographic expansions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10597–10602
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform* 1:47–50
- Excoffier L, Foll M, Petit RJ (2009) Genetic consequences of range expansions. *Annu Rev Ecol Syst* 40:481–501
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294–299
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925
- 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
- Goldstien SJ, Schiel DR, Gemmell NJ (2010) Regional connectivity and coastal expansion: differentiating pre-border and post-border vectors for the invasive tunicate *Styela clava*. *Mol Ecol* 19:874–885
- Goodall-Copestake WP, Tarling GA, Murphy EJ (2012) On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity* 109:50–56
- Grosberg RK, Cunningham CW (2001) Genetic structure in the sea from populations to communities. In: Bertness MD, Hay ME, Gaines SD (eds) Marine community ecology. Sinauer, Sunderland, MA, pp 61–84
- Gutt J (2000) Some “driving forces” structuring communities of the sublittoral Antarctic macrobenthos. *Antarct Sci* 12:297–313
- Harpending RC (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum Biol* 66:591–600
- Haydar D, Hoarau G, Olsen JL, Stam WT, Wolff WJ (2011) Introduced or glacial relict? Phylogeography of the cryptogenic tunicate *Molgula manhattensis* (Asciacea, Pleurogona). *Divers Distrib* 17:68–80
- Held C (2003) Molecular evidence for cryptic speciation within the widespread Antarctic crustacean *Ceratoserolis trilobitoides* (Crustacea, Isopoda). In: Huiskes AH, Gieskes WW, Rozema J, Schorno RM, van der Vies SM, Wolff WJ (eds) Antarctic biology in a global context. Backhuys, Leiden, pp 135–139
- Herdman WA (1902) Tunicata. In: Report on the collections of natural history made in the Antarctic regions during the voyage of the “Southern Cross”, London, pp 190–200
- Hirose E, Oka AT, Hirose M (2009) Two new species of photosymbiotic ascidians of the genus *Diplosoma* from the Ryukyu Archipelago, with partial sequences of the COI gene. *Zool Sci* 26:362–368
- Hirose M, Nozawa Y, Hirose E (2010) Genetic isolation among Morphotypes in the Photosymbiotic Didemnid *Didemnum molle* (Asciacea, Tunicata) from the Ryukyus and Taiwan. *Zool Sci* 27:959–964
- Hunter RL, Halanych KM (2008) Evaluating connectivity in the brooding brittle star *Astrofoma agassizii* across the Drake Passage in the Southern Ocean. *J Hered* 99:137–148
- Jiang X, Liu B, Lebreton S, De Brabander JK (2007) Total synthesis and structure revision of the marine metabolite Palmerolide A. *J Am Chem Soc* 129:6386–6387
- Koplovitz G, McClintock JB, Amsler CD, Baker BJ (2011) A comprehensive evaluation of the potential chemical defenses of Antarctic ascidians against sympatric fouling microorganisms. *Mar Biol* 158:2661–2671
- Kott P (1969) Antarctic Ascidiacea. *Antarctic Res Ser* 13:1–239
- Lawver LA, Gahagan LM, Dalziel IWD (2011) A different look at gateways: Drake Passage and Australia/Antarctica. In: Anderson JB, Wellner JS (eds) Tectonic, climatic, and cryospheric evolution of the Antarctic Peninsula. AGU, Washington, DC, pp 5–33
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452
- López-Legentil S, Turon X (2005) How do morphotypes and chemotypes relate to genotypes? The colonial ascidian *Cystodytes* (Polycitoridae). *Zool Scr* 34:3–14
- López-Legentil S, Turon X (2006) Population genetics, phylogeography and speciation of *Cystodytes* (Asciacea) in the western Mediterranean Sea. *Biol J Linn Soc* 88:203–214
- López-Legentil S, Dieckmann R, Bontemps-Subielos N, Turon X, Banaigs B (2005) Qualitative variation of alkaloids in color morphs of *Cystodytes* (Asciacea). *Biochem Syst Ecol* 33:1107–1119
- López-Legentil S, Turon X, Planes S (2006) Genetic structure of the star sea squirt, *Botryllus schlosseri*, introduced in southern European harbours. *Mol Ecol* 15:3957–3967
- Lynch M, Crease TJ (1990) The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol Biol Evol* 7:377–394
