Ezequiel Ale

Tempo e espaço na evolução de Cnidaria Medusozoa
- estudos filogeográficos com ênfase em populações
do Atlântico Sul-ocidental, e datações da origem das
principais linhagens dos cnidários.

Time and space in the evolution of Cnidaria
Medusozoa – phylogeographical studies
emphasizing the Southwestern Atlantic, and dating
of the divergence times of the major cnidarian
lineages.

São Paulo

2012

Ezequiel Ale

Tempo e espaço na evolução de Cnidaria Medusozoa
- estudos filogeográficos com ênfase em populações
do Atlântico Sul-ocidental, e datações da origem das
principais linhagens dos cnidários.

Time and space in the evolution of Cnidaria
Medusozoa – phylogeographical studies
emphasizing the Southwestern Atlantic, and dating
of the divergence times of the major cnidarian
lineages.

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Genética e Biologia Evolutiva.

Orientador: Antonio Carlos Marques

São Paulo

2012

Ale, Ezequiel

Tempo e espaço na evolução de
Cnidaria Medusozoa - estudos
filogeográficos com ênfase em
populações do Atlântico Sul-ocidental, e
datações da origem das principais
linhagens dos cnidários.

Número de páginas: 93

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Filogeografia 2. Medusozoa
3. Datações I. Universidade de São
Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a). _____

Prof(a). Dr(a). _____

Prof(a). Dr(a). _____

Prof(a). Dr(a). _____

Prof(a). Dr(a). _____

Orientador(a)

À Karin

Agradecimentos

Ao meu orientador, Antonio C. Marques, pela confiança e aconselhamento brindados, por ter me possibilitado formar parte de sua equipe, na qual adquiri experiências extremadamente enriquecedoras ao longo destes anos.

Ao meu co-orientador, Diogo Meyer, pela ajuda certa e os conselhos oportunos nas discussões dos meus trabalhos, e pela respostas rápidas nos momentos urgentes.

Ao professor Ziheng Yang e aos seus post-docs, Jun Inoue e Mario dos Reis; seus conselhos foram essenciais para o andamento do trabalho apresentado no capítulo 5 desta tese, limitações e controvérsias que puderem vir a surgir em relação ao mesmo são de minha responsabilidade.

À Andreja Ramšak e ao André C. Morandini pela frutífera colaboração.

A Alvaro E. Migotto por ter me permitido utilizar os laboratórios sob sua coordenação, além de ter me propiciado a possibilidade de consultá-lo sobre temas específicos do meu trabalho.

Ao Alvaro M. Ramírez, meu co-orientador no Centro de Estudios del Mar y Limnología da Universidade da Costa Rica, pelo apoio e acompanhamento constante em todas as fases da parte do meu projeto que foi desenvolvida na Costa Rica. Ao professor Jorge C. Nuñez e sua equipe, pelo apoio em trabalhos de campo.

Ao Alejandro L. Esquivel e Gustavo G. Espeleta, pelo apoio brindado para a utilização dos laboratórios sob suas respectivas coordenações na Escola de Biología da Universidade da Costa Rica.

A Florian Reyda e Andrea Waeschenbach, pela importante ajuda na correção dos textos em inglês.

Ao Departamento de Genética e Biología Evolutiva e ao CNPq, pela bolsa que me possibilitou desenvolver este projeto, pelo mesmo motivo, à Rede de Macro Universidades de América Latina e o Caribe, pela bolsa outorgada.

Ao pessoal técnico e Administrativo do CEBIMar USP, do Depto de Genética e Biología Evolutiva, da Secretaria de pós graduação do IB, do CEMAR-UCR e da Escola de Biología da UCR, pela sempre boa disposição na ajuda tanto na realização de trâmites administrativos como de trabalhos de campo.

Aos meus colegas do laboratório, fiquei muito tempo fora do mesmo e não conheço pessoalmente os novos integrantes, mas o tempo que compartilhei com os “velhos” colegas me ensinou muito, desde convívio até zoologia (o que para um geneticista não é pouco! a zoologia...).

A mi madre, a mi padre y a mi hermana, entre tantas cosas, por la paciencia y la comprensión.

À minha família brasileira, sogro, sogrinha, genro e também aos tios e primos, por me fazerem sentir em casa.

Aos amigos, que por serem amigos não se importarão com a falta de espaço para nomes. Estar, embora intermitentemente, o haver estado no seu momento, me ajudou muito.

À Karin, o meu alicerce, porque sem ela esta tese teria tido poucas chances de ser.

Índice

Capítulo I. Introdução Geral.	01
Capítulo II. Processos evolutivos associados ao padrão de distribuição de <i>Acharadria crocea</i> (Hydrozoa, Tubulariidae) no Atlântico Sul-Occidental.	11
Capítulo III. Padrão filogeográfico comum para os hidrozoários <i>Liriope tetraphylla</i> (Geryoniidae) e <i>Olindias sambaquiensis</i> (Olindiidae) da região central do Atlântico Sul-Occidental.	29
Capítulo IV. Early Pleistocene divergence in <i>Pelagia noctiluca</i> (Cnidaria: Medusozoa) between Atlantic and Mediterranean populations.	53
Capítulo V. Dating the divergences of the main-lineages of cnidarians.	75
Capítulo VI. Considerações finais.	87
Resumo.	91
Abstract.	93

Capítulo I Introdução

Filogeografia de medusozoários do Atlântico Sul-Occidental

A região geográfica

A região nerítica da porção central do Atlântico Sul-Occidental (ASO), entre o litoral sudeste do Brasil e o litoral da província de Buenos Aires (BA – Argentina), é ambientalmente heterogênea (Boltovskoy E., 1981; Matsuura, 1986; Boltovskoy D. *et al.*, 1999). De modo geral, é possível identificar diferentes áreas sob influência (i) das ressurgências sazonais da Água Central do Atlântico Sul e (ii) da corrente subtropical do Brasil, na região nerítica do Sudeste do Brasil (Emilson, 1961; Campos *et al.*, 1999; Acha *et al.*, 2004); (iii) das grandes descargas continentais de água doce do Rio da Prata, as quais podem atingir sazonalmente o sul do Brasil e o litoral norte de BA (Acha *et al.*, 2004; Piola *et al.*, 2005) e (iv) de condições particulares de circulação de águas costeiras e de aportes continentais de água doce do litoral sul de BA, sob a influência das águas da região nerítica argentina afetadas pela corrente fria das Malvinas (Lucas *et al.*, 2005).

As distintas massas de águas costeiras destas regiões podem formar frentes de encontro sem que se misturem significativamente (Lucas *et al.*, 2005; Piola *et al.*, 2005), o que pode contribuir com o isolamento geográfico entre suas populações marinhas. As condições físico-químicas das diferentes massas d'água também podem modular a distribuição de espécies com diferentes tolerâncias ecofisiológicas (Mianzan *et al.*, 2001a, 2001b; Acha *et al.*, 2003).

Dados paleoceanográficos mostram alterações no nível do mar e na circulação das massas d'água do ASO associadas às mudanças climáticas de períodos glaciais/interglaciais do Quaternário (Hastenrath, 1991; Martin *et al.*, 1991; Lambeck *et al.*, 2002). Ao longo do Holoceno as glaciações foram cíclicas, com início em um pico glacial máximo há cerca de 1,2 ou 2,3 milhões de anos (Clapperton, 1991; Mörner, 1991a; respectivamente). Contrações e expansões sucessivas da linha de costa e da área ocupada pelas massas d'água temperadas do ASO foram registradas nos períodos glaciais/interglaciais, relacionadas a variações no nível do mar e posicionamento da linha de gelo antártica (Hastenrath, 1991; Martin *et al.*, 1991; Mörner, 1991b; Lambeck *et al.*, 2002; Gersonde *et al.*, 2003; Niebler *et al.*, 2003). Os efeitos destas mudanças na distribuição de espécies terrestres no ambiente

Neotropical da América do Sul têm sido bem discutida (*viz.*, Carnaval & Moritz, 2008 e referências nesta), mas é negligenciada para o ambiente marinho.

Os efeitos da heterogeneidade ambiental e alterações geológicas dos períodos glaciais/interglaciais do Quaternário na estrutura genética e distribuição das espécies marinhas do ASO são desconhecidos. Perante esta lacuna, é relevante analisar os impactos passados e presentes da estruturação do ambiente nerítico na distribuição da biodiversidade marinha.

Os modelos de estudo

Espécies distribuídas ao longo da região central do ASO são potenciais modelos para avaliar estas questões. Entre estas espécies, foram estudados os hidrozoários *Acharadria crocea* (L. Agassiz, 1862) (Tubulariidae), amplamente distribuída em regiões temperadas e subtropicais (Ewer, 1953; Brinckmann-Voss, 1970; Millard, 1975; Petersen, 1990); *Olindias sambaquiensis* F. Müller, 1861 (Olindiidae), endêmica da região subtropical e temperada do ASO (Vannucci, 1951; Mianzan & Zamponi, 1988); e *Liriope tetraphylla* Chamisso & Eysenhardt 1821 (Geryoniidae), registrada em diferentes mares e oceanos do globo (Calder, 1971; Ueno & Mitsutani, 1994; Daly Yahia *et al.*, 2003; Batistić *et al.*, 2007; Palma *et al.*, 2007).

Além da sua presença na região central do ASO, o estudo destas três espécies baseou-se também nas diferenças entre seus ciclos de vida, o que foi sugerido como relacionado a potenciais dispersivos distintos (Gibbons *et al.*, 2010). A maioria das espécies de Medusozoa possui larvas plânulas que vivem de horas a poucos dias no plâncton (Ramírez & Zamponi, 1981). Algumas espécies apresentam também medusa, a fase adulta reprodutiva e dispersiva que pode ser de longa duração, enquanto em outras espécies esta fase pode estar ausente ou reduzida (Marques & Collins, 2004). Dentre os Medusozoa, a classe Hydrozoa apresenta as maiores variações de ciclo de vida, com (a) coexistência de pólipos e medusas (ciclo meroplanctônico); (b) redução parcial ou total (ciclo holoplanctônico) do pólipo; c) redução parcial ou total (ciclo bentônico) da medusa.

Distribuições geográficas amplas são geralmente associadas a maiores capacidades dispersivas em algumas espécies de medusozoários com a fase de medusa em seus ciclos de vida [*e.g.*, *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) (Schroth *et al.*,

2002) e *Pelagia noctiluca* (Forsskål, 1775) (Stopar *et al.*, 2010)]. Em contrapartida, a expectativa para um ciclo de vida bentônico (potencialmente pouco dispersivo) é ter populações naturais estruturadas em escalas geográficas mais amplas (Wright, 1943).

Populações de *A. crocea* (ciclo majoritariamente bentônico), *O. sambaquiensis* (ciclo meroplanctônico) e *L. tetraphylla* (ciclo holoplanctônico), habitantes de águas subtropicais do litoral brasileiro e temperadas do litoral argentino, foram estudadas comparativamente para avaliar possíveis estruturas e padrões de distribuição relacionadas ao ambiente nerítico e possíveis contrações e expansões marinhas durante os períodos glaciais/interglaciais do ASO (Capítulos 2 e 3). As inferências foram feitas a partir de análises moleculares dos genes mitocondriais citocromo c oxidase 1 (COI) e a subunidade ribossomal maior (16S), além do íntron ribossomal nuclear ITS1.

Estudo filogeográfico fora do Atlântico Sul-Occidental e datações moleculares

Análise de alguns inconvenientes

Inferências filogeográficas podem informar sobre o tempo de origem e a afinidade histórica de táxons e áreas geográficas. Por este motivo, a filogeografia atua como uma ponte entre as áreas de genética de populações, ecologia evolutiva, paleontologia e sistemática evolutiva, entre outras (Avise, 2009). Estes estudos integrados colaboram para entender a diversificação da biota marinha. Entretanto, dificuldades técnicas têm sido historicamente evocadas para explicar o menor desenvolvimento destes estudos no ambiente marinho em comparação a áreas continentais (Knowlton, 1993, Beheregaray, 2008).

Adicionalmente, o desconhecimento de aspectos evolutivos básicos em diversos grupos de organismos marinhos acentua esta desigualdade, incluindo a falta de calibração de taxas de substituição. Este foi o motivo para alguns estudos filogeográficos em cifozoários (Cnidaria, Medusozoa) não testarem hipóteses biogeográficas por meio da estimativa das datas de divergência de suas linhagens (Dawson & Jacobs, 2001; Schroth *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2004; Dawson *et al.*, 2005; Stopar *et al.*, 2010). Uma vez que a calibração de taxas evolutivas pode ser feita por meio de datas de eventos geológicos e dados fósseis, ambos enfoques foram abordados nesta tese (Capítulos 4 e 5).

Utilização de dados geológicos

Foi sugerida uma divergência entre populações dos oceanos Pacífico e Atlântico para o cifozoário *Pelagia noctiluca* (Forsskal, 1775) (Pelagiidae) (Stopar *et al.*, 2010). Os dois eventos biogeográficos mais marcantes geralmente relacionados ao isolamento Atlântico-Mediterrâneo (Atl-Med) são o estabelecimento dos períodos glaciais do hemisfério norte (começando *ca.* 3,2 milhões de anos atrás - Ma) e a crise salina do Messiniano (finalizando *ca.* 5,5 Ma) (Krijgsman *et al.*, 1999; Gibert *et al.*, 2003; Paternello *et al.* 2007; Govers, 2009). Porém, a falta de taxas de substituição calibradas em cifozoários tem impossibilitado o teste destas hipóteses alternativas em estudos filogeográficos (Stopar *et al.*, 2010).

Novas amostras provenientes do Oceano Pacífico da América Central (Costa Rica) foram incorporadas nesta tese a dados de populações do Atlântico e do Mediterrâneo de *P. noctiluca*. As novas amostras foram usadas na calibragem de taxas evolutivas para a espécie, relacionando-as à data do isolamento dos oceanos Pacífico e Atlântico, resultante do surgimento do Istmo de Panamá. Este procedimento tem sido extensivamente utilizado para outros organismos marinhos (*e.g.*, Lessios, 1979; Vawter *et al.*, 1980; Bermingham & Lessios, 1993; McCartney *et al.*, 2000). Neste estudo aplicamos esta estratégia para a obter taxas de substituição que permitam testar as hipóteses filogeográficas previamente citadas na divergência Atl-Med em *P. Noctiluca* (Capítulo 4).

Utilização de dados fósseis

Fósseis confiáveis de medusozoários datam desde o Cambriano médio até o Jurássico (*cf.* Young & Hagadorn, 2010). A princípio, a utilização destes fósseis na calibração de taxas evolutivas em estudos filogeográficos não é viável devido à sua antiguidade. Entretanto, inferir a origem das principais linhagens de Medusozoa representa um primeiro passo no posterior entendimento de como distintos eventos biogeográficos poderiam ter afetado a diversidade em cada uma delas.

Fósseis de Medusozoa de substratos rochosos do Cambriano Médio (Cartwright *et al.*, 2007) e algumas inferências moleculares (*e.g.*, Cartwright & Collins, 2007) sugerem uma correlação entre a origem e diversificação dos

Medusozoa e a “Explosão Cambriana”, aproximadamente 540 milhões de anos atrás (Ma) (Lieberman & Cartwright, 2011). Embora propondo uma origem mais antiga para Cnidaria (~700 Ma), estudos mais recentes concordam que a divergência dentro do grupo surgiu na transição entre o Ediacarano e o Cambriano (Erwin *et al.* 2011). Entretanto, Park *et al.* (2011) propuseram uma origem dos Cnidaria ao longo do Criogeniano (~736 Ma), seguida por uma divergência entre Hydrozoa e Scyphozoa no Ediacarano (~607 Ma), mas salientaram que artefatos da análise (Erwin *et al.*, 2011), ou linhagens não amostradas (Park *et al.*, 2011) poderiam ter influenciado nas estimativas. Como consequência, ainda há dúvidas quanto à origem das principais linhagens de Cnidaria.

Neste contexto, realizamos um estudo de datação baseado em sequências de DNA da subunidade menor (18S) e maior (28S) dos genes ribossomais nucleais em uma ampla amostragem taxonômica de Medusozoa (Capítulo 5). A informação fóssil disponível é utilizada para datar as origens das principais linhagens de Cnidaria (Anthozoa, Staurozoa, Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa), por meio de análises Bayesianas dos tempos de divergência entre espécies (Yang & Rannala, 2006; Rannala & Yang, 2007). Além de permitir o relaxamento do relógio molecular, este método possibilita a utilização de limites brandos (*‘soft bounds’*) nos nós calibrados e considera incertezas associadas com a calibração fóssil, permitindo uma probabilidade distinta de zero para datas fora dos limites da calibração.

Referências bibliográficas

- Acha, E.M., Mianzan, H.W., Guerrero, R.A., Favero, M., Bava, J. 2004. Marine fronts at the continental shelves of austral South America. Physical and ecological processes. *Journal of Marine Systems*, 44: 83–105.
- Acha, E.M.; Mianzan, H.W.; Iribarne, O.; Gagliardini, D.A.; Lasta, C.; Daleo, P. 2003. The role of the Río de la Plata bottom salinity front in accumulating debris. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 197–202.
- Avice, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3–15.
- Batistić, M., Jasprica, N., Carić, M., Lučić, D. 2007. Annual cycle of the gelatinous invertebrate zooplankton of the eastern South Adriatic coast (NE-Mediterranean). *Journal of Plankton Research*, 29: 671–686.

- Beheregaray, L.B., 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 17: 3754–3774.
- Bermingham, E., Lessios, H.A. 1993. Rate variation of proteins and mitochondrial DNA evolution as revealed by sea urchins separated by the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 2734–2738.
- Boltovskoy, D., Gibbons, M.J., Hutchings, L., Binet, D. 1999. General biological features of the South Atlantic. pp. 1–42. *In*: Boltovskoy D. (ed.), South Atlantic Zooplankton.
- Boltovskoy, E. 1981. Masas de agua en el Atlántico sudoccidental. pp. 227–237. *In*: Boltovskoy D. (ed.), Atlas del zooplankton del Atlántico sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplankton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata.
- Brinckmann-Voss, A. 1970. Anthomedusae/Athecatae (Hydrozoa, Cnidaria) of the Mediterranean. Part I: Capitata. *Fauna e Flora del Golfo di Napoli*, 39: 1–96.
- Calder, D.R. 1971. Hydroids and hydromedusae of southern Chesapeake bay. Virginia Institute of Marine Science. *Special Papers in Marine Science number*, 1: 125 p.
- Campos, E.J.D., Piola, A.R., Miller, J.L. 1999. Water mass distribution on the shelf and shelf-break upwelling in the southeast Brazil bight. 10th Symposium on Global Change Studies, Dallas.
- Carnaval, A.C., Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 35: 1187–1201.
- Cartwright, P., Collins, A.C. 2007. Fossils and phylogenies: integrating multiple lines of evidence to investigate the origin of early major metazoan lineages. *Integrative and Comparative Biology*, 47: 744–751.
- Cartwright, P., Halgedahl, S.L., Hendricks, J.R., Jarrard, R.D., Marques, A.C., Collins, A.G., Lieberman, B.S. 2007. Exceptionally preserved jellyfishes from the Middle Cambrian. *PLoS ONE*, Issue 10: e1121.
- Clapperton, C.M. 1991. Influence of tectonics on the extent of quaternary glaciation in the Andes. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 89–108.
- Daly Yahia, M.N., Goy, J., Daly Yahia-Kéfi, O. 2003. Distribution and ecology of

- Medusae and Scyphomedusae (Cnidaria) in Tunis Gulf (SW-Mediterranean). *Oceanologica Acta*, 26: 645–655.
- Dawson, M.N., Gupta, A.S., England, M.H. 2005. Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analyses identify multiple introductions of cryptogenic species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 34: 11968–11973.
- Dawson, M.N., Jacobs, D.K. 2001. Molecular Evidence for Cryptic Species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biological Bulletin*, 200: 92–96.
- Emilson, I. 1961. The shelf and coastal waters off southern Brazil. *Boletim do Instituto de Oceanografia de São Paulo*, 11: 101–112.
- Erwin, D.H., Laflamme, M., Tweedt, S.M., Sperling, E.A., Pisani, D., Peterson, K.J. 2011. The Cambrian Conundrum: Early divergence and later ecological success in the early history of animals. *Science*, 334: 1091–1097.
- Ewer, D.W. 1953. On a new tubularian hydroid from Natal. *Annals of the Natal Museum*, 3: 351–357.
- Gersonde, R., Abelman, A., Brathauer, U., Becquey, S., Bianchi, C., Cortese, G., Grobe, H., Kuhn, G., Niebler, H.-S., Segl, M., Sieger, R., Zielinski, U., Fütterer, D.K. 2003. Last glacial sea surface temperatures and sea-ice extent in the Southern Ocean (Atlantic-Indian sector) a multiproxy approach. *Paleoceanography*, 18: 1061.
- Gibbons, M.J., Liesl, A.J., Adiel, I., Toufiek, S. 2010. Life cycle strategy, species richness and distribution in marine Hydrozoa (Cnidaria: Medusozoa). *Journal of Biogeography*, 37: 441–448.
- Gibert, J., Gibert, L., Iglesias, A. 2003. The Gibraltar Strait: A Pleistocene Door of Europe? *Human Evolution*, 18: 147–160.
- Govers, R. 2009. Choking the Mediterranean to dehydration: The Messinian salinity crisis. *Geology*, 37: 167–170.
- Hastenrath, S. 1991. A review of glacier variations in the tropics: The past 500,000 years. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 71–73.
- Holland, B.S., Dawson, M.N., Crow, G.L., Hofmann, D.K. 2004. Global phylogeography of Cassiopea (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Marine Biology*, 145: 1119–1128.

- Knowlton N., 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 24: 189–216.
- Krijgsman, W., Hilgen, F.J., Raffi, I., Sierro, F.J., Wilson, D.S. 1999. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 400: 652–655.
- Lambeck, K., Esat, T.M., Potter, E-K. 2002. Links between climate and sea levels for the past three million years. *Nature*, 419: 199–206.
- Lessios, H.A. 1979. Use of Panamanian sea urchins to test the molecular clock. *Nature*, 280: 599–601.
- Lieberman, B.S., Cartwright, P. 2011. Macroevolutionary patterns and processes during the Cambrian radiation: Integrating evidence from fossils and molecules. *Açoreana*, 7: 15–38.
- Lucas, A.J., Guerrero, R.A., Mianzan, H.W., Acha, E.M., Lasta, C.A. 2005. Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine continental shelf (34–43°S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65: 405–420.
- Marques, A.C., Collins, A.G. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology*, 123: 23–42.
- Martin, L., Flexor, J.M., Suguio, K. 1991. Possible changes in the Holocene wind pattern recorded on southeastern Brazilian coast. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 117–131.
- Matsuura, Y. 1986. Contribuição ao estudo da estrutura oceanográfica da região sudeste entre Cabo Frio (RJ) e Cabo de Santa Marta Grande (SC). *Ciência e Cultura*, 38: 1439–1450.
- McCartney, M.A., Keller, G., Lessios, H.A. 2000. Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology*, 9: 1391–1400.
- Mianzan, H., Lasta, C., Acha, E., Guerrero, R., Macchi, G., Bremec, C. 2001a. The Rio de La Plata estuary, Argentina-Uruguay. *Ecological Studies*, 144: 185–204.
- Mianzan, H.; Acha, E.M.; Guerrero, R.A.; Ramírez, F.C.; Sorrarain, D.R.; Simionato, C.; Borus, J. 2001b. South Brazilian marine fauna in the Río de la Plata Estuary: Discussing the barrier hypothesis. IX° COLACMAR, San Andrés, Colombia, Septiembre 16-20, pp:1-4.
- Mianzan, H.W., Zamponi, M.O. 1988. Estudio bioecológico de *Olindias*

- sambaquiensis* Müller, 1861 (Limnomedusae, Olindiidae) en el área de Monte Hermoso. II. Factores meteorológicos que Influyen en su aparición. *Iheringia* 2: 63–68.
- Millard, N.A.H. 1975. Monograph on the Hydroida of southern Africa. *Annals of the South African Museum*, 68: 1–513.
- Mörner, N.A. 1991a. The Patagonian glaciations and the onset of general quaternary-type glaciations on the globe. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 109–115.
- Mörner, N.A. 1991b. Holocene sea level changes in the Tierra del Fuego region. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 133–151.
- Niebler, H.-S., Arz, H.W., Donner, B., Mulitza, S., Pätzold, J., Wefer, G. 2003. Sea surface temperatures in the equatorial and South Atlantic Ocean during the Last Glacial Maximum (23–19 ka). *Paleoceanography*, 18: 1069.
- Palma, S., Apablaza, P., Silva, N. 2007. Hydromedusae (Cnidaria) of the Chilean southern channels (from the Corcovado Gulf to the Pulluche-Chacabuco Channels). *Scientia Marina*, 71: 65–74.
- Park, E., Hwang, D.S., Lee, J.S., Song, J.I., Seo, T.K., Won, Y.J. 2011. Estimation of divergence times in cnidarian evolution based on mitochondrial protein-coding genes and the fossil record. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 62: 329–345.
- Paternello, T., Volckaert, F.A.M.J., Castilho, R. 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic–Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, 16: 4426–4444.
- Petersen, K.W. 1990. Evolution and taxonomy in capitate hydroids and medusae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 100: 1–231.
- Piola, A.R., Matano, R.P., Palma, E.D., Möller Jr., O.O., Campos, E.J.D. 2005. The influence of the Plata River discharge on the western south Atlantic shelf. *Geophysical Research Letters*, 32: 1603.
- Ramírez, F.C., Zamponi, M.O. 1981. Hydromedusae. pp: 443–469. In: Boltovskoy D. (ed.), Atlas del zooplancton del Atlántico sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata.
- Rannala, B., Yang, Z. 2007. Inferring speciation times under an episodic molecular

- clock. *Systematic Biology*, 56: 453–466.
- Schroth, W., Jarms, G., Streit, B., Schierwater, B. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology*, 2: 1–10.
- Stopar, K., Ramšak, A., Trontelj, P., Malej, A. 2010. Lack of Genetic Structure in the Jellyfish *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomeae) across European Seas. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 417–428.
- Ueno, S., Mitsutani, A. 1994. Small-scale swarm of a hydrozoan medusa *Liriope tetraphylla* in Hiroshima Bay, the Inland Sea of Japan. *Bulletin of the Plankton Society of Japan*, 41: 93–104.
- Vannucci, M. 1951. Distribuição dos Hydrozoa até agora conhecidos nas costas do Brasil. *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo*, 2: 105–124.
- Vawter, A.T., Rosenblatt, R.H., Gorman, G.C. 1980. Genetic divergence among fishes of eastern Pacific and Caribbean: Support for the molecular clock. *Evolution*, 34: 705–711.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114–138.
- Yang, Z., Rannala, B. 2006. Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 212–226.
- Young, G.A., Hagadorn, J.W. 2010. The fossil record of cnidarian medusae. *Palaeoworld*, 19: 212–221.

