



2012

M^a del Pilar Casado de Amezáa Ayala

Estudio genético de la estructura poblacional y conectividad de dos corales endémicos del Mediterráneo *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) y *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767)

Tesis Doctoral

M^a del Pilar Casado de Amezáa Ayala

2012

Estudio genético de la estructura poblacional y conectividad de dos corales endémicos del Mediterráneo:

Astroides calycularis (Pallas, 1766) y
Cladocora caespitosa (Linnaeus, 1767)

Genetic assessment of population structure and connectivity in two endemic Mediterranean corals:

Astroides calycularis (Pallas, 1766) and
Cladocora caespitosa (Linnaeus, 1767)



Universidad de Alcalá
Departamento de Ecología



Universidad de Alcalá
Departamento de Ecología



Estudio genético de la estructura poblacional y
conectividad de dos corales endémicos del Mediterráneo:
Astroides calycularis (Pallas, 1766) y
Cladocora caespitosa (Linnaeus, 1767)

Genetic assessment of population structure and
connectivity in two endemic Mediterranean corals:
Astroides calycularis (Pallas, 1766) and
Cladocora caespitosa (Linnaeus, 1767)

Memoria presentada por M^a del Pilar Casado de Amezúa Ayala para optar
por el grado de Doctor por la Universidad de Alcalá

Directores

Dr. José Templado y Dra. Annie Machordom

Mayo 2012

Portada

Edición fotográfica

Jesús Muñoz

Fotografía *Astroides calycularis*

Alexis Terrón-Singler

Fotografía *Cladocora caespitosa*

José Antonio Fayos

Fondo marino

Pilar Casado de Amezúa



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



museonacionaldecienciasnaturales

José Templado, Científico Titular del Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC),

HACE CONSTAR:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “Estudio genético de la estructura poblacional y conectividad de dos corales endémicos del Mediterráneo: *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) y *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767)”, ha sido realizado bajo su dirección por M^a del Pilar Casado de Amezúa Ayala y reúne todos los requisitos necesarios para su aprobación como Tesis Doctoral. Por lo tanto, doy mi visto bueno a la presentación de dicha Tesis Doctoral.

Madrid, a 17 de Mayo de 2012

Dr. José Templado
Director de la Tesis Doctoral



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



museonacionaldecienciasnaturales

Annie Machordom, Investigadora Científica del Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC),

HACE CONSTAR:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “Estudio genético de la estructura poblacional y conectividad de dos corales endémicos del Mediterráneo: *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) y *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767)”, ha sido realizado bajo su dirección por M^a del Pilar Casado de Amezúa Ayala y reúne todos los requisitos necesarios para su aprobación como Tesis Doctoral. Por lo tanto, doy mi visto bueno a la presentación de dicha Tesis Doctoral.

Madrid, a 17 de Mayo de 2012

Dra. Annie Machordom
Directora de la Tesis Doctoral

JULIO A. CAMARGO BENJUMEDA, Profesor Titular y Director del Departamento de Ecología de la Universidad de Alcalá,

HACE CONSTAR:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “Estudio genético de la estructura poblacional y conectividad de dos corales endémicos del Mediterráneo: *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) y *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767)” realizado por Dña. M^a del Pilar Casado de Amezúa Ayala, dentro del Programa de Doctorado Cambio Global y Desarrollo Sostenible adscrito al Departamento de Ecología de la Universidad de Alcalá, reúne todos los requisitos necesarios para su aprobación como Tesis doctoral.

Alcalá de Henares, 24 de Mayo de 2012

Agradecimientos

Y bien, una vez escrito el libro de mi tesis doctoral, este es el último (aunque aparezca el primero) apartado, en el que describo el que creo que es el aspecto más bonito de la realización de ésta tesis, el apoyo, ayuda y colaboración de muchas personas para que esta tesis se pudiera llevar a cabo. A Tod@s aquellos que me han ayudado, para lo bueno y para lo malo, que luego... visto más allá se convierte en bueno, y en lo que creo es el principal objetivo de una tesis, aprender.

Dedico con especial cariño este libro a mi madre, oohh mamá, grandísimo agradecimiento por aguantar todas las etapas con paciencia y cariño... único de madre. A mi hermano por escuchar, "no entiendo de lo que me estás hablando, pero dime en que te puedo ayudar" y dar su siempre sensata opinión en cualquier momento. A Rafa, sabio consejero de lo que una tesis implica, gran científico, amigo y pareja. Por hacerme ver que no siempre llevaba la razón (¡aunque yo siguiera pensando que la llevaba!), y seguir ahí en todo momento.

Lógicamente, a los primeros que he de agradecer la oportunidad brindada para llevar a cabo esta tesis es a mis directores, Annie y Pepe, por sus distintos apoyos en diferentes etapas de la tesis. Gracias Annie por esas esternas tardes, que a veces se hacían noches, de discusiones científicas, alineamientos de secuencias, y ahora un cigarrillo de descanso... volvemos a la tarea. Gracias Pepe por tu escucha y consejos siempre discretos, directos y concretos.

Las estancias que llevé a cabo en Italia, no las recuerdo como "lugar de paso y no vuelvo", gracias al apoyo y hospitalidad de la gente de Marine Science Group, Erik, Gabry, Claudia, Chiara, Simone, Fil, Francesco, Fio, Valentina, por integrarme en la gran "familia" MSG. A Stefano, cabecilla de MSG y gran asesor y colaborador, por enseñarme lo que es el trabajo en equipo y animarme a colaborar y expresar mis ideas.

Un especial agradecimiento a Luis de la Universidad de Granada, por ayudar a un "pececillo mareado" a convertirse en una buceadora a su estilo autodidacta. Por las discusiones bajo el agua y en superficie, que ahora recuerdo como aprendizajes de no olvidarme de lo imprescindible en un inmersión, del ordenador, la red, la tablilla, el cuadrado, las bolsitas bien puestas, numeradas, unos cuantos botes "por si acaso", el lápiz de repuesto, mosquetones e improvisaciones con un cabo o un bote. Y que decir de Charlie siempre dispuestos a poner su barca para recorrer el área de Punta de la Mona, ayudar con la botella, "ais, ¡me faltan las aletas!", "Yo tengo unas, anda que la niña del bidoncito...." venga una caña después de la inmersión.

Muy importantes para la realización de ésta tesis, han sido los muestreos que he llevado a cabo en distintos lugares del Mediterráneo (siempre occidental... algún día llegaré a explorar la parte oriental de este mar). Quiero agradecerlos a tod@s aquellos que me acompañaron y ayudaron durante las campañas, y dado que han sido muchas personas a lo largo de los cuatro años y diferentes muestreos, aquí hay mucho que agradecer. A Diego, por su estancia en las Islas Columbretes y por su paciencia con todo el material prestado ("pero no te has traído....", je, "pues no"), y aquellos momentos de intercambio de ideas acerca de Cladocora. A Javi G, Javi

D, Iván, Marta y de nuevo... a Luis, por las campañas de las Islas Chafarinas, entre Patellas, Dendropomas, Astroides, cuadrados de muestreo, mejor de 50 o mejor sin cuadrado, y las bolsitas, etiquetas etanol... ique todo esto es para un informe del OAPN! Pues habrá que hacer fotos, hechas por Luis, gran experto en el manejo de la fotografía subacuática, y que no dejaba bicho vivo, o muerto, por fotografiar, y cenas y comidas en el porche de la casa. A Óscar, por su paciencia con las bolsitas numeradas, tijeritas y a la caza del pólipos cortado, enseñanzas acerca de la ecología de Astroides, preguntas y respuestas y más preguntas de una niña curiosa ("pero... ¿y podríamos hacer? ¿Y si...??") y por su hospitalidad durante la campaña en Ceuta. A mi Jacinto, gran amigo, biólogo, no investigador, pero sabio en cualquier tema de biología marina y terrestre, por recorrer juntos las calas de Murcia en busca de un lugar apropiado para conseguir las muestras de Astroides, aletas, tubo, máscara, tijeras, bolsitas numeradas y bidón en mano, venga yo las corto y tú las guardas, a ver quien llega mas profundo, yo aguanto masssss, ahora solo queda etiquetarlas para que no se pierda la numeración, y conservarlas en etanol. A Stefano y Gabry, y la gente de SDS por su ayuda en Italia. A Antonio, por conseguir embarcarme hacia la Isla de Alborán, y el primer muestreo de reconocimiento de Astroides en la isla, aprovechando para cazar plánulas y aprender mas sobre el coralito naranja. A Marta y Silvia, por su ayuda con las muestras de Alborán; Antonio, Marta y Pilar colectan las muestras, Silvia... "yo hago de boya y me quedo aquí a recojerlas" y risas y más risas. A Mari Carmen, por su salero para organizar los muestreo de Algeciras; y que decir de Anna, cara amiga, esos muestreos que nos hemos pegado, entre Algeciras, de paso a Cabo de Gata y Granada, y unas semanas después a Alicante para luego subir a Tarragona, gran compañera de buceo y viaje. A Olgalu, por esos fines de semana de buceos de placer y muestreos, una las fotos, otras las bolsitas y otra... ia por las muestras!. A Eduard del CEAB, por dejarnos participar en su campaña de muestreo, ique bonito es juntar diferentes opiniones!. y por su hospitalidad en Tarragona y ayuda en la colecta de Cladocora y Oculina, sin él no hubiera encontrado estas localidades. A Iván y Patri, por conseguir las muestras de Cabo de Gata y Cabo Tres Forcas. Y que decir de Nano, que de forma altruista llevó a cabo una colecta entera de Cladocora en Menorca, y todavía estaba agradecido porque así le volvía a hacer sentir biólogo... igracias Nano!. Por todo el detalle del muestreo que hiciste en Cala Galdana, cada foto de cada colonia...

Dada la gran carga de trabajo de laboratorio de molecular que ha llevado esta tesis, también tengo que agradecer a tod@s aquellos que me han ayudado en el trabajo con "las agüitas" (como denomina mi amiga Mariana), en especial a Ricardo, por sus largas discusiones técnicas de como mejorar las PCRs y las rarezas de la técnica y su ayuda en momentos de agobio. A Ángela, por sus consejos y largos cafeses de desahogo.

A los "habitantes" y aquellos que pasaron por el Museo y ya no están, pero con los cuales sigo en contacto, porque "los amigos de verdad no se pueden olvidar"...tralarara"en especial al "cybercafé", Mariana, Sara, Silvia, Paco, Isaac, María, Raul, Christian, Joaquin, Olgalu... por los momentos de crisis y escuchas, risas y consejos, y luego unas cañas, y mañana volvemos. A Alejandro, fiel amigo y consejero, pragmático donde los haya, por estar siempre dispuesto a echar un vistazo a un correo o un texto, ya en Madrid o en su vuelta a Mexico A Luis, Borja, Ignacio, Nanet, Teresa, Isabel, Elena, Saioa, por estar ahí siempre dispuestos a ofrecer un consejo, o un ayuda con la estadística.

A mis amig@s de fuera de España, aunque en la distancia siempre ahí trás el Skype, o el correo, a Jorge que siempre ha estado al otro lado del skype para escuchar quejas y mas quejas, y "¿que hago?", y devolver sonrisas y respuestas. A Morten, por su ayuda siempre Zen, pacífica y sensata. Por largas conversaciones de ciencia e intercambios de ideas. A Maja, por transferirme su pragmatismo y eficacia en momentos críticos de agobio. A Lars, por su ayuda incondicional siempre puntual, clara, conceta y concisa. A Mac, a pesar de todavía no conocerla en persona, por su empatía tranquilizadora transmitida a través de correos electrónicos.

Que decir de mis amig@s "no museísticos" algunos investigadores, otros no, otros se quedaron en el camino pero seguirán. Ana, Maribel, Lucia, Alfonso, Sonya, Laura, Rubén, Víctor, Dani, Óscar, María G, María S, Helena, Javi, Willy, Marina, Pablo, Miguel, por las charlas eternas acerca de la vida y milagros y por seguir ahí, pese a los largos fines de semana metida en el laboratorio de... "no se si podré llegar... "te llamo cuando salga". A Fedoua y Esther, por estar siempre dispuestas a echar una mano donde y cuando hiciera falta. A Alexis, de la Asociación Hombre y Territorio, por ofrecer siempre su colaboración con el coralito naranja, unas fotos, muestras, ideas...A Casimiro, por su paciente escucha y consejos inagotables. ¡Gracias por ayudarme a ver que "hay vida fuera de la tesis"!

A mi primo Curro, por las largas cenas de quejas y consejos sobre la vida y sus misterios. A mi familia de Granada, en particular a Pilar, Marili, Alfonso y Pedro, por alojarme y ayudarme en las idas y venidas a la costa.

Sin el apoyo administrativo de Ana del departamento de Ecología, no hubiera sabido que hacer con la tesis ¡gracias! por su paciencia inagotable con preguntas infinitas en los últimos meses de la tesis.

¡Gracias a tod@s!



*“No es el conocimiento, sino el acto de aprendizaje, y no la posesión,
sino el acto de llegar allí, que concede el mayor disfrute”
(Carl Friedrich Gauss)*

Índice

Resumen	1
Abstract	5
Introducción general	7
Objetivos de la tesis doctoral	37
<i>Astroides calycularis</i> (Pallas, 1766)	
Capítulos incluidos en la sección	39
Capítulo I	
Phenological and morphological responses of the Mediterranean coral <i>Astroides calycularis</i> to environmental conditions	41
Capítulo II	
Slight genetic differentiation between western and eastern limits of <i>Astroides calycularis</i> (Anthozoa, Scleractinia, Dendrophylliidae) distribution, inferred from COI and ITS markers	57
Capítulo III	
Development of microsatellite markers for the threatened orange coral <i>Astroides calycularis</i> (Scleractinia, Dendrophyllidae)	73
Capítulo IV	
Genetic assessment of population structure and connectivity in the threatened Mediterranean coral <i>Astroides calycularis</i> (Scleractinia, Dendrophylliidae) at different spatial scales	81
Supporting Information	107
<i>Cladocora caespitosa</i> (Linnaeus, 1767)	
Capítulos incluidos en la sección	115
Capítulo V	
Development of microsatellite markers as a molecular tool for conservation studies of the Mediterranean reef builder coral <i>Cladocora caespitosa</i> (Anthozoa, Scleractinia).	117
Capítulo VI	
Genetic structure and gene flow of the broadcast-spawning coral <i>Cladocora caespitosa</i> in the NW Mediterranean	129
Discusión general	151
Conclusiones generales	165
General conclusions	167
Referencias	169
Anexos	
Anexo I	185
Anexo II	187

Resumen

El objetivo general de la presente tesis es determinar la estructura genética y el alcance de la conectividad de las poblaciones de dos corales escleractinios del Mediterráneo, *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) y *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767). Estos procesos están generalmente ligados a diferentes características biológicas de las especies, tales como la densidad y distribución de las poblaciones, la fecundidad, el éxito reproductor, el tipo de desarrollo larvario, la capacidad de dispersión en cualquier etapa de su existencia, las variaciones demográficas y su interacción con otros factores bióticos y abióticos. Estos estudios son de gran utilidad a la hora de prever la respuesta de las poblaciones ante perturbaciones externas o frente al cambio global. Estas técnicas han sido principalmente aplicadas en el campo de las pesquerías, pero en la actualidad es creciente el número de trabajos que se centran también en el estudio genético de especies de invertebrados clave en determinados ecosistemas marinos. Los dos corales objeto de estudio en esta tesis son organismos modulares, bioconstructores, que albergan a su vez una gran diversidad de organismos asociados, tanto en los entresijos de su esqueleto de carbonato cálcico (e.g. pequeños poliquetos, crustáceos, moluscos, algas, organismos perforadores, esponjas, etc.) como en el interior de sus tejidos (e.g. zooxantelas en el caso de *C. caespitosa*, arqueas, bacterias, etc.), formando por tanto pequeños ecosistemas en sí mismos (de ahí que los corales se hayan denominado como “holobiontes”).

Para alcanzar este objetivo, se llevaron a cabo muestreos en distintas áreas del Mediterráneo occidental. En concreto para *A. calycularis* en el mar de Alborán, donde la especie presenta mayor concentración, con comparaciones en la cuenca argelina y mar Tirreno; y para *C. caespitosa* el trabajo se ha centró en poblaciones del mar balear y cuenca argelina. Se utilizaron marcadores moleculares universales, y se diseñaron marcadores microsatélite como herramienta fundamental para el presente estudio, dada la escasa variabilidad obtenida con los primeros marcadores mencionados. Asimismo, se ha ahondado en el conocimiento de la biología reproductora de *A. calycularis*, aspecto básico para la interpretación de los resultados genéticos obtenidos.

A partir del conocimiento obtenido con el uso de los marcadores microsatélite se han pretendido dilucidar el grado de variabilidad y el flujo génico de poblaciones de estas especies y la incidencia de posibles barreras oceanográficas (i.e. corrientes, remolinos, frentes). Los resultados de la presente tesis sugieren claramente que el grado de diferenciación genética y la conectividad entre las poblaciones de ambos corales depende principalmente del potencial de dispersión de sus plánulas, el cual viene principalmente determinado por el modo de reproducción sexual (fecundación interna-incubación- vs fecundación externa). *A. calycularis* y *C. caespitosa* son especies representativas de estos dos

modos de reproducción. En tres poblaciones de *A. calycularis* geográficamente distantes, las plánulas se han descrito como “reptantes” y con flotabilidad negativa, mostrando escasa capacidad de dispersión. Ello concuerda con los resultados genéticos obtenidos de las poblaciones de la especie, que sugieren un modelo de conectividad y flujo génico predominante de aislamiento por distancia tipo “paso a paso” (“stepping-stone”), con eventos esporádicos de dispersión a mayores distancias a través de corrientes y procesos de “rafting”. Por otro lado, la fecundación en *C. caespitosa* se produce en la columna de agua. A pesar del escaso conocimiento acerca de la biología de las plánulas de este coral, su modo reproductor y el alto grado de conectividad encontrado entre sus poblaciones sugiere que éstas pueden dispersarse a grandes distancias, probablemente arrastradas por las corrientes superficiales dominantes.

En lo que se refiere a la interacción de la fase larvaria de estos corales con barreras oceanográficas que puedan influir al flujo génico, se ha comprobado que el frente Almería-Orán parece actuar como una barrera en el caso de *A. calycularis*, en sinergia con su escasa capacidad de dispersión. Por otro lado, el frente balear y el canal de Ibiza no actúan como fuerte impedimento al flujo génico, aunque, en general, se ha observado un intercambio ligeramente superior de individuos en relación norte-sur y este-oeste.

Para el diseño de las áreas marinas protegidas (AMPs) y en el marco del debate actual sobre el diseño de una red de AMPs (pocas y grandes o muchas pequeñas), debe tenerse en cuenta la escala espacial de dispersión y conectividad de al menos las especies clave de los ecosistemas marinos, como son estos corales. En el caso de *A. calycularis*, se recomendaría la creación de micro-reservas, por lo tanto, favoreciendo su auto-reclutamiento y permitiendo la dispersión a áreas no protegidas. En el caso de *C. caespitosa*, se recomienda tener en consideración la escasa presencia de arrecifes mono-específicos de esta especie de cara a su conservación y el AMP idónea sería aquella que tuviera un tamaño suficiente como para proteger las localidades más ricas.

Los dos corales estudiados han sufrido una notable regresión durante el Pleistoceno y Holoceno, debido posiblemente a causas climáticas, agravada en la época actual por la acción humana, bien sea directa o indirectamente. *A. calycularis* ya cuenta con diferentes figuras de protección en diversas legislaciones nacionales e internacionales, lo que está permitiendo un mayor acercamiento de gestores y entidades interesadas en la conservación a la especie, además de un incremento en el número de estudios acerca de su biología básica y autoecología, así como a respuestas de este coral frente a ambientes cambiantes, los cuales son de gran utilidad a la hora de elaborar los planes adecuados de gestión activa de la especie para su conservación. Sin embargo, *C. caespitosa* no posee ninguna figura legal de protección, pese a estar incluida en la lista roja de especies de la UICN, y se cree que existen suficientes motivos para la

elaboración de las propuestas convenientes a los correspondientes estamentos, y su categorización como especie amenazada.