- Matschiner M, Hanel R, Salzburger W (2009) Gene flow by larval dispersal in the Antarctic notothenioid fish *Gobionotothen gibberifrons*. *Mol Ecol* 18:2574–2587
- McCarthy C (1998) Chromas ver. 1.45. School of Health Science, Griffith University, Queensland, Australia. <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>. Accessed 14 Dec 2012
- Millar RH (1960) Ascidiacea. *Discov Rep* 30:1–160
- Monniot C, Monniot F (1983) Ascidies antarctiques et sub-antarctiques: morphologie et biogéographie. *Mem Mus Nat Hist Nat Nouv Ser A* 125:1–168
- Monniot F, Dettai A, Eleaume M, Cruaud C, Ameziane N (2011) Antarctic Ascidiacea (Tunicata) of the French-Australian survey CEAMARC in Terre Adélie. *Zootaxa* 2817:1–54
- Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York
- Nicolaou KC, Guduru R, Sun Y-P, Banerji B, Chen DY-K (2007) Total synthesis of the originally proposed and revised structures of Palmerolide A. *Angew Chem Int Ed* 46:5896–5900

- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University
- Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu Rev Ecol Syst* 25:547–572
- Pérez-Portela R, Turon X (2008) Phylogenetic relationships of the Clavelinidae and Pycnoclavellidae (Asciacea) inferred from mtDNA data. *Invertebr Biol* 127:108–120
- Pérez-Portela R, Duran S, Palacín C, Turon X (2007) The genus *Pycnoclavella* (Asciacea) in the Atlanto-Mediterranean region: a combined molecular and morphological approach. *Invertebr Syst* 21:187–205
- Pineda MC, López-Legentil S, Turon X (2011) The Whereabouts of an Ancient Wanderer: global Phylogeography of the Solitary Ascidian *Styela plicata*. *PlosONE* 6:e25495
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818
- Raupach MJ, Wägele JW (2006) Distinguishing cryptic species in Antarctic Asellota (Crustacea: Isopoda)—a preliminary study of mitochondrial DNA in *Acanthaspidia drygalskii*. *Antarct Sci* 18:191–198
- Ray N, Currat M, Excoffier L (2003) Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Mol Biol Evol* 20:76–86
- Riesenfeld CS, Murray AE, Baker BJ (2008) Characterization of the microbial community and Polyketide biosynthetic potential in the Palmerolide-producing tunicate *Synoicum adareanum*. *J Nat Prod* 71:1812–1818
- Rogers AD (2007) Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Phil Trans R Soc B* 362:2191–2214
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552–569
- Ronquist F, Huelsenbeck J (2003) Mrbayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574
- Sabbadin A (1982) Formal genetics of ascidians. *Am Zool* 22:765–773
- Savidge DK, Amft JA (2009) Circulation on the West Antarctic Peninsula derived from 6 years of shipboard ADCP transects. *Deep-Sea Res I* 56:1633–1655
- Stoner DS, Weissman IL (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
- Swofford DL (2001) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall KA, Pascual M, Turon X (2001) Cryptic species of *Clavelina* (Asciacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean. *Mar Biol* 130:455–462
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall KA, Pascual M, Turon X (2004) Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. *Mol Ecol* 13:3125–3136
- Thatje S (2012) Effects of capability for dispersal on the evolution of diversity in antarctic benthos. *Integr Comp Biol* 52:470–482
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 24:4876–4882
- Turon X, Tarjuelo I, Duran S, Pascual M (2003) Characterising invasion processes with genetic data: an Atlantic clade of *Clavelina lepadiformis* (Asciacea) introduced into Mediterranean harbours. *Hydrobiologia* 503:29–35
- Van Name WG (1945) The North and South American ascidians. *Bull Am Mus Nat Hist* 84:1–476
- Wares JP, Gaines SD, Cunningham CW (2001) A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution* 55:295–306
- Wright S (1969) Evolution and the genetics of populations. The theory of gene frequencies, vol 2. University of Chicago Press, Chicago, IL
- Yund PO, O'Neil PG (2000) Microgeographic genetic differentiation in a colonial ascidian (*Botryllus schlosseri*) population. *Mar Biol* 137:583–588