Capítulo II

Processos evolutivos associados ao padrão de distribuição de *Acharadria crocea* (Hydrozoa, Tubulariidae) no Atlântico Sul-Occidental

Resumo

A ampla distribuição de *Acharadria crocea*, associada a uma limitada capacidade dispersiva, sugere que a espécie pode ser considerada criptogênica no Atlântico Sul-Occidental (ASO). Invertebrados marinhos considerados bioinvasores frequentemente apresentam ausência de estruturação genética ao longo de escalas geográficas amplas; em contrapartida, um ciclo de vida pouco dispersivo resultaria em populações naturais mais estruturadas. No ASO, onde *A. crocea* ocorre desde o estado do Espírito Santo (Brasil) até a província de Buenos Aires (Argentina), esse padrão estruturado seria potencializado pelas condições oceanográficas heterogêneas. Inferências dos processos responsáveis pela distribuição de *A. crocea* no ASO, considerando os efeitos de um poder dispersivo restrito e o potencial bioinvasor da espécie, foram conduzidas a partir de análises moleculares de segmentos do gene mitocondrial COI e do íntron ribossomal nuclear ITS1, utilizando populações brasileiras e argentinas. Os resultados revelaram uma população estruturada, com sinais da ação da seleção natural e de expansões populacionais resultantes de eventos geológicos do Quaternário. A estrutura genética detectada não sustenta a ocorrência de *A. crocea* no ASO como resultado de uma introdução antropogênica.

Abstract

The wide distribution of *Acharadria crocea*, associated to its limited dispersive capability, suggests a cryptogenic status for this species in the South-West Atlantic (SWA). Marine invertebrates that often have been considered as invasive show absence of genetic structure over large geographic scales. In contrast, a less dispersive potential would result in structured natural populations and high genetic diversity in large geographic scales. In the SWA, where *A. crocea* occurs from the state of Espírito Santo (Brazil) to the province of Buenos Aires (Argentina), this pattern could be favoured by heterogeneous oceanographic conditions. Inferences of the processes responsible for the distribution of *A. crocea* from SWA, taking into account its restricted dispersive capability and its invasive potential, were conducted by molecular analyses of segments of the mitochondrial COI gene and the nuclear ribosomal intron ITS1 from Brazilian and Argentinean populations. The results revealed structured populations, with signs of natural selection and population expansion resulting from the Quaternary geological events. The genetic structure detected does not support the occurrence of *A. crocea* in the SWA as a result of anthropogenic introduction.

Introdução

Distribuições geográficas amplas são geralmente associadas a capacidades dispersivas maiores em algumas espécies de medusozoários com a fase de medusa em seus ciclos de vida [e.g., *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758), *Pelagia noctiluca* (Forsskål, 1775) (Schroth *et al.*, 2002; Stopar *et al.*, 2010)]. Porém, complexos de espécies crípticas têm sido detectados para alguns medusozoários amplamente distribuídos [e.g., *Aurelia aurita*, Holland *et al.*, 2004; Dawson, 2005; *Obelia geniculata* (Linnaeus, 1758), Govindarajan *et al.*, 2005], demonstrando que nem sempre ocorrem distribuições

mais abrangentes, mas sim uma incompreensão sobre os limites específicos das linhagens.

Acharadria crocea (L. Agassiz, 1862) é uma espécie de medusozóário amplamente distribuída, especialmente em distintas regiões entremarés de águas temperadas do globo (Ewer, 1953; Brinckmann-Voss, 1970; Millard, 1975; Petersen, 1990). Esta ampla distribuição de *A. crocea* não estaria, a princípio, relacionada a um grande poder dispersivo, já que ela não possui fase de medusa em seu ciclo de vida, havendo apenas uma larva actínula de curta duração (cf. Bornancin, 2011).

No Atlântico Sul-Occidental (ASO), *A. crocea* ocorre desde o estado do Espírito Santo (Brasil) até a província de Buenos Aires (Argentina), em substratos naturais (rochas ou em epibiose) e artificiais (cordas, boias e cascos de embarcações) (Migotto & da Silveira, 1987; Grohmann, 1997; Genzano, 1994, 2001; Genzano & Zamponi, 1997; Migotto *et al.*, 2001). A reprodução assexuada estolonial intensa possibilita a colonizar áreas extensas do substrato disponível, chegando a altas densidades que ocasionalmente impossibilitam a individualização das colônias (obs. pess.). A espécie é considerada criptogênica no ASO (Orensanz *et al.*, 2002), sendo também registrada em portos dos Estados Unidos, Reino Unido, África do Sul e Austrália (Agassiz, 1862; Ewer, 1953; Rees, 1963; Millard, 1975; Watson, 1980).

Estudos filogeográficos testando a possibilidade de *A. crocea* ser um complexo de espécies crípticas ainda não foram abordados. Porém, sua ampla distribuição, limitada capacidade dispersiva, intenso crescimento assexuado e intensa colonização de substratos artificiais sugerem alto potencial bioinvasor da espécie. Invertebrados marinhos considerados bioinvasores frequentemente possuem baixa diversidade genética e ausência de estruturação populacional ao longo de amplas escalas geográficas (Mackie *et al.*, 2006; Chandler *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2012). Em contrapartida, a expectativa para um ciclo de vida pouco dispersivo, como em *A. crocea*, seria de populações naturais estruturadas e com maior diversidade genética em escalas geográficas amplas. No ASO esse padrão poderia ser potencializado por ser uma região com condições oceanográficas heterogêneas, incluindo diferentes massas de água e disponibilidade de substrato nos litorais argentino e brasileiro (Emilson, 1961; Boltovskoy, 1981; Capurro, 1981; Matsuura, 1986; Lucas *et al.*, 2005). No entanto, não é conhecida a estrutura genética das populações de *A. crocea* do ASO.

O objetivo deste estudo é inferir os processos responsáveis pela distribuição de *A. crocea* no ASO levando em conta os efeitos de um poder dispersivo restrito e o

potencial bioinvasor da mesma. Esta inferência é feita a partir de análises moleculares de segmentos do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI), e do íntron ribossomal nuclear ITS1 de populações brasileiras e argentinas.

Material e métodos

Amostragem e sequenciamento de DNA

Amostras de colônias de *A. crocea* foram coletadas em substratos naturais rochosos e artificiais de regiões entremarés do Brasil [Macaé (MA), Cabo Frio (CF), São Sebastião (SS), Peruíbe (PE), Paranaguá (PR), Bombas (BO), Laguna (LG) e Torres (TO)] e Argentina [Mar del Plata (MP)] (Tabela 1 e Figura 1). As amostras foram preservadas em etanol absoluto e mantidas a -20°C. Sessenta e três extrações de DNA foram feitas com o reagente Instagene (Bio-Rad) a partir de um hidrante cada (~3 mm de diâmetro). O par de *primers* *LCO1490* + *HCO2198* (Folmer *et al.*, 1994) e os *primers* de Schroth *et al.* (2002) foram utilizados para amplificação e sequenciamento de segmentos do COI e do ITS1, respectivamente. As reações de PCR foram conduzidas com o reagente Illustra PuReTaq Ready-To-Go™ (GE Healthcare), com parâmetros de 94°C, 3' / 35X: 94°C, 30''; 48°C, 30''; 72°C, 45'' / 72°C, 3'. Os produtos de PCR foram purificados com o reagente Illustra™ GFX™ (GE Healthcare). As purificações foram sequenciadas em ambos sentidos aplicando-se o reagente Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), seguido por leitura em sequenciador ABI PRISM® 3100 (Hitachi). Sequências consenso foram editadas em CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). A identidade das sequências foi checada por meio de BLAST no GenBank. A sequência codificadora do COI foi obtida por meio do código genético mitocondrial de invertebrados disponível no Geneious v5.5.7 (Drummond *et al.*, 2011).

Tabela 1. Número de haplótipos únicos de COI e ITS1 para amostras de *Acharadria crocea* do Atlântico Sul-Occidental discriminadas por localidade e tipo de substrato.

País	Estado	Localidade	Substrato	Número de amostras	Número de haplótipos únicos	
					COI	ITS1
Brasil	Rio de Janeiro	Macaé (MA)	Rocha	11	5	1
		Cabo Frio (CF)	Casco de barco	5	1	1
	São Paulo	São Sebastião (SS)	Boia	6	1	1
		Peruíbe (PE)	Rocha	10	7	1
	Paraná	Paranaguá (PR)	Coluna de píer	6	4	1
	Santa Catarina	Bombas (BO)	Rocha	4	3	2
		Laguna (LG)	Rocha	8	3	5
	Rio Grande do Sul	Torres (TO)	Rocha	10	5	4
Argentina	Buenos Aires	Mar del Plata (MP)	Rocha	4	3	3

Figura 1. Locais de proveniência das amostras de *Acharadria crocea* na região de estudo do Atlântico Sul-Occidental.

Análises filogenéticas

Haplótipos únicos de COI ($n=26$) e de ITS1 ($n=9$) foram considerados terminais do grupo interno nas análises filogenéticas. Os tubulariídeos *Ralpharia gorgoniae* Petersen, 1990 e *Ectopleura larynx* (Ellis & Solander, 1786) foram usados para enraizamento das análises com COI, e os hidrozoários Anthoathecata *Cladonema pacificum* Naumov, 1955 (Cladonematidae), *Euphysa japonica* (Maas, 1909) (Corymorphidae), *Hydra viridissima* Pallas, 1766 (Hydridae), *Pandea conica* (Quoy & Gaimard, 1827) (Pandeidae) e *Velella velella* (Linnaeus, 1758) (Porpitidae) para as análises com ITS1. Alinhamentos foram feitos utilizando MAFFT v5 (Katoh *et al.*, 2005). Análises filogenéticas por inferência bayesiana (IB) foram realizadas no MrBayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), com modelos de substituição nucleotídica estimados através do jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008; Guindon & Gascuel, 2003). O melhor modelo sob o critério de Akaike foi GTR+G para COI e HKY+I para ITS1. As análises de IB utilizaram quatro cadeias de Markov Monte Carlo de 1×10^6 gerações, amostrando parâmetros gerados para as árvores calculadas a cada 100 gerações. Duas rodadas paralelas por análise foram conduzidas, com a finalidade de confirmar a congruência dos resultados. A estabilização dos valores de verossimilhança das análises foi checada por meio do TRACER 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007).

Árvores de consenso de maioria (50%) foram calculadas com base em cada uma das duas rodadas, após o descarte de 10% das primeiras amostragens ('burn-in'). As árvores restantes foram utilizadas nos cálculos da probabilidade posterior (pp) dos clados (pp > 0,95 considerado significativo).

Análises de genética de populações

Haplótipos únicos para amostras vindas de uma área inferior a $\sim 1 \text{ m}^2$ de substrato foram utilizados nas análises, dada a impossibilidade de individualização das colônias. Com isso, buscou-se evitar haplótipos repetidos por serem potencialmente pertencentes à mesma colônia. Esta estratégia reduziu o conjunto original de 63 sequências de COI e 44 de ITS1 para 30 e 20, respectivamente.

Relações entre os haplótipos foram investigadas por meio de redes construídas sob o critério de parcimônia em TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000). A estrutura genética entre clados das análises filogenéticas e entre grupos das redes haplotípicas foi inferida em análises da variância molecular (AMOVA) e comparações pareadas dos cálculos de valores de *Fst* (Excoffier *et al.*, 1992). Foi estimada a conectividade por meio do cálculo do número de migrantes por geração (*Nm*, Hudson *et al.*, 1992). A significância estatística das análises foi avaliada através de 10.000 permutações realizadas em ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

O programa DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009) foi utilizado para estimativas do número de haplótipos, o número de sítios polimórficos (*S*) e o índice $\theta_\pi = 2N\mu$ (em que *N* = tamanho efetivo populacional). Sinais de recombinação foram testados para o ITS1 por meio do teste gamético (*four-gamete test*; Hudson & Kaplan, 1985). Desvios de neutralidade resultantes de efeitos da seleção natural ou de alterações dos tamanhos populacionais foram analisados pela aplicação combinada dos testes *D* (Tajima, 1989) e *F_s* (Fu, 1997) para COI e ITS1, e do teste MK (McDonald & Kreitman, 1991) para o COI. A significância estatística dos testes *D* e *F* foi calculada com base em 10.000 réplicas de simulações coalescentes; para o teste MK foi realizado o teste exato de Fisher (Fisher, 1922). Análises da distribuição das diferenças nucleotídicas par a par (*mismatch distribution*) foram conduzidas para testar hipóteses de equilíbrio *versus* expansão populacional, valores de $\tau = 2\mu t$ (em que μ = taxa de mutação do gene por geração) dos tempos de expansão populacional foram calculados (Rogers & Harpending, 1992). Estes valores foram convertidos em tempos cronológicos utilizando

a taxa de substituição do COI inferida para o *Leptothecata Obelia geniculata* ($=7,38 \times 10^{-9}$ mudanças/sítio/ano; Govindarajan *et al.*, 2005).

Resultados

A IB sobre o alinhamento do COI (658bp) resultou em estruturação geográfica para alguns grupos que colonizavam substratos naturais, tais como (i) haplótipos do sul do Brasil (BO, LG e TO); (ii) haplótipos de MP relacionados a (iii) haplótipos de MA; (iv) haplótipos de PE (Figura 2). Por outro lado, houve a formação de um clado exclusivo de colonizadores de substrato artificial, sem estruturação geográfica, com haplótipos de CF, SS e PR. Em contraste, a topologia da IB para o alinhamento do ITS1 (332bp) resultou nos haplótipos agrupados em um único clado, sem qualquer estruturação geográfica (topologia não mostrada).

Figura 2. Topologia enraizada das relações filogenéticas entre haplótipos de COI de *Acharadria crocea* (Acro) do Atlântico Sul-Occidental, obtida por inferência bayesiana (modelo evolutivo: GTR+G). Os números acima dos ramos indicam probabilidades posteriores estatisticamente significativas ($>0,95$), números abaixo dos ramos representam comprimentos em número de substituições totais.

A rede haplotípica do ITS1 (Figura 3a) revelou dois grupos de sequências com estruturação significativa (AMOVA: $F_{ST}=0,8$, $p=0.00$): um incluindo todas as localidades brasileiras e outro incluindo os haplótipos de MP e de algumas localidades do sul do Brasil (BO, LG e TO). A rede de ITS1 é reticulada, mas não foi detectada recombinação ($R_m=0$). A rede de COI (Figura 3b), também reticulada, é mais estruturada que a de ITS1, com padrão semelhante ao da análise de IB (Figura 2). A inclusão dos clados detectados na análise de IB do marcador COI em um único agrupamento resultou em uma estrutura genética significativa (AMOVA: $F_{ST}=0,68$, $p=0.00$). Estrutura genética significativa também foi detectada em comparações pareadas entre todos os clados detectados em análises de IB do COI nos cálculos de F_{ST} e N_m (Tabela 2).

Tabela 2. Índice de fixação F_{ST} (abaixo da diagonal) e taxa de migração $M=2N_m$ (acima da diagonal) para os grupos resultantes das análises filogenética e rede de haplótipos de COI (Figuras 2 e 3b) em *Acharadria crocea* do Atlântico Sul-Occidental.

	Substrato artificial	Sudeste Macaé	Sudeste Peruíbe	Sul do Brasil	Mar del Plata Argentina
Substrato artificial		0,080	0,127	0,093	0,222
Sudeste-Macaé	0,863**		0,156	0,157	0,350
Sudeste-Peruíbe	0,798**	0,762**		0,127	0,200
Sul do Brasil	0,843**	0,761**	0,797**		0,141
Mar del Plata-Argentina	0,692*	0,588*	0,715**	0,780**	

Valores significativos * $p<0,05$ ** $p<0,001$

Valores negativos de D e F_s para COI e ITS1 foram registrados para todos os grupos detectados (Tabela 3) e, juntamente aos gráficos de *mismatch distribution* (Figura 4), condizem com o modelo de expansão populacional, sendo significativos para F_s ($p<0,05$). Os valores de τ para os possíveis eventos de expansão populacional foram congruentes para os agrupamentos detectados para ITS1 ($\tau \sim 0,6$) (Tabela 3). Tomando como parâmetro a taxa de substituição do COI calculada para *O. geniculata*, os eventos de expansão populacional na região estudada teriam ocorrido entre 626.000 e 350.000 anos atrás, se considerados os distintos grupos, e há ca. 956.000 anos atrás para a espécie como um todo (Tabela 3).

O teste MK revelou que a relação entre divergência/polimorfismo foi de 92/41 para substituições sinônimas e de 3/10 para não sinônimas, detectando evidência significativa de seleção negativa sobre mutações fracamente deletérias agindo no COI ($IN=7,48$; $p=0,001$).

Figura 3. Redes haplotípicas construídas por parcimônia para *Acharadria crocea* do Atlântico Sul-Occidental, utilizando os marcadores ITS1 (a) e COI (b). Os haplótipos estão representados por elipses, cujos tamanhos são proporcionais às frequências dos mesmos. Os códigos das colônias de *A. crocea* (Acro) a partir das quais os diferentes haplótipos foram isolados estão informados dentro das elipses; o código indica a localidade de origem: Macaé (MA), Cabo Frio (CF), São Sebastião (SS), Peruíbe (PE), Paranaguá (PR) Bombas (BO), Laguna (LG), Torres (TO), Mar del Plata (MP).

Tabela 3. Índices de diversidade genética e testes de neutralidade para *Acharadria crocea* do Atlântico Sul-Occidental, considerando o número total de haplótipos e os grupos detectados nas análises filogenéticas e redes haplotípicas para COI e ITS1 (Figuras 2 e 3). n = número de sequências analisadas, S = número de sítios polimórficos, θ_π = diversidade nucleotídica, D = teste de Tajima, F_s = Teste de Fu, τ = tempo da expansão populacional expressado como $2\mu t$ (onde μ é a taxa de mutação e t é o tempo cronológico em anos).

Marcador molecular	Agrupamento	n	S	θ_π (s.d.)	D	F_s	$\tau / t(10^3)$
COI	Grupo único	30	25	0,013 (0,005)	-0,536	-4,974*	4,070 / 956
	Substrato artificial	6	4	0,003 (0,002)	-0,676	-2,712**	1,533 / 360
	Sudeste, Macaé	4	3	0,003 (0,002)	-0,755	-2,367**	1,5 / 352
	Sudeste, Peruíbe	7	7	0,004 (0,002)	-0,690	-5,015**	2,476 / 581
	Sul do Brasil	10	10	0,003 (0,002)	-0,973	-3,986**	1,622 / 380
	Mar del Plata, Argentina	3	4	0,006 (0,004)	-	-	2,667 / 626
ITS1	Grupo único	19	4	0,004 (0,002)	-1,410	-2,558**	0,596
	Brasil, todas as localidades	12	3	0,003 (0,002)	-1,180	-1,592*	0,636
	Sul do Brasil e Argentina	7	2	0,003 (0,002)	-1,230*	-0,922	0,571

Valores significativos * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Figura 4. *Mismatch distribution* para sequências de COI e ITS1 de *Acharadria crocea* do Atlântico Sul-Occidental. A linha contínua representa a distribuição esperada sob o modelo de expansão populacional, a linha tracejada representa a distribuição observada.

Discussão

O ciclo de vida de *A. crocea*, presumidamente de capacidade dispersiva restrita, não explica sozinho a estrutura genética da espécie no ASO. Análises de IB e redes haplotípicas do COI mostraram que, enquanto populações do sudeste do Brasil (MA e PE) foram individualizadas, provavelmente por isolamento oceanográfico e auto-

recrutamento larval, populações do sul do Brasil (BO, LG, TO) compartilharam haplótipos em um clado exclusivo (Figuras 2 e 3b). Além disso, os haplótipos de MP se relacionam aos de MA em vez de com populações geograficamente mais próximas, como esperado para ciclos com capacidade dispersiva restrita (Figuras 2 e 3b). Porém, os haplótipos de ITS1 de MP agruparam com haplótipos de populações do sul do Brasil (BO, LG e TO) (Figura 3a).

A análise de COI também agrupa colônias coletadas em substratos artificiais, não correlacionadas geograficamente (*viz.*, CF, SS, PR) (Figuras 2 e 3b). A capacidade de colonizar substratos artificiais é uma das características indicadoras do potencial de introdução por ação antrópica (Chapman & Carlton, 1991). Assim, uma hipótese seria que a navegação de cabotagem em portos com atividade intensa (SS e PR) ou mediana (CF, próxima ao porto de Macaé) explique a metapopulação crescendo em substrato artificial. Contrapõe-se a esta hipótese o fato de a população de MA não ter afinidades com o grupo. Alternativamente, condições oceanográficas menos evidentes e sazonais como, por exemplo, a associação a áreas de ressurgência de CF e SS (Campos *et al.*, 1999) e talvez PR (Mesquita *et al.*, 1983; Brandini, 1990), expliquem a identidade e conectividade das colônias da metapopulação de substrato artificial. Entretanto, os períodos de ressurgência são geralmente no verão, assíncronos à *A. crocea*, que ocorre no inverno e início da primavera (Migotto *et al.*, 2001; Bornancin, 2011; obs. pess.). Uma terceira alternativa seriam correntes costeiras frias deslocando-se no sentido sul-norte (Campos *et al.*, 1996) transportando propágulos de *A. crocea* desde PR à SS no inverno (Migotto *et al.*, 2001), mas isso não explica porque os haplótipos de PE (intermediário entre SS e PR) não estão incluídos no agrupamento PR, SS, CF.