Estudios como los llevados a cabo en la presente tesis son primordiales a la hora de establecer planes de manejo y conservación, no ya sólo de las especies estudiadas, sino de otras especies con características biológicas y ciclos de vida similares, aportando estos resultados un modelo de aproximación a la conectividad de especies cuyas larvas tienen diferente potencial de dispersión.

Abstract

The main objective of this thesis is to provide knowledge about the genetic structure and extent of population connectivity in two endemic Mediterranean scleractinian corals, *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) and *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767). These processes are generally linked to different biological characteristics, such as density and population distribution, fertility, reproductive success, the type of larval development, dispersal ability at various life stages, demographic changes and its interactions with other biotic and abiotic factors. These studies are useful for predicting the response of populations that face external disturbances or global changes. Previously, these assessments were mainly restricted to the field of fisheries biology, but recently the number of studies focusing on the genetics of keystone invertebrate species in certain marine ecosystems has grown. The two corals studied here are considered modular organisms and bioconstructor species. They provide a habitat for a diversity of associated micro- and macrofauna, not only in the intricacies of their skeletons (e.g. small polychaetes, crustaceans, molluscs, algae, dwelling organisms, sponges, etc.), but also in their tissues (e.g. zooxantellae, archeas, bacteria, etc.), thereby forming small ecosystems themselves (thus, corals are also known as “holobionts”).

To achieve the main objective, different areas of the western Mediterranean Sea were sampled. Sampling for *A. calycularis* was primarily performed in the Alboran Sea, where the concentration of species is higher, with comparisons of samples from the Algerian Basin and Tyrrhenian Sea; *C. caespitosa* genetic studies focused on populations in the Balearic Sea and Algerian Basin. For genetic analyses, universal molecular markers were first used, but given the low variability obtained with these markers, microsatellite markers were designed as a basic tool for this study. The findings presented in this thesis also expand the knowledge of the sexual reproductive cycle of *A. calycularis*, which is important for the interpretation of the genetic analyses.

The data based on the analysis of microsatellite markers attempts to clarify the degree of variability and gene flow of populations of these species and the potential impact of oceanographic barriers (i.e. currents, eddy fronts). The results suggest that the degree of genetic differentiation and connectivity among populations of both corals depend mainly on the potential dispersal of their planulae, which is primarily determined by the species sexual reproductive pattern (internal fertilization/incubation vs. external fertilization). *A. calycularis* and *C. caespitosa* are representative species of these two different reproductive patterns. In three geographically distant populations of *A. calycularis*, the planulae were observed to be “crawling larvae” and as and acquiring negative buoyancy at the time of release, showing low dispersal abilities. This description is consistent with the genetic results obtained from the coral populations, which suggest a “stepping-stone”

pattern of connectivity and gene flow, with sporadic dispersal events at greater distances by currents and “rafting” processes. In contrast, the fertilization of *C. caespitosa* occurs in the water column (i.e. a broadcast spawner). Despite the lack of knowledge of the biology of *C. caespitosa* planulae, its reproductive mode and the high degree of connectivity found among populations suggest that its planulae are able to disperse over long distances, probably via the prevailing surface currents.

In terms of the interaction between the planulae of these corals and oceanographic barriers that influence gene flow, it was found that the Almería-Orán front appears to act as a barrier to dispersal in the case of *A. calycularis*, in synergy with its limited dispersal abilities. In contrast, the Ibiza Channel and Balearic Front do not act as strong impediments to gene flow; although in general, a slightly higher exchange of individuals from north to south and from east to west was observed.

The spatial scale of dispersal and connectivity of a keystone species, such as the corals studied in this thesis, should be taken into consideration for the design of marine protected areas (MPAs) and in the current debate of few large or many small (SLOSS). In the case of *A. calycularis*, the creation of micro-reserves is recommended, thus promoting self-recruitment and allowing the spread into non-protected areas. In the case of *C. caespitosa*, for their conservation, the scarcity of monospecific reefs should be considered; a suitable MPA would be one that is of sufficient size to protect the wealthiest localities.

These two corals have suffered significant regression processes during the Pleistocene and Holocene, possibly due to climatic causes, further aggravated by anthropogenic impacts. *A. calycularis* is currently catalogued under different national and international legislations, which allows managers and stakeholders interested in conservation to better understand this coral. Thus, the number of studies about its biology and auto-ecology and responses of the coral to changing environments have increased, which is useful for the active management and conservation of the species. Although included in the IUCN red list, *C. caespitosa* currently has no legal category of protection. However, there are sufficient reasons to consider it a threatened species. Thus, the development of appropriate proposals for the categorization of this species as threatened is recommended.

Studies such as those carried out in this thesis are paramount for establishing management and conservation plans, not only for the species studied, but also for other species with similar biological characteristics and life cycles. The results from this thesis provide a model approach for studying anthozoans species with different potential dispersals.

Introducción general

La presente tesis es una contribución al estudio genético de la estructura poblacional y conectividad de dos corales escleractinios endémicos del Mediterráneo, el coral naranja *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) y la madrepora mediterránea *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767), cuyas poblaciones han experimentado una alarmante regresión en épocas recientes. Para un mejor conocimiento de los procesos que influyen a estos parámetros poblacionales en el medio marino, es necesaria la comprensión del ciclo de vida de dichas especies, así como de los factores abióticos que puedan afectar a la conectividad entre sus poblaciones (i.e. corrientes superficiales y barreras al flujo génico). Los corales poseen un ciclo de vida sencillo que se caracteriza por una fase sésil de pólipo y una larva de vida libre, denominada larva plánula. Esta plánula es la principal causante de la conectividad entre poblaciones, así como la determinante de la estructura genética de éstas. El área de estudio abarca el Mediterráneo occidental. En la introducción que sigue se sintetizan las características físicas y oceanográficas del mar Mediterráneo, con especial hincapié en el Mediterráneo occidental. Se hace una introducción a los corales escleractinios del Mediterráneo y se exponen los antecedentes sobre el conocimiento de los corales objeto de estudio. Por último se hace un repaso de los marcadores y técnicas estadísticas utilizadas para la estructura poblacional y conectividad en especies de corales escleractinios, así como el interés de estas herramientas para la conservación y manejo de estas especies.

1. El mar Mediterráneo

El nombre de mar Mediterráneo, proviene del latín "*Mare Medi Terraneum*", utilizado por primera vez en el siglo III de la época tardorromana por Julius Solinus, Isidorus Origines y Guido de Pisa, y refleja la especial situación de este mar como "mar en el medio de las tierras", situado entre Europa, Asia y África (Hofritcher 2004). En la actualidad el Mediterráneo es un mar casi cerrado. Los límites de este mar comprenden en el extremo occidental el estrecho de Gibraltar, conexión del Mediterráneo con el océano Atlántico, de unos 12 km de ancho y una profundidad que no supera los 400 m. Por el extremo suroccidental, el Mediterráneo comunica de forma artificial con el mar Rojo por el canal de Suez, de unos 120 m de ancho y una profundidad media de 12 m. Por la parte nororiental termina en el mar Negro el cual se conecta con el resto del Mediterráneo por el mar de Mármara. Las tres grandes cuencas marinas que conforman el Mediterráneo en la actualidad son el mar Negro, el Mediterráneo occidental y el Mediterráneo oriental, las cuales ocupan un total de 2.969.000 km² con profundidades medias de 1.460 m, y máximas de 5.267 m (Coll et al. 2010).

El déficit hídrico es negativo en toda la cuenca, sobre todo en la oriental, con una evaporación que excede los aportes fluviales y pluviales. Ello provoca un descenso

del nivel del mar de oeste a este que es compensado por la continua entrada de agua atlántica, más fría y menos salina, que circula hacia el este, aumentando progresivamente su salinidad y temperatura (Bas 2009). Por tanto, la circulación general termohalina del Mediterráneo está determinada por la corriente entrante de agua atlántica por el estrecho de Gibraltar y por el hundimiento de las aguas que se forman en las tres áreas más frías de esta cuenca, el golfo de León, el norte del Adriático y norte del Egeo.

La temperatura superficial del agua presenta un notable cambio estacional y también un gradiente creciente hacia el este. La temperatura invernal en la cuenca occidental oscila entre los 12°C y los 14°C, mientras que en el extremo oriental no baja de los 18°C. En verano la temperatura alcanza normalmente entre 22 y 26°C en la cuenca occidental, dependiendo de las zonas, y supera esa temperatura en la oriental. Por otro lado, una característica muy notable del Mediterráneo, en comparación con el Atlántico, es la alta homotermia de sus aguas por debajo de los 250-300 m de profundidad, con una temperatura que no baja de los 13°C. En definitiva, el Mediterráneo puede calificarse como un mar templado-cálido, con elevada salinidad, alta irradiancia (un 20% superior a la de latitudes similares en el Atlántico oriental), aguas transparentes y oligotróficas, con fuertes oscilaciones estacionales de la temperatura, con la aparición de una marcada termoclina estival y una homotermia en torno a los 13°C por debajo de 250 m.

La biota marina actual del Mediterráneo, surge de la interacción entre factores ecológicos, pero también históricos, como son las oscilaciones del clima y del nivel del mar, el cierre y la abertura de puentes geográficos o conexiones globales y las diferentes direcciones de colonización que de ellos resultan. Todo ello hace que en el Mediterráneo aparezcan especies de origen atlanto-mediterráneo, cosmopolitas y lesepianas, así como endemismos propios de este mar (Bianchi & Morri 2000). El Mediterráneo se considera como uno de los "hot spot" de biodiversidad marina a nivel mundial, con una mezcla de elementos subtropicales y templados y un gran porcentaje de especies endémicas (Fredj et al. 1992). Una reciente revisión (Coll et al. 2011) ha puesto de manifiesto que se conocen en este mar cerca de 10.000-12.000 especies marinas, de las cuales 8.500 son macroscópicas y 1.300 son especies vegetales. Esta biodiversidad representa el 8-9% del número total de especies de los mares y océanos mundiales.

En función de su origen, Bianchi & Morri (2000) o Boudouresque (2004) distinguen varias categorías corológicas entre las especies mediterráneas:

- ▶ *Endemismos*. Especies que viven exclusivamente en este mar y que suponen el 28% de las especies. Pueden ser *paleoendemismos*, si corresponden a especies que han sobrevivido a la crisis del Messiniense (en refugios en el Atlántico próximo o dentro del mismo Mediterráneo), o *neoendemismos* surgidos por procesos de especiación dentro del Mediterráneo durante el Plio-Pleistoceno.
- ▶ *Especies atlanto-mediterráneas* propias de aguas templadas, que comprenden más la mitad de las especies que hoy pueblan este mar, procedentes

originariamente del Atlántico próximo con posterioridad a la crisis del Messiniense. La dominancia de este componente corológico determina que el Mediterráneo se considere como una provincia de la región Biogeográfica denominada Atlanto-Mediterránea.

- *Especies atlánticas subtropicales*, relictas de la antigua fauna senegalense o de reciente establecimiento en el Mediterráneo como consecuencia de su desplazamiento hacia el norte debido al calentamiento del mar.
- *Especies atlánticas boreales*, que penetraron en el Mediterráneo en los periodos glaciales y han permanecido en algunos refugios de su vertiente norte o en las aguas profundas.
- *Especies cosmopolitas o panoceánicas*, de amplia distribución y de origen incierto.
- Especies introducidas en la época actual por la acción humana. La mayor parte de ellas son de origen indo-pacífico y han penetrado en el Mediterráneo a través del canal de Suez (*migración lessepsiana*).

1.1. El Mediterráneo occidental

La cuenca Mediterránea occidental, cubre unos 860.000km². Está físicamente delimitada del Mediterráneo oriental por el estrecho de Mesina (que se extiende hasta los 400m de profundidad entre Túnez y Sicilia), y del océano Atlántico por el estrecho de Gibraltar (Margalef 1997). La mayor profundidad que alcanza esta cuenca son 3.700m. Tiene una salinidad de 38,5% en las aguas profundas, y un poco menor en las superficiales. La temperatura de las aguas profundas alcanza los 13°C, y es relativamente constante durante todo el año, mientras que la temperatura de las aguas superficiales varía de los 13°C en invierno a los 26°C en verano (Margalef 1997).

De acuerdo con la Organización Hidrográfica Internacional, esta subregión del Mediterráneo se subdivide en las siguientes masas de agua (Fig. 1): el estrecho de Gibraltar, el mar de Alborán, el mar Balear, el mar de Liguria y el mar Tirreno.

Por otra parte Bianchi (2007) destaca 13 sectores biogeográficos en todo el Mediterráneo, de los cuales 6 pertenecen al Mediterráneo Occidental (Fig. 1). Éstos son:

- *Mar de Alborán*. Caracterizado por la fuerte influencia del agua atlántica entrante. Delimitado por el extremo oriental por el frente Almería-Orán. Comparte afinidades faunísticas con el océano Atlántico, debido a la continua entrada de fauna y flora de este océano con la corriente atlántica.
- *Cuenca argelina*. Constituye el sector más cálido del Mediterráneo occidental y abarca las costas de Argelia y Túnez, hasta el Cabo Bone, y las del sureste español, entre el Cabo de Gata (Almería) y el Cabo de la Nao (Alicante). Presenta un carácter predominantemente oceánico debido a su estrecha plataforma continental. Todavía se puede reconocer una cierta afinidad faunística con

el mar de Alborán, y con las especies atlanto-mediterráneas, mezclándose elementos termófilos del Mediterráneo y atlánticos.

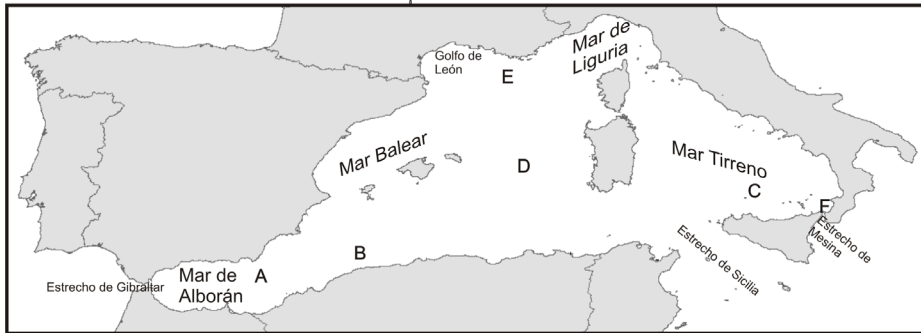


Figura 1. Delimitación de los mares del Mediterráneo occidental y de los sectores biogeográficos (modificado de Bianchi 2007). A, mar de Alborán; B, cuenca argelina, costas de SE de la Península Ibérica y costas de Argelia y Túnez; C, mar Tirreno; D mar Balear y mar de Cerdeña; E, golfo de León y mar de Liguria; F, estrecho de Mesina

- *Mar Tirreno.* Presenta unas características intermedias o de transición entre el resto de los sectores. Queda muy bien delimitado entre las costas del oeste de Italia y las grandes islas de Córcega, Cerdeña y Sicilia. Aparecen especies típicamente mediterráneas, atlanto-mediterráneas y subtropicales. Esta región presenta un carácter marcadamente oceánico. Aquí coinciden las corrientes del Atlántico y aquellas en dirección al Atlántico, produciendo fuertes movimientos hídricos. La hidrología del mar Tirreno se caracteriza por las aguas profundas orientales, cálido y con sal, y en menor grado por las aguas superficiales atlánticas.
- *Mar Balear.* Ocupa una posición central, dentro de la cuenca occidental, y presenta unas características intermedias o de transición entre los demás sectores.
- *Golfo de León y mar de Liguria.* Es el sector más septentrional y frío de la cuenca occidental. Presenta un marcado carácter oceánico debido a la estrecha plataforma continental. En consecuencia, viven relativamente cerca especies atlanto-boreales y subtropicales.
- *Estrecho de Mesina.* Sirve como barrera entre el Mediterráneo occidental y oriental. Se han hallado endemismos locales y remanentes atlánticos.

La circulación en el Mediterráneo occidental es claramente termohalina, provocada por las diferencias de temperatura y densidad existentes. Las tres capas de aguas descritas se mueven independientemente a lo largo de toda la cuenca, aunque, como ya se ha indicado, hay algunos procesos de mezcla entre capas. En general, el agua entrante desde el Atlántico sufre un movimiento hacia el este y por el contrario el agua levantina intermedia, y el agua profunda del Mediterráneo

occidental sufren un movimiento hacia el oeste. Sin embargo, debido a la fuerza de Coriolis, las capas tienden a tener movimientos ciclónicos desde el punto de entrada del agua (estrecho de Gibraltar en el caso de agua atlántica y las “fuentes de agua profunda” para las otras dos capas).

La masa de agua contenida en la cuenca occidental del Mediterráneo se compone de tres capas caracterizadas por diferencias en temperatura y salinidad (Millot 1999):

- *Agua atlántica*, que penetra través del estrecho de Gibraltar. La temperatura de estas aguas cerca del estrecho de Gibraltar oscila entre los 15.0-20.0°C, variando en función de la época del año, y su salinidad entre 36.0-36.5%. Conforme va avanzando esa masa de agua por el Mediterráneo se mezcla con la capa inmediatamente inferior dando lugar al Agua Atlántica Modificada, de salinidad algo superior.
- *Agua intermedia*, constituida por dos capas de diferentes características:
 - Agua Intermedia Levantina*, formada durante el periodo invernal en Mediterráneo Oriental entre Rodas y Chipre y que va penetrando en la cuenca occidental a través del Estrecho de Sicilia. Esta capa se sitúa entre los 200 y 600m de profundidad y se caracteriza por ser la que alcanza mayores valores de temperatura y salinidad. Posee valores de temperatura alrededor de los 14,0°C y salinidad de 38,8% (Font 1987).
 - Aguas intermedias locales*, formadas cerca de la pendiente continental en las zonas del norte de la cuenca (mar Balear, golfo de León, riviéra Francesa). Son menos densas que las anteriores y se sitúan entre los 50-200m de profundidad. La temperatura de esta capa alcanza los 12,5-13,0°C y una salinidad alrededor de 38,0%. En las zonas del sur no es fácil encontrar este segundo tipo, debido que el enfriamiento invernal no es tan fuerte. Se tiene entonces, en esas zonas, un gradiente de masas de agua que van desde las aguas superficiales a las del agua intermedia levantina.
- *Agua profunda mediterránea*, masa de agua de características constantes en toda la cuenca por lo que es considerada como “agua tipo”. Los valores de temperatura y salinidad son de 13,0° y 39,0% respectivamente. En lo que se refiere al Mediterráneo occidental este tipo de agua se forma en la zona noroccidental del mismo.

Circulación general de las corrientes en el Mediterráneo occidental

La circulación general en el Mediterráneo occidental (Fig. 2) puede sintetizarse de la siguiente manera: la entrada de agua del Atlántico a través del estrecho de Gibraltar conlleva un patrón de circulación de corrientes que más al este afectan a todo el Mediterráneo. Esta corriente entrante fluye con una velocidad que puede superar el metro por segundo, pero que va disminuyendo en su avance al tiempo

que se ensancha. Por debajo de esta vena entrante, se desplaza en sentido contrario un flujo difuso y lento de agua del Mediterráneo más densa (alrededor de 38‰), que supone un volumen de salida de unos 36.000 km³ de agua al año. La consecuencia de este intercambio de masas de agua a través del estrecho de Gibraltar es la renovación del agua mediterránea, que tarda unos 100 años en completarse en su totalidad. El mar de Alborán se considera como la antesala que da paso al mar Mediterráneo desde el océano Atlántico. Está configurado como un corredor marino de unos 170 km de ancho situado entre el sur de la Península Ibérica y el norte de África. Ocupa un área de unos 54.000 km², con una profundidad máxima cercana a los 1.500 m en su cuenca occidental y unos 2.000 m en la oriental, ambas separadas por una cordillera submarina que se extiende en dirección suroeste-noreste. Hacia el este se abre a la denominada cuenca argelina. La corriente de agua atlántica superficial se dirige inicialmente hacia el noreste, debido a la propia configuración topográfica del estrecho de Gibraltar, y posteriormente gira hacia el sur, dando lugar a un gran remolino anticiclónico de carácter permanente en la cuenca occidental del mar de Alborán, conocido como el giro de Alborán (Hopkins 1989; Robinson et al. 2001). Como consecuencia de este giro se producen a lo largo de las costas de noroccidentales de la Península Ibérica afloramientos de aguas más profundas y frías. Estos afloramientos son más evidentes en los meses estivales, cuando el contraste termal es mayor (La Violette 1984). Se ven potenciados cuando los vientos del oeste soplan de tierra hacia el mar, empujando mar adentro las capas superficiales de agua (Sarhan et al. 2000). Tras el giro de Alborán, la mayor parte de esta masa superficial de agua pasa por el sur de la isla de Alborán y se divide en dos ramas, una en dirección noroeste, formando un segundo remolino anticiclónico de carácter más inestable; y la segunda en dirección noreste, hacia las costas orientales de Baleares y costa occidental de Córcega y Cerdeña, llegando hasta el golfo de Nápoles, desde donde se vuelve a dirigir hacia la costa francesa meridional y costas del Levante del litoral español. En el mar de Alborán, el agua atlántica que llega al Cabo de Gata (ya bastante modificada) se encuentra con una corriente mediterránea de dirección suroeste, que circula en paralelo a las costas levantinas, lo que origina un flujo de agua en dirección a Orán (en la costa argelina), denominado frente Almería-Orán (Tintoré et al. 1988). Dicho frente tiene una longitud de unos 200 km, abarca una capa superficial de unos 300 m y presenta un fuerte gradiente horizontal de densidad. El frente Almería-Orán, constituye el límite oriental del mar de Alborán y marca en las costas del sureste español el límite de la zona de fuerte influencia atlántica, lo que tiene su reflejo en los límites de distribución de numerosas especies atlánticas o mediterráneas (véase, por ejemplo, Cebrián & Ballesteros, 2004). Dicho frente es visible desde el aire, o incluso desde la cubierta de un barco, pues se producen aquí fenómenos de ruptura del oleaje, corrientes, acumulación de detritos, etc. En estas zonas de contacto de masas de aguas de distintas características tiene lugar una gran actividad y producción biológica, por lo que es frecuente que se concentren aquí muchas aves

marinas. Asimismo, se ha demostrado que este frente puede constituir una barrera importante para la dispersión de muchas larvas planctónicas y, por consiguiente, para el flujo génico (véase la revisión de Patarnello et al. 2007).

Al llegar a las costas africanas, parte de las aguas atlánticas pueden quedar retenidas en un segundo giro, pero el resto continúa en dirección este para formar la corriente argelina, con carácter inestable y formadora de numerosos remolinos y meandros que alcanza el canal de Cerdeña. Por otro lado, esta corriente recorre los litorales argelino y tunezino, en donde se vuelve a subdividir en otras dos ramas, una que se dirige hacia el resto del Mediterráneo y otra que se adentra en el mar Tirreno.

La corriente del norte, está formada por agua atlántica modificada proveniente del este y oeste de Córcega, que se une en la cuenca del mar de Liguria, otro frente oceanográfico. Esta corriente fluye hacia el sur de la Península Ibérica y se divide en dos ramas a la altura del canal de Ibiza, una de ellas vuelve en dirección noroeste dando lugar a la corriente Balear, y la otra sigue hacia el sur encontrándose con la corriente argelina (Pinot et al. 2002). El canal de Ibiza se ha identificado como una barrera al flujo génico para las especies *Paramuricea clavata* (Mokthar-Jamaï 2011) y *Serranus cabrilla* (Schunter et al. 2011). Cerca de las Islas Baleares se forma un frente escalonado y de carácter termohalino, generado por los remolinos anticiclónicos de la corriente argelina y la corriente del norte, el frente Balear (García et al. 1994). Este frente se ha visto que actúa como barrera al flujo génico en varias especies de peces (revisado en Galarza et al. 2009). La corriente del norte es de carácter estacional, en invierno sobre todo fluye a lo largo de las costas orientales de la Península Ibérica, mientras que durante los meses estivales, esta corriente se desvía hacia las Baleares dando lugar a un remolino anticiclónico entorno a estas islas.

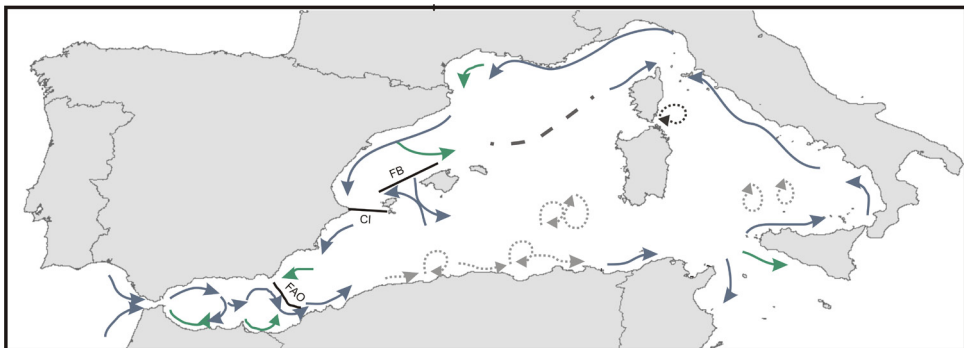


Figura 2. Esquema del sistema general de corrientes del mediterráneo occidental. Flechas azules, circulación principal/permanente. Flechas verdes, circulación secundaria/ recirculación. Flechas grises, inestabilidad de las corrientes, remolinos y meandros. Modificado de Millot 1999). Se indican los dos frentes termohalinos presentes en esta región del Mediterráneo: el frente Almería-Orán (FAO) y el Frente Balear (FB), además del canal de Ibiza (CI).

2. Corales escleractinios del Mediterráneo

La clase Anthozoa es la más conocida dentro del filo Cnidaria. Esta clase incluye corales pétreos, anémonas, abanicos y plumas de mar. Está dividida en dos subclases, Hexacorallia o Zoantharia y Octocorallia o Alcyonaria, ambas divididas en varios órdenes (Daly et al. 2007). El orden Scleractinia, corales comúnmente denominados corales pétreos por poseer un esqueleto externo formado por carbonato cálcico, se caracteriza por tener un número de septos de 6 o múltiplo de 6. La mayor parte de las especies de este orden tienen una simetría hexámera, pero también son comunes especies con simetría hecta- y decamera (Rupert & Barnes 1996).

Los orígenes de los corales escleractinios y arrecifes en el Mediterráneo derivan de tiempos pasados ya que los ecosistemas marinos tropicales, incluyendo los arrecifes de coral, desaparecieron del Mediterráneo durante el Plioceno, con el comienzo de las glaciaciones. Las formaciones más antiguas han sido datadas del Triásico (hace 200 m.a.), cuando el Mediterráneo formaba parte del mar Tetis (Bianchi & Morri 2002). Las formaciones del Paleoceno y Eoceno, estaban dominadas por las familias Poritidae, Actinacidae, Acroporidae y Faviidae (Budd et al. 1996). Durante el Oligoceno, dominaba el género *Acropora*, recientemente presente en regiones tropicales del mar Rojo y en el Pacífico occidental (Schuster 2000). Durante el Mesiniense (Mioceno Tardío, hace 6 m.a.), todavía existían arrecifes de los géneros *Porites*, *Tarbellastrea*, *Siderastrea*, *Plesiastrea*, *Favites*, *Stylophora* y *Acanthastrea*. Estos arrecifes estaban formados por un número limitado de especies, llegando a ser monoespecíficos en algunas ocasiones (Budd et al 1996). La baja diversidad de especies y la baja tasa de crecimiento estimada a finales de esta época indican que las condiciones en aquella época se encontraban en el límite de las requeridas por los arrecifes de coral (Brachert et al. 2007). También en este periodo dio lugar la denominada crisis salina del Mesiniense. En este periodo se produjo el cierre del estrecho de Gibraltar, interrumpiéndose la comunicación con el Atlántico. Ello convirtió al mar Mediterráneo en una cuenca cerrada y con un balance hídrico negativo, lo que condujo a una progresiva desecación de este mar y a la extinción de los arrecifes de coral y un gran número de otras especies marinas. Con la reapertura del estrecho de Gibraltar (hace unos 5,3 m.a.), el Mediterráneo volvió a poblarse con especies procedentes del Atlántico próximo. En este periodo los arrecifes no volvieron a asentarse de nuevo, pero se aparecieron otras formas coralinas de gran diversidad para este mar, así se menciona ya desde el año 1874 (coincidiendo con el segundo viaje de Darwin), en el que una de las más importantes revistas españolas, la Revista Europea, publicó el artículo "Las islas de coral y sus arquitectos" (Allmann 1874). En este artículo se mencionan corales no formadores de arrecifes, para demostrar que no todos son formadores de arrecifes!. Entre otros, incluye géneros como *Caryophyllia*, y *Dendrophyllia*, así como al coral rojo *Corallium rubrum*. Actualmente, más de 200 especies de antozoos habitan el mar Mediterráneo. Algunas de estas especies son endémicas, mientras que otras tienen

un origen subtropical. Otras son comunes en zonas árticas o cosmopolitas. Entre éstas, se han llegado a describir un total de 33 especies pertenecientes a la familia Scleractinia.

Los corales escleractinios son excelentes indicadores de las condiciones climáticas, presentan un buen registro fósil y, por tanto, constituyen archivos paleoclimáticos. Por medio del estudio de los isótopos estables de sus esqueletos se puede obtener información sobre las condiciones pasadas (e.g. Montagna et al. 2007). Por otro lado, episodios recientes de mortandades masivas de invertebrados sésiles con motivo de calentamientos anormales han afectado también a algunos corales escleractinios (Pérez et al. 2000; Rodolfo-Metalpa et al. 2005; Garrabou et al. 2009). Todo ello los convierte en un objetivo idóneo para inferir la historia reciente del Mediterráneo y para evaluar los efectos de los cambios acelerados que se están produciendo en la actualidad.

A continuación se detalla el conocimiento actual acerca de los dos corales objeto de estudio: *Astroides calycularis* y *Cladocora caespitosa*. Ambos corales son especies clave de los ecosistemas del Mediterráneo y se caracterizan por ser organismos modulares y el potencial de formar bioconstrucciones, las cuales albergan gran diversidad de flora y fauna asociadas, tanto en las cavidades del esqueleto calcáreo (e.g. pequeños poliquetos, algas, organismos perforadores, esponjas, etc.) como en el interior de los tejidos (e.g. zooxantelas en el caso de *C. caespitosa*, arqueas, bacterias, etc.). Esto ha llevado a que algunos autores hayan denominado a los corales como “holobiontes”, por formar pequeños ecosistemas en si mismos.

2.1. El coral naranja *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) (Scleractinia, Dendrophylliidae)



A. calycularis es un coral escleractinio colonial que se caracteriza por el color fuertemente anaranjado del cenosarco y pólipos. Cada pólipo tiene unos 30 tentáculos. El esqueleto calcáreo es de color blanco. Cada cáliz presenta unos 30 septos o tabiques radiales muy estrechos que se unen en un eje central (columela) ancho y poroso. Tanto los septos como la columela no sobresalen de los cálices.

Pertenece a la familia Dendrophylliidae y estudios filogenéticos recientes (Cairns 2001; Cuif et al. 2002) lo sitúan próximo a los géneros *Balanophyllia*, cosmopolita, y *Tubastrea*, típico de mares tropicales. Morfológicamente se asemeja más a este último género, por tratarse de corales coloniales de colores llamativos (Zibrowius 1995). La especie geográficamente más próxima de este

género es *Tubastrea coccinea* (Lesson, 1829), circumtropical, que está presente en las islas de Cabo Verde.

Las colonias de este coral, muestran dos morfologías diferentes, dependiendo del hábitat y su exposición al hidrodinamismo (Kruzic et al. 2002). Cerca de la superficie (elevado hidrodinamismo), se encuentran colonias con morfología “masiva”, con cálices poligonales. En este morfotipo, los nuevos pólipos se producen por gemación en la parte externa de las colonias y entre los pólipos ya existentes. Por otro lado en lugares de menor hidrodinamismo, e.g. grandes profundidades, cuevas y salientes, las colonias tienen una morfología “ramificada” con corallitos mostrando un cáliz circular. En estas colonias, el mismo pólipo puede producir yemas a diferentes alturas del cáliz.

A. calycularis es una especie azooxantelada que, a pasera de no tener preferencia por lugares luminosos (Zibrowius 1983), no puede considerarse una especie fotófila. Muestra preferencia por zonas muy oxigenadas y protegidas de la incidencia directa de los rayos solares. Se instala sobre sustratos rocosos verticales o casi verticales, principalmente en niveles superficiales, pero puede extenderse hasta unos 40 m de profundidad. Es muy frecuente en extraplomos y en la entrada de cuevas. Donde las condiciones le son más favorables, *A. calycularis* puede ser la especie dominante en el recubrimiento del sustrato (Zibrowius 1995). En algunas localidades del Estrecho de Gibraltar, esta especie se ha llegado a encontrar en abundancia hasta los 60m de profundidad (Ocaña et al. 2009).

El ciclo de reproducción de la especie, ha sido caracterizado por Goffredo et al. (2010, 2011) en una localidad del mar Tirreno. La especie se ha sido descrita como gonocórica a nivel de pólipo y de colonia y con fecundación externa (incubadora). Esto contradice la información obtenida por el naturalista Lacaze-Duthiers (1873) en Argelia, el cual, tras observaciones bajo la lupa de pólipos de la especie, concluye que esta es hermafrodita a nivel de colonia, encontrando pólipos que también poseían gametos masculinos y femeninos. Según Goffredo et al. (2010 y 2011), el periodo de maduración gonadal se ha visto que corresponde con los meses de noviembre a mayo. Así pues, las colonias masculinas expulsan los gametos a finales de primavera y comienzos de verano, coincidiendo con el periodo de incremento de la temperatura del mar, y la planulación se produce en junio. La larvas plánula de la especie, de forma cilíndrica y algo aplanada dorsoventralmente, se caracterizan por poseer una flotabilidad negativa y un comportamiento demersal, reptando por el sustrato rocoso hasta encontrar un lugar donde asentarse y formar la colonia. La formación de la colonia a partir del pólipo original se da por gemación de éste una vez asentado en el sustrato (Goffredo et al. 2010, Lacaze-Duthiers 1873).

En la presente tesis se aborda el estudio del periodo maduración de los gametos de este coral en las costas del mar de Alborán.

Distribución

A. calycularis se ha categorizado como indicadora de oscilaciones climáticas durante el Cuaternario. Durante el Pleistoceno, esta especie se encontraba ampliamente distribuida a lo largo de la cuenca del Mediterráneo occidental, como se ilustra con el descubrimiento de especímenes fósiles en tres localidades del Mediterráneo noroccidental (Zibrowius 1995). Tras las glaciaciones del Pleistoceno que disminuyeron la temperatura del agua, la especie desapareció del norte del mar Mediterráneo (Pérès 1967) (Figura 3).

En la actualidad, este coral, se encuentra en las costas del mar Tirreno, desde el estrecho de Messina hasta el golfo de Nápoles, en Sicilia e islas del canal de Sicilia, en Malta y Por el norte de África se extiende desde las costas atlánticas de Marruecos hasta el cabo Bone, en Túnez (Templado et al. 2004). En las costas españolas se distribuye desde el cabo de Gata, en Almería, hasta el estrecho de Gibraltar (Templado et al. 2004; Moreno et al. 2008b). Existen algunas colonias aisladas más al norte, hasta el cabo de Palos, en Murcia, y en algunos puntos de las costas atlánticas de Cádiz. Es también abundante en la isla de Alborán, Ceuta, Melilla y en las islas Chafarinas. En fechas recientes la especie parece estar desplazándose hacia el noreste y ha sido citada en algunos puntos del Adriático hasta Venecia (Grubelic et al. 2004; Bianchi 2007; Casellato et al. 2007). De acuerdo con estos autores la reciente expansión del rango de distribución de la especie hacia el Adriático puede deberse al calentamiento global y a la corriente ciclónica del Jónico que favorecería el flujo de las larvas a lo largo de las costas croatas (Fig. 3).



Figura 3. Área de distribución actual de *Astroides calycularis* (líneas negras costeras). +=Citas fósiles del Pleistoceno. Triángulos negros= citas recientes de colonias fuera de la distribución conocida : isla del Giglio (Italia); islas y costas de Croacia; Rota (Cádiz) y Huelva (costa atlántica de la Península Ibérica). Triángulos blancos= citas históricas (1899 y 1904) no confirmadas en las décadas recientes (Grubelic et al. 2004). Modificado de Bianchi (2007).

Estado de protección

La reciente regresión de la especie en el Mediterráneo parece responder a causas naturales, y se ve agravada por la destrucción de muchos roquedos costeros de las áreas donde habita. Además, el buceo recreativo, la pesca tradicional y la colecta de especímenes con fines decorativos, además de recolección ilegal del comúnmente denominado “datil de mar” (*Litophaga lithophaga*) que habita en el interior de paredes y bloques rocosos, son otras causas añadidas que inciden en su progresiva desaparición (Moreno et al. 2008b).

En la Tabla 1, se detalla un listado de las figuras de protección de la especie.

Tabla 1. Estado de protección de *Astroides calycularis*

Convención	Organismo	Implementación geográfica	Estatus
Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES)	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP)	Global	Apéndice II. Especies que no están necesariamente amenazadas de extinción pero que podrían llegar a estarlo a menos que se controle estrictamente su comercio y “especies semejantes”, es decir, especies cuyos especímenes objeto de comercio son semejantes a los de las especies incluidas por motivos de conservación
Convenio de Barcelona. Convenio para la protección del Mediterráneo de la contaminación	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP)	Mediterráneo	Protocolo sobre las zonas especialmente protegidas y la diversidad biológica en el Mediterráneo. Anexo II Lista de especies en peligro o amenazadas.
Convenio de Berna. Convenio relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural en Europa	Comunidad Europea	Europa+Global	Apéndice II. Especies animales estrictamente protegidas
Catálogo español de especies amenazadas (RD 139/2011)	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (España)	España	Vulnerable
Libro Rojo de las especies amenazadas de Andalucía	Junta de Medio Ambiente de Andalucía	Andalucía	Vulnerable

2.2. La madrepora mediterránea *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767) (Scleractinia, Caryophylliidae)



C. caespitosa es uno de los pocos corales escleractinios del Mediterráneo que posee zooxantelas como simbiontes. Tradicionalmente, la especie ha sido incluida en la familia Faviidae, una de las más importantes en los arrecifes de coral. Sin embargo, estudios moleculares recientes, han incluido a este coral en la familia Caryophylliidae (Romano and Cairns 2000, Cairns et al. 2001). Por otro lado, recientemente Fukami et al. 2008, posi-

ciona al género *Cladocora* en la familia Oculiniidae.

Fisiológicamente, *C. caespitosa* es similar a las especies tropicales formadoras de arrecifes, ya que es una especie zooxantelada y colonial, capaz de formar extensas bioconstrucciones (Zibrowius 1980). Dado que no es una especie que contribuya a la formación de arrecifes poliespecíficos, *C. caespitosa* fue inicialmente inicialmente clasificada como coral ahermatípico por Schumacher & Zibrowius (1985). A pesar de ello dada las similitudes que muestra con los típicos corales tropicales formadores de arrecifes, así como el registro fósil existente, Aguirre & Jiménez (1998) y Kruzic & Benkovich (2008) lo consideran como el único coral escleractinio capaz de formar arrecifes monoespecíficos en el Mediterráneo.