Experimentos de colonização demonstraram o potencial generalista, em relação à natureza do substrato, das larvas actínulas de populações de Santa Catarina (Bornancin, 2011). Entretanto, a dinâmica do assentamento e desenvolvimento de colônias de *A. crocea* sobre substratos (*e.g.*, interações com outras espécies da comunidade bentônica, tolerância às condições microambientais) é ignorada na natureza. Assim, perante a estruturação genética observada para o grupo de colônias de *A. crocea* crescendo sobre substrato artificial, é também necessário considerar a hipótese de que o potencial de se desenvolver neste tipo de substrato poderia ser polimórfico na espécie. Há alguns estudos com invertebrados marinhos considerados introduzidos em que uma ou poucas linhagens são frequentemente espalhadas em escala global via transporte antropogênico [*e.g.*, o caranguejo *Carcinus maenas* (Linnaeus,

1758) (Darling *et al.*, 2008)]. O efeito fundador seria uma primeira explicação para a menor variabilidade genética de populações introduzidas em comparação com populações naturais, como para o gastrópode *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Chandler *et al.*, 2008). Entretanto, quando há populações polimórficas em regiões com tráfego marítimo intenso, o efeito fundador nem sempre explicaria o motivo da linhagem introduzida em múltiplas regiões exógenas ser praticamente a mesma, como reportado para o briozoário *Bugula neritina* (Linnaeus, 1758) (Mackie *et al.*, 2006), e as ascídias *Botryllus schlosseri* Pallas 1766 (Bock *et al.*, 2012) e *Clavelina oblonga* Herdman, 1880 (Rocha *et al.*, 2012).

Por outro lado, não foi detectada para *A. crocea* do ASO uma baixa diversidade genética no COI, como a reportada para algumas populações consideradas introduzidas em outras espécies de organismos marinhos (Chandler *et al.*, 2008; Darling *et al.*, 2008). Ao contrário, a diversidade genética total do COI em *A. crocea* do ASO, medida pelo índice θ_π (Tabela 3), não difere da mesma medida obtida para a hidromedusa *Olindias sambaquiensis* F. Müller, 1861 ($\pi=0,013$; Ale, 2008), a qual é considerada endêmica do ASO (Vannucci, 1951; Mianzan & Zamponi, 1988).

À parte diferenças entre substrato natural e artificial, *A. crocea* poderia sofrer diferentes pressões seletivas ao longo de sua distribuição no ASO, consequência da heterogeneidade ambiental. Temperatura, salinidade e disponibilidade de substrato rochoso são fatores variáveis na zona nerítica do sudeste e sul do Brasil e da Província de Buenos Aires (Argentina) (Emilson, 1961; Boltovskoy, 1981; Capurro, 1981; Matsuura, 1986; Lucas *et al.*, 2005). Modelagens de nicho ecológico sobre dados eco-fisiológicos de adultos e larvas de *A. crocea* do ASO também mostraram probabilidades de ocorrência diferentes para estas regiões (Bornancin, 2011). Nossos resultados não mostram o efeito da seleção positiva relacionando a estrutura genética do COI (*viz.* MP na Argentina; BO-LG-TO no sul do Brasil; e MA separada de PE no sudeste do Brasil) como efeito de adaptação local. No entanto, o teste MK detectou ação da seleção negativa (que não exclui a ação da seleção positiva) sobre o COI, sugerindo que a seleção natural possa ter tido um papel importante no estabelecimento do padrão de estruturação do COI. Porém, estes efeitos da seleção natural poderiam corresponder a eventos mais antigos que as expansões populacionais detectadas por meio do teste *F_s* e das análises de *mismatch distribution*, para o ITS1 e para o COI (Tabela 3 e Figura 4).

Dependendo da população, as expansões populacionais teriam ocorrido entre 600.000 e 350.000 anos, ou ao redor de 955.000 anos para *A. crocea* como um todo no

ASO (Tabela 3). Vale notar que estas estimativas são baseadas em taxas de substituição relacionada a um hidrozoário filogeneticamente distante, e calculadas sobre filogenias de espécies crípticas que tomaram a abertura do estreito de Bering como ponto de calibração (Govindarajan *et al.*, 2005) – demandam, portanto, cautela em sua interpretação. A aplicação de taxas de mutação calculadas em análises filogenéticas de eventos evolutivos mais antigos poderia levar à superestimativa de tempos de eventos evolutivos em escala populacional (Ho *et al.*, 2005). Sendo assim, as datas aqui calculadas devem ser consideradas como máximas e os eventos biogeográficos possivelmente relacionados às flutuações nos tamanhos populacionais devem ser pesquisados em um período inferior a 1 milhão de anos, a partir do Pleistoceno Médio. Neste período foram registradas contrações e expansões sucessivas da linha de costa (por variações no nível do mar) e da área ocupada pelas massas d'água temperadas do ASO pelos avanços no sentido norte da linha de gelo antártica (Hastenrath, 1991; Martin *et al.*, 1991; Mörner, 1991a; Lambeck *et al.*, 2002; Gersonde *et al.*, 2003; Niebler *et al.*, 2003). Deve-se considerar que estes eventos geológicos aconteceram ciclicamente ao longo do Quaternário, como consequência da alternância entre períodos glaciais e interglaciais, começando aproximadamente partir de um pico glacial máximo registrado entre 1,2 e 2,3 milhões de anos atrás (Clapperton, 1991; Mörner, 1991b, respectivamente).

Contrações e expansões populacionais sucessivas, derivadas da diminuição e aumento da área habitável, poderiam ter originado o padrão de distribuição sem estruturação filogeográfica dos haplótipos de COI e ITS1 ao longo do litoral do ASO. As populações resultantes de uma expansão populacional recente conservam polimorfismos das populações ancestrais que impedem uma clara elucidação das estruturas filogeográficas (primeira hipótese filogeográfica de Avise *et al.*, 1987). Simultaneamente, a seleção negativa agiria conservando polimorfismos com estruturação local marcante. O efeito combinado da expansão populacional e da seleção natural, esta última podendo agir ao longo de escalas de tempo amplas e, inclusive, anteriores às expansões populacionais detectadas no presente estudo, explicariam as estruturas genéticas das colônias habitando substratos naturais e artificiais. Finalmente, a estrutura genética detectada para ITS1 e COI não sustenta a ocorrência de *A. crocea* no ASO como resultado de uma introdução antropogênica.

Referências bibliográficas

- Agassiz, L. 1862. Contributions to the Natural History of the United States of America, IV. Little, Brown & Company, Boston. 380 p.
- Ale, E. 2008. Estudo filogeográfico de duas espécies de medusozoários (Cnidaria), *Liriope tetraphylla* (Trachymedusae, Gerioniidae) e *Olindias sambaquiensis* (Limnomedusae, Olindiasidae), em uma região do Oceano Atlântico Sul-ocidental. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. 73 p.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489–522.
- Bock, D.G., MacIsaac, H.J., Cristescu, M.E. 2012. Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279: 2377–2385.
- Boltovskoy, E. 1981. Masas de agua en el Atlántico sudoccidental. pp. 227–237. In: Boltovskoy D. (ed.), Atlas del zooplankton del Atlántico sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplankton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata.
- Bornancin, E.C. 2011. *Acharadria crocea* (Cnidaria: Hydrozoa): estudo integrado da ecofisiologia do assentamento larval e modelagem de nicho ecológico. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia. 53 p.
- Brandini, F.P. 1990. Hydrography and characteristics of the phytoplankton in shelf and oceanic Waters off southeastern Brazil during winter (July / August 1982) and summer (February / March 1984). *Hydrobiologia*, 196: 111–148.
- Brinckmann-Voss, A. 1970. Anthomedusae/Athecatae (Hydrozoa, Cnidaria) of the Mediterranean. Part I: Capitata. *Fauna e Flora del Golfo di Napoli*, 39: 1–96.
- Campos, E.J.D., Ikeda, Y., Castro, B.M., Gaeta, S.A., Lorenzetti, J.A., Stevenson, M.R. 1996. Experiment studies circulation in the western South Atlantic. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 77: 253–259.

- Campos, E.J.D., Piola, A.R., Miller, J.L. 1999. Water mass distribution on the shelf and shelf-break upwelling in the southeast Brazil bight. 10th Symposium on Global Change Studies, 10–15 January 1999, Dallas, TX.
- Capurro, L.R.A. 1981. Características físicas del Atlántico Sudoccidental. pp. 219–225. In: Boltovskoy D. (ed), Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata.
- Chandler, E.A., McDowell, J.R., Graves, J.E. 2008. Genetically monomorphic invasive populations of the rapa whelk, *Rapana venosa*. *Molecular Ecology*, 17: 4079–4091.
- Chapman, J.W., Carlton, J.T. 1991. A test of criteria for introduced species: the global invasion of the isopod *Synidotea laevidorsalis* (Miers, 1881). *Journal of Crustacean Biology*, 11: 386–400.
- Clapperton, C.M. 1991. Influence of tectonics on the extent of Quaternary glaciation in the Andes. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 89–108.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.
- Darling, J.A., Bagley, M.J., Roman, J., Tepolt, C.K., Geller, J.B. 2008. Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*. *Molecular Ecology*, 17: 4992–5007.
- Dawson, M.N. 2005. *Cyanea capillata* is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for *C. annaskala* and *C. rosea* (Scyphozoa: Semaestomeae: Cyaneidae) in south-eastern Australia. *Invertebrate Systematics*, 19: 361–370.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., Wilson, A. 2011. Geneious v5.5.7, <http://www.geneious.com>, data de último acesso: 15 de março de 2012.
- Emilson, I. 1961. The shelf and coastal waters off southern Brazil. *Boletim do Instituto de Oceanografia de São Paulo*, 11: 101–112.
- Ewer, D.W. 1953. On a new tubularian hydroid from Natal. *Annals of the Natal Museum*, 3: 351–357.

- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47–50.
- Excoffier, L., Smouse, P.E, Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*, 131: 479–491.
- Fisher, R.A. (1922). On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society*, 85: 87–94.
- 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. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Genzano, G.N. 1994. La comunidad hidroide del intermareal de Mar del Plata (Argentina). I. Estacionalidad, abundancia y periodos reproductivos. *Cahiers de Biologie Marine*, 35: 289–303.
- Genzano, G.N. 2001. Associated fauna and sediment trapped by colonies of *Tubularia crocea* (Cnidaria, Hydrozoa) from the rocky intertidal of Mar del Plata, Argentina. *Biociencias*, 9: 105–119.
- Genzano, G.N., Zamponi, M.O. 1997. Frecuencia de estudio y diversidad de los hidrozoos bentónicos de la Plataforma Continental Argentina. *Ciencias Marinas*, 23: 285–232.
- Gersonde, R., Abelmann, A., Brathauer, U., Becquey, S., Bianchi, C., Cortese, G., Grobe, H., Kuhn, G., Niebler, H.-S., Segl, M., Sieger, R., Zielinski, U., Fütterer, D.K. 2003. Last glacial sea surface temperatures and sea-ice extent in the Southern Ocean (Atlantic-Indian sector) a multiproxy approach. *Paleoceanography*, 18, 1061.
- Govindarajan, A.F., Halanych, K.M., Cunningham, C.W. 2005. Mitochondrial evolution and phylogeography in the hydrozoan *Obelia geniculata* (Cnidaria). *Marine Biology*, 146: 213–222.
- Grohmann, P.A., Souza, M.M., Nogueira, C.C. 1997. Hydroids from the vicinity of a large industrial area in Vitória, Espírito Santo, Brazil. pp. 227–232. In: J.C.

- Hartog (ed.), *Proceedings of the 6th International Conference on Coelenterate Biology*. Nationaal Natuurhistorisch Museum, Leiden.
- Guindon, S., Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696–704.
- Hastenrath, S. 1991. A review of glacier variations in the tropics: The past 500,000 years. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 71–73.
- Ho, S.Y., Phillips, M.J., Cooper, A., Drummond, A.J., 2005. Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1561–1568.
- Holland, B.S., Dawson, M.N., Crow, G.L., Hofmann, D.K. 2004. Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Marine Biology*, 145: 1119–1128.
- Hudson, R.R., Kaplan, N.L. 1985. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA-sequences. *Genetics*, 111: 147–164.
- Hudson, R.R., Slatkin, M., Maddison, W.P. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583–589.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., Miyata, T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33: 511–518.
- Lambeck, K., Esat, T.M., Potter, E.-K. 2002. Links between climate and sea levels for the past three million years. *Nature*, 419: 199–206.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Lucas, A.J., Guerrero, R.A., Mianzan, H.W., Acha, E.M., Lasta, C.A. 2005. Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine continental shelf (34–43°S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65: 405–420.
- Mackie, J.A., Keough, M.J., Christidis, L. 2006. Invasion patterns inferred from cytochrome oxidase I sequences in three bryozoans, *Bugula neritina*, *Watersipora subtorquata*, and *Watersipora arcuata*. *Marine Biology*, 149: 285–295.
- Martin, L., Flexor, J.M., Suguio, K. 1991. Possible changes in the Holocene wind pattern recorded on southeastern Brazilian coast. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 117–131.

- Matsuura, Y. 1986. Contribuição ao estudo da estrutura oceanográfica da região sudeste entre Cabo Frio (RJ) e Cabo de Santa Marta Grande (SC). *Ciência e Cultura*, 38: 1439–1450.
- Mesquita, A.R., Leite, J.B.A., Rizzo, R. 1983. Note on the shelf break upwelling off the southeast coast of Brazil. *Boletim do Instituto Oceanográfico*, 32: 193–198.
- Mianzan, H.W., Zamponi, M.O. 1988. Estudio bioecológico de *Olindias sambaquiensis* Müller, 1861 (Limnomedusae, Olindiidae) en el area de Monte Hermoso. II. Factores meteorológicos que influyen en su aparición. *Iheringia*, 2: 63–68.
- Migotto, A.E., da Silveira, F.L. 1987. Hidróides (Cnidaria, Hydrozoa) do litoral sudeste e sul do Brasil: Halocordylidae, Tubulariidae e Corymorphidae. *Iheringia. Série Zoologia*, 66: 95–115.
- Migotto, A.E., Marques, A.C., Flynn, M.N. 2001. Seasonal recruitment of hydroids (Cnidaria) on experimental panels in the São Sebastião channel, southeastern Brazil. *Bulletin of Marine Science*, 68: 287–298.
- Millard, N.A.H. 1975. Monograph on the Hydroida of southern Africa. *Annals of the South African Museum*, 68: 1–513.
- Mörner, N.A. 1991a. Holocene sea level changes in the Tierra del Fuego region. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 133–151.
- Mörner, N.A. 1991b. The Patagonian glaciations and the onset of general quaternary-type glaciations on the globe. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 109–115.
- Niebler, H.-S., Arz, H.W., Donner, B., Mulitza, S., Pätzold, J., Wefer, G. 2003. Sea surface temperatures in the equatorial and South Atlantic Ocean during the Last Glacial Maximum (23–19 ka). *Paleoceanography*, 18, 1069.
- Orensanz, J.M. (Lobo), Schwindt, E., Pastorino, G., Bortolus, A., Casas, G., Darrigran, G., Elías, R., López-Gappa, J.J., Obenat, S., Pascual, M., Penchaszadeh, P., Piriz, M.L., Scarabino, F., Spivak, E., Vallarino, E.A. 2002. No longer the pristine confines of the world ocean: a survey of exotic marine species in the southwestern Atlantic. *Biological Invasions*, 4: 115–143.
- Petersen, K.W. 1990. Evolution and taxonomy in capitate hydroids and medusae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 100: 1–231.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256.

- Rambaut, A., Drummond, A.J. 2007. Tracer v1.4, <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>, data do último acesso: 10 de março de 2012.
- Rees, W.J. 1963. *Tubularia crocea* L. Agassiz in British Waters. *Nature*, 197: 1223.
- Rocha, R.M., Kremer, L.P., Fehlaue-Ale, K.H. 2012. Lack of COI variation for *Clavelina oblonga* (Tunicata, Ascidiacea) in Brazil: evidence for its human-mediated transportation? *Aquatic invasions*, 3: 419–424.
- Rogers, A.R., Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.
- Schroth, W., Jarms, G., Streit, B., Schierwater, B. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology*, 2: 1–10.
- Stopar, K., Ramsak, A., Trontelj, P., Malej, A. 2010. Lack of genetic structure in the jellyfish *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomeae) across European seas. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 417–428.
- Tajima, F. 1989 Statistical-Method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Vannucci, M. 1951. Distribuição dos Hydrozoa até agora conhecidos nas costas do Brasil. *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo*, 2: 105–124.
- Watson, J.E. 1980. The identity of two tubularian hydroids from Australia with a description and observations on the reproduction of *Ralpharia*. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 41: 53–63.

Capítulo III

Padrão filogeográfico comum para os hidrozoários *Liriope tetraphylla* (Geryoniidae) e *Olindias sambaquiensis* (Olindiidae) da região central do Atlântico Sul-Occidental.

Resumo

A região nerítica central do Atlântico Sul-Occidental (ASO), entre o litoral sudeste do Brasil e o litoral da província de Buenos Aires (Argentina), além de ser ecológica e oceanograficamente heterogênea, também sofreu alterações associadas às mudanças climáticas dos períodos glaciais/interglaciais do Quaternário. Duas espécies distribuídas ao longo desta região, *Liriope tetraphylla* e *Olindias sambaquiensis*, foram estudadas para determinar se as suas populações apresentam (i) estrutura genética relacionada às heterogeneidades do ambiente costeiro e (ii) sinais de contrações e expansões populacionais provocadas pela alteração do tamanho da área habitável em períodos glaciais e interglaciais. Análises moleculares foram conduzidas utilizando sequências de segmentos dos genes mitocondriais COI e 16S, e do íntron nuclear ITS1. Ambas espécies revelaram padrões semelhantes de expansões populacionais e estruturação genética acompanhada de padrões filogenéticos sem uma clara correlação geográfica. Os eventos evolutivos relacionados a estes padrões datam, como máximo, do Pleistoceno Superior, período a partir do qual glaciações cíclicas determinaram contrações e expansões sucessivas da linha de costa e da área ocupada pelas massas d'água temperadas do ASO. Essas variações da área habitável teriam provocado alterações semelhantes de tamanhos populacionais e o estabelecimento de padrões filogeográficos comuns em *L. tetraphylla* e *O. sambaquiensis*, independentemente de as espécies possuírem histórias naturais distintas.

Abstract

The neritic region of the Southwestern Atlantic (SWA), between the Southeastern coast of Brazil and the coast of the province of Buenos Aires (Argentina), is not only environmentally and oceanographically heterogeneous, but also has also experienced climatic changes that occurred along the Quaternary glacial/interglacial periods. Two species distributed throughout this region, *Liriope tetraphylla* and *Olindias sambaquiensis*, were studied to determine if their populations have (i) genetic structure related to the heterogeneity of the coastal environment and (ii) signs of population contractions and expansions caused by changes in the size of the habitable area during glacial and interglacial periods. Molecular analyses were conducted using sequences of the mitochondrial genes COI and 16S and the nuclear intron ITS1. Both species exhibited similar patterns of genetic structure and population expansion, accompanied by phylogenetic patterns with lack of geographic correlation. The evolutionary events related to these patterns date, as a maximum, from the Pleistocene, a period in which cyclical glaciations determined successive contractions and expansions of the coastline and the area occupied by the temperate water masses of the ASO. These variations in the habitable area would have caused similar changes in population sizes and the establishment of common phylogeographic patterns in *L. tetraphylla* and *O. sambaquiensis*, independently of their distinct natural histories.

Introdução

A região nerítica central do Atlântico Sul-Occidental (ASO), entre o litoral sudeste do Brasil e o litoral da província de Buenos Aires (BA – Argentina), não tem sido estudada do ponto de vista filogeográfico. Isso talvez ocorra por não apresentar as barreiras geográficas marcantes que propiciem claros modelos vicariantes, os quais

suscitaram uma ampla gama de estudos para diversas espécies marinhas do Atlântico Norte [e.g., Península da Flórida entre o Atlântico e o Mar do Caribe; Estreito de Gibraltar entre o Atlântico e o Mar Mediterrâneo (viz., Avise, 1992; Wares & Cunningham, 2001; Paternello *et al.*, 2007)]. Entretanto, a região central do ASO é heterogênea ecológica e oceanograficamente (Boltovskoy E., 1981; Matsuura, 1986; Boltovskoy D. *et al.*, 1999), e o efeito desta heterogeneidade na estrutura genética das populações que a habitam é desconhecido.

Dados paleoceanográficos também sugerem alterações no nível do mar e na circulação das massas de água do ASO, associadas a mudanças climáticas dos períodos glaciais/interglaciais do Quaternário (Hastenrath, 1991; Martin *et al.*, 1991; Lambeck *et al.*, 2002). Embora os efeitos das mudanças climáticas relacionadas a estes eventos tenham sido investigados para espécies terrestres (ver Carnaval & Moritz, 2008 e suas referências), desconhece-se suas relações com a distribuição de espécies marinhas e a estruturação de suas populações. Portanto, inferências filogeográficas com espécies distribuídas na região central do ASO representam modelos iniciais para investigar estas questões.

Dentre os modelos potenciais, duas espécies filogeneticamente relacionadas (ambas Limnomedusae, cf. Collins *et al.*, 2006) e simpátricas na região subtropical e temperada do ASO, mas com ciclos de vida e, conseqüentemente, potenciais dispersivos e histórias naturais diferentes, foram selecionadas. A primeira, *Olindias sambaquiensis* F. Müller, 1861, é endêmica da região em questão (Vannucci, 1951; Mianzan & Zamponi, 1988) e tem ciclo de vida presumidamente meroplanctônico, conforme sua congênere, *Olindias phosphorica* (Delle Chiaje, 1841), cujo pólipó foi descrito por Weill (1936). A segunda, *Liriope tetraphylla* Chamisso & Eysenhardt 1821, é mais amplamente distribuída (Calder, 1971; Ueno & Mitsutani, 1994; Daly Yahia *et al.*, 2003; Batistić *et al.*, 2007; Palma *et al.*, 2007) e tem ciclo de vida holoplanctônico.

Assim, o objetivo deste estudo é testar se populações de *L. tetraphylla* e *O. sambaquiensis* na região central do ASO apresentam (i) estrutura genética relacionada às heterogeneidades do ambiente costeiro que habitam e (ii) sinais de contrações e expansões populacionais provocadas pela alteração do tamanho da área habitável em períodos glaciais e interglaciais. A análise molecular está baseada em sequências de segmentos dos genes mitocondriais citocromo c oxidase 1 (COI) e a subunidade ribossomal maior (16S). Adicionalmente, o íntron nuclear ITS1 foi utilizado nas

análises de *L. tetraphylla*.

Material e métodos

Amostragem e sequenciamento de DNA

Medusas de *L. tetraphylla* e *O. sambaquiensis* foram coletados utilizando redes de plâncton com malhas variando entre 300 e 500 µm e por meio de arrasto de redes de porta para pesca de camarão, respectivamente. As localidades de coleta foram São Sebastião (SS), Pontal do Sul (PS) e Bombas (BO), no Brasil, e Rio de La Plata (RP), Baía de Samborombón (SB) e Claromecó (CL), na Argentina (Tabela 1; Figura 1). As amostras foram preservadas em etanol absoluto e mantidas a -20°C. Extrações de DNA foram conduzidas com os reagentes EZ-DNA (Biosystems) e Instagene (Bio-Rad), a partir de medusas inteiras (~5mm de diâmetro) de *L. tetraphylla* (n=33), e de amostras de tecido de ~5mm de espessura do manúbrio de cada medusa de *O. sambaquiensis* (n=39).

Tabela 1. Número de sequências de COI, 16S e ITS1 para amostras de *Liriope tetraphylla* e *Olindias sambaquiensis* do Atlântico Sul-Occidental, discriminadas por localidade de coleta.

Espécie	País	Estado	Localidade	Número de sequências		
				COI	16S	ITS1
<i>Liriope tetraphylla</i>	Brasil	São Paulo	São Sebastião (SS)	13	10	14
		Santa Catarina	Bombas (BO)	8	9	9
	Argentina	Buenos Aires	Samborombón (SB)	12	10	7
	TOTAL			33	29	30
<i>Olindias sambaquiensis</i>	Brasil	São Paulo	São Sebastião (SS)	11	5	-
		Paraná	Pontal do Sul (PS)	12	10	-
		Santa Catarina	Bombas (BO)	5	3	-
	Argentina	Buenos Aires	Rio de La Plata (RP)	1	1	-
			Claromecó (CL)	10	4	-
	TOTAL			38	23	

Os pares de *primers* LCO1490 + HCO2198 (Folmer *et al.* 1994) e *primer 1* + *primer 2* (Cunningham & Buss 1993) foram utilizados para amplificação e sequenciamento de segmentos do COI e do 16S, respectivamente, para ambas as espécies; adicionalmente, *primers* de Schroth *et al.* (2002) foram utilizados na amplificação e sequenciamento do segmento do ITS1 de *L. tetraphylla*.

As reações de PCR foram conduzidas utilizando o reagente Illustra PuReTaq Ready-To-Go™ (GE Healthcare), sob os parâmetros 94°C, 3' / 35x: 94°C, 30''; 48°C, 30'' (COI e ITS1) ou 56°C, 42'' (16S); 72°C, 45'' / 72°C, 3'. Os produtos de PCR foram purificados com o reagente Illustra™ GFX™ (GE Healthcare). As purificações

foram sequenciadas em ambos sentidos aplicando-se o reagente Big Dye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems), seguido por leitura em sequenciador ABI PRISM[®] 3100 (Hitachi). Sequências consenso foram editadas em CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). A identidade das sequências foi checada por meio de BLAST no GenBank. A sequência codificadora do COI foi verificada por meio do código genético mitocondrial de invertebrados disponível no Geneious v5.5.7 (Drummond *et al.* 2011).

Figura 1. Locais de proveniência das amostras de *Liriope tetraphylla* (quadrados) e *Olindias sambaquiensis* (círculos) no Atlântico Sul-Occidental.

Análises filogenéticas

Haplótipos únicos de COI, 16S e da concatenação COI+16S, de *L. tetraphylla* e *O. sambaquiensis*, assim também como de ITS1 de *L. tetraphylla*, foram considerados terminais dos grupos internos nas análises filogenéticas. Número de terminais, tamanho dos alinhamentos e grupos externos das análises filogenéticas são apresentados na Tabela 2.

Os alinhamentos foram gerados utilizando MAFFT v5 (Katoh *et al.* 2005). Análises filogenéticas por inferência Bayesiana (IB) foram realizadas no MrBayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), com modelos de substituição nucleotídica estimados independentemente para cada partição através do jModelTest 0.1.1 (Guindon &

Gascuel 2003; Posada 2008). Os melhores modelos sob o critério de Akaike foram: *L. tetraphylla*, GTR+I (COI), HKY+I (16S, ITS1) e TPM1uf+I (COI+16S); *O. sambaquiensis*, GTR+G (COI), HKY+G (16S, COI+16S). As análises de IB utilizaram quatro cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) de 3×10^6 gerações, amostrando parâmetros gerados para as árvores calculadas a cada 100 gerações. Duas rodadas paralelas por análise foram conduzidas, com a finalidade de confirmar a congruência dos resultados. A estabilização dos valores de verossimilhança das análises foi checada por meio do TRACER 1.5 (Rambaut & Drummond 2007). Árvores consenso de maioria (50%) foram calculadas com base em cada uma das duas rodadas, após o descarte de 10% das primeiras amostragens ('burn-in'). As árvores restantes foram utilizadas nos cálculos da probabilidade posterior (pp) dos clados.

Tabela 2: Táxons utilizados nas análises filogenéticas de COI, 16S, COI+16S e ITS1 para *Liriope tetraphylla* e *Olindias sambaquiensis* do Atlântico Sul-Occidental. Para as espécies do grupo interno, o número de haplótipos únicos (n) e o comprimento de cada alinhamento em pares de base (bp) é informado. Para as espécies do grupo externo, o número de acesso do GenBank é informado.

	COI		16S		COI+16S		ITS1	
	n	bp	n	bp	n	bp	n	bp
<i>Liriope tetraphylla</i> Chamisso & Eysenhardt 1821	20	585	15	599	26	1183	22	543
<i>Olindias sambaquiensis</i> F. Müller, 1861	34	585	11	514	35	1082	-	-
<hr/>								
Grupo externo de <i>L. tetraphylla</i>								
<hr/>								
Geryoniidae:								
<i>L. tetraphylla</i> (Costa Rica, Oceano Pacífico)	presente estudo		presente estudo		presente estudo			
<i>Geryonia proboscidalis</i> (Huxley, 1859)	GQ120078		EU293979					
Rhopalonematidae:								
<i>Crossota rufobrunnea</i> (Kramp, 1913)					AB377581			
<i>Pantachogon haeckeli</i> Maas, 1893					AB377562			
<i>Rhopalonema velatum</i> Gegenbaur, 1857					AB377544			
<hr/>								
Grupo externo de <i>O. sambaquiensis</i>								
<hr/>								
Olindiidae:								
<i>Craspedacusta sowerbyi</i> Lankester, 1880	FJ423614		EU293971					
<i>Maeotias marginata</i> (Modeer, 1791)	AF383926-7		AY512508					
<i>Olindias phosphorica</i> (Delle Chiaje, 1841)			AY512509					

Análises de genética de populações

Os haplótipos repetidos foram mantidos nas análises de genética de populações, sendo analisados os seguintes conjuntos de genes: COI+16S (*L. tetraphylla*, n=32; *O. sambaquiensis*, n=39); COI apenas, por ser o segmento mitocondrial mais variável (*L. tetraphylla*, n=32; *O. sambaquiensis*, n=39); e ITS1 (*L. tetraphylla*, n=27).

Os relacionamentos entre os haplótipos foram investigados por meio de redes construídas sob o critério de parcimônia em TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000).

A estrutura genética entre localidades de amostragem, regiões geográficas e grupos detectados após análises filogenéticas e construção de redes haplotípicas foi inferida por meio de testes de análise da variância molecular (AMOVA) e comparações pareadas dos cálculos de valores de F_{st} (Excoffier *et al.* 1992). A significância estatística dos testes foi avaliada através de 10.000 permutações realizadas em ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

Estimativas do (i) número de sítios polimórficos S , (ii) número de haplótipos h , (iii) diversidade haplotípica Hd , (iv) índices de diversidade nucleotídica (v) por sítio π e (vi) por sequência θ_w foram obtidas utilizando o programa DnaSP v5 (Librado & Rozas 2009). Sinais de recombinação foram testados para o ITS1 por meio do teste gamético (*four-gamete test*; Hudson & Kaplan 1985). Desvios de neutralidade resultantes de efeitos da seleção natural ou de alterações dos tamanhos populacionais foram analisados pela aplicação combinada dos testes D (Tajima 1989), F_s (Fu 1997) e, para *O. sambaquiensis*, do teste MK (McDonald & Kreitman 1991) utilizando *Maeotias marginata* (Modeer, 1791) como grupo externo. A significância estatística dos testes foi calculada com base em 10.000 réplicas de simulações coalescentes para D e F , e por meio do teste exato de Fisher (Fisher, 1922) para MK. Análises da distribuição das diferenças nucleotídicas par a par (*mismatch distribution*) foram conduzidas para testar hipóteses de equilíbrio *versus* expansão populacional e para calcular os valores de $\tau=2\mu t$ (em que μ = taxa de mutação do gene por geração) dos tempos de expansão populacional, seguindo as metodologias de Rogers & Harpending (1992).

O modelo de isolamento com migração implementado no programa IMA2 (Hey, 2010) foi utilizado em análises coalescentes dos conjuntos de dados COI+16S e ITS1 para *L. tetraphylla* e COI+16S para *O. sambaquiensis*. Para ambas as espécies os dados foram organizados nos grupos (i) Brasil e (ii) Argentina. Deste modo, parâmetros populacionais de migração $m=m\mu$ (onde m é o número de indivíduos migrantes e μ a taxa de mutação para o gene por geração), do tamanho efetivo populacional $N=4N\mu$ (onde N é o número de indivíduos) e do tempo de divergência entre populações $t=t\mu$ (onde t é o tempo em gerações), foram calculados. Os limites superiores para os valores *a priori* dos parâmetros populacionais para cada conjunto de dados foram calculados utilizando a estimativa de θ_w do grupo (Brasil ou

Argentina) apresentando o valor de θ_w mais elevado. Para os genes mitocondriais concatenados (COI+16S) foi aplicado o modelo de substituição de Hasegawa-Kishino-Yano (1985) e um fator de herança = 0.25; já para o ITS1, o modelo evolutivo de sítios infinitos (Kimura, 1969) e um fator de herança = 1 foi aplicado. As genealogias foram simuladas ao longo de rodadas de MCMC utilizando o método de *branch sliding* para modificar as topologias coalescentes (Nielsen, 2000; Hey & Nielsen, 2007). O estado estacionário das rodadas de análise foi verificado nos gráficos de tendências gerados pelo programa IMA2. Após um período de *burn-in* de 10^6 gerações, os valores dos parâmetros populacionais foram recuperados a cada 100 gerações de uma rodada de análise de 10^6 passos. A independência entre as amostragens feitas ao longo de cada rodada foi confirmada por meio das estatísticas de auto-correlação informadas pelo programa. Cada rodada foi finalizada após o tamanho efetivo das amostragens de todos os parâmetros ter excedido o valor de 100. Para confirmar a convergência em distribuições estacionárias reais, cinco rodadas utilizando diferentes números de partida (*random number seeds*) para cada conjunto de dados foram conduzidas. Os valores mais prováveis juntamente aos valores máximos e mínimos dos parâmetros populacionais foram obtidos do intervalo de confiança de 95% das distribuições geradas a partir das genealogias amostradas.

Resultados

As análises de IB dos genes concatenados COI+16S para *L. tetraphylla* e *O. sambaquiensis*, e do ITS1 para *L. tetraphylla* revelaram padrões similares de falta de estruturação geográfica (Figura 2). Análises de IB para COI e 16S analisados separadamente também revelaram falta de estruturação geográfica para ambas as espécies (dados não mostrados). Nas redes haplotípicas (Figura 3a,b), os haplótipos de localidades da Argentina para ambas as espécies apresentaram uma tendência de estruturação maior que os haplótipos brasileiros. Por outro lado, a rede haplotípica do ITS1 para *L. tetraphylla* revelou dois grupos separados por um *indel* de 20bp – o grupo ‘a’ com haplótipos menores e o grupo ‘b’ com os maiores (Figura 3c). Haplótipos de SS foram principalmente incluídos no grupo ‘a’, enquanto haplótipos de BO no grupo ‘b’. Coincidentemente, ambas populações mostraram estruturação genética significativa entre elas (F_{st} 0,2, $p < 0,05$) (Tabela 3). A rede de ITS1 é reticulada, mas não foi detectada recombinação ($R_m = 0$).

Figura 2. Topologias enraizadas das relações filogenéticas entre haplótipos de COI+16S de (a) *Liriope tetraphylla* (Lte) e (b) *Olindias sambaquiensis* (Osa), e de ITS1 de (c) *Liriope tetraphylla* do Atlântico Sul-Occidental obtidas por inferência bayesiana (modelos evolutivos TPM1uf+I, HKY+G e HKY+I, respectivamente). Não foram detectados clados com probabilidades posteriores maiores a 0,95. As barras na parte inferior de cada topologia representam escalas de comprimento de ramo em número de substituições por sítio. Os códigos dos exemplares para ambas as espécies a partir das quais os diferentes haplótipos foram isolados são informados nos terminais; o código indica a localidade de origem: São Sebastião (SS), Pontal do Sul (PS), Bombas (BO), Rio da Prata (RP), Samborombón (SB), Claromecó (CL).

O teste da estrutura populacional Brasil/Argentina não revelou estrutura genética significativa para ambas as espécies (AMOVA, $p > 0,05$). Entretanto, para *L. tetraphylla* há estrutura genética significativa (1) para as sequências mitocondriais em um único grupo (AMOVA: F_{st} 0,16, $p < 0,05$ para COI+16S; F_{st} 0,23, $p < 0,01$ para COI); (2) para comparações pareadas entre SB (Argentina) e PS e SS (Brasil), sendo a estruturação entre SB e PS levemente maior que entre SB e SS, que são os dois extremos geográficos da distribuição estudada (Tabela 3). Para *O. sambaquiensis*

também há estrutura significativa para sequências de COI quando incluídas em um único grupo (AMOVA: F_{st} 0,28, $p < 0,01$), porém a estruturação é não significativa para os genes mitocondriais concatenados (AMOVA: F_{st} 0,006, $p > 0,05$), incluindo o segmento do 16S, o menos polimórfico entre os marcadores utilizados (dados não mostrados). As comparações pareadas de F_{st} resultaram em estrutura genética não significativa (COI+16S) ou menos marcante (COI) entre CL e SS, localidades extremas na distribuição estudada (Tabela 4). Não foram detectados desvios significativos de neutralidade no teste MK para o marcador COI de *O. sambaquiensis* ($p > 0,05$).

a) *Liriope tetraphylla* - COI+16S b) *Olindias sambaquiensis* - COI+16S c) *Liriope tetraphylla* - ITS1

Argentina
Brasil

Figura 3. Redes haplotípicas construídas por parcimônia para (a) *Liriope tetraphylla* (Lte) e (b) *Olindias sambaquiensis* (Osa) utilizando os marcadores COI+16S, e para (c) *Liriope tetraphylla* utilizando o marcador ITS1. Os haplótipos estão representados por elipses, cujos tamanhos são proporcionais às frequências dos mesmos. Os códigos dos exemplares para os diferentes haplótipos estão informados dentro das elipses segundo a localidade de origem: São Sebastião (SS), Pontal do Sul (PS), Bombas (BO), Rio da Prata (RP), Samborombón (SB), Claromecó (CL).

Tabela 3. Índice de fixação F_{ST} entre localidades de amostragem para haplótipos de COI/COI+16S (abaixo da diagonal) e de ITS1 (acima da diagonal) em *Liriope tetraphylla* do Atlântico Sul-Occidental.

	São Sebastião (SS)	Bombas (BO)	Samborombón (SB)
São Sebastião (SS)		0,20*	-0,057
Bombas (BO)	-0,037/-0,048		0,012
Samborombón (SB)	0,026**/0,323**	0,252**/0,340**	

Valores significativos *p<0,05 **p<0,001

Tabela 4. Índice de fixação F_{ST} entre localidades de amostragem para haplótipos de COI (abaixo da diagonal) e de COI+16S (acima da diagonal) em *Olindias sambaquiensis* do Atlântico Sul-Occidental.

	São Sebastião (SS)	Pontal do Sul (SS)	Bombas (BO)	Claromecó (CL)
São Sebastião (SS)		0,197	0,340	-0,072
Pontal do Sul (SS)	0,09		-0,054	0,315*
Bombas (BO)	-0,025	-0,05		0,462*
Claromecó (CL)	0,178**	0,314**	0,496**	

Valores significativos *p<0,05 **p<0,001

Valores negativos de D e F_s ($p<0,05$) foram registrados para dados mitocondriais para (1) o agrupamento total e (2) as populações do Brasil e da Argentina de ambas as espécies (Tabela 5). Os gráficos de *mismatch distribution* (Figuras 4a,b) e os valores de D e F_s revelaram expansões populacionais para COI e 16S; e resultados significativos de F_s (Tabela 5) e padrões de *mismatch distribution* condizentes com expansões populacionais também foram detectados (Figura 4c) para o ITS1 do grupo 'b' de *L. tetraphylla* (Figura 3b). Os valores de τ para os possíveis eventos de expansão populacional foram maiores para populações brasileiras de ambas as espécies (Tabela 5).

As simulações coalescentes também permitiram inferir processos de expansões populacionais similares para ambas as espécies (Figura 5). Estas expansões foram marcantes nas populações brasileiras, que mostraram tamanhos populacionais muito superiores aos das populações ancestrais (Figura 5). As análises coalescentes não detectaram índices significativos de migração ($p>0,05$) entre Brasil e Argentina.

Tabela 5. Índices de diversidade genética e testes de neutralidade para *Liriope tetraphylla* e *Olindias sambaquiensis* do Atlântico Sul-Occidental baseados nos genes COI e ITS1, considerando o número total de haplótipos das regiões amostradas (Brasil e Argentina) e, quando pertinente, a estrutura detectada na Figura 3c para *L. tetraphylla*. n = número de seqüências analisadas, S = número de sítios polimórficos, h = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica por sítio, Θ_w = diversidade nucleotídica por seqüência, D = teste de Tajima, F_S = Teste de Fu, τ = tempo da expansão populacional expressado como $2\mu t$ (onde μ é a taxa de mutação e t é o tempo em gerações).

Espécie	Agrupamento	Gene	n	S	h	Hd (s.d.)	π (s.d.)	Θ_w	D	F_S	τ
<i>Liriope tetraphylla</i>	Total	COI	32	35	20	0,913 (0,04)	0,007 (0,0)	8,691	-2,01**	-11,583**	2,511
	(SS,BO,SB)	ITS1	27	19	10	0,735 (0,077)	0,010 (0,0)	4,929	-0,737	-0,576	1,621
	Brasil	COI	20	29	15	0,958 (0,033)	0,008 (0,0)	8,174	-1,740	-7,253**	3,768
	(SS,BO)	ITS1	23	22	12	0,862 (0,059)	0,013 (0,01)	5,961	-0,660	-0,454	1,964
	Argentina	COI	12	6	6	0,682 (0,15)	0,002 (0,0)	1,987	-1,894**	-3,342**	1,0
	(SB)	ITS1	7	8	4	0,81 (0,13)	0,011 (0,002)	3,265	1,642	1,393	1,635
	Grupo 'a'	ITS1	18	13	6	0,562 (0,134)	0,006 (0,002)	3,780	-1,260	-0,158	0,5
	(Figura 3c)										
	Grupo 'b'	ITS1	12	12	9	0,909 (0,079)	0,006 (0,002)	3,974	-1,430	-4,577**	1,622
	(Figura 3c)										
<i>Olindias sambaquiensis</i>	Total	COI	39	56	34	0,993 (0,007)	0,013 (0,0)	13,245	-1,688*	-27,26**	6,118
	(SS,PS,BO,RP,CL)										
	Brasil	COI	27	48	24	0,991 (0,013)	0,013 (0,0)	12,453	-1,616*	-15,298**	5,507
	(SS,PS,BO)										
	Argentina	COI	12	18	10	0,970 (0,044)	0,008 (0,0)	5,961	-1,123	-4,119*	4,424
	(RP,CL)										

Valores significativos *p<0,05, **p<0,001

Figura 4. *Mismatch distribution* para (a) *Liriope tetraphylla* e (b) *Olindias sambaquiensis* utilizando os marcadores COI+16S, e (c) para o grupo 'b' da Figura 3c de *Liriope tetraphylla* utilizando o marcador ITS1. As linhas contínuas representam as distribuições esperadas sob o modelo de expansão e contração populacional, as linhas tracejadas representam as distribuições observadas.

a) *Liriope tetraphylla* (COI+16S e ITS1) b) *Olindias sambaquiensis* (COI+16S)

Figura 5. Resultados das simulações coalescentes para a divergência entre populações do Brasil e da Argentina: (a) *Liriope tetraphylla*, utilizando os marcadores COI+16S e ITS1; (b) *Olindias sambaquiensis*, utilizando a concatenação COI+16S. Os retângulos representam os tamanhos efetivos das populações do Brasil, da Argentina e das populações ancestrais. O tamanho efetivo populacional ($4N\mu$) é informado entre parênteses para cada população. O tempo de divergência é informado em função da taxa de mutação ($t\mu$). As setas indicam intervalos de confiança de 95% das probabilidades posteriores de cada parâmetro. Não foram detectados índices significativos de migração entre as populações do Brasil e da Argentina ($p > 0,05$).

Discussão

O potencial de dispersão das espécies, presumidamente relacionado aos seus ciclos vitais diferentes, não deve ser o único motivo relacionado aos padrões genéticos de *L. tetraphylla* e *O. sambaquiensis* no ASO. A princípio, o potencial dispersivo explicaria a falta de estruturação filogeográfica nas análises de IB. Entretanto, nas redes haplotípicas da concatenação COI+16S (Figuras 3a,b), há uma tendência a agrupamento dos haplótipos argentinos que, por sua vez, está acompanhada de valores significativos de *Fst* em comparações pareadas entre as populações de ambas as regiões. Ademais, a estrutura genética para o COI e ITS1 foi menor entre populações mais distantes geograficamente. Finalmente, o ciclo de vida holoplanctônico de *L. tetraphylla*, potencialmente mais dispersivo, não resulta em menor estruturação que a meroplanctônica *O. sambaquiensis*.

Duas hipóteses alternativas poderiam explicar padrões filogenéticos sem correlações geográficas claras acompanhados de populações geneticamente estruturadas: (i) isolamento antigo seguido de introgressão ou (ii) isolamento recente ou em andamento, com compartilhamento de polimorfismos da população ancestral (Funk & Omland, 2003). Os resultados das simulações coalescentes conduzidas para as duas espécies favorecem a segunda hipótese, uma vez que índices de migração significativos, que justificariam processos de introgressão, não foram detectados na divergência calculada entre populações do Brasil e da Argentina.

Usando a taxa de substituição de $6,13 \times 10^{-9}$ mudanças/sítio/ano [Govindarajan *et al.*, 2005, estimada a partir da concatenação COI+16S para *Obelia geniculata* (Linnaeus, 1758)], e um tempo geracional anual estimado com base na sazonalidade e desenvolvimento gonadal de *O. sambaquiensis* na região de estudo (Mianzan & Zamponi, 1988; Chiaverano *et al.*, 2004; Ale, 2008), o tempo de divergência coalescente $2.2t_{\mu}$ para *O. sambaquiensis* (Figura 5b) resultaria em 331.674 anos atrás. Esta estimativa deve ser interpretada com cautela, já que a taxa de substituição utilizada foi calculada para um hidrozoário filogeneticamente distante e no contexto de análises filogéticas que tomaram como ponto de calibração a abertura do estreito de Bering (Govindarajan *et al.*, 2005), sendo que a aplicação de taxas de mutação estimadas em análises filogenéticas de eventos evolutivos mais antigos pode levar à superestimativa de tempos evolutivos em escala populacional (Ho *et al.*, 2005).

Assim, a data aqui calculada deve ser considerada como máxima, o que posicionaria o limite máximo da divergência entre populações de Brasil e Argentina no Pleistoceno tardio.

Datas de divergência para *L. tetraphylla* não foram estimadas devido ao desconhecimento sobre o tempo geracional da espécie no ASO. Entretanto, espécimes mediterrâneos de *L. tetraphylla* apresentaram ciclos reprodutivos de quatro à sete semanas nos meses mais quentes e mais frios, respectivamente (Buecher *et al.*, 1997). Este dado coincide com os resultados das análises de *mismatch distribution*, que mostraram valores de τ para *L. tetraphylla* menores que os registrados para *O. sambaquiensis* (Tabela 5). Dentro da teoria neutra, considerando taxas de mutação semelhantes para ambas as espécies, estes τ denotariam que um número maior de gerações de *L. tetraphylla* seriam produzidas anualmente na região estudada. Embora com um ciclo de vida potencialmente mais dispersivo, um maior número de gerações ao ano, principalmente nos meses do verão, quando as águas do estuário do Rio da Prata são retidas no litoral norte de BA (Acha *et al.*, 2004; Piola *et al.*, 2005), favoreceria uma menor dispersão populacional da população de SB e uma conseguinte estruturação de *L. tetraphylla*, comparável à observada para *O. sambaquiensis*.

As análises coalescentes também detectaram expansões populacionais (Figura 5) condizentes com os valores significativos dos índices de F_s (Tabela 5), teste mais sensível aos efeitos de expansões populacionais (Fu, 1997; Ramos-Onsins & Rozas, 2002), e com as curvas de *mismatch distribution* (Figura 4). Expansões populacionais foram mais significativas e possivelmente mais antigas (Tabela 5) para o agrupamento das populações brasileiras [*L. tetraphylla*: $\tau=3,768$ (COI), $\tau=1,964$ (ITS1); *O. sambaquiensis*: $\tau=5,507$ (COI)] que para as populações argentinas [*L. tetraphylla*: $\tau=1$ (COI), $\tau=1,635$ (ITS1); *O. sambaquiensis*: $\tau=4,424$ (COI)]. Populações resultantes de uma expansão populacional recente conservam polimorfismos das populações ancestrais que impedem uma definição clara das estruturas filogeográficas (primeira hipótese filogeográfica de Avise *et al.*, 1987). Este efeito foi detectado nas análises de COI+16S e, mais marcadamente, no ITS1, uma vez que o DNA nuclear possui N_e quatro vezes maior que o do genoma mitocondrial (Moore, 1995).

Liriope tetraphylla e *O. sambaquiensis* são espécies conspícuas ao longo da região amostrada (Tronolone, 2007; Mianzan & Zamponi, 1988; Mianzan *et al.*, 2001; Ale, 2008; Oliveira *et al.*, aceito para publicação) e, portanto, suas estruturas

populacionais podem estar relacionadas às heterogeneidades ambientais da zona nerítica do Sudeste e Sul do Brasil e da Província de Buenos Aires (BA) (Emilson, 1961; Boltovskoy E., 1981; Capurro, 1981; Matsuura, 1986; Lucas *et al.*, 2005). De fato, as amostras provêm de áreas sob a influência (i) das ressurgências sazonais da Água Central do Atlântico Sul e (ii) da corrente subtropical do Brasil, na região nerítica do Sudeste do Brasil (Emilson, 1961; Campos *et al.*, 1999; Acha *et al.*, 2004); (iii) das grandes descargas continentais de água doce do Rio da Prata, as quais podem atingir sazonalmente o sul do Brasil e o litoral norte de BA (Acha *et al.*, 2004; Piola *et al.*, 2005) e (iv) de condições particulares de circulação de águas costeiras e de aportes continentais de água doce do litoral sul de BA, sob a influência das águas da região nerítica argentina afetadas pela corrente fria das Malvinas (Lucas *et al.*, 2005). Essas diferentes massas de água eventualmente formam frentes de encontro sem mistura importante entre elas (Lucas *et al.*, 2005; Piola *et al.*, 2005) ao longo da região, o que explicaria um isolamento geográfico atual entre as populações.