Este coral crece sobre cualquier tipo de sustrato duro, preferentemente en ambientes someros, bien iluminados y donde no existe una sedimentación intensa (Templado et al. 2002). En lugares de aguas muy claras puede extenderse hasta unos 40 m de profundidad. Algunos aspectos de la biología de esta especie han sido estudiados por Valls (1989), Schiller (1993) o Peirano et al. (1998, 1999 y 2001).

La energía aportada por la acción fotosintética de las zooxantelas simbiontes contribuye a la formación de carbonato cálcico y posibilita, por tanto, un crecimiento más rápido del coral. Estas zooxantelas son algas unicelulares dinoflageladas, pertenecientes al género *Symbiodinium* (Dynophyceae). El clado o linaje que se ha descrito como simbionte de *C. caespitosa* es el "Templado A" (Visram et al. 2006). Aparte de este aporte de energía autótrofa, este coral también posee, como otros corales, un mecanismo de alimentación heterótrofa, a través de la secreción de mucosidades, que en *C. caespitosa* es muy elevada y parece tener una doble función, por un lado alimenticia y, por otro, como mecanismo limpiador de las partículas de sedimento. Schiller (1993) señala que la energía aportada por las zooxantelas constituye cerca del 70% del total durante los meses de invierno, pero desciende hasta alrededor del 40% en verano. Sin duda, esta proporción variará también con la profundidad. En las colonias asentadas a mayores profundidades, el crecimiento del coral es más lento, pues la actividad fotosintética del simbionte es muy escasa. Los estudios realizados sobre el patrón de bandas detectado por

rayos X estiman el crecimiento vertical de los coralitos entre 1,5 y 4 mm al año, bajo condiciones normales de temperatura e irradiancia (Peirano et al. 1999 y 2004). Según Peirano et al. (2001) este coral es uno de los mayores productores de carbonatos de Mediterráneo, con unos valores de producción de entre 1,1 y 1,7 kg de CaCO_3/m^2 y año. Por otro lado, la utilidad del estudio de los elementos isotópicos del esqueleto de este coral como archivo climático de alta resolución ha sido puesta de manifiesto por Silenzi et al. (2005) y Montagna et al. (2009).

La morfología de sus colonias es muy variable, dependiendo de las condiciones del medio, desde formas incrustantes, en lugares con fuerte hidrodinamismo, hasta formas masivas, e incluso arbustivas, en zonas calmadas (Schiller 1993), pudiendo alcanzar gran tamaño (colonias de más de 1 m de diámetro y más 0.5 m de altura). Lo más frecuente es que presente morfologías almohadilladas o semiesféricas. Los coralitos que componen la colonia crecen en vertical, pueden sobrepasar los 20 cm de largo en las colonias más viejas, oscilando su diámetro entre unos 4-6 mm, y se disponen muy densamente apretados, aunque sin fusionarse unos a otros. El color del esqueleto es blanco sucio, mientras que los pólipos muestran una tonalidad pardo verdosa, debido a la presencia de las zooxantelas.

En aquellos lugares donde *C. caespitosa* es abundante, sus colonias pueden encontrarse formando dos tipos de agrupaciones: 1) colonias abundantes pero con cierto grado de aislamiento entre ellas, a las cuales Peirano et al. (1999) denominaron como "beds" (lechos), y por otro lado, 2) formaciones de mayor envergadura, con colonias agrupadas en contacto unas con otras, que pueden llegar a cubrir superficies de varios metros cuadrados y medir unos cuantos decímetros en altura, a las que los autores anteriores denominaron como "banks" (bancos o arrecifes). Obviamente, entre ambas situaciones pueden encontrarse combinaciones intermedias.

Algunos aspectos de la biología reproductora de este coral se han descrito en las costas del Adriático (Kruzic et al. 2008) y en el mar Balear en las Islas Columbretes (Casado 2011). Kruzic et al. (2008), describe a la especie en las costas del Adriático como hermafrodita y con fertilización externa, observaciones echas *in situ* concluyen que las colonias expulsan gametos masculinos y femeninos al comienzo del verano coincidiendo con un incremento en la temperatura del agua y relacionado con el ciclo lunar. En las Islas Columbretes (Casado 2011), este coral presenta una condición sexual gonocórica a nivel de pólipo y colonia, y con un periodo de maduración gonadal de agosto a octubre. Además, eventos de reproducción asexual por expulsión del cáliz en ambientes fluctuantes han sido descritos (Kruzic 2007).

Distribución

C. caespitosa se considera parte de la historia fósil del mar mediterráneo (Fig. 4). Se trata de una especie endémica del Mediterráneo, donde en épocas pasadas llegó a formar auténticos bancos de coral en algunas zonas (Kühlmann 1996; Bernasconi

et al. 1997; Aguirre & Jiménez 1998; Peirano et al. 2009), que pueden considerarse como remanentes de los verdaderos arrecifes de coral. Los bancos de *C. caespitosa* más antiguos conocidos, ahora emergidos, han sido hallados en las cercanías de la bahía de Almería (Aguirre & Jiménez 1998) y datan del Plioceno Superior (hace unos 2 m.a.). Durante el Cuaternario este madreporario era muy frecuente por todo el Mediterráneo (Peirano et al. 2009) y, por ejemplo, en las islas Baleares existen importantes bancos pleistocénicos de la especie (Cuerda et al. 1986; Fornós et al. 1996). Laborel (1987) señala la presencia de extensos bancos de *Cladocora* muertos, pero recientes (con una antigüedad de entre 2,500 y 3,000 años), en las costas de Túnez y de Córcega.



Figura 4. Depósitos fosiles de formaciones monoespecíficos de *Cladocora caespitosa* en el Mediterráneo. CBL cala Blava, Palma (Mioceno 23-5m.a); AL cuenca Almería-Níjar (Plioceno tardío, 5-1.8m.a); PV Toscana, SAR Cerdeña, CAL Calabria, TA Apulia (Plioceno-Holoceno 5m.a.-11000 años); TUN Túnez; ATL golfo de Atalaya; RHO Rodas (Plesitoceno 1.8m.a.-11000 años); MEN Menorca (Holoceno 11000 años-actualidad) (Modificado de Peirano et al. 2009).

En la actualidad esta especie parece estar en regresión, aunque todavía es frecuente en buena parte del Mediterráneo. Existen también algunas citas aisladas en aguas atlánticas próximas (Zibrowius 1983; López-González 1993; Moreno et al. 2008a). También ha sido citada recientemente en el mar de Mármara (Özalp & Alparslan 2011). En la figura 4 se muestra un mapa con la distribución actual de *C. caespitosa*. Todavía quedan algunos arrecifes monoespecíficos de este coral en algunos puntos, como en el golfo de Atalanta y en algunos otros lugares aislados del Egeo (Laborel 1961), en el golfo de La Spezia, en el sector oriental de las costas Ligures (Morri et al. 1994, 2000), en la isla de Mljet y otros puntos aislados de las costas croatas del Adriático (Kruzic & Pozar-Domac 2003; Kruzic & Benkovic 2003) o en las Islas Columbretes (Templado et al. 2002; Kersting & Linares, 2012). En las costas españolas este coral es frecuente en el litoral levantino y, especialmente, en Baleares, donde todavía quedan algunos bancos de coral de esta especie, como el que señala San Félix (2000) en los fondos próximos a la isla de Espardell, entre

Ibiza y Formentera. Se extiende también por el mar de Alborán, donde es menos abundante y donde aparecen sólo pequeñas colonias aisladas (Moreno et al. 2008). López-González (1993) cita una colonia viva en La Caleta (litoral atlántico gaditano) y Moreno et al. (2008a) señalan algunas colonias aisladas en el litoral onuvense (Fig. 5).

Estado de protección

El actual rango de distribución de los arrecifes monoespecíficos de *C. caespitosa*, ha disminuido con respecto al encontrado en el registro fósil. La regresión de esta especie hizo que Augier (1982) la incluyera en una lista de especie marinas en peligro de extinción. Morri et al. (2001) subraya que esta extinción sigue en avance. En el año 2008, la especie se ha catalogado como “Datos Insuficientes” en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN, señalando que hace falta mas información sobre la ecología de la especie. Además, recientemente eventos de mortandad de la especie se han descrito en varias localidades a lo largo de su área de distribución. Un listado del estado legal de protección de la especie se detalla en la Tabla 2.

Los eventos de mortandad descritos en el Mediterráneo, han sido descritos tanto a nivel de pólipo como de colonias enteras, en localidades del mar de Liguria (Italia) (Rodolfo-Metalpa et al. 2000), costas francesas (Perez et al. 2000) y de la Península Ibérica (Kersting & Templado 2006). En estas localidades, se ha observado *in situ* necrosis y pérdida del cenosarco y pólipos de diferentes colonia. Las posibles causas de estos eventos son el incremento en la contaminación del agua, incrementos masivos de algas y organismos patógenos (Pérez et al. 2000). Una revisión reciente de estos eventos llevada a cabo por Garrabou et al. (2009), concluye que los recientes incrementos en la temperatura del agua son el factor mas convincente de estos eventos.



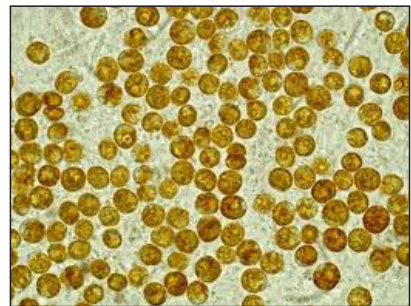
Figura 5. Área de distribución de *Cladocora caespitosa* en el Mediterráneo. Se representan las localidades donde la especie forma los mayores arrecifes monoespecífico. COL Islas Columbretes; MA Golfo de Marsella; SPE golfo de la Spezia; TUN Túnez; PIR Bahía de Piran; ROV Rovinj; PRV Prvíc; MLJ Mljet; Eub Eubée.

Tabla 2. Estado de protección legal de *Cladocora caespitosa*

Convención	Organismo	Aplicación geográfica	Estatus
Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES)	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP)	Global	Apéndice II. especies que no están necesariamente amenazadas de extinción pero que podrían llegar a estarlo a menos que se controle estrictamente su comercio y “especies semejantes”, es decir, especies cuyos especímenes objeto de comercio son semejantes a los de las especies incluidas por motivos de conservación
Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Lista Roja de Especies Amenazadas.	UICN	Global	Datos insuficientes
Catálogo Andaluz de Especies Amenazadas	Junta de Medio Ambiente de Andalucía	Andalucía	Vulnerable

3. Las zooxantelas, importancia para los corales hermatípicos

Muchos miembros del filo Cnidaria, tiene una relación simbiótica con dinoflagelados fotosintéticos del género *Symbiodinium* (Freudenthal, 1962) (Trench 1993). Estos organismos también conocidos como zooxantelas, contribuyen a la alimentación del hospedador proveyéndolo de productos derivados del carbono fijados durante el proceso de la fotosíntesis, mientras que el hospedador suministra a las zooxantelas de nutrientes inorgánicos y un ambiente luminoso, además refugio frente a los herbívoros (Weis et al. 2001). La mayor parte de los corales escleractinios zooxantelados, en ausencia de sus simbioses disminuyen la probabilidad de supervivencia y fitness (Brown 1997). El género *Symbiodinium* incluye numerosos linajes evolutivos, también denominados clado (del A hasta el H) (Baker 2003, Coffroth & Santos 2005). Es difícil generalizar entre la especificidad entre clado y hospedador, en parte debido a que el estudio de la diversidad de zooxantelas está aun en los comienzos. En general, cada clado incluye una amplia diversidad de tipologías genéticas, que exhiben patrones biogeográficos, ecológicos y hospedador-específicos, y que son usualmente diferenciados a través de distintas técnicas moleculares (ITS, rRNA, DGGE etc) (Coffroth & Santos 2005). Algunos clado de *Symbiodinium* son pueden encontrar en una amplia variedad de especies y regiones geográficas (Loh et al. 2001; Rodríguez-Lanetty & Hoegh-Guldberg 2003), mientras que otros clado muestran alta especificidad por el hospedador o son endémicos de una región (LaJeunesse 2001).



En el mar Mediterráneo, solo se ha descrito el clado “Templado A” en diferentes especies de cnidarios (Visram et al. 2006). La única especie que se ha comprobado como hospedadora de un clado diferente es la anémona de mar *Bunodeopsis*

strumosa, una especie endémica del Mediterráneo de origen tropical que se encuentra frecuentemente en lagunas salobres con temperatura y salinidad variable. Esta especie de anémona se ha descrito como hospedadora del “Clado B” de *Symbiodinium*. Según mencionan Visram et al. (2006) la aparición de clados diferentes al “Templado A”, posiblemente haya sido facilitada por la actividad humana (i.e. rutas de navegación, apertura del canal de Suez, etc.), y que su desarrollo y proliferación se vean favorecidos por el actual calentamiento global.

4. Marcadores moleculares y técnicas estadísticas para la estimación de la variabilidad genética intraespecífica y los patrones de conectividad

Para ser potencialmente útiles en la estimación de la estructura poblacional, flujo génico y conectividad de las poblaciones de una misma especie, los marcadores moleculares utilizados han de tener variabilidad intraespecífica, además de conocerse los medios de herencia (Hellberg et al. 2002). La elección del marcador molecular más apropiado depende de la facilidad de uso, el nivel de polimorfismo, y las características evolutivas del marcador, incluyendo la forma de herencia (biparental o maternal), el número de copias en el genoma, la expresión del marcador (dominante, recesivo o codominante) y las tasas de divergencia y/o mutación (Avice 2004).

Los corales escleractinios son organismos sésiles, en los cuales las larvas plámulas representan la única oportunidad de dispersión (Cowen & Sponaugle 2009). Generalmente, la fase larvaria de estos organismos es difícil de rastrear con metodologías de seguimiento activo, por tanto los marcadores moleculares son una herramienta ideal para la estimación indirecta de la estructura y conectividad de sus poblaciones.

Hasta la actualidad se han encontrado pocos marcadores moleculares que sean útiles en para el estudio de procesos evolutivos y genética de poblaciones en corales escleractinios. Una revisión de los marcadores más comúnmente utilizados así como sus ventajas e inconvenientes se ofrece a continuación

4.1. Marcadores moleculares

4.1.1. Alozimas

Tradicionalmente, han sido los marcadores moleculares más utilizados en genética de poblaciones de diversas especies tanto terrestres como marinas (e.g. Sunnucks 2000; Godoy 2009). Las alozimas son variantes de las enzimas, que representan diferentes alelos de un mismo locus. El método conocido como “electroforesis de gel de almidón de proteínas alozímicas”, o simplemente “electroforesis de proteínas”, fue el primer sistema molecular realmente útil para trabajos taxonómicos, sistemáti-

cos o ecológicos (Stoddart 1984, Vanveghel & Bak 1993, Adjeroud & Tsuchiya 1999, Ridgway 2005).

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada desde la década de los 80, para estudio sobre la estructura poblacional y conectividad de corales formadores de arrecifes, siendo la mayor parte de los estudios disponibles basados en especies del Pacífico oeste (e.g. *Pocillopora damicornis*, Stoddart 1984, Ayre et al. 1997; *Seriatophora hystrix*, Ayre & Dufty 1994; *Mycedium elephantotus*, Yu et al. 1999; *Goniastrea aspera*, Nishiwaka & Sakai 2003; *Acropora millepora*, Smith-Keune & van Oppen 2006), arrecifes de la región caribeña (e.g. *Acropora palmata*, Zubillaga et al. 2008) y el sur de África (*Pocillopora verrucosa*, Ridgway et al. 2001). En corales solitarios del Pacífico este, también se han aplicado estos marcadores (*Balanophyllia europaea*, Hellberg 1994, 1995). En el Mediterráneo, estos marcadores han sido recientemente utilizados en dos especies de corales solitarios, *Balanophyllia europaea* (Goffredo et al. 2004) y *Leptosammia pruvotti* (Goffredo et al. 2009). Otros estudios en base a estos marcadores, han servido para dilucidar determinados aspectos de la reproducción sexual de las especies (e.g. *Pocillopora damicornis*, Whitaker 2006; *Seriatophora hystrix*, Sherman 2008; *Balanophyllia europea*, Hellberg & Taylor 2002).

Para el uso de esta técnica no se requiere conocimiento a priori del genoma de la especie objeto de estudio, ya que se utilizan enzimas metabólicas comunes a gran parte de los organismos, lo que convierte el método en bueno en cuanto a la relación coste-efectividad (van Oppen et al. 2000). Sin embargo, estos marcadores tienen por lo menos tres limitaciones. Principalmente, debido a la rápida degradación de las enzimas, el análisis con alozimas depende de la disponibilidad de tejido fresco o congelado en nitrógeno líquido, lo que es difícil de mantener en largos periodos de muestreo. Además los datos obtenidos de la electroforesis de enzimas son difíciles de comparar entre laboratorios, ya que la interpretación o denominación de los alelos es realmente subjetiva. Y, por último, cierto número de los loci analizados han demostrado no ser marcadores neutrales (e.g. Powers et al. 1993), limitando su utilidad en estudios demográficos, lo que puede afectar a los resultados.

En la actualidad, los estudios de la estructura poblacional de corales escleractinios se basan en marcadores basados en el ADN de las especies.

4.1.2. Marcadores basados en ADN

Los marcadores basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), son los más utilizados debido a la poca cantidad de ADN que se requiere para su inicio. A partir de los productos obtenidos por amplificación por PCR, y combinando o aplicando otras técnicas como digestión con enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, el uso de sondas marcadas y las hibridaciones, se puede obtener un número casi ilimitado de marcadores moleculares, así como cubrir la totalidad del genoma de un organismo (Sunnucks 2000).

ADN mitocondrial y nuclear

En la mayor parte de los grupos animales, estos marcadores se han caracterizado como de alta resolución proveyendo datos fiables a nivel intraespecífico (Godoy 2009). En el caso de los corales escleractinios, los genes mitocondriales más utilizados para el estudio de las relaciones filogenéticas entre grupos son el 16S (Romano & Palumbi 1996), citocromo b (van Oppen et al. 1999) y la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI, Medina et al. 1999). Sin embargo, el uso de estos tres marcadores a nivel intraespecífico es muy pobre, debido principalmente a la escasa variabilidad intrapoblacional que se observa con el análisis de estas regiones (Shearer et al. 2002), tal y como muestran estudios llevados a cabo, por ejemplo, en corales formadores de arrecifes del sureste de África (*Pocillopora verrucosa*, Ridgway 2002) y en el coral solitario *Balanophyllia elegans* de las costas de California (Shearer et al. 2002). Las regiones de ADN mitocondrial se han visto invariantes a nivel de especie, hasta entre poblaciones geográficamente distantes y poblaciones aisladas (France et al. 1996). Una de las razones aducidas para explicar esto, es que el ADN mitocondrial de los componentes del filo Cnidaria, evoluciona más lentamente que en otros metazoos (Shearer et al. 2002), debido a la escasa habilidad del genoma mitocondrial de este filo para la acumulación de mutaciones o por la reducción de la diversidad de este genoma a lo largo de la historia reciente de estas especies (Huang et al. 2008). En gorgonias, también se han aportado datos sobre el posible sistema de reparación que podrían, igualmente, reducir el número de sustituciones (France & Hoover 2002).

A pesar de la aparición de estudios recientes con marcadores mitocondriales desarrollados en regiones no codificantes del genoma (Fukami et al. 2004; Concepcion et al. 2006), todavía no se ha visto que el grado de variación de estas secuencias sea mayor que con los marcadores mitocondriales tradicionalmente utilizados, por lo que no se creen como útiles para los estudios a nivel intraespecífico (Ridgway & Gates 2001).