A heterogeneidade ambiental também pode explicar a existência do efeito diferencial da seleção natural (*viz.* seleção no locus *Lap* em *Mytilus edulis*, Linnaeus 1758 cf. Koehn *et al.* 1980; Hilbish & Koehn, 1985). Nestes casos a seleção natural pode restringir o fluxo gênico, aumentando o efeito do isolamento populacional (Palumbi, 1994; Hellberg *et al.*, 2002). Além disso, o DNA mitocondrial (DNAm) é suscetível ao efeito de varreduras seletivas que diminuem sua diversidade genética total em decorrência de seleção positiva agindo apenas sobre uma porção do mesmo (Bazin *et al.*, 2006; Eyre-Walker, 2006). Nossas análises, entretanto, não detectaram efeitos de seleção natural positiva na concatenação COI+16S, e estes marcadores se mostraram suficientemente polimórficos para serem informativos de eventos demográficos. Isto pode estar relacionado a que o DNAm recuperaria variação neutra suficiente após eventuais varreduras seletivas em uma escala de tempo relativamente curta (Mulligan *et al.*, 2006; Berry, 2006; Wares *et al.*, 2006). Adicionalmente, o padrão de estruturação genética detectado foi comum a duas concatenações de COI+16S de espécies com histórias naturais distintas e, portanto, possivelmente sujeitas a diferentes pressões seletivas. Assim, os efeitos expostos, das expansões populacionais e isolamento das massas d'água, poderiam explicar a estrutura genética detectada para toda a área geográfica estudada, independente da seleção natural ter tido ou não um efeito local não detectado em algum ponto desta área ambientalmente heterogênea.

Monofiletismos recíprocos coincidentes com quebras biogeográficas de longa duração, como proposto na terceira hipótese filogeográfica de Avise *et al.* (1987), não foram detectados. Entretanto, estendendo o segundo corolário desta hipótese, pode-se esperar que eventos biogeográficos marcantes imprimiriam padrões filogeográficos comuns em espécies com histórias naturais similares ou, até mesmo, com biologias diferentes. Embora *L. tetraphylla* e *O. sambaquiensis* possuam ciclos de vida e histórias naturais diferentes, elas revelaram padrões semelhantes de expansões populacionais e estruturação genética acompanhada de padrões filogenéticos sem uma clara correlação geográfica. Este padrão condiz também com o de *Acharadria crocea* (L. Agassiz, 1862) da mesma região geográfica (*viz.* Capítulo 2), uma espécie que possui ciclo de vida majoritariamente bentônico e filopátrico, portanto diferente dos apresentados por *L. tetraphylla* e *O. sambaquiensis*.

O limite temporal máximo dos eventos evolutivos relacionados aos padrões filogeográficos data do Pleistoceno Superior. A partir deste período, e ao longo do Holoceno, houve glaciações cíclicas, iniciadas com um pico glacial máximo cerca de 1,2 ou 2,3 milhões de anos atrás (Clapperton, 1991; Mörner, 1991a, respectivamente). Neste período houve contrações e expansões sucessivas da linha de costa e da área ocupada pelas massas d'água temperadas do ASO devido a variações no nível do mar e no posicionamento da linha de gelo antártica, marcando estágios glaciais e interglaciais (Hastenrath, 1991; Martin *et al.* 1991; Mörner, 1991b; Lambeck *et al.*, 2002; Niebler *et al.*, 2003; Gersonde *et al.*, 2003). Essas variações da área habitável teriam provocado o mesmo efeito de alteração de tamanhos populacionais e o estabelecimento de padrões filogeográficos comuns em *L. tetraphylla*, *O. sambaquiensis* e *A. crocea* do ASO. Deste modo, conclui-se que a história das alterações do ambiente nerítico do ASO ao longo dos períodos glaciais/interglaciais imprimiriam assinaturas comuns aos padrões filogeográficos de espécies com histórias naturais distintas.

Referências bibliográficas

- Acha, E.M., Mianzan, H.W., Guerrero, R.A., Favero, M., Bava, J. 2004. Marine fronts at the continental shelves of austral South America. Physical and ecological processes. *Journal of Marine Systems*, 44: 83–105.
- Ale, E. 2008. Estudo filogeográfico de duas espécies de medusozoários (Cnidaria),

- Liriope tetraphylla* (Trachymedusae, Gerioniidae) e *Olindias sambaquiensis* (Limnomedusae, Olindiasidae), em uma região do Oceano Atlântico Sul-ocidental. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. 73 p.
- Awise, J.C. 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*, 63: 62–76.
- Awise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489–522.
- Batistić, M., Jasprica, N., Carić, M., Lučić, D. 2007. Annual cycle of the gelatinous invertebrate zooplankton of the eastern South Adriatic coast (NE-Mediterranean). *Journal of Plankton Research*, 29: 671–686.
- Bazin, E., Glémin, S., Galtier N. 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*, 312: 570–572.
- Berry, O.F. 2006. Mitochondrial DNA and population size. *Science*, 314: 1388.
- Boltovskoy, D., Gibbons, M.J., Hutchings, L., Binet, D. 1999. General biological features of the South Atlantic. pp. 1–42. *In*: Boltovskoy D. (ed.), South Atlantic Zooplankton.
- Boltovskoy, E. 1981. Masas de agua en el Atlántico sudoccidental. pp. 227–237. *In*: Boltovskoy D. (ed.), Atlas del zooplankton del Atlántico sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplankton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata.
- Buecher, E., Jacqueline, G.O.Y., Planque, B., Ettienne, M., Dallot, S. 1997. Long-term fluctuations of *Liriope tetraphylla* in Villefranche bay between 1966 and 1993 compared to *Pelagia nocticula* pullulations. *Oceanologica Acta* 20: 145–157.
- Calder, D.R. 1971. Hydroids and hydromedusae of southern Chesapeake bay. Virginia Institute of Marine Science. *Special Papers in Marine Science number*, 1: 125 p.
- Campos, E.J.D., Piola, A.R., Miller, J.L. 1999. Water mass distribution on the shelf and shelf-break upwelling in the southeast Brazil bight. 10th Symposium on Global Change Studies, Dallas.

- Capurro, L.R.A. 1981. Características físicas del Atlántico Sudoccidental. pp. 219–225. In: Boltovskoy D. (ed.), Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata.
- Carnaval, A.C., Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 35: 1187–1201.
- Chiaverano, L., Mianzan, H., Ramírez, F. 2004. Gonad development and somatic growth patterns of *Olindias sambaquiensis* (Limnomedusae, Olindiidae). *Hydrobiologia*, 530/531: 373–381.
- Clapperton, C.M. 1991. Influence of tectonics on the extent of quaternary glaciation in the Andes. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 89–108.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.
- Cunningham, C., Buss, L.W. 1993. Molecular evidence for multiple episodes of paedomorphosis in the family Hydractiniidae. *Biochemical Systematic Ecology*, 21: 57–69.
- Daly Yahia, M.N., Goy, J., Daly Yahia-Kéfi, O. 2003. Distribution and ecology of medusae and scyphomedusae (Cnidaria) in Tunis Gulf (SW-Mediterranean). *Oceanologica Acta*, 26: 645–655.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., Wilson, A. 2010. Geneious v5.5.7, <http://www.geneious.com>, data de último acesso: 15 de março de 2012.
- Emilson, I. 1961. The shelf and coastal waters off southern Brazil. *Boletim do Instituto de Oceanografia de São Paulo*, 11: 101–112.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47–50.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*, 131: 479–491.
- Eyre-Walker, A. 2006. Size does not matter for mitochondrial DNA. *Science*, 312: 537–538.

- Fisher, R.A. 1922. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society*, 85: 87–94.
- 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. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Funk, D.J., Omland, K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics*, 34: 397–423.
- Gersonde, R., Abelmann, A., Brathauer, U., Becquey, S., Bianchi, C., Cortese, G., Grobe, H., Kuhn, G., Niebler, H.-S., Segl, M., Sieger, R., Zielinski, U., Fütterer, D.K. 2003. Last glacial sea surface temperatures and sea-ice extent in the Southern Ocean (Atlantic-Indian sector): a multiproxy approach. *Paleoceanography*, 18: 1061.
- Govindarajan, A.F., Halanych, K.M., Cunningham, C.W. 2005. Mitochondrial evolution and phylogeography in the hydrozoan *Obelia geniculata* (Cnidaria). *Marine Biology*, 146: 213–222.
- Guindon, S., Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696–704.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160–174.
- Hastenrath, S. 1991. A review of glacier variations in the tropics: The past 500,000 years. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 71–73.
- Hellberg, M.E., Burton, R.S., Neigel, J.E., Palumbi, S.R. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*, 70: 273–290.
- Hey, J. 2010. Isolation with migration models for more than two populations. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 905–920.
- Hilbish, T.J., Koehn, R.K. 1985. The physiological basis of natural selection at the *Lap* locus. *Evolution*, 39: 1302–1317.
- Ho S.Y., Phillips M.J., Cooper A., Drummond A.J., 2005. Time dependency of

- molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1561–1568.
- Hudson, R.R., Kaplan, N.L. 1985. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA-sequences. *Genetics*, 111: 147–164.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., Miyata, T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33: 511–518.
- Koehn, R.K., Newell, R.I.E., Immermann, F. 1980. Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proceedings of the Natural Academy of Science*, 77: 5385–5389.
- Lambeck, K., Esat, T.M., Potter, E.-K. 2002. Links between climate and sea levels for the past three million years. *Nature*, 419: 199–206.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Lucas, A.J., Guerrero, R.A., Mianzan, H.W., Acha, E.M., Lasta, C.A. 2005. Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine continental shelf (34–43°S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65: 405–420.
- Martin, L., Flexor, J.M., Suguio, K. 1991. Possible changes in the Holocene wind pattern recorded on southeastern Brazilian coast. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 117–131.
- Matsuura, Y. 1986. Contribuição ao estudo da estrutura oceanográfica da região sudeste entre Cabo Frio (RJ) e Cabo de Santa Marta Grande (SC). *Ciência e Cultura*, 38: 1439–1450.
- McDonald, J.H., Kreitman, M. 1991. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature*, 351: 652–654.
- Mianzan, H., Lasta, C., Acha, E., Guerrero, R., Macchi, G., Bremec, C. 2001. The Rio de La Plata Estuary, Argentina-Uruguay. *Ecological Studies* 144: 185–204.
- Mianzan, H.W., Zamponi, M.O. 1988. Estudio bioecológico de *Olindias sambaquiensis* Müller, 1861 (Limnomedusae, Olindiidae) en el área de Monte Hermoso. II. Factores meteorológicos que influyen en su aparición. *Iheringia* 2: 63–68.
- Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49: 718–726.

- Mörner, N.A. 1991a. The Patagonian glaciations and the onset of general quaternary-type glaciations on the globe. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 109–115.
- Mörner, N.A. 1991b. Holocene sea level changes in the Tierra del Fuego region. *Boletim do Instituto de Geologia da USP*, 8: 133–151.
- Mulligan, C.J., Kitchen, A., Miyamoto, M.M. 2006. Comment on “Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals”. *Science*, 314: 1390.
- Niebler, H.-S., Arz, H.W., Donner, B., Mulitza, S., Pätzold, J., Wefer, G. 2003. Sea surface temperatures in the equatorial and South Atlantic Ocean during the Last Glacial Maximum (23–19 ka). *Paleoceanography*, 18: 1069.
- Palma, S., Apablaza, P., Silva, N. 2007. Hydromedusae (Cnidaria) of the Chilean southern channels (from the Corcovado Gulf to the Pulluche-Chacabuco Channels). *Scientia Marina*, 71: 65–74.
- Palumbi, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27: 547–572.
- Paternello, T., Volckaert, F.A.M.J., Castilho, R. 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic–Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, 16: 4426–4444.
- Piola, A.R., Matano, R.P., Palma, E.D., Möller Jr., O.O., Campos, E.J.D. 2005. The influence of the Plata River discharge on the western south Atlantic shelf. *Geophysical Research Letters*, 32: L01603.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256.
- Rambaut, A., Drummond, A.J. 2007. Tracer v1.4, <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>, data do último acesso: 10 de março de 2012.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2092–2100.
- Rogers, A.R., Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.
- Schroth, W., Jarms, G., Streit, B., Schierwater, B. 2002. Speciation and

- phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology*, 2: 1–10.
- Tajima, F. 1989 Statistical-Method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Tronolone, V.B., 2007. Estudo faunístico e da distribuição das hidromedusas (Cnidária, Hydrozoa) da região compreendida entre Cabo Frio (RJ) e Cabo de Santa Marta Grande (SC), Brasil. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 209p.
- Ueno, S., Mitsutani, A. 1994. Small-scale swarm of a hydrozoan medusa *Liriope tetraphylla* in Hiroshima Bay, the Inland Sea of Japan. *Bulletin of the Plankton Society of Japan*, 41: 93–104.
- Vannucci, M. 1951. Distribuição dos Hydrozoa até agora conhecidos nas costas do Brasil. *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo*, 2: 105–124.
- Wares, J.P., Barber, P.H., Ross-Ibarra, J., Sotka, E.E., Toonen, R.J. 2006. Mitochondrial DNA and population size. *Science*, 314: 1388–1389.
- Wares, J.P., Cunningham, C.W. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 55: 2455–2469.
- Weill, R. 1936. Existence de larves polypoïdes dans le cycle de la Trachyméduse *Olindias phosphorica* Della Chiaje. *C.r. hebd. séanc. Acad. Sci., Paris*, 203: 1018–1020.
- Zamponi, M.O., Facal, O.N. 1987. Estudio bioecológico de *Olindias sambaquiensis* Müller, 1861 (Limnomedusae; Olindiidae) en el área de Monte Hermoso. I. Ciclo de vida. *Neotropica* 33: 119–126.

Capítulo IV

Early Pleistocene divergence in *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Medusozoa) between Atlantic and Mediterranean populations

Resumo

Inferências filogeográficas têm sido utilizadas para elucidar o tempo de origem e as afinidades históricas de táxons e áreas geográficas. No entanto, o tempo de origem de algumas linhagens é elusivo, devido à falta de taxas de substituição calibradas. Este é o caso para a detecção de dois clados mitocondriais reciprocamente monofiléticos (Clado I e Clado II) que sugerem uma divergência, seguida de fluxo gênico, entre populações do Atlântico e do Mediterrâneo (Atl-Med) de *Pelagia noctiluca*. Os dois principais eventos biogeográficos relacionados ao isolamento Atl-Med, afetando a conexão entre as duas bacias, são as glaciações do hemisfério norte (GHN) (começando há ca. 3,2 milhões de anos atrás) e a crise salina do Messiniano (CSM) (terminando há ca. 5,5 milhões de anos atrás). Neste estudo, foi avaliado se o tempo de separação entre os Clados I e II estaria associado às GHN ou à CSM. Utilizou-se a data do surgimento do istmo do Panamá para calibrar as taxas de substituição. A calibração foi baseada na detecção de uma estrutura genética significativa, acompanhada de uma divergência filogenética rasa entre populações do Pacífico e do Atl de *P. noctiluca* (com base nos marcadores 16S, COI e ITS1). Considerando a presente calibração para COI, os dados refutaram uma possível origem dos clados I e II durante a CSM. Alternativamente, a presente estimativa alocou entre 2,4-2,2 Ma a origem de um suposto ancestral comum dos Clados I e II. Estas datas correspondem ao Pleistoceno recente (Gelasiano), quando alterações ambientais em grande escala foram provocadas pelo início das GHN. Essas alterações ambientais incluíram mudanças do nível do mar e das correntes oceânicas na região do Estreito de Gibraltar, o que poderia explicar a origem dos dois clados mitocondriais de populações de *P. noctiluca* do Atl-Med.

Abstract

Phylogeographic inferences have been used to elucidate the time of origin and the historical affinities of taxa and geographical areas. However, the time of origin of some species lineages is elusive, as a result of the lack of calibrated substitution rates. This is the case for the detection of two reciprocally monophyletic mitochondrial clades (Clade I and Clade II) that suggest a past splitting, followed by gene flow, between Atlantic and Mediterranean (Atl-Med) populations of *Pelagia noctiluca*. The two main biogeographic events mostly related to the Atl-Med isolation, by affecting the water connection between both basins, are the North Hemisphere Glaciations (NHG) (starting ca. 3.2 Mya) and the Messinian Salinity Crisis (MSC) (ending ca. 5.5 Mya). We assessed if the splitting time between Clade I and Clade II is associated to the NHG or to the MSC. We used the rise of the Isthmus of Panama as a proxy to calibrate substitution rates. The calibration was based on the detection of a significant but shallow genetic structure between *P. noctiluca* from Pacific and Atl populations (based on 16S, COI and ITS1 markers). Considering our calibration for COI, our data likely refute a possible origin of Clades I and II during the MSC. Alternatively, our estimate placed the origin for a putative common ancestor of Clades I and II at 2.4-2.2 Ma. These dates correspond to the Gelasian stage of the early Pleistocene, when large-scale environmental alterations were triggered by the onset of the NHG. These environmental alterations included changes of sea level and oceanic currents at the Strait of Gibraltar region that could explain the origin of the two mitochondrial clades of *P. noctiluca* in the Atl-Med.

Introduction

Integrative approaches help unravel the diversification of marine biota. In this context, phylogeographic inferences have been used to get a better understanding of the time of origin and historical affinities of taxa and geographical areas (Avice, 2009). However, the time of origin of some lineages is elusive because of the lack of calibrated substitution rates. Therefore, previous phylogeographic studies on scyphozoan jellyfishes did not estimate dates of evolutionary events (Dawson & Jacobs, 2001; Schroth *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2004; Dawson *et al.*, 2005). Thus, the phylogeographic patterns of these taxa still have raised questions about when their populations split.

A phylogeographic study for *P. noctiluca* has shown two reciprocally monophyletic mitochondrial clades (Clade I and Clade II), and this phylogenetic pattern has suggested a past splitting, followed by gene flow, between Atlantic and Mediterranean (Atl-Med) populations (Stopar *et al.*, 2010). In fact, biogeographic events that temporarily isolated Atl-Med populations by affecting water connections between both basins have long been proposed to explain phylogeographic patterns (see Paternello *et al.*, 2007). The two main events mostly related to this isolation are the Northern Hemisphere Glaciations (NHG) that lasted from the Late Pliocene (*ca.* 3.2 Mya) until the Pleistocene, and the Messinian Salinity Crisis (MSC) of the Late Miocene, which ended approximately at 5.5 Mya. However, the dating of separation between Clades I and II was not possible due to lack of reliable calibrated substitution rates for scyphozoans. Therefore, it remains elusive whether some biogeographic event or the intraspecific coalescence of the haplotypes produced this structure.

Although substitution rates may be calibrated by using fossil data, reliable medusozoan fossil records date from the Mid-Cambrian to the Jurassic, and more recent medusozoan fossils to calibrate evolutionary rates for phylogeographic studies are absent (*cf.* Young & Hagadorn, 2010). Alternatively, we adopted a geological event as a landmark to calibrate evolutionary rates. This event is the closure of the Central American Seaway (CAS) due to the rise of the Isthmus of Panama (IP), which has long been employed to calibrate evolutionary rates (*e.g.*, Lessios, 1979; Vawter *et al.*, 1980; Bermingham & Lessios, 1993; McCartney *et al.*, 2000).

Therefore, the goal of this study is to assess the time of origin of Clades I and II of *P. noctiluca* from Atl-Med populations in relation to NHG and MSC. We used mitochondrial (16S, COI) and nuclear (ITS1) DNA sequences. We also included new

data from a population of the Pacific coast of Central America that allowed us to use the closure of the CAS as a proxy to calibrate the substitution rate for COI.

Material and methods

Sampling, amplification and sequence analysis

Fifteen ephyrae from the Pacific Ocean shore of Costa Rica (PO) (Figure 1) were collected with a 200 µm mesh plankton net. The ephyrae were preserved in absolute ethanol and then stored at -20 °C. Genomic DNA was extracted from individual ephyrae (<2 mm in diameter) using Instagene (Bio-Rad). Identification of ephyrae as *P. noctiluca* was confirmed by microscopic observation of morphological traits and also by molecular identification using Bayesian Inference for sequences of the mitochondrial ribosomal gene 16S. Species used for comparisons in molecular analysis are shown in Appendix A. Primers from Cunningham & Buss (1993), Folmer *et al.* (1994) and Schroth *et al.* (2002) were used for amplification of 16S, COI and ITS1 gene fragments, respectively. Amplification was performed in a total volume of 25 µl using Illustra PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare). DNA fragments were amplified in 35 cycles, at annealing temperatures of 56°C for 42 s for 16S and 48°C for 60 s for COI and ITS1. PCR products were cleaned up with the Illustra™ GFX™ column kit (GE Healthcare). Products were sequenced in both directions using the Big Dye® Terminator v3.1 reagent (Applied Biosystems) with the same primer pairs as the first amplification and then were read in an ABI PRISM® 3100 (Hitachi) sequencer. Contigs were assembled and edited using CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). The identity of the sequences was checked by BLAST searches in GenBank. The sequences were deposited in GenBank (see accession numbers in Appendix A).

Sequences from PO were aligned with other sequences of *P. noctiluca* available from GenBank (Table 1, Figure 1). Sequences from Sargasso Sea (SS) and Georges Basin (GB), North West Atlantic (NWA) were taken from Ortman *et al.* (2010). Sequences from North East Atlantic (NEA), Azores (AZ), Western Mediterranean (WM), North Adriatic (NA) and South Adriatic (SA) were taken from Stopar *et al.* (2010).

Sequences were aligned using CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), resulting in gapless alignments. The correctness of the nucleic acid alignment of COI sequences was verified at the amino acid level, using the mitochondrial genetic code

of invertebrates available in the software Geneious v5.5.7 (Drummond *et al.* 2011).

Figure 1. Geographic location of samples of *Pelagia noctiluca* used in the study. The abbreviations for geographic regions are: NA, North Adriatic; SA, South Adriatic; WM, Western Mediterranean; AZ, Azores; NEA, Northeast Atlantic; GB, Georges Basin; SS, Sargasso Sea; PO, Pacific Ocean.

Table 1. Number of sequences analyzed for the mitochondrial COI and the nuclear ITS1 from *Pelagia noctiluca*, for each geographic region: Pacific Ocean of Costa Rica (PO); Northwestern Atlantic Ocean (NW); Northeastern Atlantic Ocean (NE); Atlantic Ocean/Azores (AZ); Western Mediterranean Sea (WM); South Adriatic Sea (SA); North Adriatic Sea (NA).

	PO	NWA*	NEA**	AZ**	WM**	SA**	NA**
COI	15	4	18	20	43	23	40
ITS1	9	-	17	13	20	13	35

* Sequences from Ortman *et al.*, 2010

** Sequences from Stopar *et al.*, 2010

Phylogenetic analyses

Analyses were conducted separately using unique haplotypes, 122 of COI (655 bp) and 18 of ITS1 (391 bp), including respective outgroups (Appendix A). Alignments between ingroup and outgroup sequences were generated using MAFFT (Kato & Kuma, 2002). Phylogenetic analyses using Bayesian inference (BI) were carried out with MrBayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Prior to tree searches, the optimal substitution model was selected by likelihood analyses in ModelTest 0.1.1

(Posada & Crandall 1998). The best models under the Akaike information criterion (Akaike, 1973) were GTR+G for 16S, TPM1uf+I=G for COI and TPM1uf+G for ITS1. Markov chain Monte Carlo (MCMC) searches were run with four chains of 1×10^6 generations for ITS1 or 1.5×10^6 for 16S and 2×10^6 generations for COI, and each sampled every 100 generations in all cases. Two runs were performed for each of the three analyses. The stationarity of likelihood values was checked using TRACER 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007). Majority rule consensus trees (50%) were calculated over the two runs for each marker, after discarding the first 10% samples as 'burn in'. The remaining trees were used to calculate posterior probabilities (pp) of the clades.

Population genetic analyses

The final dataset for population genetic analyses of *P. noctiluca* consisted of 163 sequences for COI and 141 sequences for ITS1. Analyses of population structure were independently performed on COI and ITS1 datasets.

Nucleotide diversity (π) and haplotype diversity (h) were estimated using DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). Past demographic expansions were investigated by applying the combination of neutrality tests: Tajima's D (Tajima, 1989), Fu's F_s (Fu, 1997), and R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Mismatch distributions were generated in DnaSP to search for demographic signatures of population size changes (Rogers & Harpending, 1992).

Parsimony haplotype networks using the program TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) were inferred for COI and ITS1 to visualize the relationships between populations.

Genetic differentiation among localities and phylogroups recognized by phylogenetic analyses were calculated by pairwise F_{ST} values, and genetic structure in relation with geographical areas and phylogroups was examined by AMOVA. Both analyses were tested for significance using 10,000 permutations in ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Splitting time and divergence time calculations

Coalescent simulations were used to estimate demographic and genetic parameters using the program IMA2 (Hey, 2010) with the same data set of COI sequences used for population genetic analyses. Genealogies were simulated and

updated along an MCMC with Metropolis coupling. Upper bounds of parameter priors on maximum population size and maximum splitting times were set using the Watterson estimator of θ of the group with the highest value for this parameter. No migration was considered for PO/Atl splitting time calculations, as no migration is expected after the final closure of the CAS. The substitution model of Hasegawa-Kishino-Yano (1985) and an inheritance scalar of 0.25 were used. Stationarity was examined by parameter trendline plots. After a burnin period of 1×10^6 generations, population parameter values were subsequently recorded every 100 generations in a total run of 2×10^6 steps. Independence of samples collected along a chain was assessed via their autocorrelation statistics, and runs were continued until the effective sample size exceeded 100 for all parameters. To assess convergence upon the true stationary distribution, independent runs using different random number seeds were conducted. The higher probability values along with maximum and minimum values for the splitting time were obtained from the 95% confidence interval (CI) distributions of the genealogies sampled. In this way, the most probable PO/Atl splitting time was obtained as a compound value $t = t_{\mu}$ (t is the time since splitting expressed in generations and μ the mutation rate per year for the locus). A generation time of one year was assumed for *P. noctiluca* (Rottini Sandrini & Avian, 1991). The most probable value of μ for COI was deduced from the final splitting time of 3 or 2.7 Ma which are proposed dates for the closure of the IP (Keigwin, 1982; Duque-Caro, 1990; Coates & Obando, 1996; Bartoli *et al.*, 2005). The divergence time between Clade I and Clade II was accessed using the calibrated μ for COI and the genetic divergence between these clades. The validity of the molecular clock was tested by a likelihood ratio test between the clock model vs. the model without clock, using the programs Dnaml and Dnmlk from PHYLIP package v.3.69 (Felsenstein, 1989). Time (T) to the most recent common ancestor of Clades I and II was calculated from $d_{xy} = 2\mu T$ (μ is the mutation rate per year and d_{xy} is the genetic distance between species). With this formula we inferred T given our estimated substitution rate for COI. Maximum likelihood analyses with the F84 model with estimated gamma distribution were used for d_{xy} calculations in Dnadist software. The results were visualized in a NJ tree using the software Neighbor (PHYLIP package v.3.69).

Results

Estimated genetic diversity of ITS1 is lower than COI for the Pacific Ocean

(PO) population, but for both markers neutrality tests and mismatch distributions agree with a population expansion (Table 2, Figure 2). Hitchhiking effects resulting from positive selection would give similar demographic signals, but Tajima's D is less or non significant when compared with F_s and R_2 tests, the latter two tests being more sensitive to population growth (Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

Table 2. Genetic diversity indexes and test of neutrality for COI and ITS1 from *Pelagia noctiluca* (Pacific Ocean, Costa Rica).

Marker	Bp	# of specimens	# haplotypes	Haplotype diversity h (var.)	Nucleotide Diversity π (var.)	Θ_s	Tajima's D	Fu's F_s	R_2
COI	655	15	14	0.99 (0.001)	0.9 (0.14)	0.016	-1,855*	-7.696**	0.000**
ITS1	391	9	6	0.58 (0.034)	0.2 (0.08)	0.003	-0.936	-1.417*	0.153*

* Indicates significant results: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Figure 2. Mismatch distribution for the sets of sequences of COI and ITS1 for *Pelagia noctiluca* from the Pacific Ocean population. The solid line represents the expected distribution under a population growth and decline model; the dashed line represents the observed distribution.

Parsimony haplotype network showed no geographic structure for ITS1. Four out of nine sequences from PO represent a single haplotype that is also shared with Atl-Med (Figure 3). For COI, PO haplotypes formed a single clade separated from Clades I and II, which are composed of Atl-Med sequences (Figure 4). Bayesian analysis of ITS1 resulted in no population structure (data not shown). The same analysis for COI resulted in a star-like phylogeny without clear phylogenetic relationships among populations, but depicting the PO haplotypes in a paraphyletic position in relation with the reciprocally monophyletic arrangement between Clade I and Clade II (Figure 5).

Figure 3. Parsimony haplotype network of ITS1 for *Pelagia noctiluca*. Figure 4. Parsimony haplotype network of COI for *Pelagia noctiluca*. PO: Pacific Ocean

Genetic structure was detected under different grouping strategies for separate AMOVA analyses of COI and ITS1 (Table 3). There was an important proportion of genetic differentiation between PO/Atl-Med for COI (more than 60%, fixation index=0.63, Table 3), but it is not statistically significant ($p>0.05$), probably due to the similar, but significant, within population variation for the Atl-Med group (fixation index=0.64, $p<0.05$). Furthermore, the high fixation index within the group consisting of Clade I+Clade II is higher than the same index between the groups PO/Clade I+Clade II.

Pairwise F_{ST} comparisons of COI and ITS1 for PO and Atl-Med, either arranged by clades or by localities, resulted in significant differences (Tables 4 & 5). Comparing the localities, PO is the only one with significant differences from all the rest ($p<0.01$ for COI and $p<0.05$ for ITS1, Table 4). Haplotypes of COI from PO also show significant genetic difference compared with Clade I and Clade II, but the genetic distance between Clade I and Clade II is the highest (Table 5). In summary, there is significant genetic structure but shallow divergence between PO and Atl-Med.

The assumption of a molecular clock for the divergence between Clades I and II was not rejected; the log-likelihood of the more complex model (without clock) was not significantly increased with respect to the simpler model ($P > 0.05$). Estimates of substitution rates for COI were 0.005 and 0.006 changes/site/Myr, using calibration dates of 3 or 2.7 Ma respectively (Table 6, Figure 6). The application of these substitution rates for COI to the genetic distance between Clades I and II (0.025 substitutions per site) resulted in a estimated date for the divergence between these clades of ~2.2 and 2.45 Ma, respectively (Figure 6). These dates placed the existence of the common ancestor of the two clades at the Gelasian stage of the Pleistocene (Figure 7).

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) for alternative groupings of geographic regions and phylogroups for *Pelagia noctiluca*.

Group	Source of variation	Locus	df.	Sum of squares	Variance components	% of variation	Fixation index
1 group: all together {PO,AZ,NEA,WM,SA,NA}	Among populations	COI	5	204.9	1.456	28.27	0.28*
		ITS1	5	2.284	0.007	2.15	0.023
	Within populations	COI	153	565.3	3.695	71.73	
		ITS1	101	33.557	0.332	97.85	
	Total	COI	158	770.2	5.151		
		ITS1	106	35.841	0.340		
3 groups: Pacific, Atl., Med. {PO} {AZ,NEA} {WM,SA,NA}	Among populations	COI	2	184.6	2.221	36.89	0.369*
		ITS1	2	1.584	0.020	5.66	0.057*
	Among populations within groups	COI	3	20.3	0.106	1.75	0.023*
		ITS1	3	0.7	-0.005	-1.52	-0.016
	Within populations	COI	153	565.3	3.695	61.36	0.386*
		ITS1	1	33.557	0.332	95.86	0.041
2 Groups: Pacific, Atl.+Med. {PO} {AZ,NEA,WM,SA,NA}	Total	COI	158	770.2	6.021		
		ITS1	106	35.841	0.347		
	Among groups	COI	1	181.967	6.517	63.36	0.634
		ITS1	1	1.257	0.059	15.31	0.153
	Among populations within groups	COI	4	22.921	0.073	0.71	0.019
		ITS1	4	1.017	-0.004	-1.07	-0.013
3 Phylogroups {PO} {Clade I} {Clade II}	Within populations	COI	153	565.326	3.695	35.93	0.641*
		ITS1	101	33.557	0.332	85.77	0.142
	Total	COI	158	770.2	10.285		
		ITS1	106	35.841	0.387		
	Among groups	COI	2	380.495	8.167	75.28	0.753*
		COI	114	305.676	2.681	24.72	
2 Phylogroups {PO} {Clade I+Clade II}	Total		119	686.171	10.849		
	Among groups	COI	1	156.302	-2.805	-29.09	-0.291
		COI	1	224.193	9.764	101.28	0.785*
	Among populations within groups	COI	114	305.676	2.681	27.81	0.722*
		COI	114	305.676	2.681	27.81	0.722*
Total			119	686.171	10.849		

* Indicates significant differentiation, $p < 0.05$ (10000 permutations of significant test). d.f.: degree of freedom. Codes for populations are: PO: Central-West Pacific Ocean, AZ: Azores, NEA: Northeast Atlantic, WM: Western Mediterranean, SA: South Adriatic, North Adriatic.

Table 4. Pairwise F_{ST} values between geographic regions based on 10,000 permutations for *Pelagia noctiluca*.

	PO	WM	AZ	NEA	SA	NA
PO	-	0.07707*	0.06674*	0.13337*	0.07889*	0.12964*
WM	0.62331**	-	-0.00247	-0.00216	-0.01179	0.00203
AZ	0.64840**	-0.02256	-	-0.02791	-0.02107	-0.02659
NEA	0.67837**	0.01618	0.00973	-	0.01539	-0.00403
SA	0.54941**	-0.00285	-0.01144	0.04175	-	-0.02026
NA	0.74654**	0.02512	0.01744	0.01829	0.08725*	-

Asterisks indicate significant differentiation, 10,000 permutations of significant test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Population pairwise F_{ST} for COI below diagonal, for ITS1 above diagonal.

Significant differentiation for COI between NA and SA were already discussed by Stopar *et al.* (2010).

Table 5. Pairwise F_{ST} values (below diagonal) and average number of pairwise differences (above diagonal) for COI phylogroups based on 10,000 permutations for *Pelagia noctiluca*.

	PO	Clade I	Clade II
PO	-	19.89438*	23.83077*
CladeI	0.70718*	-	24.12360*
CladeII	0.74012*	0.79724*	-

*Indicates significant differentiation, $p < 0.01$ (10,000 permutations of significant test)

Table 6. Substitution rates for COI and for other mitochondrial markers calculated for different species.

Taxa	Vicariant event	Age (Ma)	Molecular marker	Reciprocal monophyly	Divergence estimation methods	Rate (changes/site/Myr)	Reference
<i>Alpheus</i> mangrove shrimps	Rise of Panama Isthmus	3.0	COI	yes	Maximum likelihood corrected % of sequence divergence	0.007	Knowlton & Weigt, 1998
<i>Echinometra</i> sea urchins	Rise of Panama Isthmus	3.1	COI	yes	Kimura two parameters average pairwise divergences	0.018	McCartney <i>et al.</i> , 2000
<i>Obelia geniculata</i> cnidarian hydrozoan	Opening of Bering Strait	3.1	COI	yes	Branch length of a maximum likelihood phylogeny	0.007	Govindarajan <i>et al.</i> , 2005
<i>Galaxias divergens</i> freshwater fish	New Zealand Southern Alps	2.0–5.0	Cyt b and control region	yes	Bayesian calculation over coalescent genealogies	0.011	Burridge <i>et al.</i> , 2008
<i>Gobiomorphus breviceps</i> freshwater fish	New Zealand Southern Alps	2.0–5.0	Cyt b and control region	yes	Bayesian calculation over coalescent genealogies	0.008	Burridge <i>et al.</i> , 2008
<i>Pelagia noctiluca</i> cnidarian scyphozoan	Rise of Panama Isthmus	2.7–3.0	COI	no	Bayesian calculation over coalescent genealogies	0.006–0.005*	This work

* Minimum and maximum posterior probability values for substitution rates, 95% confidence intervals, for 0.006: (0.003-0.009) and for 0.005: (0.002-0.008).

Figure 6. Estimate of calibrated substitution rates for COI and dating of the divergence between Clades I and II (see Figure 5) of *Pelagia noctiluca*. A) Coalescent estimation of splitting time ($t=\mu$) between Pacific and Atlantic populations; the most likely value of t is inside the white box. B) Coalescent times were used to estimate substitution rates (μ) for COI (My = million years) using the alternative dates (t) of 2.7 and 3.0 million years ago (Ma) for the closure of the Isthmus of Panama; the values of μ obtained by using the most likely value of t are inside the white box. C) Genetic distance ($2\mu T$) between Clades I and II was obtained by maximum likelihood estimation under the F84 model, and was used to date the time of separation (T) between Clades I and II by applying the substitution rates estimated for COI.

Figure 7. Possible dates for the divergence between Clades I and II of *Pelagia noctiluca* from the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. Dates are contained in the Gelasian Age of the Early Pleistocene (white box). Relevant geological events (vertical grey bars) are represented over the time line, following information published by Krijgsman *et al.*, 1999; Gilbert *et al.*, 2003; Bartoli *et al.* 2005; Molnar, 2008 and Govers, 2009 (IP: Isthmus of Panama, CAS: Central American Seaway). Dating was conducted using a calibrated substitution rate for COI (see Figure 6). Alternative calibrations by dates of 3 or 2.7 Ma for the rise of the IP result in divergences between Clades I and II at ~2.4 Ma (black circle) or ~2.2 Ma (open circle), respectively. Marks at the end of the dashed lines represent possible minimum and maximum dates, corresponding to the highest and lowest values at the 95% confidence interval for the posterior probability of the substitution rates (see Figure 6).

Discussion

We obtained a calibrated substitution rate for COI that allowed us to estimate an early Pleistocene Atl-Med divergence in *P. noctiluca*. The calibration was based on the shallow but significant phylogeographic structure between *P. noctiluca* from PO and all the other Atl-Med populations. Such phylogeographic structure justified our coalescent calculation of population splitting time to obtain substitution rates using geological events for calibration (*cf.* other estimates by Waters *et al.*, 2007; BurrIDGE *et al.*, 2008).

Pelagia noctiluca is frequently observed in the Mediterranean Sea (Goy *et al.*, 1989; Kogovšek *et al.*, 2009), as is reflected in the differences in distribution and sample sizes of our data. Nevertheless, despite differences in sample size, the PO population showed genetic diversity indices and genetic features of population expansion that are comparable to those reported by Stopar *et al.* (2010) for Atl-Med populations. Our comparisons also detected the same phylogeographic structure for Clade I and II as previously reported by Stopar *et al.* (2010), with the addition that the newly analyzed sequences of NWA nested in Clade I. Therefore, Clade II remains mostly composed by Mediterranean haplotypes, corroborating its possible Mediterranean origin.

The study of congeneric trans-isthmian species that differ in rates of genetic divergence across the same geographic barrier can serve as a model to explore the usefulness of geological events for calibration of molecular evolution (Knowlton & Weigh, 1998; Marko, 2002; Hurt *et al.*, 2009). Unfortunately, *P. noctiluca* has no available trans-isthmian congeners. Our calibration point, however, is also based on independent evidence. The shallow phylogeographic structure between PO and Atl-Med for *P. noctiluca* contrasts, for example, with highly structured trans-isthmian samples of the hydromedusan *L. tetraphylla*, another holoplanktonic species tolerant of different environmental conditions (E. Ale and A. Marques, unpublished data). This phylogeographic pattern also contrasts with COI and ITS1 analyses of other scyphozoans distributed over a more restricted geographic range (Atlantic-Mediterranean) (Dawson & Jacobs, 2001; Schroth *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2004). A recent divergence between PO/Atl-Med populations of *P. noctiluca* would be the most parsimonious explanation for this pattern. Additionally, considering that the connection across the Strait of Gibraltar is wide enough to prevent isolation between Atl-Med populations of *P. noctiluca* (Stopar *et al.*, 2010), we suggest that only a complete closure of the water connection across the CAS could effectively isolate Pacific and Atlantic populations.

The rise of the IP is the most recent geological event related to the closure of the CAS, therefore suitable for our calibration. The exact time of the final closure of the CAS is controversial (see Molnar, 2008 for a discussion on the subject). Paleooceanographic evidence suggests a gradual process starting 4.5-4 Ma, with a shallow water connection between the Pacific and the Atlantic Oceans extending up ~3.0 or 2.7 Ma (Bartoli *et al.*, 2005; Molnar, 2008). Therefore, we used these alternative estimated dates for the closure of the IP for calibrations. Slight differences in these dates, due to the uncertainties associated to any geological date, will not substantially change the estimated time of separation of the two COI clades.

Mediterranean and Atlantic basins were isolated from each other several times in the past. The MSC (6-5.5 Ma) was the most important example for this kind of event (Krijgsman *et al.*, 1999; Govers, 2009), and it is frequently associated with the origin of the Mediterranean fauna (Fredj *et al.*, 1992; Blondel *et al.*, 2010). However, our estimate refutes a possible origin of Clades I and II during the MSC crisis, since the likely time of origin for a putative common ancestor of Clades I and II was 2.4-2.2 Ma (Figures 6 & 7). This time corresponds to the Gelasian stage of the early

Pleistocene, when important climatic and oceanic changes occurred (Bartoli *et al.*, 2005; Molnar, 2008). Large-scale environmental alterations during the Gelasian included the onset of the NHG with variations of sea level and changes of oceanic currents, including those of the Strait of Gibraltar region (Gilbert *et al.*, 2003). This barrier would explain the origin of two clades of *P. noctiluca* in the Atl-Med.

The hypothesis of an origin of Clades I and II during the MSC demands extremely low mutation rates, even lower than the minimum bound of the 95% CI of our estimated substitution rate (Figure 7). Slow substitution rates were inferred for anthozoans (Shearer *et al.*, 2002; France & Hoover, 2002; Hebert *et al.*, 2003), but COI evolution in medusozoans is faster than in anthozoans, similar to other metazoans (Huang *et al.*, 2008; Ortman *et al.*, 2010). The rates estimated for COI are slightly lower but comparable with those obtained for different metazoan species for COI and for other mitochondrial genes using different methodologies and similar vicariance dates for calibration (Table 6 and references therein). In addition, faster substitution rates imply more recent dates than those we have obtained for the origin of Clades I and II. Faster rates can be obtained when calibrations are made over pedigrees or population splitting processes of less than 1 to 2 Ma, rather than over phylogenetic, more ancient, divergences (Waters *et al.*, 2007; BurrIDGE *et al.*, 2008), namely the ‘time dependency of substitution rates’ (Ho *et al.*, 2005). Time-dependency effects seem not to be an issue for our calculations, since our calibration and hypotheses are on time scales that are not as different as pedigree versus phylogenetic time-scales. Moreover, our calculated mutation rate for COI seems to be conservative enough in light of its 95% CI (Table 6 and Figure 7).

A putative biogeographical separation between Atl and Med biotas is controversial (Paternello *et al.*, 2007). Many species show phylogeographic patterns involving cladogenesis, genetic structure and population expansions between both basins, supposedly resulting from evolutionary processes that occurred during the Quaternary (Paternello *et al.*, 2007). However, there are counter-examples of lack of genetic structure, contrasting phylogeographic patterns between closely related species with similar population dynamics and life histories, and lack of calibration of evolutionary rates that pose difficulties on the elucidations of a more detailed biogeographical history (see Paternello *et al.*, 2007 for a discussion on the subject). Our results for *P. noctiluca* agree with the Quaternary timeframe detected for most of the phylogeographic patterns for the Atl-Med biota (Paternello *et al.*, 2007).

Moreover, the estimated time of origin of Clades I and II coincides with the low sea levels at the Gelasian, favouring the terrestrial fauna interchange between Africa and Europe and the isolation of some marine populations of different species from Atl and Med basins (Gilbert *et al.*, 2003; Paternello *et al.* 2007). Further studies focusing on demographic patterns could test different evolutionary scenarios for complex phylogeographic patterns, like abrupt population expansions followed by isolation, or ancient divergences followed by introgression (Funk & Omland, 2003). Also, the substitution rates we have obtained for COI, a marker extensively used in marine phylogeography, may be useful priors for some of these future phylogeographic studies in scyphozoan species.

References

- Akaike, H. 1973. Information theory as an extension of the maximum-likelihood principle. In: Petrov, B.N., Csaki, F. (Eds.), Second International Symposium on Information Theory. Akademiai Kiado, Budapest, pp. 267–281.
- Avice, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3–15.
- Bartoli, G., Sarnthein, M., Weinelt, M., Erlenkeuser, H., Garbe-Schönberg, D., Lea, D.W. 2005. Final closure of Panama and the onset of northern hemisphere glaciation. *Earth and Planetary Science Letters*, 237: 33–44.
- Bermingham, E., Lessios, H.A. 1993. Rate variation of proteins and mitochondrial DNA evolution as revealed by sea urchins separated by the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 2734–2738.
- Blondel, J., Aronson, J., Bodiou, J-Y., Boeuf, G. 2010. The Mediterranean Region: Biological Diversity in Space and Time, 2nd Edition. New York: Oxford University Press. 401 p.
- Burridge, C.P., Craw, D., Fletcher, D., Waters, J.M. 2008. Geological Dates and Molecular Rates: Fish DNA Sheds Light on Time Dependency. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 624–633.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1660.
- Coates, A.G., Obando, J.A. 1996. The geologic evolution of the Central American isthmus. Pp. 21–56 in Jackson J.B.C., Budd A.F., Coates A.G., eds. Evolution and environment in tropical America. University of Chicago Press, Chicago.

- Cunningham, C., Buss, L.W. 1993. Molecular evidence for multiple episodes of pedomorphosis in the family Hydractiniidae. *Biochemical Systematic Ecology*, 21: 57–69.
- Dawson, M.N., Jacobs, D.K. 2001. Molecular Evidence for Cryptic Species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biological Bulletin*, 200: 92–96.
- Dawson, M.N., Gupta, A.S., England, M.H. 2005. Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analyses identify multiple introductions of cryptogenic species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 34: 11968–11973.
- Duque-Caro, H. 1990. Neogene stratigraphy, palaeoceanography, and palaeobiology in northwest South America and the evolution of the Panama seaway. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 77: 203–234.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., Wilson, A. 2010. Geneious v5.5.7, <http://www.geneious.com>, last access: march 15th 2012.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47–50.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5: 164–166.
- Folmer, O., Black, M., Hoch, W, Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.
- Fredj, G., Bellan-Santini, D., Meinardi, M. 1992. Etat des connaissances sur la faune marine méditerranéenne. *Bulletin de l'Institut Oceanographique de Monaco*, 9: 133–145.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Funk, D.J., Omland, K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Reviews, Ecology, Evolution, and Systematics*, 34: 397–423.