Las regiones del ADN ribosómico nuclear, que comprende las regiones internas espaciadoras (ITS) y el gen 5.8S, junto con las anteriormente citadas, son las que más extensamente se han utilizado en estudio filogenéticos entre especies de corales escleractinios (Diekmann et al. 2001; Fukami et al. 2004), mostrando que las filogenias entre especies son complejas y generalmente polifiléticas entre especies cercanas. En el caso de estudios a nivel de población, pocos trabajos han utilizado estos marcadores (e.g. estudios del coral *Stylopora pistillata* a nivel regional y local, Tabayashi et al. 2003), mostrando patrones de variabilidad similares a los obtenidos con el uso de alozimas. Como ha sido revisado en el estudio de Vollmer & Palumbi 2004, los marcadores ITS pueden ser de poca utilidad a nivel poblacional, sobre todo teniendo en cuenta las recientes evidencias de hibridación que hay entre especies de corales (Quijada et al. 1997, van Oppen et al. 2001), así como la naturaleza multicopia de estos marcadores (Ridgway et al. 2001), que hace de la presencia de diferentes loci en el genoma.

Para paliar este último inconveniente, y con la finalidad de obtener marcadores más resolutivos para trabajar a nivel intraespecífico con antozoos, recientemente se están desarrollando marcadores genéticos monocopia para trabajar a nivel intraespecífico.

Marcadores microsatélite

Los marcadores microsatélite son los más ampliamente utilizados en estudios a nivel intraespecífico, por ser unas herramientas relativamente sencillas de desarrollar y altamente reproducibles. Se trata de regiones constituidas por repeticiones en tándem de unos pocos pares de bases (1 a 6). El polimorfismo de estas regiones viene determinado por los diferentes números de repeticiones, dando fragmentos amplificados por PCR de distinto tamaño (González 2003). Desde su descubrimiento (Litt & Luty 1989; Weber & May 1989), y debido a la alta tasa de mutación, estas regiones del genoma han sido ampliamente utilizadas como marcadores moleculares en estudios de genética de poblaciones y conservación. Son marcadores considerados de selección neutra, codominantes y con herencia mendeliana (Underwood et al. 2009).

El trabajo de Maier et al. (2001), describe por primera vez el desarrollo de este tipo de marcadores en el coral *Seriatophora hystrix*. A partir de entonces, el número de trabajos que han utilizado marcadores microsatélite para el estudio de la estructura genética, y conectividad de corales escleractinios, se ha ido progresivamente extendiendo. Este tipo de estudios se han centrado principalmente en corales formadores de arrecifes del Caribe (e.g. *Acropora palmata*, Baums et al. 2005), océano Pacífico (e.g. *Pocillopora* spp, Magalon et al. 2004; *Acropora millepora*, Wang et al. 2009) y sur de África (*Pocillopora verrucosa*, Ridgway et al. 2008). Hasta el presente, no se habían desarrollado microsatélites para el análisis de corales de áreas templadas como el Mediterráneo.

El aislamiento y desarrollo de marcadores microsatélite es costoso, en comparación con otros marcadores. Estos marcadores pueden llegar a ser útiles entre especies del mismo género (e.g. Magalon et al. 2004), pero no suelen ser transferibles fuera del nivel de género (Ridgway & Gates 2006). A pesar de estas desventajas, a día de hoy se consideran como los más útiles a la hora de estudios a nivel intraespecífico entre poblaciones de corales escleractinios.

A la hora de desarrollar este tipo de marcadores en corales scleractinios hermatípicos, hay que destacar la importancia de tener en cuenta la presencia de zooxantelas, algas dinoflagelados del género *Symbiodinium*, simbioses en el tejido de estas especies. Así pues, Shearer et al. 2005 revisan diferentes metodologías para asegurar la obtención de marcadores específicos para el tejido del coral y no de la zooxantela.

En la presente tesis, se desarrollan marcadores microsatélite específicos para ambos corales, *Astroides calycularis* y *Cladocora caespitosa*, dada la necesidad de ob-

tener marcadores hipervariables para la caracterización de la variabilidad intraespecífica y conectividad entre poblaciones de las especies.

4.2. Técnicas estadísticas

Diferentes aproximaciones analíticas son utilizadas actualmente para definir la variación genética dentro y entre poblaciones (Beerli 1998). A nivel intraespecífico, las poblaciones evolucionan a través de cambio en las frecuencias alélicas. Estos cambios en las frecuencias alélicas de un determinado marcador molecular resultan de la combinación de distintas fuerzas evolutivas: mutación de las regiones genómicas y deriva génica, causado por fluctuaciones estocásticas en poblaciones finitas, flujo génico, resultante de la migración de individuos entre poblaciones, y selección entre y dentro de las poblaciones, además de factores ecológicos de los individuos que conforman las poblaciones. La relación entre la capacidad de dispersión de los organismos y la diferenciación genética entre sus poblaciones a diferentes escalas, supone un vínculo fundamental entre los procesos ecológicos y evolutivos a nivel intraespecífico (Bohonak 1999). La conectividad entre poblaciones juega un papel fundamental desde escalas locales a dinámica y estructura de poblaciones o metapoblaciones, así como para obtener más conocimiento de la resiliencia de las poblaciones ante la presión antropogénica (Botsford et al. 2001).

A continuación se hace una introducción de las metodologías analíticas utilizadas para el desarrollo de la presente tesis.

4.2.1 Inferencia filogenética

En el caso de análisis de secuencias de ADN, recientemente el surgimiento de la filogeografía ha dado lugar a numerosas aproximaciones que apoyan dichos análisis, aun más aquellas que incorporan los métodos estadísticos de síntesis provenientes de la genética de poblaciones tradicional en los métodos basados en árboles de genes (Hey & Machado, 2003). Entre las herramientas involucradas se encuentran los análisis de diversidad genética derivados de la genética de poblaciones clásica, análisis filogenéticos, la teoría de la coalescencia y la biogeografía, con el fin de entender los procesos históricos que están implicados en la estructuración poblacional, la formación de nuevas especies y la reconstrucción del contexto geográfico de la diversificación. Análisis de las relaciones filogenéticas entre individuos de diferentes poblaciones, son generalmente llevados a cabo tras el uso de marcadores mitocondriales y/o nucleares.

Alineamiento de secuencias

Es el paso más crítico en el proceso de inferencia filogenética, ya que mediante el alineamiento se establecen las regiones homólogas entre los distintos nucleótidos, definiendo las relaciones existentes entre cada una de las posiciones que componen las secuencias en estudio. Hay que tener en cuenta que las secuencias a lo largo de la evolución pueden acumular multitud de cambios en forma de sustituciones, deleciones e inserciones que pueden ocasionar problemas o dar lugar a errores a la hora de definir el alineamiento correcto. Así pues, el proceso de alineamiento se basa en determinar las regiones más conservadas de las secuencias y a partir de éstas, detectar cambios en las posiciones nucleotídicas, incorporando “espacios”, en caso necesario, para mantener la homología posicional. Hoy en día existen muchas herramientas informáticas que, mediante el uso de algoritmos matemáticos, permiten alinear un gran número de secuencias de manera automática y en poco tiempo, aun así, resulta imprescindible que se revisen estos alineamientos automáticos de forma manual.

Métodos de inferencia filogenética

En la presente tesis, se utilizaron métodos de distancia y métodos discretos para evaluar la diversidad genética intraespecífica de *Astroides calcycularis*, por lo que son estos métodos los que se detallan a continuación. Los métodos de distancia transforman las diferencias observadas entre cada par de secuencias en un valor de disimilaridad, para después buscar el árbol que se ajuste lo máximo posible a la matriz de distancias calculada (Felsenstein 2004). Al aplicar estos métodos hay que tener en cuenta que las secuencias generalmente acumulan multitud de sustituciones a lo largo de la evolución y que hay posiciones en las que los cambios son más probables. Por ello, es común que en el análisis, dichas sustituciones deriven en la aparición de las homoplasias, causando que a partir del cálculo de una determinada divergencia, las secuencias se saturen.

Para ello, en los métodos de distancias se aplican distintos modelos sustitutivos (modelos de sustitución) que, en función de las supuestas homoplasias existentes, corrigen las distancias calculadas. Una vez calculada, la matriz de distancias corregidas se emplea para inferir el árbol filogenético, bien mediante la aplicación de métodos de optimización, o mediante métodos algorítmicos. El método algorítmico empleado en esta tesis, es el del *Neighbour-Joining (NJ)* (Saitou & Nei 1987). En este método se modifica la matriz de distancias inicial de tal manera que la divergencia entre cada par de secuencias se ajusta de acuerdo a la divergencia media del resto de pares de secuencias. De esta forma, se corrigen las distancias para evitar el efecto de las distintas tasas de evolución en las ramas. Posteriormente, mediante un algoritmo de agrupamiento, se reconstruye la topología, uniendo sucesivamente los pares de secuencias más próximos.

Los métodos discretos emplean la información obtenida de las alineaciones, considerando directamente la posición y distribución de los caracteres a lo largo del alineamiento de las secuencias. En esta tesis se emplearon los siguientes:

Maxima parsimonia (MP)

Se basa en que la mejor explicación de los datos es aquella que requiere un menor número de asunciones *ad hoc*, asumiendo que entre dos posibles explicaciones igualmente válidas para un mismo hecho, la más simple siempre es la mejor. Partiendo de esta premisa, el método de parsimonia trara de buscar la topología que requiere el menor número de paso (menor número de sustituciones nucleotídicas) para explicar la matriz de datos. Mediante este método se optimiza en un árbol cada uno de los caracteres presentes en la matriz de datos, calculando la cantidad de cambios de estado o pasos que han sufrido a lo largo de las diferentes ramas del árbol, de forma que la suma de los pasos de cada uno de los caracteres presenta la longitud total del árbol. Finalmente entre todos los árboles posibles se elige aqule o aquellos que presenten un menor número de pasos, o una longitud total menor.

Máxima verosimilitud (ML)

Se basa en obtener un árbol que presenta la probabilidad o verosimilitud más alta de producir la alineación observada. Esta verosimilitud se calcula en base a la probabilidad de que la variación observada en una determinada posición de alineación se debe a un modelo evolutivo de sustitución definido y un árbol filogenético determinado. De esta forma, para calcular la verosimilitud total del árbol, se multiplican las probabilidades calculadas para cada una de las posiciones de alineación. Posteriormente se elige el árbol que presenta un valor de similitud mas elevado. Hay que destacar que cada modelo evolutivo asume unos parámetros diferentes de sustitución, por lo que es importante la elección del modelo apropiado que mejor se ajuste a los datos, para ello se suelen utilizar paquetes de programas (Posada & Crandall 2001), que permite de forma rápida y eficaz calcular el modelo de sustitución apropiado para un alineamiento concreto.

Inferencia bayesiana (IB)

Este método fue descrito por Rannala & Yang (1996), y provee de una herramienta rápida y eficaz que se ha extendido rápidamente frente a los anteriores mencionados. La inferencia bayesiana se basa en el concepto de la probabilidad *a posteriori*, en el que la probabilidad *a priori* de obtener una determinada inferencia filogenética, se ve transformada en una probabilidad *a posteriori*, una vez incorporada la evidencia que aportan los datos. Así pues, la mejor inferencia filogenética

es aquella que maximiza la probabilidad posterior de que un árbol determinado sea el correcto. Esta probabilidad posterior se calcula mediante el teorema de Bayes, que tiene en cuenta la probabilidad *a priori* de una filogenia (es decir, su verosimilitud) y la probabilidad de los datos. Puesto que desde el punto de vista estadístico no es factible calcular con exactitud de las probabilidades posteriores de todos los árboles posibles, lo que se infiere es una aproximación de estas probabilidades, para posteriormente obtener la probabilidad posterior aproximada de una determinada filogenia. Dicha aproximación se calcula mediante el método denominado "Markov Chain monte Carlo" (MCMC) (Metropolis et al. 1953)

4.2.2. Análisis de Clados Anidados (NCPA)

Los patrones filogeográficos, pueden resultar de eventos históricos y/o de flujo génico restringido entre poblaciones aisladas en épocas recientes. La técnica denominada como Análisis de clados anidados (NCPA) (Templeton 2004), permite, en primer lugar, detectar y probar estadísticamente los mecanismos evolutivos responsables de la distribución espacial de los patrones de variación genética observada, y por otro lado, detectar posibles deficiencias en los esquemas de muestreo. Así pues, este método utiliza las relaciones entre árboles de haplotipos para definir una serie anidada de clados, en la cual el haplotipo más antiguo se localiza en el centro y los haplotipos más recientes en el exterior, permitiendo así un análisis evolutivo de la variación genética entre poblaciones.

4.2.3. Análisis de microsatélites

Estimación de la diversidad genética a nivel intrapoblacional

En el caso de marcadores microsatélite, lo más común es aplicar parámetros de medida de la diversidad genética como son el número de alelos por locus (N_a , diversidad alélica), el número de alelos privados o exclusivos de cada locus en la población (P_a), y el número de alelos estandarizado con la población de menor tamaño de muestra (N_s , Nei & Chesser 1983). Además, los genotipos obtenidos en la muestra para cada uno de los loci analizados, han de ser testados para observar si cumplen el equilibrio de Hardy-Weinberg, a través de la comparación de frecuencias genotípicas en base al número de heterocigotos y homocigotos analizados. Así pues, la heterocigosidad observada (h_o) se define como la frecuencia relativa de heterocigotos observados para cualquiera de los loci en una determinada población; la heterocigosidad esperada (h_e) se define como la probabilidad de que escogiendo dos alelos de un determinado locus en la población al azar, éstos sean diferentes entre sí (Crow & Kimura 1970). Asumiendo que una población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, la frecuencia de heterocigotos esperados de un locus J con i alelos viene dada por la siguiente ecuación: donde, p_{ij} es la frecuencia de alelos i-ésimo en el locus i-ésimo.

$$h_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_{ij}^2$$

Las heterocigosidades promedio observadas (H_o) y esperadas (H_e) en una muestra se obtienen calculando el valor promedio de h_o y h_e en todos los loci de la población.

La ley de Hardy-Weinberg (Hardy 1908; Weinberg 1908) asume la unión al azar de los gametos en la población analizada y, en consecuencia, el apareamiento aleatorio entre los individuos de dicha población, manteniendo las frecuencias génicas y genotípicas constantes de generación en generación. Una población que se desvía significativamente de este equilibrio presentará un exceso o defecto de heterocigotos que pueden detectarse mediante el índice de fijación F_{IS} de Wright (1965), o coeficiente de endogamia. Este coeficiente, es una medida de la desviación de frecuencias genotípicas de las frecuencias dadas por una población en equilibrio de Hardy-Weinberg, en términos de exceso o déficit de heterocigotos, causada principalmente por la tendencias a que se den cruces entre individuos emparentados o por la estimación de la presencia de "alelos nulos" (Brookfield 1996). En el caso de loci con dos o más alelos, los valores de F_{IS} oscilan entre 0 y 1, indicando valores >0 un exceso de heterocigotos.

El desequilibrio de ligamiento es el término empleado para designar la asociación no aleatoria entre alelos de dos loci diferentes (Lewontin & Kojima 1960). La existencia de este desequilibrio entre las combinaciones alélicas de diferentes loci puede ser debida a diversos tipos de selección natural, deriva génica, mecanismos de reproducción asexual en la población o a la mezcla de poblaciones con diferentes características genéticas.

Además, en el caso de corales coloniales y dada la probabilidad de muestrear la misma colonia más de una vez o de existencia de procesos de reproducción asexual, es importante introducir otro análisis como son el del cálculo de la probabilidad de identidad (P_{ID}) y análisis de parentesco que permitan la identificación de individuos cercanamente emparentados o de clones y por tanto mecanismos de reproducción asexual (Kalinowsky et al. 2006; Baums 2008).

El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional ya que determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente. Los métodos indirectos estiman el flujo génico entre poblaciones a partir de diferencias genéticas entre estas asumiendo que estas poblaciones están en equilibrio (Slatkin 1993). Estos métodos se basan en modelos teóricos de estructura de las poblaciones, tales como el modelo de islas de Wright (Wright 1951). Diferentes metodologías se han utilizado tradicionalmente para definir la variación genética entre poblaciones, así como el flujo génico y conectividad entre estas.

A continuación, se describen diferentes aproximaciones analíticas que se utilizan recientemente para definir la diversidad genética a nivel intrapoblacional a partir de datos obtenidos con marcadores microsatélite.

Estimación de la diversidad genética a nivel interpoblacional

Estimas clásicas basadas en estadística de la F

Este tipo de técnicas derivan del parámetro estadístico F de Wright, el cual es una medida de la correlación entre los genes en una subpoblación en relación a la población entera (Wright 1951). Se define como la probabilidad de que dos alelos provenientes de distintas poblaciones sean idénticos por descendencia.

El coeficiente más utilizados para medir diferencias genéticas entre pares poblaciones es el estadístico F_{ST} , que permite estimar la correlación existente entre dos gametos tomados al azar de cada una de las poblaciones, midiendo el grado de diferenciación genética entre las mismas. Existen varias metodologías para el cálculo de este parámetro y su significancia estadística, una de las más frecuentes y la utilizada a lo largo de los capítulos de la presente tesis, es, tomando como hipótesis nula la “no diferenciación”, estimar la significancia estadística mediante metodologías de permutación (alternando la posición de los individuos entre las diferentes muestras) para evitar problemas derivados de la diferencia en el tamaño de muestra entre las diferentes poblaciones. Los valores de F_{ST} oscilan entre 0, cuando las poblaciones objeto de estudio tienen frecuencias alélicas idénticas, y 1, cuando las poblaciones no comparten alelos.

El modelo de Wright (1951) asume un número finito de poblaciones de islas de igual tamaño que intercambian migrantes con una tasa constante, y en las cuales la tasa de migración excede la de mutación, siempre teniendo en cuenta que los marcadores utilizados sean neutrales. Muestra que en un modelo de isla en equilibrio,

$$N_m = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$$

donde N_m es el número actual de migrantes por generación

Se convierte en un estimador bastante preciso del flujo génico, siendo relativamente insensible a moderados niveles de selección de los marcadores (Slatkin & Barton 1989).

Recientemente el uso de estadística basada en F_{ST} para establecer la diferenciación de las poblaciones, ha sido cuestionado para el uso de marcadores hipervariables (Jost 2008). Así pues, este autor cuestiona este parámetro dado que es dependiente de la heterocigosidad dentro de cada población, subestimando la variabilidad interpoblacional conforme incrementa la variación intrapoblacional. Así pues Jost (2008) ha propuesto un parámetro denominado D_{est} como estimador de la diferenciación real entre poblaciones.

El Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA), así como comparaciones entre pares de poblaciones tomando en consideración frecuencias alélicas, se utilizan para detectar diferencias alélicas de una manera jerárquica, así como patrones geográficos entre poblaciones (Excoffier et al. 2005), analizando jerárquicamente la proporción de varianza debida a variación de las frecuencias alélicas intra e intergrupos.

Análisis de aislamiento por distancia

Este análisis permite discernir entre flujo génico actual y separación histórica reciente, ya que el primero se espera que tenga una correlación positiva con la distancia geográfica entre dos poblaciones (Slatkin 1993). Para esto se suelen utilizar dos modelos: Rousset (1997), en el que se establece una correlación entre el parámetro ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) y el logaritmo de la distancia geográfica entre poblaciones; y Slatkin (1993), modelo que utiliza el logaritmo de M (donde $M = (1-F_{ST})/4F_{ST}$) entre pares de poblaciones como una medida de similaridad, frente al logaritmo de la distancia geográfica. En ambos modelos se establece la correlación entre variables a través de un test de Mantel, el cual permite establecer una correlación entre dos variables dependientes como son las distancias genéticas y las distancias geográficas analizadas.