- France, S.C., Hoover, I.L. 2002. DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiology*, 471: 149–155.
- Gibert, J., Gibert, L., Iglesias, A. 2003. The Gibraltar Strait: A Pleistocene Door of Europe? *Human Evolution*, 18: 147–160.
- Goy, J., Dalot, S., Morand, P. 1989. Long term fluctuations of *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphomedusae) in the western Mediterranean Sea. *Deep Sea Research*, 36: 269–279.
- Govers, R. 2009. Choking the Mediterranean to dehydration: The Messinian salinity crisis. *Geology*, 37: 167–170.
- Govindarajan, A.F., Halanych, K.M., Cunningham, C.W. 2005. Mitochondrial evolution and phylogeography in the hydrozoan *Obelia geniculata* (Cnidaria). *Marine Biology*, 146: 213–222.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., de Waard, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*, 270: S96–S99, doi: 10.1098/rsbl.2003.0025 (accessed 3 March 2011).
- Hasegawa, M., Kishimo, H., Yano, T. 1985. Dating of human – ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 22: 160–174.
- Hey, J. 2010. Isolation with Migration Models for More Than Two Populations. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 905–920.
- Hey, J., Nielsen, R. 2004. Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics*, 167: 747–760.
- Ho, S.Y., Phillips, M.J., Cooper, A., Drummond, A.J. 2005. Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1561–1568.
- Holland, B.S., Dawson, M.N., Crow, G.L., Hofmann, D.K. 2004. Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Marine Biology*, 145: 1119–1128.
- Huang, D., Meier, R., Todd, P.A., Chou, L.M., 2008. Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for

- DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution*, 66: 167–74.
- Hurt, C., Anker, A., Knowlton, N. 2009. A multilocus test of simultaneous divergence across the Isthmus of Panama using snapping shrimp in the genus *Alpheus*. *Evolution*, 63: 514–530.
- Katoh, M., Kuma, M., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30: 3059–3066.
- Keigwin, L.D. 1982. Isotopic paleoceanography of the Caribbean and east Pacific: role of Panama uplift in late Neogene time. *Science*, 217: 350–352.
- Knowlton, N., Weigt, L.A. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society B*, 265: 2257–2263.
- Kogovšek, T., Bogunović, B., Malej, A., 2009. Recurrence of bloom-forming scyphomedusae: wavelet analysis of a 200 year time series. *Hydrobiologia*, 217: 81–96.
- Krijgsman, W., Hilgen, F.J., Raffi, I., Sierro, F.J., Wilson, D.S. 1999. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 400: 652–655.
- Lessios, H.A. 1979. Use of Panamanian sea urchins to test the molecular clock. *Nature*, 280: 599–601.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Marko, P.B. 2002. Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2005–2021.
- McCartney, M.A., Keller, G., Lessios, H.A. 2000. Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology*, 9: 1391–1400.
- Molnar, P. 2008. Closing of the Central American Seaway and the Ice Age: A critical review. *Paleoceanography*, 23: PA2201, doi:10.1029/2007PA001574 (accessed 20 February 2011).
- Ortman, B.D., Bucklin, A., Pages, F., Youngbluth, M. 2010. DNA Barcoding the Medusozoa using mtCOI. *Deep-Sea Research*, 57: 2148–2156.
- Paternello, T., Volckaert, F.A.M.J., Castilho, R. 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic–Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, 16: 4426–4444.

- Posada, D., Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817–818.
- Rambaut, A., Drummond, A.J. 2007. Tracer v1.5. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/> (accessed 23 April 2010).
- Ramos-Onsins, S., Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2092–2100.
- Rogers, A.R., Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.
- Rottini Sandrini, L., Avian, M. 1991. Reproduction of *Pelagia noctiluca* in the central and northern Adriatic. *Hydrobiologia*, 216: 197–202.
- Schroth W., Jarms, G., Streit, B., Schierwater, B. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology*, 2: 1–10.
- Shearer, T.L., Van Oppen, M.J.H., Romano, S.L., Wörheide, G. 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*, 11: 2475–2487.
- Stopar, K., Ramšak, A., Trontelj, P., Malej, A. 2010. Lack of Genetic Structure in the Jellyfish *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomeae) across European Seas. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 417–428.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680.
- Vawter, A.T., Rosenblatt, R.H., Gorman, G.C. 1980. Genetic divergence among fishes of eastern Pacific and Caribbean: Support for the molecular clock. *Evolution*, 34: 705–711.
- Waters, J.M., Rowe, D.L., Apte, S., King, T.M., Wallis, G.P., Anderson, L., Norris, R.J., Craw, D., Burrridge, C.P. 2007. Geological dates and molecular rates: Rapid divergence of rivers and their biotas. *Systematic Biology*, 56: 271–282.

Young, G.A., Hagadorn, J.W. 2010. The fossil record of cnidarian medusae.
Palaeoworld, 19: 212–221.

Appendix A

Taxon	GB Accession n°		
	16S	COI	ITS1
<i>Pelagia noctiluca</i> ¹	JX235404	JX235428	JX235419
	JX235405	JX235429	JX235420
	JX235406	JX235430	JX235421
	JX235407	JX235431	
	JX235408	JX235432	JX235422
	JX235409	JX235433	
	JX235410	JX235434	JX235423
	JX235411	JX235435	JX235424
	JX235412	JX235436	JX235425
	JX235413	JX235437	
	JX235414	JX235438	JX235426
	JX235415	JX235439	JX235427
	JX235416	JX235440	
	JX235417	JX235441	
	JX235418	JX235442	
<i>Aurelia aurita</i>		AY903133	AY935212
<i>Cyanea capillata</i>		AY902911	U65481
<i>Chrysaora</i> sp.		DQ083524	DQ083525
<i>Craterolophus convolvulus</i>	AY845343		
<i>Lucernaria janetae</i>	AY845342		
<i>Depastromorpha africana</i>	AY845341		
<i>Haliclystus octoradiatus</i>	AY845338		
<i>Haliclystus "sanjuanensis"*</i>	AY845339		
<i>Carybdea marsupialis</i>	AF360118		
<i>Alatina mordens</i>	GQ506986		
<i>Alatina moseri</i>	GQ507005		
<i>Drymonema larsoni</i>	HQ234651		
<i>Drymonema dalmatinum</i>	HQ234628		
<i>Chrysaora</i> sp.	JN184787		
<i>Chrysaora</i> sp.	JN184784		
<i>Chrysaora quinquecirrha</i>	GU300724		
<i>Aurelia aurita</i>	AF461398		
<i>Aurelia aurita</i>	U19373.1		
<i>Aurelia labiata</i>	AF461401		
<i>Aurelia limbata</i>	AF461403		
<i>Aurelia</i> sp.	AF461400		
<i>Aurelia</i> sp.	AF461399		
<i>Aurelia</i> sp.	AF461404		
<i>Aurelia</i> sp.	AF461402		
<i>Pelagia noctiluca</i>	EU999227		
<i>Cassiopea</i> sp.	U19374		
<i>Cassiopea</i> sp.	JN184783		
<i>Rhopilema esculentum</i>	EU373725		
<i>Rhopilema esculentum</i>	EU373726		
<i>Nemopilema nomurai</i>	EU373727		

¹ Samples were collected near Despena Island, El Jobo, Costa Rica (N-11°06'08'', W-085°45'15'') in October 2009.

* Deposited in GenBank as *Haliclystus sanjuanensis*.

Capítulo V

Dating the divergences of the major cnidarian lineages

Resumo

Os cnidários são um grupo de metazoários que exibem grande diversidade em suas histórias naturais, biologia do desenvolvimento e características moleculares. O registro fóssil do grupo e os resultados de algumas análises moleculares têm associado a origem e a diversificação dos cnidários à explosão cambriana. Estudos moleculares mais recentes propuseram uma origem mais antiga do grupo; porém, foi discutido que artefatos analíticos e/ou ausência de importantes linhagens não incluídas nas análises poderiam ter influenciado estes resultados. Desta forma, dúvidas em relação à correspondência entre o surgimento da enorme diversidade de Cnidaria e a explosão cambriana ainda persistem. Neste estudo, estimativas dos tempos de divergência entre as principais linhagens de Cnidaria (Anthozoa, Staurozoa, Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa) foram conduzidas. A amostragem taxonômica foi melhorada em relação a estudos prévios, e um método de datação que permite o relaxamento do relógio molecular e a utilização de limites brandos nos nós calibrados foi utilizado, o que leva em consideração as incertezas das datas fósseis nas calibrações. Uma base de dados de sequências das subunidades menor e maior dos genes ribossomais nucleares de espécies representativas de todas as classes de cnidários foi analisada. Datas mais antigas do que as previamente informadas por outros autores foram obtidas; a origem e a diversificação das principais linhagens de Cnidaria teriam acontecido ao longo do Criogeniano e o Ediacarano, pré-datando a explosão cambriana. A reavaliação da taxonomia e dos relacionamentos evolutivos dos grupos fósseis, assim como a incorporação de novos dados de sequências, são necessárias para testar a hipótese de que a explosão cambriana seja um fenômeno tafonômico de uma origem muito mais antiga dos eumetazoários.

Abstract

The Cnidaria is a highly diverse group of metazoans that exhibits remarkable features concerning natural history traits, developmental biology, and unique molecular characteristics. The fossils record of this group, which is sparse, and some molecular analyses, led many authors to associate the origin and diversification of cnidarians with the Cambrian explosion. Recent molecular studies proposed more ancient origins for cnidarians; however, these studies noted that some artifacts or non-sampled lineages could have influenced the estimates of both, the date of the cnidarians origin and the date of its divergence. As a consequence, some doubts still remain with regards to the correspondence between the rise of the strikingly diversity of cnidarians and the Cambrian explosion. Herein we present an alternative estimate for the origin of the major lineages of Cnidaria (Anthozoa, Staurozoa, Cubozoa, Scyphozoa, and Hydrozoa) by improving the taxon sampling of previous studies, as well as by using a Bayesian estimation of lineage divergence time that not only relaxes the molecular clock hypothesis, but also permits the adoption of soft bounds at the calibration nodes; such strategy takes into account the uncertainties of fossil calibration. We analyzed a data set of small (18S) and large (28S) subunits of the nuclear ribosomal genes from representatives of all the cnidarian classes, in order to significantly improve taxon sampling. We obtained date estimates that are more ancient than those of previous studies. The origin of Cnidaria and the diversification of its major lineages remitted to the Cryogenian and Ediacaran periods, pre-dating the Ed-Ca transition. A reassessment of the taxonomy and evolutionary relationships of the fossil groups, as well incorporation of new sequences, is needed to test the hypothesis that the Cambrian explosion is the result of a taphonomic feature of a much more ancient origin of animals.

Introduction

The Cnidaria is a highly diverse group of metazoans that exhibits remarkable features concerning natural history traits (*e.g.*, contrasting life cycles among closely related species; Marques & Collins, 2004; Collins *et al.*, 2006), developmental biology (*e.g.*, synchronic coexistence of the same genome in completely different morphs), and unique molecular characteristics, such as the variable morphologies of circular and linear mitochondrial DNAs in the subphyla Anthozoa and Medusozoa, respectively (Kayal *et al.*, 2011). Additionally, cnidarians are considered an early divergent lineage of the Metazoa – therefore, date-estimation of the origin of their striking diversity is a key aspect for the understanding of animal evolution.

Among the Cnidaria, the subphylum Medusozoa, which includes the classes Staurozoa, Hydrozoa, Scyphozoa, and Cubozoa (Collins *et al.* 2006), encompass a large majority of the genome, phenotype and life history diversity found in the phylum. Paleontologically, the most ancient fossils undoubtedly assigned to medusozoans were found in an assembly from the Middle Cambrian, in the Marjun Formation (Cartwright *et al.*, 2007). These fossils, and some molecular analyses, led many authors to conclude that the cnidarians diversified during the Cambrian explosion, approximately 540 million years ago (Ma) (Cartwright & Collins, 2007; Lieberman & Cartwright, 2011). Recent molecular studies dating the origin of metazoans proposed more ancient origins for cnidarians, such as ~700 Ma (Erwin *et al.* 2011) or even a Cryogenian origin (736 Ma) followed by an Ediacaran divergence of Hydrozoa and Scyphozoa (607 Ma) (Park *et al.*, 2011). However, these studies noted that some artifacts (Erwin *et al.*, 2011) or non-sampled lineages (Park *et al.*, 2011) could have influenced the estimates of both, the date of the cnidarians origin and the date of divergence of medusozoans. As a consequence, some doubt still remains with regards to the origin of the major lineages of Cnidaria. Hence, a clear perspective about the correspondence between the rise of the strikingly diversity of cnidarians and the Cambrian explosion during the Ediacaran-Cambrian (Ed-Ca) transition remains elusive.

Herein we present an alternative estimate for the origin of the major lineages of Cnidaria (Anthozoa, Staurozoa, Cubozoa, Scyphozoa, and Hydrozoa) by a) improving the taxon sampling, and b) using alternative analytical methods. We analyzed a data set of

small (18S) and large (28S) subunits of the nuclear ribosomal genes from representatives of all the cnidarian classes to significantly improve taxon sampling. This is expected to diminish artifacts related to long lengths of internal branches caused by the lack of data from important lineages. Methodologically, we used a Bayesian estimation of lineage divergence time (Yang & Rannala, 2006; Rannala & Yang, 2007) that not only relaxes the molecular clock hypothesis, but also permits the adoption of soft bounds at the calibration nodes, which take into account the uncertainties of fossil calibration.

Material and methods

Sequence data, taxon sampling, and phylogenetic hypothesis

We analyzed 18S and 28S sequences obtained from GenBank from 54 cnidarian species (Appendix A). These sequences were aligned in MAFFT 6 (Katoh & Kuma, 2002), and regions of ambiguous homology were excluded. Matrices of 4,876 sites were divided into three partitions: The first partition consists of 1,799 sites of the 18S; the other two partitions represent two regions of the 28S, one of them with 923 sites (the most variable region at the 5'end), and the other with 2,154 sites (the more conservative remaining region).

The phylogenetic tree used in this study was generated by maximum likelihood (ML) analysis using the software RAxML 7.2.7 (Stamatakis *et al.*, 2005). A parenthetic backbone tree based on a previous phylogenetic hypothesis of cnidarian evolution (Collins *et al.*, 2006) was used as constraint; the remaining settings were the default options of RAxML. Branch lengths were subsequently eliminated of the final tree and this final topology (Figure 1) was treated as a constant in the further date-calibration analyses.

Fossil calibration

The calibration was performed with one maximum and five minimum bounds (Figure 1). These calibration points, based on the cnidarian fossil record, were extracted from the literature (Table 1). The maximum bound was set at the root of the tree, dating the divergence between Anthozoa and Medusozoa. The minimum bounds were set at divergences in Scleractinia, Trachylina, Hydroidolina, Carybdeida and Discomedusae (Figure 1). Both minimum and maximum bounds were “soft”, which means that the

probability of the true divergence time being outside the bounds is nonzero, allowing molecular data to correct for conflicting fossil information (Yang & Rannala, 2006). Minimum bounds are represented using truncated Cauchy distributions (Inoue *et al.*, 2010) with 0.1% left tail probability; maximum bound used the default 2.5% tail probability.

Table 1. References considered for fossil calibration, dates are in million years ago (Ma).

Taxa	System Period	Age in Ma*	References
Anthozoa/Medusozoa	Ediacaran	580	Chen <i>et al.</i> , 2002
Scleractinia/Other Anthozoa	Lower Cambrian	540	Han <i>et al.</i> , 2010
Scyphozoa	Middle Cambrian	505	Hagadorn <i>et al.</i> , 2002 Cartwright <i>et al.</i> , 2007 Hagadorn & Belt, 2008
Coronatae	Middle Cambrian	505	Cartwright <i>et al.</i> , 2007
Cubozoa	Middle Cambrian	505	Cartwright <i>et al.</i> , 2007
Hydrozoa, Narcomedusae	Middle Cambrian	505	Cartwright <i>et al.</i> , 2007
Hydrozoa, “Anthomedusae-Leptomedusae”	Upper Ordovician	444	Young <i>et al.</i> , 2007
Cubozoa, Chirodromidae	Upper Carboniferous	307	Johnson & Richardson, 1968

*Dates were checked on the international stratigraphic chart of the International Commission on Stratigraphy

Figure 1. Phylogenetic hypotheses for 54 cnidarian species showing fossil calibrations. Calibrations are in million years ago as maximum (>) and minimum (<) bounds. The tree topology follows Collins *et al.*, 2006.

Bayesian estimation of lineage divergence times

The program MCMCTREE 4.4 (Yang & Rannala, 2006; Rannala & Yang, 2007) was used in the date estimation. MCMCTREE allows fossil calibrations, specified as labels on the nodes of the rooted tree, to behave as soft bounds. Therefore, by sampling over the MCMC simulations, the Bayes posterior estimations of the divergence dates were accompanied by 95% confidence intervals (CIs), which are expected to contain the fossil calibration uncertainties (see Inoue *et al.*, 2010 for details). The three sequence partitions were simultaneously analyzed. The likelihood was calculated using a normal approximation of the MLEs of branch lengths (Thorne *et al.*, 1998), obtained using the BASEML program under the HKY85 substitution model (Yang 1994) (see Yang 2006, p. 246–247, for details). The prior mean for the overall rate was set to a rough estimate obtained by fitting a molecular clock to the sequence data, using point calibrations. In MCMCTREE, the independent-rates model was used to specify the prior of rates. The time unit was 100 Myr. The parameters of the birth–death process with species sampling were fixed at $\lambda = \mu = 1$ and $\rho = 0$. A diffuse gamma prior $G(1, 1)$ for the overall substitution rate was used. The rate drift parameter σ^2 was assigned $G(1, 1)$. Parameter σ^2 reflects the amount of rate variation across lineages or how seriously the molecular clock is violated. The number of iterations, the burn-in and the sampling frequency were determined in test runs of the programs. Every analysis was conducted at least twice to ensure consistency between runs.

Results and discussion

Both the origin of Cnidaria and of its major lineages (*viz.*, Staurozoa, Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa, and Anthozoa) might have pre-dated the Ed-Ca transition (Figure 2). Actually, their diversification remitted to the Cryogenian and Ediacaran periods.

Our date estimates are more ancient than those of previous studies (Cartwright & Collins, 2007; Erwin *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011). However, direct comparisons among estimates from different studies are difficult because they used different molecular markers, taxon sampling, calibration strategies, and methodological approaches. Notwithstanding the importance of estimating the exact dates of origin, it is interesting to highlight that

different outcomes seem to agree with a Cryogenian origin for the Cnidaria (*cf.*, Waggoner & Collins, 2004; Erwin *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011).

Figure 2. Timetree of Cnidaria, numbers at nodes and at time-line represent million years ago (Ma). The horizontal bars represent the posterior 95% CI for the node ages.

A Cryogenian origin (800 Ma or more) of the common ancestor of multicellular metazoans has been proposed based on estimates of Cnidaria (Waggoner & Collins, 2004) and Metazoa (Erwin *et al.*, 2011). This ancestor would have the elementary developmental toolkit of all metazoans (Erwin *et al.*, 2011; Lieberman & Cartwright, 2011). However, metazoan divergence would not depend only on this toolkit, but also on appropriate paleoenvironmental conditions necessary for its ecological success (Erwin *et al.*, 2011). These conditions would have arisen in the Ed-Ca transition due to the increase of atmospheric and dissolved oxygen concentration, therefore explaining the time lag between the Cryogenian metazoan origin and the diversification of the group during the Cambrian (Shu, 2008; Erwin *et al.*, 2011).

The rise of oxygen concentration would have allowed larger metazoan body sizes to develop, increasing their chance to be preserved and detected in the fossil record (Chen *et al.*, 2002). Therefore, the great diversity found at the Ed-Ca transition could be either a true biological radiation or a taphonomic artefact.

The “Snowball Earth” hypothesis proposed that ice extensively covered Earth several times during the Cryogenian (Hoffman *et al.*, 1998; Hyde *et al.*, 2000). These global glaciations eventually formed carbonate and phosphate deposits in the Ediacaran strata (Chen *et al.*, 2002), where well-preserved fossils of eumetazoans have been found (*viz.*, McCall, 2006; Shu, 2008). Therefore, whether or not microscopic planktonic and/or interstitial eumetazoans inhabit lower oxygenated environments of Neoproterozoic, before the formation of these deposits, is still an open question (Shu, 2008).

The date of the origin of the major lineages of Cnidaria supports the hypothesis that a diversified fauna existed before the Ed-Ca transition, and reinforces the need of more studies on Ediacaran fossils related to the Vendobionta (Waggoner & Collins, 2004; McCall, 2006; Yuan *et al.*, 2011). Ediacaran Tabulata corals, Conulata scyphozoans, and probably hydrozoan fossils are examples of a cnidarian (and metazoan) diversification that would help unravel the early history of metazoans (Xiao *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Van Iten *et al.*, 2006; McCall, 2006 and references therein, Van Iten *et al.*, 2012). Even considering that the divergence between Anthozoa and Medusozoa during the Cryogenian could be an analytical artefact, Erwin *et al.* (2011) considered that cnidarians could be potential late Cryogenian predators preying on benthic micrometazoans.

Fossil calibration uncertainties are the main concern related to molecular dating analyses (Inoue *et al.*, 2010), and it is not different for the Medusozoa whose fossil record is sparse (*cf.* Young & Hagadorn, 2010). Even though, our results corroborate a more ancient origin of Cnidaria than is usually accepted, and reveal that the divergence of the major lineages also took place before the Cambrian. A reassessment of the taxonomy and evolutionary relationships of the fossil groups, as well incorporation of new sequences, is needed to test the hypothesis that the Cambrian explosion is the result of a taphonomic feature of a much more ancient origin of animals.

References

- Cartwright, P., Halgedahl, S.L., Hendricks, J.R., Jarrard, R.D., Marques, A.C., Collins, A.G., Lieberman, B.S. 2007. Exceptionally preserved jellyfishes from the Middle Cambrian. *PLoS ONE*, 10: e1121.
- Cartwright, P., Collins, A.C. 2007. Fossils and phylogenies: integrating multiple lines of

- evidence to investigate the origin of early major metazoan lineages. *Integrative and Comparative Biology*, 47: 744–751.
- Chen, J.Y., Oliveri, P., Gao, F., Dornbos, S.Q., Li, C.W., Bottjer, D.J., Davidson, E.H. 2002. Precambrian animal life: probable developmental and adult cnidarian forms from Southwest China. *Developmental Biology*, 248: 182–196.
- Collins, A.G., Schuchert, P., Marques, A.C., Jankowski, T., Medina, M., Schierwater, B. 2006. Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology*, 55: 97–115.
- Erwin, D.H., Laflamme, M., Tweedt, S.M., Sperling, E.A., Pisani, D., Peterson, K.J. 2011. The Cambrian conundrum: Early divergence and later ecological success in the early history of animals. *Science*, 334: 1091–1097.
- Han, J., Kubota, S., Uchida, H., Stanley Jr., G.D., Yao, X., Shu, D., Li, Y., Yasui, K. 2010. Tiny sea anemone from the Lower Cambrian of China. *PLoS One*, 5: e13276.
- Hagadorn, J.W., Belt, E.S. 2008. Stranded in upstate New York: Cambrian medusae from the Potsdam Sandstone. *Palaaios*, 23: 424–441.
- Hagadorn, J.W., Dott Jr., R.H., Damrow, D. 2002. Stranded on a Late Cambrian shoreline: medusae from central Wisconsin. *Geology*, 30: 147–150.
- Hoffman, P.F., Kaufman, A.J., Halverson, G.P., Schrag, D.P. 1998. A Neoproterozoic Snowball Earth. *Science*, 281: 1342–1346.
- Hyde, W.T., Crowley, T.J., Baum, S.K., Peltier, W.R. 2000. Neoproterozoic “snowball Earth”: Simulations with a coupled climate/ice-sheet model. *Nature*, 405: 425–429.
- Inoue, J., Donoghue, P.C.J., Yang, Z. 2010. The impact of the representation of fossil calibrations on bayesian estimation of species divergence times. *Systematic Biology*, 59: 74–89.
- Johnson, R.G., Richardson, E.S. 1968. The Essex Fauna and medusae. *Fieldiana. Geology*, 12: 109–115.
- Kayal, E., Bentlage, B., Collins, A.G., Kayal, M., Pirro, S., Lavrov, D.V. 2011. Evolution of Linear Mitochondrial Genomes in Medusozoan Cnidarians. *Genome Biology and Evolution*, 4: 1–12.

- Katoh, M., Kuma, M., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30: 3059–3066.
- Lieberman, B.S., Cartwright, P. 2011. Macroevoolutionary patterns and processes during the Cambrian radiation: Integrating evidence from fossils and molecules. *Açoreana*, 7: 15–38.
- McCall, G.J.H. 2006. The Vendian (Ediacaran) in the geological record: Enigmas in geology's prelude to the Cambrian explosion. *Earth-Science Reviews*, 77: 1–229
- Marques, A.C., Collins, A.G. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology*, 123: 23–42.
- Park, E., Hwang, D.S., Lee, J.S., Song, J.I., Seo, T.K., Won, Y.J. 2011. Estimation of divergence times in cnidarian evolution based on mitochondrial protein-coding genes and the fossil record. *Molecular Phylogeny and Evolution*.
- Rannala, B., Yang, Z. 2007. Inferring speciation times under an episodic molecular clock. *Systematic Biology*, 56: 453–466.
- Shu, D. 2008. Cambrian explosion: Birth of tree of animals. *Gondwana Research*, 14: 219–240.
- Stamatakis, A., Ott, M., Ludwig, T. 2005. RAxML-OMP: An efficient program for phylogenetic inference on SMPs". In Proceedings of 8th International Conference on Parallel Computing Technologies (PaCT2005), Lecture Notes in Computer Science, 3506: 288–302, Springer Verlag.
- Thorne, J.L., Kishino, H., Painter, I.S. 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1647–1657.
- Van Iten, H., Moraes Leme, J., Guimarães Simões, M., Marques, A.C., Collins, A.G. 2006. Reassessment of the phylogenetic position of conulariids (?Ediacaran–Triassic) within the subphylum Medusozoa (phylum Cnidaria). *Journal of Systematic Palaeontology*, 4: 109–118.
- Van Iten, H., Moraes Leme, J., Marques, A.C., Simões M.G. 2012. Alternative interpretations of some earliest Ediacaran fossils from China. *Acta Palaeontologica Polonica*, <http://dx.doi.org/10.4202/app.2011.0096>.