Estadística bayesiana utilizada para agrupar grupos de individuos en base a las frecuencias alélicas

Dado el alto nivel de polimorfismo que tienden a expresar los marcadores microsatélite, en ocasiones es posible diferenciar los individuos pertenecientes a distintas poblaciones mediante el análisis de las frecuencias de sus genotipos multi-locus. De esta forma, dada una muestra de individuos con distintos orígenes, esta estadística permite su clasificación en grupos, en función de su similitud genética. Así pues, la inferencia bayesiana es un tipo de inferencia estadística en la que las evidencias u observaciones se emplean para actualizar o inferir la probabilidad de que una hipótesis pueda ser cierta. Una de las limitaciones de las técnicas analíticas actuales en genética de poblaciones, es que asumen la existencia de poblaciones a priori que no siempre corresponden con las entidades biológicas (Pearse & Crandall 2004). En los análisis que utilizan la estadística bayesiana, los individuos son asignados a grupos o "clúster" o a una determinada población muestreada en base a las frecuencias alélicas de sus genotipos, partiendo de que las poblaciones se encuentran en equilibrio. El método bayesiano de agrupamiento, toma un determinado número de genotipos y asume un modelo en el cual hay K poblaciones (K puede ser desconocida), y asigna individuos probabilísticamente a poblaciones o a varias poblaciones si sus genotipos indican mezcla.

Los análisis actuales además permiten la incorporación de variables geográficas a través de la localización de individuos y/o poblaciones, para proceder a una estimación de las posibles barreras geográficas que afectan al flujo génico y conectividad entre poblaciones (Safner et al. 2011).

Migrantes y tasas de migración

Además del análisis que permiten las F_{ST} en cuanto a la inferencia del flujo génico entre poblaciones, en base al número de migrantes por generación entre pares

de poblaciones (N_m), los análisis de asignación comienzan con la determinación de la frecuencia esperada del genotipo de cada migrante potencial en cada población origen, basándose en las frecuencias alélicas halladas en estas poblaciones. A partir de aquí, el genotipo de un determinado individuo puede ser asignado a la población que le corresponde con mayor probabilidad (Pritchard et al. 2000). Recientemente, se han desarrollado métodos de máxima verosimilitud basados en la teoría de coalescencia. Éstos permiten obtener tasas de migración entre poblaciones de distinto tamaño, así como analizar la direccionalidad del flujo génico (Beerli & Felsenstein 2001).

5. Aplicación de las herramientas moleculares a la conservación

Hace ya más de dos décadas que las técnicas moleculares juegan un papel fundamental en estudios acerca de la estructura, dinámica y reproducción de las especies. En estudios en biología de la conservación, estas técnicas han sido ampliamente utilizadas en el caso de vertebrados terrestres, pero su aplicación en el medio marino ha sido principalmente aplicada en el campo de las pesquerías, para la identificación de stocks de peces o en acuicultura. En cuanto a los corales escleractinios, estos estudios se han llevado principalmente a cabo en áreas tropicales en corales formadores de arrecifes (e.g. Baums 2008, Ayre & Hughes 2000, Ridgway et al. 2008, Polato et al. 2010). A día de hoy, sólo hay dos estudios que se hayan llevado a cabo en el Mediterráneo con los corales solitarios *Balanophyllia europaea* (Goffredo et al. 2004) y *Leptosammia pruvotti* (Goffredo et al. 2009). Los marcadores moleculares permiten la obtención de información a diferentes niveles: sobre la estructura de las poblaciones, el flujo génico entre estas, relaciones de parentesco entre individuos y patrones históricos de biogeografía (Godoy 2009).

Todo esto juega un papel fundamental en estudio de conservación de las especies ya que permiten la inferencia de la dispersión larvaria y el reclutamiento entre otros (e.g. Kyle & Boulding 2000; Jover et al. 2003). Además estas técnicas permiten la detección de barreras al flujo génico, procesos de introgresión y cuellos de botellas o aislamiento y fragmentación de las poblaciones (Baums 2008). A través de la caracterización genética de las especies, pueden establecerse dentro de cada una de las diferentes poblaciones locales (entendiendo por tales los conjuntos de individuos que interaccionan regularmente unos con otros), si estas son cerradas (el intercambio de individuos o larvas con otras poblaciones locales no existe o es muy raro y su crecimiento depende de la reproducción dentro de la misma) o abiertas (el intercambio de individuos o larvas con otras poblaciones es común y su crecimiento depende también de la importación o inmigración) (Hellberg et al. 2002). Además, estas herramientas permiten la distinción de poblaciones a diferentes escalas geográficas, así como la conectividad entre las mismas (Jones 2007).

Las áreas marinas protegidas (AMPs), juegan un papel fundamental en el manejo y conservación de las especies. Uno de los objetivos de las AMPs, es proteger

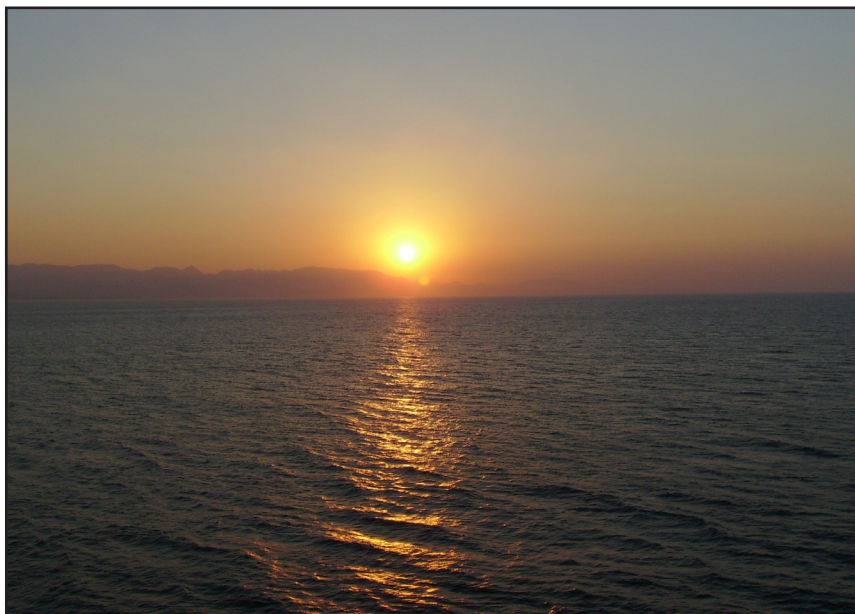
la diversidad genética de las especies que albergan en las áreas donde están localizadas (Kelleher 1999). El desarrollo de estrategias de conservación y el diseño de las AMPs, debería de centrarse en la modelación espacial de la dinámica de las poblaciones, especialmente teniendo en cuenta la dispersión larvaria y por tanto conectividad entre poblaciones (Cowen et al. 2007). Estas áreas juegan un papel fundamental a escalas mas allá de sus límites, así pues el entendimiento de la estructura genética a nivel local, también es fundamental a la hora de establecer valores mínimos de dispersión larvaria y procesos de reproducción asexual (Palumbi 2003). En el Mediterráneo, desde el punto de vista de las áreas marinas protegidas, se he escrito algo sobre su papel como exportadoras de larvas o adultos a las áreas próximas, aunque son pocos los trabajos que lo corroboren. Por otro lado, apenas se ha comentado el papel de tales reservas como importadoras de larvas. Otro aspecto, en cambio, muy debatido ha sido si es más conveniente establecer una red de numerosas reservas marinas de pequeño tamaño repartidas a lo largo de todo el litoral, o si, por el contrario es mejor la existencia de pocas reservas grandes en zonas adecuadamente seleccionadas (Halpern & Walner 2003). Para resolver estas cuestiones, y otras muchas relacionadas con los aspectos marinos protegidos, es necesario, una vez más el estudio de los aspectos anteriormente mencionados.

Objetivos de la tesis doctoral

El objetivo general es determinar la estructura genética y el alcance de la conectividad de las poblaciones de dos corales endémicos del mar Mediterráneo, *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) y *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767), así como detectar los factores bióticos y abióticos que podrían modular dichos procesos y, en última instancia, aportar datos para la toma de decisiones de cara a la conservación y el adecuado manejo de estas especies.

Objetivos específicos

1. Estudiar la biología reproductora de *Astroides calycularis* en el mar de Alborán.
2. Estimar la variabilidad genética y los patrones de flujo génico dentro y entre poblaciones de *Astroides calycularis* y *Cladocora caespitosa*
3. Desarrollar marcadores microsatélite para *Astroides calycularis* y para *Cladocora caespitosa*
4. Evaluar la influencia de las características biológicas de *Astroides calycularis* y de *Cladocora caespitosa*, factores abióticos y barreras geográficas y oceanográficas, en la estructura genética y conectividad de sus poblaciones





Astroides calycularis (Pallas, 1766)

Foto G. Neto

Capítulos incluidos en la sección

Capítulo I

Casado-Amezúa P, Gasparini G, Goffredo G. Phenological and morphological responses of the Mediterranean coral *Astroides calycularis* to environmental conditions. Enviado.

Capítulo II

Merino-Serrais P, Casado-Amezúa P, Ocaña O, Templado J, Machordom A (2012) Slight genetic differentiation between western and eastern limits of *Astroides calycularis* (Anthozoa, Scleractinia, Dendrophylliidae) inferred from COI and ITS. *Graellsia*. En prensa.

Capítulo III

Casado-Amezúa P, Acevedo I, García-Jiménez R, Machordom A (2010) Development of microsatellite markers for the orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia, Dendrophylliidae). Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2009-30 September 2009. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 232-236.

Capítulo IV

Casado-Amezúa P, Goffredo S, Templado J, Machordom A (2012) Genetic assessment of population structure and connectivity in the threatened Mediterranean coral *Astroides calycularis* (Scleractinia, Dendrophylliidae) at different spatio scales. *Molecular Ecology*. En prensa

Phenological and morphological responses of the Mediterranean coral *Astroides calycularis* to environmental conditions

Resumen

Estudios acerca de la variación intraespecífica en la presencia de diferentes características ambientales son esenciales para mejorar el conocimiento de la dinámica de las poblaciones. La temperatura superficial del agua (SST por sus siglas en inglés) juega un papel fundamental en el período de maduración gonadal de los corales escleractinios. *Astroides calycularis* es un coral escleractinio azooxantheidos que se encuentran comúnmente en hábitats rocosos poco profundos del suroeste del mar Mediterráneo. Este estudio compara el periodo de maduración gonadal del coral entre dos localidades distantes con diferentes SST, una en la costa sur de la Península Ibérica (promedio de SST $20,4 \pm 1,8$ °C), y la otra en la costa suroeste de Italia (promedio de SST $21,5 \pm 1,9$ °C). Las colonias presentaban morfologías diferentes entre localidades, las colonias colectadas en la primera localidad presentaban una morfología “masiva” (i.e. colonias con gran densidad de pólipos), mientras que en la localidad de Italia las colonias mostraban una morfología “ramificada” (i.e. pólipos separados en el interior de las colonias) y los pólipos separados. Estas diferencias se deben posiblemente a las diferentes condiciones hidrodinámicas de sus respectivos hábitats. Gonocorismo e incubación de la plánula como condición y patrón sexual del coral coincidieron en ambas localidades, pero en relación a los aspectos cuantitativos de la gametogénesis, se observó un retraso en la maduración gonadal y planulación de la población del sur de la Península Ibérica con respecto a la del suroeste del mar Tirreno, ligado al periodo en el que el agua alcanza el máximo de temperatura anual en ambas áreas.

Abstract

Studies of intraspecific variation in the presence of different environmental features are essential in improving the knowledge of species population dynamics and structure. Sea surface temperature (SST) plays a fundamental role on the fertilization period of scleractinian corals. *Astroides calycularis* is an azooxanthellate scleractinian coral commonly found in shallow rocky habitats of the southwestern Mediterranean Sea. This study compares the fertilization period of the coral between two distant localities with different sea surface temperatures; one in the southern coast of the Iberian Peninsula (average SST 20.4 ± 1.8 °C), and the other in the southwestern coasts of Italy (average SST 21.5 ± 1.9 °C). Colony morphology varied between localities, the former having “massive” morphology with densely

crowded polyps, the latter having “branchy” morphology and separated polyps. These differences are possibly due to the different hydrodynamic conditions of their respective habitats. Gonochorism and planula brooding as sexual patterns and conditions of the coral coincide in both sites, but a delay in the timing of fertilization and planulation of the southern Iberian Peninsula population was observed, linked to a shift in the period that seawater reaches its maximum temperature in both sites.

Introduction

The reproductive cycle of a species and the factors affecting it are important issues to better understand its population dynamics (Torrents & Garrabou 2011). In the case of marine invertebrates, reproductive traits are related to environmental conditions, which may change in relation with geographical factors (Olive 1995). Thus, studies of intraspecific variation in reproductive biology in the presence of different environmental features are essential in improving the knowledge of the geographic variation of life history traits (Giese 1959; Olive 1995). Comparisons of coral spawning patterns within a geographic-based framework may reflect regional variations in environmental cycles, and may be suitable for discerning species responses to those variations (Babcock et al. 1994). Some available studies on the sexual reproduction of anthozoans conclude that reproductive traits vary among geographical locations, along latitudinal gradients and between regions (Fan & Dai 1995; Wilson & Harrison 2003; Gori et al. 2007).

Sea surface temperature (SST) is one of the main parameters controlling the metabolic rates of marine organisms, which, in turn, affects numerous processes within species developmental rate and survival (Allen et al. 2006). A slight increase in this parameter can have positive effects on individuals, for example by increasing rates of colony or population growth and larval development (O’Connor et al. 2007). Many marine invertebrates begin to reproduce when a certain temperature level is reached after a period of either increasing or decreasing temperature, or in response to sudden temperature changes (Kinne 1970; Bates 2005), often confining their reproductive period to relatively narrow thermal ranges (Riesgo & Maldonado 2008). Traditionally SST has been considered as the most important seasonal environmental factor that affects reproductive timing of anthozoans, such that spawning time has been shown to correspond to the warming of seawater and the time when seawater reaches its annual maximum (Harrison & Wallace 1990; Baird et al. 2009). SST may change across a species distribution range, related to geographical factors such as latitudinal gradients (Kain 1989), and the appearance of oceanographic phenomena such as upwelling (Sarahn et al. 2000). Up to now, few studies have been done comparing intraspecific sexual reproductive traits between localities in anthozoans from the Mediterranean Sea (Fine & Loya 2001; Gori et al. 2007; Torrents & Garrabou 2011).

Astroides calycularis (Pallas, 1766) is a colonial scleractinian coral characterized by the bright orange color of its coenosarc and polyps (Zibrowius 1995). It is an azooxanthellate coral that is found covering relatively large surfaces of vertical walls, cave entrances, overhangs and slopes (Zibrowius 1995). It is a typical shallow water coral that can be commonly found in abundance, from the intertidal fringe to a depth of 40m, with lower abundances of the colonies below this level (Kruzic et al. 2002). It has been described as a species with a narrow temperature tolerance (Grubelic et al. 2004). Despite it was widely distributed in the western Mediterranean during the Pleistocene (Zibrowius 1995), climatic fluctuations occurred during that period lead to a regression in its distribution range, restricting the species to the southwestern basin of the Mediterranean. Currently its presence has been observed in the Atlantic coast of the Iberian Peninsula (Moreno et al. 2008), and some spread colonies have been cited in the northeastern part of the Adriatic Sea (Casellato et al. 2007; Kruzic et al. 2002). The recent records of this coral into the Adriatic Sea have been related to the seawater warming together with the prevailing sea current system and the rocky coastal configuration (Grubelic et al. 2004). *A. calycularis* sexual reproductive cycle has been previously documented by Goffredo et al. (2010, 2011), who described the different qualitative and quantitative aspects of its reproduction in the locality of Palinuro (Italy, Southern Tyrrhenian Sea).

This study extends the current knowledge on the sexual reproduction of *A. calycularis*, by studying its traits during the late spring-summer in the locality Punta de la Mona (South Iberian Peninsula, Alboran Sea) and comparing them with previous assessments from Palinuro (Italy, Southern Tyrrhenian Sea) (Goffredo et al. 2010, 2011). We focus on the comparison of morphological and quantitative aspects of oogenesis and spermatogenesis between the two localities. The coasts of the new studied locality are characterized by colder SST compared to Tyrrhenian waters due to the upwelling of deep Mediterranean waters (Sarhan et al. 2000). This difference in SST is expected to influence the reproduction of the study species (e.g. Wilson & Harrison 2003; Guest et al. 2005; Gori et al. 2007).

Material and Methods

Sampling

A. calycularis samples were collected at Punta de la Mona (Granada, Spain, Alboran Sea, 36°43.13'N; 3°43.629'W) (Fig. 1) from the months of April to August during 2009-2010. Data from colonies from Palinuro (Italy, Southern Tyrrhenian Sea; 40°01.81'N; 15°16.74'E) (Fig. 1) was based on Goffredo et al. (2010, 2011).

In both localities, samples were collected by scuba diving in a depth range from 7-10 m. Colonies were at least 2 m apart. Collected samples were fixed in

saturated Formalin solution (10% formaldehyde and 90% sea water; the solution was saturated with calcium carbonate) and transferred to the laboratories for histological analysis.



Figure 1. Sampling sites.

Biometric analysis

For each colony, the major axis of the colony (colony length, L_c) and the minor axis of the colony (colony width, W_c) were measured, and colony area was calculated using the formula $A_c = \pi \frac{L_c \times W_c}{4}$ (Goffredo et al. 2010). Also, a biometric analysis of each analyzed polyp was performed: major axis of the oral disc (polyp length, L_p), minor axis of the oral disc (polyp width, W_p) and height oral-aboral axis (h). Body volume was calculated as $v_p = \pi \frac{h \times L_p \times W_p}{4}$ (Goffredo et al. 2010).

Sexuality pattern and gamete development

Histological protocol, polyps post-fixation, decalcification and tissue staining followed the conditions in Goffredo et al. (2010, 2011). Histological observations were made under a light microscope. Gonadal measurements were made with a LEICA 5001 W image analyzer. At each polyp, the maximum and minimum diameter of the spermaries and oocytes in nucleated sections were measured. Regarding samples from Punta de la Mona, only mature active polyps (>3-4 mm in length, according to Goffredo et al. 2011) that showed gonads were included in the analysis. Polyps within the above size range that did not show gonads were assumed to belong to male colonies, according to the fact that only female polyps had gonads during all the year (Goffredo et al. 2010, 2011). The size of each reproductive element was determined as the mean of the two diameters (maximum diameter, D and minimum diameter, d , for the nucleated section of oocytes and spermaries in the different developmental stages) and was classified into developmental stages following Goffredo et al. (2005, 2011).

Gamete index was expressed as the percentage of polyp body volume occupied by the gametes (Goffredo et al. 2005). Gamete volume was estimated using the formula $v_g = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{D}{2}\right) \times \left(\frac{d}{2}\right)^2$ (Goffredo et al. 2011), as oocytes and spermaries were ellipsoidal

in shape, and volume of gametes was calculated as the sum of the volume of each oocyte or spermary.

Fecundity was expressed at the polyp level as the number of mature oocytes produced per female polyp, using the formula $F = \frac{A \times B}{C}$ (Goffredo et al. 2011), where A is the length of the “ovary”, based on the number of sections in which oocytes were found; B is the observed frequency of mature oocytes; and C is the size of mature oocytes. At the colony level, fecundity was calculated as the sum of the fecundity estimates for each polyp of the female colony.

Sea water temperature

As in other studies on anthozoan reproduction (e.g. Fine et al. 2001; Neves & Pires 2002; Gori et al. 2007), measurements of SST were taken from publicly available measurement networks of oceanographic parameters. Data from locality of Punta de la Mona during years 2009-2010 was available from the Spanish Port System (Ministry of Public Works of Spain; <http://www.puertosdelestado.es>). Data from years 2003-2004 from the locality of Palinuro was obtained from the National Mareographic Network of the Agency for the Protection of the Environment and Technical Services (APAT, <http://www.apat.gov.it>).