- Waggoner, B., Collins, A.G. 2004. *Reductio ad absurdum*: Testing the evolutionary relationships of Ediacaran and Paleozoic problematic fossils using molecular divergence dates. *Journal of Paleontology*, 78: 51–61.
- Xiao, S., Yuan, X., Knoll, A.H. 2000. Eumetazoan fossils in terminal Proterozoic phosphorites? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 13684–13689.
- Yang, Z. 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *Journal of Molecular Evolution*, 39: 306–314.
- Yang, Z. 2006. Computational molecular evolution. Oxford: Oxford University Press.
- Yang, Z., Rannala, B. 2006. Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 212–226.
- Yuan, X., Chen, Z., Xiao, S., Zhou, C., Hua, H. 2011. An early Ediacaran assemblage of macroscopic and morphologically differentiated eukaryotes. *Nature*, 17: 390–393.
- Young, G.A., Rudkin, D.M., Dobrzanski, E.P., Robson, S.P., Nowlan, G.S., 2007. Exceptionally preserved Late Ordovician biotas from Manitoba, Canada. *Geology* 35 (10), 883–886.
- Young, G.A., Hagadorn, J.W. 2010. The fossil record of cnidarian medusae. *Palaeoworld*, 19: 212–221.

Appendix A. List of taxa, GenBank accession numbers of the ribosomal small subunit (SSU-18S) and the large ribosomal subunit (LSU-28S), and codes for taxa as used in Figure 1.

Class	Subclass/Order/Family	Taxon name	SSU-18S	Taxon name	LSU-28S	Code
Anthozoa	Antipatharia	<i>Antipathes galapagensis</i>	AF100943	<i>Antipathes galapagensis</i>	AY026365	Antipagal
Anthozoa	Antipatharia	<i>Cirripathes lutkeni</i>	AF052902	<i>Cirripathes angina</i>	FJ626243	Cirripath
Anthozoa	Antipatharia	<i>Stichopathes spessi</i>	AF052899	<i>Stichopathes cf. flagellum</i>	FJ626232	Stichopat
Anthozoa	Octocorallia	<i>Acalygcorgia inermis</i>	AJ133545	<i>Calcygorgia</i> sp.	FJ642926	Acantogor
Anthozoa	Octocorallia	<i>Xenia</i> sp.	AF052931	<i>Eleutherobia aurea</i>	GQ377456	Alcyoniin
Anthozoa	Scleractinia	<i>Montastraea franksi</i>	AY026382	<i>Montastraea franksi</i>	AY026375	Montasfra
Staurozoa	Stauromedusae	<i>Craterolophus convolvulus</i>	AY845344	<i>Craterolophus convolvulus</i>	AY920781	Cratercon
Staurozoa	Stauromedusae	<i>Halicystus octoradiatus</i>	AY845346	<i>Halicystus octoradiatus</i>	AH014894	Haliclist
Cubozoa	Carybdeida	<i>Carukia barnesi</i>	AF358107	<i>Carukia barnesi</i>	GQ849059	Carukibar
Cubozoa	Carybdeida	<i>Copula sivickisi</i> ¹	AF358110	<i>Copula sivickisi</i>	GQ849064	Carybdsiv
Cubozoa	Carybdeida	<i>Carybdea xaymacana</i>	AY920775	<i>Carybdea xaymacana</i>	GQ849067	Carybdxay
Cubozoa	Carybdeida	<i>Tamoya haplonema</i>	GQ849085	<i>Tamoya haplonema</i>	GQ849062	Tamoyahap
Cubozoa	Carybdeida	<i>Alatina mordens</i>	GQ849082	<i>Alatina mordens</i>	GQ849058	Alatinamo
Cubozoa	Chirodropida	<i>Chironex fleckeri</i>	AF358104	<i>Chironex fleckeri</i>	AY920785	Chironfle
Cubozoa	Chirodropida	<i>Chiropsalmus quadrumanus</i>	GQ849080	<i>Chiropsalmus quadrumanus</i>	GQ849056	Chiropquad
Scyphozoa	Coronatae	<i>Atolla vanhoeffeni</i>	AF100942	<i>Atolla vanhoeffeni</i>	AY026368	Atollavan
Scyphozoa	Coronatae	<i>Nausithoe rubra</i>	AF358095	<i>Nausithoe rubra</i>	AY920776	Nausitrub
Scyphozoa	Semaeostomeae	<i>Chrysaora</i> sp.	AY920769	<i>Chrysaora</i> sp.	AY920779	Chrysaora
Scyphozoa	Semaeostomeae	<i>Phacellophora camtschatica</i>	AF358096	<i>Phacellophora camtschatica</i>	AY920778	Phacelcam
Scyphozoa	Rhizostomeae	<i>Catostylus mosaicus</i>	HM194779	<i>Catostylus mosaicus</i>	HM194832	Catostylu
					AY920777	
Hydrozoa	Aplanulata	<i>Candelabrum cocksi</i>	AY920758	<i>Candelabrum cocksi</i>	AY920796	Candelcoc
Hydrozoa	Aplanulata	<i>Corymorpha intermedia</i>	AY920759	<i>Corymorpha pendula</i>	EU305510	Corymorph
Hydrozoa	Aplanulata	<i>Ectopleura larynx</i>	AY920760	<i>Ectopleura dumortieri</i>	EU272561	Ectopleur
Hydrozoa	Aplanulata	<i>Hydra circumcincta</i>	AF358080	<i>Hydra circumcincta</i>	AY026371	Hydracirc
Hydrozoa	Filifera	<i>Bougainvillia</i> sp.	AF358093	<i>Bougainvillia fulva</i>	EU305507	Bougainvi
Hydrozoa	Filifera	<i>Eudendrium racemosum</i>	AF358094	<i>Eudendrium racemosum</i>	EU272562	Eudendrac
Hydrozoa	Filifera	<i>Garveia</i> sp.	AY920766	<i>Garveia grisea</i>	EU272588	Garveia
Hydrozoa	Filifera	<i>Hydractinia serrata</i>	AY920764	<i>Hydractinia</i> sp.	EU305518	Hydractin
Hydrozoa	Filifera	<i>Pandea</i> sp.	AY920765	<i>Pandea</i> sp.	EU272580	Pandea sp.
Hydrozoa	Filifera	<i>Podocoryna carnea</i>	AF358092	<i>Podocoryna exigua</i>	AY920802	Podocoryn
Hydrozoa	Filifera	<i>Proboscoidactyla flavicirrata</i>	AY920768	<i>Proboscoidactyla flavicirrata</i>	EU305527	Proboscfl
Hydrozoa	Filifera	<i>Fabienna sphaerica</i>	AY920767	<i>Fabienna sphaerica</i>	AY920797	Fabiensph
Hydrozoa	Leptothecata	<i>Melicerissa</i> sp.	AF358075	<i>Melicerissa</i> sp.	AY920798	Melicesp
Hydrozoa	Leptothecata	<i>Melicerium octocostatum</i>	AY920757	<i>Melicerium octocostatum</i>	EU272575	Melicerito
Hydrozoa	Limnomedusae	<i>Aglauropsis aeora</i>	AY920754	<i>Aglauropsis aeora</i>	AY920793	Aglauraeo
Hydrozoa	Limnomedusae	<i>Limnocyda tanganyicae</i>	AY920755	<i>Limnocyda tanganyicae</i>	AY920795	Limnoctan
Hydrozoa	Limnomedusae	<i>Maeotias marginata</i>	AF358056	<i>Maeotias marginata</i>	EU247810	Maeotimar
Hydrozoa	Limnomedusae	<i>Olindias phosphorica</i>	AY920753	<i>Olindias phosphorica</i>	EU247808	Olindipho
Hydrozoa	Narcomedusae	<i>Aegina citrea</i>	AF358058	<i>Aegina citrea</i>	AY920789	Aeginacit
Hydrozoa	Narcomedusae	<i>Solmissus marshalli</i>	AF358060	<i>Solmissus marshalli</i>	AY920790	Solmisamar
Hydrozoa	Other Capitata	<i>Cladonema californicum</i>	AF358085	<i>Cladonema radiatum</i>	GQ424290	Cladonema
Hydrozoa	Other Capitata	<i>Coryne pusilla</i>	Z86107	<i>Coryne pusilla</i>	GQ424304	Corynepus
Hydrozoa	Other Capitata	<i>Moerisia</i> sp.	AF358083	<i>Moerisia</i> sp.	AY920801	Moerissp
Hydrozoa	Other Capitata	<i>Pennaria disticha</i>	AY920762	<i>Pennaria disticha</i>	EU272581	Pennardis
Hydrozoa	Other Capitata	<i>Polyorchis penicillatus</i>	AF358090	<i>Polyorchis haplus</i>	GQ424317	Polyorchis
Hydrozoa	Other Capitata	<i>Porpita</i> sp.	AF358086	<i>Porpita</i> sp.	AY920803	Porpitsp
Hydrozoa	Other Capitata	<i>Scrippisia pacifica</i>	AF358091	<i>Scrippisia pacifica</i>	AY920804	Scripppac
Hydrozoa	Other Capitata	<i>Solanderia secunda</i>	AJ133506	<i>Solanderia secunda</i>	EU305533	Solandsec
Hydrozoa	Other Capitata	<i>Staurocladia wellingtoni</i>	AF358084	<i>Staurocladia wellingtoni</i>	FJ550376	Staurowel

Hydrozoa	Siphonophorae	<i>Nanomia bijuga</i>	AF358071	<i>Nanomia bijuga</i>	EU272576	Nanomibij
Hydrozoa	Siphonophorae	<i>Nectopyramis</i> sp.	AF358068	<i>Nectopyramis</i> sp.	AY026377	Nectopsp
Hydrozoa	Siphonophorae	<i>Physophora hydrostatica</i>	AF358072	<i>Physophora hydrostatica</i>	EU272582	Physophyd
Hydrozoa	Trachymedusae	<i>Crossota rufobrunnea</i>	AF358063	<i>Crossota rufobrunnea</i>	EU247800	Crossoruf
Hydrozoa	Trachymedusae	<i>Pantachogon haeckeli</i>	AF358062	<i>Pantachogon haeckeli</i>	AY920792	Pantachae

¹-Previously assigned to *Carybdea*.

Capítulo VI

Considerações finais

Alterações da área habitável nos períodos glaciais/interglaciais estariam relacionados a padrões filogeográficos comuns em *Liriope tetraphylla*, *Olindias sambaquiensis* e *Acharadria crocea* do Atlântico Sul-Occidental (ASO) (viz. Capítulos 2 e 3). As três espécies revelaram expansões populacionais e estruturação genética acompanhada de padrões filogenéticos sem uma correlação geográfica evidente. Portanto, modificações do ambiente nerítico do ASO ao longo Pleistoceno determinaram padrões filogeográficos comuns a espécies com histórias naturais distintas. Estas constatações são inéditas no contexto de entender a origem dos padrões de distribuição da biodiversidade marinha na região central do ASO. O teste deste padrão ocorrerá ao confrontá-los com padrões filogeográficos de outras espécies (tanto de Cnidaria como de outros filos) do ASO, como também do estudo de populações do Atlântico Sul-Oriental (ASOr), no litoral africano. No ASOr a contração da região temperada nos períodos glaciais foi mais marcante que no ASO (Niebler *et al.*, 2003) o que, em hipótese, denotaria sinais mais evidentes de expansões populacionais.

Recentemente foi corroborada a hipótese que ciclos de vida mais dispersivos em Medusozoa resultariam em distribuições geográficas mais amplas e na diminuição da diversidade de espécies (Gibbons *et al.*, 2010). Controvérsias a esta hipótese advêm (1) da existência de espécies crípticas, que contradizem os pretensos cosmopolitismos de espécies com medusas de longa duração planctônica [e.g.: *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) (Schroth, *et al.* 2002); *Cyanea capillata* (Linnaeus, 1758) (Dawson, 2005)], e (2) da predominância de espécies com ciclos majoritariamente bentônicos em áreas oceânicas remotas (Cornelius, 1992a, 1992b).

As questões taxonômicas de certas linhagens e a incompreensão do poder dispersivo real de diferentes histórias naturais não necessariamente contradizem que há incongruências entre a informação de certos padrões filogeográficos e o esperado pelo conhecimento da história natural de alguns organismos marinhos (Paternello *et al.*, 2007). Em ambos lados da barreira biogeográfica da região do Estreito de Gibraltar, entre o Atlântico (Atl.) e o Mediterrâneo (Med.), populações estruturadas das espécies *Scomber scombrus* Linnaeus, 1758 (Pisces, Actinopterygii) e *Asparagopsis armata* Harvey, 1855 (Rhodophyta, Eurhodophytina) contrastam com a

falta de estrutura das suas respectivas espécies congêneras *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782 e *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan de Saint-Léon, 1845 (Paternello *et al.*, 2007 e sus referências), respectivamente. Portanto, padrões filogeográficos semelhantes foram detectados entre espécies com biologias bastante diferentes, similar ao descrito para os três hidrozoários do ASO (Capítulos 2 e 3).

Tanto estudos que corroboram a correlação entre biologia e diversidade de espécies (Gibbons *et al.*, 2010), como os que demonstram a falta de correlação entre biologia e processos microevolutivos (Paternello *et al.*, 2007) concluem que maiores esforços amostrais e calibrações filogeográficas de taxas evolutivas são necessários para um melhor entendimento da influência da história natural sobre as estruturas filogeográficas. A calibração de taxas evolutivas obtidas neste estudo para o COI de *Pelagia noctiluca* permitiu determinar que processos biogeográficos do Quaternário teriam influenciado o padrão filogeográfico das populações do Atl. e do Med. desta espécie (Capítulo 4). Os mesmos processos biogeográficos que originaram monofiletismos recíprocos entre populações do Atl. e do Med. de outras espécies (Paternello *et al.*, 2007 e suas referências) também teriam afetado as populações de *P. noctiluca* da mesma região. A princípio, a falta de monofiletismo recíproco entre populações de *P. noctiluca* do Atl. e do Med. foi interpretada como ausência de estrutura devido ao amplo poder dispersivo de seu ciclo de vida holoplantônico (Stopar *et al.*, 2010). Porém, ademais da capacidade dispersiva, as marcas de efeitos de vicariância ou da alteração dos tamanhos populacionais (*e.g.*, monofilias recíprocas, fixação de alelos por gargalos evolutivos) em populações maiores seriam menos evidentes que em outras menores. Embora o tamanho das populações ancestrais de *P. noctiluca* seja desconhecido, sua elevada diversidade genética (*viz.* Stopar *et al.*, 2010 e Capítulo 4) associada a ‘*blooms*’ populacionais episódicos no Atl. e no Med. (Stopar *et al.*, 2010 e suas referências) sugerem tamanhos populacionais grandes, os quais também poderiam explicar os sinais de estruturação filogeográfica menos marcantes do Atl. e do Med. Concomitantemente, foram encontrados índices de diversidade genética semelhantes entre *A. crocea* e *O. sambaquiensis*, como também expansões populacionais similares a partir de populações de tamanho efetivo menor em análises coalescentes de *L. tetraphylla* e *O. sambaquiensis* (Capítulos 2 e 3). Assim, tamanhos populacionais podem ser um fator comum entre espécies com biologias diferentes. Deste modo, a demografia seria afetada pela história biogeográfica, mas também modularia o grau de resposta das

populações aos eventos biogeográficos. Logo, em análises filogeográficas, além da biologia e do maior esforço amostral, é necessário considerar em que nível eventos biogeográficos de vulto deixariam marcas em populações com demografias similares.

Por fim, deve ser salientado que a interpretação da influência da história natural nos estudos biogeográficos não se restringe a estudos microevolutivos. A origem dos metazoários é geralmente associada ao impacto biológico de mudanças ambientais (e.g., disponibilidade de nutrientes e de oxigênio dissolvido) que ocorreram entre o Ediacarano e o Cambriano, desencadeando a grande diversidade animal (Erwin *et al.*, 2011). Entretanto, a atividade tectônica que propiciou estas mudanças é pouco discutida dentro de uma abordagem biogeográfica, a qual é considerada controversa (Grazhdankin, 2004). Ao longo do Criogeniano e o Ediacarano, quando as linhagens principais de Cnidaria teriam surgido (Capítulo 5), a placa continental do supercontinente Rodínia fragmentou-se gerando novos mares e áreas de plataformas marinhas rasas (Torsvik, 2003; Donnadieu *et al.*, 2004). A relação destes eventos geológicos com um possível surgimento de biotas marinhas diversificadas, que poderiam ser consideradas as primeiras cladogêneses em Eumetazoa relacionadas a eventos vicariantes, é uma nova hipótese a ser considerada.

Referências bibliográficas

- Awise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489–522.
- Cornelius, P.F.S. 1992a. Medusa loss in leptolid hydrozoan (Cnidaria), hydroid rafting, and abbreviated life-cycles among their remote-island faunae: an interim review. *Scientia Marina*, 56: 245–261.
- Cornelius, P.F.S. 1992b. The Azores hydroid fauna and its origin, with discussion of rafting and medusa suppression. *Arquipélago. Life and Earth Sciences*, 10: 75–99.
- Dawson, M.N. 2005. *Cyanea capillata* is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for *C. annaskala* and *C. rosea* (Scyphozoa: Semaestomeae: Cyaneidae) in south-eastern Australia. *Invertebrate Systematics*, 19: 361–370.

- Donnadieu, Y., Goddris, Y., Ramstein, G., Ndlec, A., Meert, J. 2004. A ‘snowball Earth’ climate triggered by continental break-up through changes in runoff. *Nature*, 428: 303–306.
- Erwin, D.H., Laflamme, M., Tweedt, S.M., Sperling, E.A., Pisani, D., Peterson, K.J. 2011. The Cambrian Conundrum: Early Divergence and Later Ecological Success in the Early History of Animals. *Science*, 334: 1091–1097.
- Gibbons, M.J., Liesl, A.J., Adiel, I., Toufiek, S. 2010. Life cycle strategy, species richness and distribution in marine Hydrozoa (Cnidaria: Medusozoa). *Journal of Biogeography*, 37: 441–448.
- Grazhdankin, D. 2004. Patterns of distribution in the Ediacaran biotas: facies versus biogeography and evolution. *Paleobiology*, 30: 203–221.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 189–216.
- Niebler, H.-S., Arz, H.W., Donner, B., Mulitza, S., Ptzold, J., Wefer, G. 2003. Sea surface temperatures in the equatorial and South Atlantic Ocean during the Last Glacial Maximum (23–19 ka). *Paleoceanography*, 18: 1069, doi:10.1029/2003PA000902, 2003.
- Paternello, T., Volckaert, F.A.M.J., Castilho, R. 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic–Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, 16: 4426–4444.
- Schroth, W., Jarms, G., Streit, B., Schierwater, B. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology*, 2: 1–10.
- Stopar, K., Ramak, A., Trontelj, P., Malej, A. 2010. Lack of Genetic Structure in the Jellyfish *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomeae) across European Seas. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 417–428.
- Torsvik, T.H. 2003. The Rodinia Jigsaw Puzzle. *Science*, 300: 1379–1381.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114–138.

Resumo

Estudos filogeográficos para distintas espécies de Medusozoa (Cnidaria) foram conduzidos enfatizando a área nerítica central do Atlântico Sul-ocidental (ASO), entre os litorais sudeste do Brasil e o litoral da província de Buenos Aires na Argentina. Estes foram baseados em sequências de DNA dos genes mitocondriais COI e 16S e do íntron nuclear ITS1, levando em consideração tanto a heterogeneidade atual e a história geológica das condições oceanográficas do ASO, como também as capacidades dispersivas de *Liriope tetraphylla*, *Olindias sambaquiensis* e *Acharadria crocea*, inferidas pelos seus ciclos de vida. Adicionalmente, a estrutura filogeográfica de *Pelagia noctiluca* foi avaliada em outras regiões oceânicas, considerando o Atlântico (Atl.) e o Mediterrâneo (Med.) e utilizando os marcadores COI, 16S e ITS1. Este estudo foi conduzido através de calibrações de taxas de substituição baseadas em uma divergência significativa embora filogeneticamente rasa, entre populações do Atl. e do Pacífico. Os resultados específicos indicam: 1) padrões comuns, de expansões populacionais e estruturação genética acompanhada de padrões filogenéticos sem uma correlação geográfica evidente, para as três espécies estudadas do ASO, os quais remetem a alterações de área habitável em períodos glaciais e interglaciais a partir do Pleistoceno médio ou tardio; 2) uma estrutura filogeográfica entre populações de *P. noctiluca* do Atl. e do Med. que remete a possíveis efeitos de isolamento entre ambas bacias durante o Gelasiano. Além disso, aspectos dos resultados que sugerem a importância de se considerar que a demografia não seria apenas afetada pela história biogeográfica são discutidos. A demografia também modularia o grau de resposta das populações aos eventos biogeográficos, podendo ser uma característica comum para populações de espécies que mostram padrões filogeográficos similares, a despeito de possuírem biologias marcadamente distintas. É importante salientar que a prevalência na interpretação da influência da história natural nos estudos biogeográficos não se restringe a estudos microevolutivos. A origem dos metazoários é geralmente associada ao impacto biológico de mudanças ambientais que teriam desencadeando a chamada explosão cambriana. Entretanto, a atividade tectônica que propiciou estas mudanças é pouco discutida dentro de uma abordagem biogeográfica, a qual é considerada controversa. Resultados indicadores de que as principais linhagens de Cnidaria teriam surgido ao longo do Criogeniano e o Ediacarano foram obtidos, Períodos em que novos mares e áreas de plataforma rasa estavam surgindo como resultado da fragmentação da placa continental de Rodínia. A relação entre estes eventos geológicos e um possível surgimento de biotas marinhas diversificadas, as quais poderiam ser consideradas as primeiras cladogêneses em Eumetazoa relacionadas a eventos vicariantes, é uma nova hipótese a ser considerada.

Abstract

Phylogeographic studies for different species of Medusozoa (Cnidaria) were performed, emphasizing the central neritic area of the South-Western Atlantic (SWA), localized between the southeastern Brazilian coast and the coast of the Buenos Aires province in Argentina. These were based on DNA sequences of the mitochondrial genes COI and 16S, and the nuclear intron ITS1. They considered both the heterogeneity of the geological history and the present oceanographic conditions of the SWA, as well as the dispersal capabilities of *Liriope tetraphylla*, *Olindias sambaquiensis* and *Acharadria crocea*, inferred by their life cycles. Additionally, the phylogeographic structure of *Pelagia noctiluca* was evaluated in other oceanic regions, considering the Atlantic (Atl.) and Mediterranean (Med.) and using COI, ITS1 and 16S as molecular markers. This study was conducted through calibrations of substitution rates based on a significant but phylogenetically shallow divergence, between populations from the Atl. and the Pacific. Specific results indicate: 1) common patterns of population expansion and genetic structure associated to phylogenetic patterns without a clear geographical correlation, for the three species of the ASO, which refer to changes of the habitable area during glacial and interglacial periods since the middle or late Pleistocene; 2) genetic structure between populations of *P. noctiluca* from the Atl. and Med., referring to possible isolation effects between the two basins during the Gelasian. Moreover, the results also suggest the importance of considering that the demographic aspects would not be affected only by the biogeographical history. The demography would also modulate the degree of response of populations to biogeographic events, and could be a common feature for populations of species that exhibit similar phylogeographic patterns, in spite of having markedly different biological features. It is important to notice that the prevalence in the interpretation of the influence of natural history in biogeographical studies is not restricted to microevolutionary studies. The origin of metazoans is generally associated with the biological impact of environmental changes that would have triggered the Cambrian explosion. However, the tectonic activity that resulted in such changes is not discussed within a biogeographic approach, which is considered controversial. Results indicating that the main lineages of Cnidaria emerged during the Cryogenian and Ediacaran were obtained, at that Period new seas and areas of shallow platform were emerging as a result of the fragmentation of the Rodinia continental plate. The relationship between those geological events and the possible emergence of a diverse marine biota, whose could be considered as the firsts cladogenesis in Eumetazoa related to vicariant events, is a new hypothesis to be considered.