Statistical analyses

Factorial ANOVA, and Spearman correlation, were used for statistical comparisons among the quantitative aspects of the sexual reproduction of the coral. Wilcoxon Matched Paired test were applied to SST comparisons between months per year and sampling locality. All statistical analyses were computed Statistica 7.0. (StatSoft, Inc) software.

Results

Sexual pattern and biometry analysis

A total of 40 colonies and 88 polyps from Punta de la Mona, and 35 colonies and 97 polyps from Palinuro were used for the study. Twenty polyps from Punta de la Mona and 31 polyps from Palinuro were inactive, and therefore assumed to be inactive males after fertilization.

All mature active polyps and colonies from Punta de la Mona were observed to have either female or male germ cells inside the mesenteries, as also seen in colonies from Palinuro. Therefore colonies from both sites were gonochoric, both at the polyp and colony level.

Colonies in both localities were ellipsoidal in shape, but different colony morphology was observed between the localities. Polyps inside the colonies from Punta de la Mona were densely crowded, showing a “massive” morphology

(Fig. 2); Palinuro polyps appeared separated showing a “branchy” morphology.

No statistical significance was found in the biometric variables measured (L_c , W_c , A_c) between female and male colonies either at Punta de la Mona or Palinuro (Factorial ANOVA $P>0.20$, data not shown), even between localities (Table 1).

At the polyp level, no statistical significance was found in the biometric variables (L_p , W_p , h_p , V_p) between female and male polyps within localities (Factorial ANOVA $P>0.09$, data not shown). However, significant differences were found between localities among measured polyps (Table 2), with polyps from Punta de la Mona being larger in size than those from Palinuro.

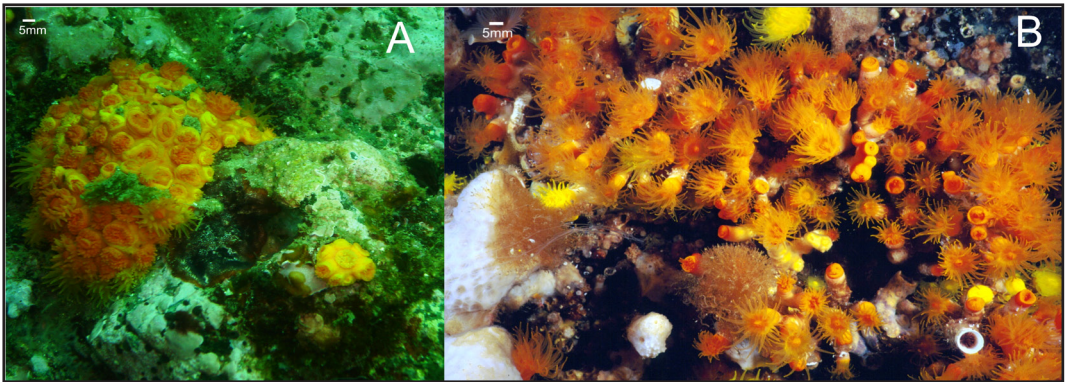


Figure 2. A) colony photographed at Punta de la Mona showing the “massive” morphology, in which polyps inside the colony are densely crowded. B) colonies photographed at Palinuro showing “branchy” morphology, in which polyps are separated from each other.

Table 1. Biometric parameters (mean±SE) of colonies from Punta de la Mona (this study) and Palinuro (Goffredo et al. 2010, 2011). L_c =major axis of the colony; W_c =colony width; A_c =colony area

	Punta de la Mona		Palinuro		Between localities
	Females (N=20)	Males (N=20)	Females (N=16)	Males (N=19)	Factorial ANOVA
L_c (cm)	5.47±1.84	5.55±1.43	5.37±2.04	6.08±1.88	$F_{(1,74)}=0.01, P=0.92$
W_c (cm)	4.12±0.98	4.31±1.09	4.14±1.50	4.44±1.62	$F_{(1,74)}=0.05, P=0.81$
A_c (cm ²)	18.91±10.40	19.26±8.70	19.41±14.55	23.36±14.63	$F_{(1,74)}=0.18, P=0.66$

Gamete development

Spermaries and oocytes from mature active polyps followed the characteristics described in Goffredo et al. (2010).

Spermatogenic indexes decreased as season advanced in both localities, with remaining spermaries visible in June only at Punta de la Mona. The ovogenic index was higher in the month of May in Punta de la Mona (Fig. 3), and started decreasing in Palinuro during February-March (See Fig. 3 from Goffredo et al. 2011).

Table 2. Biometric parameters (mean±SE) of polyps from Punta de la Mona (this study) and Palinuro (Goffredo et al. 2010, 2011). L_p =major axis of the polyp; W_c =minor axis of the polyp; h =height oral-aboral pole; V_p = polyp volume.

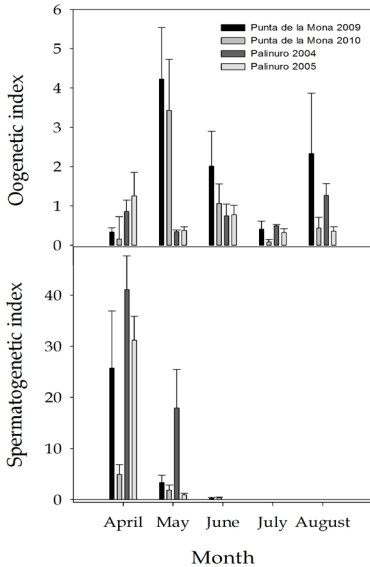
	Punta de la Mona		Palinuro		Between localities
	Females (N=43)	Males (N=45)	Females (N=49)	Males (N=48)	Factorial ANOVA
L_p (mm)	7.85±2.05	7.82±1.76	5.21±0.71	5.01±0.76	$F_{(1,184)}=96.00$ $P<0.01$
W_p (mm)	6.04±1.79	6.84±1.58	4.88±0.76	4.78±0.77	$F_{(1,184)}=40.69$ $P<0.01$
h_p (mm)	7.17±2.66	7.18±2.04	5.18±1.24	4.97±1.20	$F_{(1,184)}=32.43$ $P<0.01$
V_p (mm ³)	297.20±193.74	332.57±214.68	108.4±47.28	98.57±41.38	$F_{(1,184)}=58.75$ $P<0.01$

During the studied period, only spermaries from development stages III to V were found in both localities (Fig. 4), while developmental stage II was only found in Punta de la Mona in April. During June, no spermaries were found in Palinuro, but spermaries in the IV and V stages were still found in Punta de la Mona (Fig. 4)

In Punta de la Mona, mature oocyte (>400µm) frequencies were found to increase from April to June (Fig. 5), indicating that the fertilization period finished in June. Mature oocytes ranged from 400 to 1960 µm. At the polyp level, 40 ± 10 mature oocytes (mean ± SE, hereafter) were found in mean-sized female polyps of $V_p = 300.6 \pm 38.8$ mm³ ($L_p = 7.8 \pm 0.35$ mm; $W_p = 6.56 \pm 0.33$ mm; $h_p = 6.43 \pm 0.47$ mm; $N = 29$). At the colony level, fecundity also varied with colony area, with an average of 1135.93 ± 209.42 mature oocytes found in colonies of 18.24 ± 2.55 cm² in area ($L_c = 5.49 \pm 0.46$ cm; $W_c = 4.02 \pm 0.24$ cm; $N = 27$). There was a positive correlation between polyp length and fecundity (Spearman rank correlation $r_{L_p} = 0.42$, $N = 27$, $P = 0.03$), and a slight positive correlation was found between colony area and colony fecundity (Spearman rank correlation $r_{A_c} = 0.52$, $N = 14$, $P = 0.045$). Meanwhile, in the locality of Palinuro, fertilization occurred from February to May (Goffredo et al. 2011). During this period, mature oocytes ranged from 400 to 1590µm. At the polyp level, a mean of 14 ± 2 mature oocytes were found in mean-sized female polyps of $V_p = 92.81 \pm 9.71$ mm³ ($L_p = 4.67 \pm 0.21$ mm; $W_p = 4.33 \pm 0.20$ mm; $h = 4.93 \pm 0.22$ mm; $N = 42$), with a positive correlation between polyp length and fecundity (Spearman rank correlation $r_{L_p} = 0.56$, $P<0.05$). At the colony level, fecundity varied with colony area (Spearman rank correlation $r_{A_c} = 0.88$, $P<0.05$).

At this level, a mean of 472.33 ± 107.71 mature oocytes were found in mean-sized female colonies of $A_c = 13.46 \pm 3.74 \text{ cm}^2$ ($L_c = 4.47 \pm 0.71 \text{ cm}$; $W_c = 3.40 \pm 0.41 \text{ cm}$; $N = 15$ colonies collected during the fertilization period from February to May).

In both localities, embryos were found in the coelenteric cavity, and gastrulation was observed to take place by delamination. Moreover, in both localities, lipid vesicles were present inside the embryos, as well as inside the oocytes during the different stages of oogenesis. In Punta de la Mona, early stereoblastula (solid and lacking a blastocel; $481\text{-}802 \text{ }\mu\text{m}$ in diameter) and intermediate stereogastrula (a visible layer of cells surrounding the yolk mass; $653\text{-}917 \text{ }\mu\text{m}$), were observed during June 2009 (two female polyps) and July 2010 (three female polyps), when SST was $20\text{-}23^\circ\text{C}$. Planula larvae were seen in the field from the second week of June until the end of July. In the locality of Palinuro, embryos were found in polyps collected during May. Steroblastulae had diameters of $556\text{-}964 \text{ }\mu\text{m}$, and stereogastrulae had diameters of $991\text{-}1134 \text{ }\mu\text{m}$. Planulation in this locality took place between May and July (both in 2004 and 2005), when SST was $19\text{-}25.0^\circ\text{C}$.



Sea water temperature

The Wilcoxon Matched Paired test analysis revealed no significant differences in SST among years within sites (Punta de la Mona $T=3$, $N=5$, $P=0.46$; Palinuro $T=5$, $N=5$, $P=0.50$), but significant differences between localities ($T=6$, $N=10$, $P<0.05$). Mean average values within localities during the sampling period were $20.4 \pm 1.8^\circ\text{C}$ in Punta de la Mona (ranging from 15.1°C to 25.2°C) and $21.5 \pm 1.9^\circ\text{C}$ in Palinuro (ranging from 15.4°C to 25.9°C) (Fig. 6).

Figure 3. Variation in gametic indexes during the studied period.

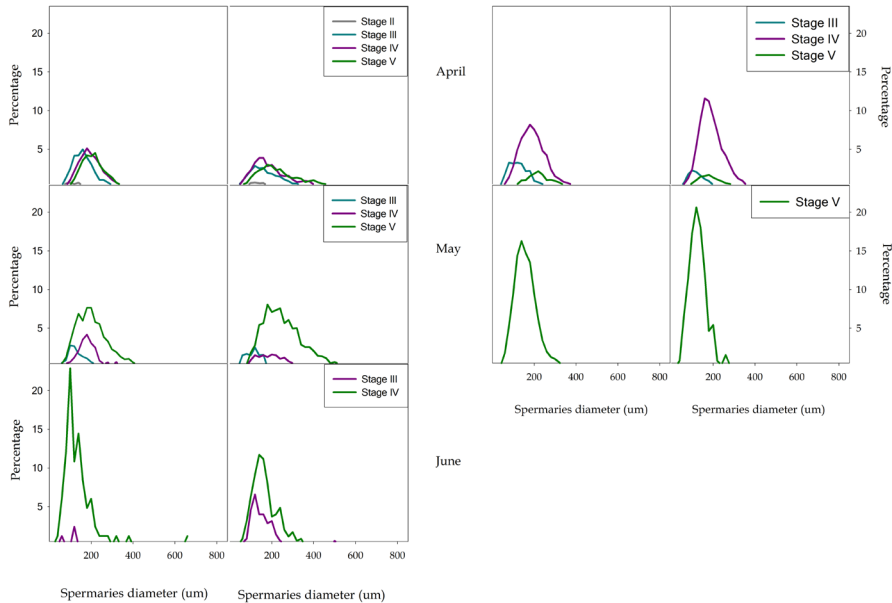


Figure 4. Size-frequency distribution of the four stages of spermaries maturation. Left plots represent Punta de la Mona years 2009-2010 (this study), right ones Palinuro years 2003-2004 (Goffredo et al. 2011), black lines year represents first year samples, grey lines second year samples.

Discussion

This study is in concordance with the morphologic analysis on the sexual reproduction carried out by Goffredo et al. (2010), which characterizes *Astroides calycularis* as gonochoric at both the polyp and colony level in the Tyrrhenian Sea. Moreover, it contradicts the observations made by Lacaze-Duthiers (1873) with a magnifying glass on dissected polyps from colonies sampled from Algerian coasts. The latter author described the colonies of the species to be hermaphroditic, formed mainly by sex-separated polyps, with some rare cases of simultaneous hermaphroditic polyps. Nevertheless, all the studies performed to date conclude that *A. calycularis* is a brooder species. Even though actual available data suggest that sexual patterns are generally consistent within most of the corals (Harrison 2011), species changing sexual condition in different populations have been described in the literature. Such is the case of the scleractinian reef builder coral *Diploastrea heliophora*, first classified as gonochoric on the Great Reef Barrier (Guest et al. 2005), but recorded to have colonies with hermaphroditic polyps, showing concurrent male and female gametes (Guest et al. 2012) in Singapore. As suggested by Guest et al. (2012), polyps within colonies of *D. heliophora* could be predominantly of a sin-

gle sex, but exhibit alternate sexual function with overlap occurring when the end of one gametogenic cycle coincides with the beginning of the next cycle. In other species, such as *Stylophora pistillata*, unidirectional protandry has been regarded related to colony size and age (Rinkevich & Loya 1979). Studies carried out with corals from the family Fungiidae, also show bidirectional sex change in this family (Loya & Skai 2008). Moreover, in octocorals, such as the alcyonarian *Sarcophyton glaucum*, changes in sexual traits have also been observed (Schleyer et al. 2004). Therefore, the possibility that *A. calycularis* might express a different sexuality in populations other than Palinuro and Punta de la Mona cannot be ruled out.

Colony morphology varied between localities, probably due to the differences in habitat of the sampling sites; samples from Punta de la Mona were collected on a vertical wall exposed to sea waves and high levels of hydrodynamism and samples from Palinuro were collected near the entrance of a cave. These two morphologies have been previously described by Zibrowius (1980) and Kruzic et al. (2002). These authors mention that near the surface (high hydrodynamism) colonies have a massive morphology with densely crowded polyps and corallites have a circular or polygonal calix. In these colonies the new polyps bud both in the outskirts and between existing polyps. On the other hand, in deeper waters and sheltered areas such as caves, colonies appear to have a “branchy” morphology with separated polyps that are budded at different heights of the calyx. In the latter morphology corallites show a circular calix. It is understood in biology that phenotypic differences among individuals and species are related to differences in their ecology (Travis

1994). In the case of *A. calycularis*, water movement is suggested to be the factor driving morphological plasticity. Todd (2008) provides a detailed review on the morphological plasticity of corals and the influence of environmental factors. This author found that the main environmental factors affecting morphological plasticity are light, seawater movement, nutrients, sediment and nutrient availability.

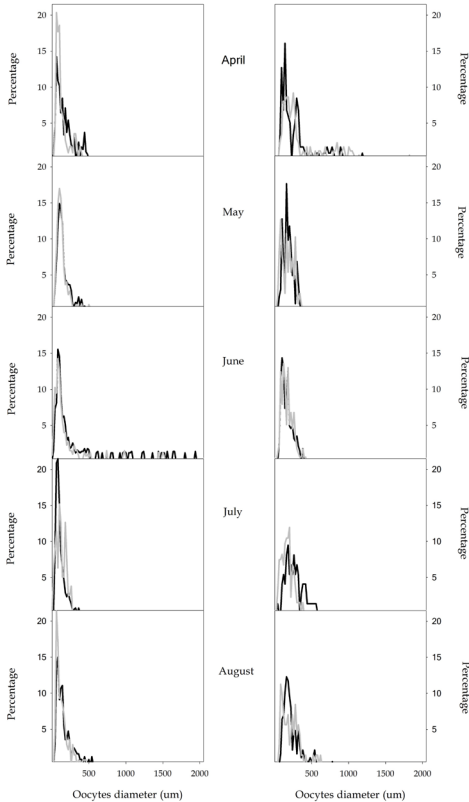


Figure 5. Size-frequency distribution of oocytes. Left plots correspond with Punta de la Mona and right ones with Palinuro. Black lines of both localities, indicate first year samples, grey lines indicates second year samples.

Similarly, Kaandorp (1999) noted that the degree of compactness in *Millepora alcicornis* and *Pocillopora damicornis* increased with increasing hydrodynamism. On the other hand, colonies from Punta de la Mona showed an average number of mature oocytes per colony area, almost six times larger than colonies from Palinuro. Colony size of modular organisms affects the allocation of energy into reproduction (Hall & Hughes 1996), suggesting that the relative investment in growth declines with colony size, allowing more energy for sexual reproduction (Goffredo & Lasker 2006). As in the case of coral reef builders, Hall and Hughes (1996) found a positive correlation between colony size and colony fecundity when comparing different corals from the Great Barrier Reef with different size and morphology at the intraspecific level. As has been found in gorgonians, reproductive output is influenced by the density of polyps in the colony, with a

positive relation between colony size and fecundity (Beiring & Lasker 2000; Tsounis et al. 2006).

The results show a delay in the sexually reproductive cycle of *A. calycularis* in Punta de la Mona compared to Palinuro. In the former locality, despite the lack of data during the previous months, mature oocytes were seen until June, and even mature spermaries were seen in the same month. The fertilization period was described to be during February to May in Palinuro, as shown by the disappearance of mature oocytes and

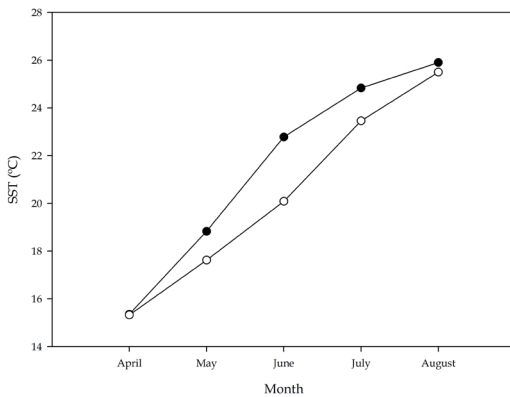


Figure 6. Monthly averages sea surface temperatures. White circles Punta de la Mona; black circles: Palinuro.

the increase in spermaries in developmental stage V (Fig. 3; see also Goffredo et al. 2011). In Punta de la Mona, embryos were found in the coelenteric cavity during June and July (SST 20-23°C); while in Palinuro they were observed in May (SST 19°C). Planula release was observed from the middle of June to the end of July in Punta de la Mona, when SST was 20-23°C (P. Casado-Amezúa Pers obs). Planulation during this period has also been seen since 2008, coinciding with the period when SST reaches 18°C (Terrón-Singler et al. 2011). Planulation in the locality of Palinuro was observed to take place between May and July, when SST was 19-25°C. There is a shift in the period that seawater reaches its maximum temperature from Punta de la Mona in comparison to Palinuro. SST in Punta de la Mona is influenced by the upwelling of deep waters, with this phenomenon being more evident in the summer when the thermal contrast is greater, as observed in infrared satellite images (La Violette 1984), and is more noticeable near the coast when another factor, namely the strong western winds, transport the water offshore where it sinks meeting less dense waters from the Atlantic (Sarhan et al.

2000). Thus, this phenomenon can cause marked SST declines during the spring-summer seasons. Therefore, these features could be responsible for the delay observed in the fertilization timing of *A. calycularis*.

Several scleractinian species from inshore and offshore reefs at the Great Barrier Reef have been observed to spawn within one month of each other, a feature that is suggested to be due to differences in increasing SST (Babcock et al. 1986). Specifically, the role of SST in controlling the reproductive cycle of coral species has been previously documented in Pacific stony corals with a broadcasting reproductive mode (e.g. Glynn et al. 2008; Putron and Rylan 2009) showing that when other abiotic parameters appear to be stable, the timing of the reproductive season corresponds to species-specific temperature responses with latitudinal variations across varying temperature profiles. Other studies with scleractinian species from the central and lower Caribbean, show relative homogeneity in spawning timing as similar oceanographical conditions mitigate the annual changes in seawater temperature (Soong 1991; Steiner 1995). In other anthozoans such as the brooder gorgonians *Paramuricea clavata* and *Eunicella singularis*, the fertilization period has been observed to coincide with increases in SST in the spring; however, between localities a shift in SST increase was observed also affecting the fertilization timing of the gorgonians (Gori et al. 2007). Other factors that can contribute to differences in spawning timing are lunar activity and daylight (Babcock 1994; Glynn et al. 2008) or physiology to enhance fertilization, and predator avoidance (Oliver et al. 1988).

Thus, this study contributes to the knowledge on the population dynamics and structure of Mediterranean scleractinian corals, habitat to various marine species due to their bioconstrunctional features, by showing the phenological and morphological responses to different environmental conditions. Specifically, this survey shows different morphology patterns of *A. calycularis* depending on habitat hydrodynamism, as well as a delay on the fertilization timing of the coral linked with SST conditions.

Acknowledgements

We want to thank to L. Sánchez-Tocino (University of Granada), A. Terrón-Singler, D. León-Muez (Hombre y Territorio Association), Boichi, Charlie (Almuñecar, Granada), O. Hernández and A. Addamo (MNCN-CSIC), for their assistance in the field. We are very grateful to C. Pazzini, C. Marchini, M. Rocchi (Marine Sciences Group), M. Gallardo (MNCN-CSIC), S. Montalbán and O. Sánchez (CNB-CSIC) for their assistance with histological processing. M. Tourmente and E. Roldán (MNCN-CSIC) gave us support for the image analyses of part of the study. Photographed corals from Palinuro were provided by G. Neto. R. Barrientos (University of Castilla La Mancha) significantly improved this manuscript with suggestions. The Regional Government of Andalusia (Consejería

de Medio Ambiente), gave as the sampling permission for this study. S. Young improve significantly the English grammar and writing style. P. Casado-Amezua was funded by a grant from the Spanish Research Council (CSIC). S. Goffredo was funded by the European Research Council (CoralWarm, ERC grant agreement n° 249930). This study was supported by donations from Scuba Nitrox Safety International, Association of Italian Tour Operators, Ministry of Tourism of Egypt, Project Aware foundation and the Spanish Ministry of Science and Innovation (CTM2008-00496/MAR).

References

- Allen A, Gillooly J, Savage V, Brown JH (2006) Kinetic effects of temperature on rates of genetic divergence and speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **103**, 9130-9135.
- Babcock RC, Bull GD, Harrison PL, Heyward AJ, Oliver JK, Wallace CC, Willis BL (1986) Synchronous spawning of 105 scleractinian coral species on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, **90**, 379-394.
- Babcock RC, Wills BL, Simpson CJ (1994) Mass spawning of corals on a high latitude coral reef. *Coral Reefs*, **13**, 161-169.
- Baird AH, Guest JR, Willis BL (2009) Systematic and biogeographical patterns in the reproductive biology of scleractinian corals. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **40**, 551-571.
- Bates WR (2005) Environmental factors affecting reproduction and development in ascidians and other protochordates. *Canadian Journal of Zoology*, **83**, 51-61.
- Beiring EA, Lasker HR (2000) Egg production by colonies of a gorgonian coral. *Marine Ecology Progress Series*, **196**, 169-177.
- Casellato S, Masiero L, Sichirollo E, Soresi S (2007) Hidden secrets of the Northern Adriatic: Tegnùe, peculiar reefs. *Central European Journal of Biology*, **2**, 122-136.
- Fan T, Dai C (1995) Reproductive ecology of the scleractinian coral *Echinopora lamellose* in northern and southern Taiwan. *Marine Biology*, **123**, 565-572.
- Fine M, Zibrowius H, Loya Y (2001). *Oculina patagonica*: a non-lessepsian scleractinian coral invading the Mediterranean Sea. *Marine Biology*, **13**, 1195-1203.
- Giese AC (1959) Comparative physiology. Annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Annual Review of Physiology*, **21**, 547-576.
- Glynn PW, Colley SB, Mate JL, Cortés J, Guzman HM, Bailey RL et al. (2008) Reproductive ecology of the azooxanthellate coral *Tubastrea coccinea* in the Equatorial Eastern Pacific: Part V. Dendrophylliidae. *Marine Biology*, **153**, 529-544.
- Goffredo S, Radetic J, Airi V, Zaccanti F (2005) Sexual reproduction of the solitary sunset cup coral *Leptosammia pruvotti* (Scleractinia, Dendrophylliidae) in the Mediterranean. 1. Morphological aspects of gametogenesis and ontogenesis. *Marine Biology*, **147**, 485-495.

- Goffredo S, Lasker HR (2006) Modular growth of a gorgonian coral can generate predictable patterns of colony growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **336**, 221-229
- Goffredo S, Gasparini G, Marconi G, Putignano MT, Pazzini C, Zaccanti F (2010). Gonochorism and planula brooding in the Mediterranean endemic orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia: Dendrophylliidae): Morphological aspects of gametogenesis and ontogenesis. *Marine Biology Research*, **10**, 421-436.
- Goffredo S, Gasparini G, Marconi G, Putignano MT, Pazzini C, Airi V et al. (2011) Sexual reproduction in the Mediterranean endemic orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia, Dendrophylliidae). *Bulletin of Marine Sciences*, **87**, 589-604.
- Gori A, Linares C, Rossi S, Coma R, Gili JM (2007) Spatial variability in the reproductive cycle of the gorgonians *Paramuricea clavata* and *Eunicella singularis* (Anthozoa, Octocorallia). *Marine Biology*, **151**, 1571-1584.
- Grubelic I, Antolic B, Despalatovi M, Grbec B, Paklar BG (2004) Effect of climatic fluctuations on the distribution of warm-water coral *Astroides calycularis* in the Adriatic Sea: new records and review. *Journal of the Marine Biology Association of the UK*, **84**, 599-602.
- Guest JR, Baird AH, Goh BPL, Chou LM (2005) Seasonal reproduction in equatorial reef corals. *Invertebrate Reproduction and Development*, **48**, 207-218.
- Guest J, Baird A, Goh B, Chou LM (2012) Sexual patterns in scleractinian corals: an unusual pattern in the reef-building species *Diploastrea heliopora*. *Coral Reefs*, DOI 10.1007/s00338-012-0881-4.
- Hall A, Hughes T (1996) Reproductive strategies of modular organisms: comparative studies of reef-building corals. *Ecology*, **77**, 950-963.
- Harrison PL, Wallace CC (1990) Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. In: Dubinsky Z (Ed.). *Ecosystems of the World: Coral Reefs*. Elsevier Science, pp 133-207.
- Harrison PL (2011) Sexual reproduction of scleractinian corals. In: Dubinsky, Z. and Stambler, N. (Eds.). *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Springer, pp 59-85.
- Kain JM (1989) The seasons in the subtidal. *British Phycological Journal*, **24**, 203-215.
- Kaandorp JA (1999) Morphological analysis of growth forms of branching marine sessile organisms along environmental gradients. *Marine Biology*, **134**, 295-306.
- Kinne O (1970) Temperature-invertebrates. In: Kinne, O. (Ed.) *Marine Ecology: A Comprehensive Integrated Treatise of Life in Oceans and Coastal Waters*. Wiley-Interscience, London, UK, pp. 407- 514.
- Kruzic P, Zibrowius H, Pozar-Domac A (2002) Actiniaria and Scleractinia (Cnidaria, Anthozoa) from the Adriatic Sea: First records, confirmed occurrences and significant range extensions of certain species. *Italian Journal of Zoology*, **69**, 345-353.
- Lacaze-Duthiers H (1897). Faune du Golfe du Lion. Coralliaires, Zooanthaires, Sclérodermés. *Archives de Zoologie Expérimentale Générale*, **5**, 1-249.

- La Violette PE (1984). The advection of cyclic submesoscale thermal features in the Alboran Sea Gyre. *Journal of Physical Oceanography*, **14**, 550-565.
- Loya Y, Skai K (2008). Bidirectional sex change in mushroom corals. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences*, **275**, 2335-2343.
- Meroz E, Brickner I, Loya Y, Retzman-Shemer A, Ilan M (2002). The effect of gravity on coral morphology. *Proceedings of the Royal Society*, **224**, 153-166.
- Neves EG, Pires DO (2002). Sexual reproduction of Brazilian coral *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902). *Coral Reefs*, **21**, 161-168.
- O'Connor MI, Bruno JF, Gaines SD, Halpern BS, Lester SE, Kinlan BP et al. (2007) Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution and conservation. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, **104**, 1266-1271.
- Oliver JK, Babcock RC, Harrison PL, Willis BL (1988). The geographic extent of mass coral spawning: clues to proximate and ultimate factors. *Proceedings 6th International Coral Reefs Symposium*, Townsville. 1, 803-810.
- Olive PJW (1995) Annual breeding cycles in marine-invertebrates and environmental temperature probing the proximate and ultimate causes of reproductive synchrony. *Journal of Thermal Biology*, **20**, 79-90.
- Putron JS, Rylan JS (2009) Effect of seawater temperature on reproductive seasonality and fecundity of *Pseudoplexaura porosa* (Cnidaria: Octocorallia): latitudinal variation in Caribbean gorgonian reproduction. *Invertebrate Biology*, **128**, 213-222.
- Riesgo A, Maldonado M (2008) Differences in reproductive timing among sponges sharing habitat and thermal regime. *Invertebrate Biology*, **127**, 357-367.
- Rinkevich B, Loya Y (1979) Reproduction of the Red Sea coral *Stylophora pistillata*. 1. Gonads and planulae. *Marine Ecology Progress Series*, **1**, 133-144.
- Sarhan T, García Lafuente J, Vargas M, Vargas JM, Plaza F (2000) Upwelling in the northwestern Alboran Sea. *Journal of Marine Systems*, **23**, 317-331.
- Schleyer MH, Kruger A, Benayahu Y (2004) Reproduction and the unusual condition of hermaphroditism in *Sarcophyton glaucum* (Octocorallia, Alcyoniidae) in ZwaZulu-Natal, South Africa. *Hydrobiologia*, **530**, 399-409.
- Soong K (1991) Sexual reproductive patterns of shallow water reef corals in Panama. *Bulletin of Marine Sciences*, **49**, 832-846.
- Steiner SCC (1995) Spawning in scleractinian corals from SW Puerto Rico (West Indies). *Bulletin of Marine Sciences*, **56**, 899-902.
- Terrón-Singler A (2011) Detectan la reproducción sexual del coral naranja, una especie amenazada. *Quercus*, **307**, 61.
- Todd P (2008) Morphological plasticity in scleractinian corals. *Biological Reviews*, **83**, 315-337.
- Torrents O, Garrabou J (2011) Fecundity of red coral *Corallium rubrum* (L.) populations inhabiting in contrasting environmental conditions in the NW Mediterranean. *Marine Biology*, **5**, 1019-1028.
- Travis J (1994). Evaluating the adaptive role of morphological plasticity. In:

- Ecological Morphology: integrative organism biology*. Wainwright, P.C. and Reilly, S.M., (eds.). University of Chicago Press. Pp 99-122.
- Tsounis G, Rossi S, Aranguren M, Gili JM, Arntz W (2006) Effects of spatial variability and colony size on the reproductive output and gonadal development cycle of the Mediterranean red coral (*Corallium rubrum* L.). *Marine Biology*, **148**, 513-527.
- Wilson J, Harrison PL (2003) Spawning patterns of scleractinian corals at the Solitary Islands- a high latitude coral community in eastern Australia. *Marine Ecology Progress Series*, **260**, 115-123.
- Zibrowius H (1980) Les scleractiniales de la mediterranee et de l'atlantique nord-oriental. *Memoires de l'Institut Oceanographique*. Fondation Albert 1^{er}, Prince de Monaco.
- Zibrowius H (1995) The "Southern" *Astroides calycularis* in the Pleistocene of the northern Mediterranean-An indicator of climatic changes (Cnidaria, Scleractinia). *Geobios*, **28**, 9-16.

Slight genetic differentiation between western and eastern limits of *Astroides calycularis* (Anthozoa, Scleractinia, Dendrophylliidae) distribution inferred from COI and ITS markers

Resumen

El estudio de la estructura de las poblaciones y su diferenciación a nivel genético es de gran utilidad para la elaboración de planes de manejo y conservación de especies amenazadas. En este estudio, utilizamos marcadores nucleares y mitocondriales (espaciadores internos de genes ribosomales-ITS y citocromo oxidasa, subunidad I-COI) y métodos de análisis filogenéticos y de clados anidados (NCA), como aproximación al conocimiento de la estructura genética de una especie amenazada del Mediterráneo, el coral naranja *Astroides calycularis*, a partir de muestras de 12 localidades a lo largo del área de distribución de la especie. En las localidades situadas en la región más occidental del Mediterráneo, se encontró cierta homogeneidad genética, mientras que al comparar estas localidades con las de las cuencas areglina y del mar Tirreno y la argelina, se observó una ligera diferenciación.

Abstract

Understanding population genetic structure and differentiation among populations is useful for the elaboration of management and conservation plans of threatened species. In this study, we use nuclear and mitochondrial markers (internal transcribed spacers -ITS and cytochrome oxidase subunit one -COI) for phylogenetics and nested clade analyses (NCA), thus providing the first assessment of the genetic structure of the threatened Mediterranean coral *Astroides calycularis*, based on samples from 12 localities along its geographic distribution range. Overall, we found no population differentiation in the westernmost region of the Mediterranean; however, a slight differentiation was observed when comparing this region with the Tyrrhenian and Algerian basins.

Introduction

Polyspecific coral reefs disappeared from the Mediterranean Sea at the end of the Messinian, Late Miocene (Esteban 1996). In spite of this, 33 species of scleractinian corals can currently be found in this sea (approximately half of them are colonial species), only one species, *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767), remains as a monospecific coral-reef builder. Although many of these species are affected by

disruption or regression due to global climate change and human impacts, none of them are included in the annexes of the Habitat Directive, and only one, *Astroides calycularis*, has been included in Annex II of the Berna and Barcelona Conventions (a list of endangered or threatened species).

Astroides calycularis (Pallas, 1766) is a colonial azooxanthellate coral commonly known as “Mediterranean orange coral” because of the deep orange colour of its coenosarc and polyps (Zibrowius 1995). It belongs to the family Dendrophylliidae, which comprises nearly 150 species worldwide (Cairns 2001) and represents approximately 23% of all azooxanthellate coral species (Picciani et al. 2011). Zibrowius (1995) suggested that this coral resembles some species of *Tubastrea*, a genus that occurs worldwide in tropical seas, and in particular with relatively similar species found in Cape Verde islands. More recently, based on skeletal biomineralization patterns and 28S rRNA sequences, the monotypic genus *Astroides* is phylogenetically close to the genera *Balanophyllia* and *Tubastrea* (Cuif et al. 2002). A detailed description of the species has been provided by Zibrowius (1980), and more recently, Goffredo et al. (2011) studied the colony and polyp biometric relationships and intra-colony polyp population size structure. This coral lives in shaded habitats (e.g. vertical walls, overhangs and cave entrances), prefers areas with high hydrodynamics and can be found from the water surface to a depth of approximately 50 metres; however, it is mainly found in shallow waters. In some places, this coral is the dominant species covering up to 80-90% of the surface of the walls. In places of high hydrodynamics, it typically forms massive colonies with polygonal corallites. In sheltered or deeper places, colonies tend to have a bush-shaped morphology with nearly circular corallites.

This species has been characterised as gonochoric, both at the polyp and colony level, and planula-brooder (Goffredo et al. 2010). Field observations performed by various authors have characterised the larvae as having negative buoyancy and a demersal behaviour, and thus crawling along the vertical rocky wall until finding a substrate to settle on (Lacaze-Duthiers 1873; Goffredo et al. 2009).

Some authors regard *A. calycularis* as an ancient Tethyan species (Ocaña et al. 2007; Ocaña et al. 2009). It is considered an indicator of Quaternary climate oscillations (Zibrowius 1995) and a warm-water species with a tolerance for a narrow temperature range (Bianchi & Morri 1993). Based on fossil evidence, its distribution covered the entire Western Mediterranean Sea during certain periods of the Pleistocene (Zibrowius 1995), but disappeared from the Northern Mediterranean areas during colder periods. This response is similar to that of other warm-water species (Ocaña et al. 2007; Ocaña et al. 2009).

Currently, the range distribution of *A. calycularis* is restricted to the south-central part of the Western Mediterranean Sea. In particular, it is found in the following regions: the southeast Iberian Peninsula, from the Strait of Gibraltar to Cape Palos (Murcia); the northern coasts of Africa, from the Strait of Gibraltar to Cape Bonn in Tunisia; around Sicily and nearby islands; and the Gulf of Naples in the Tyrr-

henian Sea (Zibrowius 1995; Bianchi 2007; Goffredo et al. 2010). In addition, some records report its existence in the Atlantic coast of southern Spain and northern Morocco. Recently, *A. calycularis* has also been found in the Adriatic Sea, along the coast of Croatia (Grubelic et al. 2004) up to the Gulf of Venice (Casellato et al. 2007). The recent range expansion of this species into the Adriatic Sea has been influenced by the warming of seawater with the prevailing sea current system and the rocky coastal configuration (Grubelic et al. 2004). However, currently, this species is disappearing in some places because of destruction or loss of habitats caused by human activities, such as coastal development, pollution, diving, angling and illegal fishing of the endolithic date-mussel *Lithophaga lithophaga* (Templado et al. 2004; Moreno et al. 2008).

To better understand the processes impacting regression of this coral during its history, its current expansion to the northeast and the establishment the proper conservation plans, it is important to determine the genetic structure and the extent of gene flow among different populations along its geographical range. It is difficult to disentangle the effects of contemporary gene flow with those of historic population extinctions, expansions and colonisations, all of which have led to the present-day species distribution and population structure. To date, population genetic studies of Mediterranean scleractinian corals are limited to the solitary species *Balanophyllia europea* (Goffredo et al. 2004) and *Leptosamia pruvoti* (Goffredo et al. 2009); in both cases, these studies were based on allozyme electrophoresis.

Therefore the aim of this study is to provide the first characterisation of the population genetic structure of *A. calycularis*.

Materials and methods

Sampling collection

Colonies of *A. calycularis* were collected from 12 sites along its distribution range (Fig. 1, Table 1). We selected superficial colonies (0-5 m) from vertical walls and caves entrances where the population density was higher. At each site, colonies were removed from the rocky substrate with a knife. In order to avoid sampling the same colony twice, colonies were removed from different patches (15-20 mm of diameter).

DNA extraction and amplification

Total DNA was extracted from individual polyps that were preserved in absolute ethanol using ChargeSwitch gDNA Micro Tissue Kit (Invitrogen). Partial sequences of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) and the nuclear region of ribosomal internal transcribed spacers (ITS1+5.8S+ITS2=ITS) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers:

LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' (Folmer et al., 1994) and COI-H 5'-TCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Machordom et al., 2003); ITS2.1 5'-CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC-3' and ITS2.2 5'-CCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC-3' (Hugall et al. 1999). For both sets of primers, the PCR mix contained 1-3µl of DNA, 5 µl of the corresponding buffer (with 10 x 2mM MgCl₂), 1µl of dNTPs mix (10mM), 0.7µl of both primers (10µM), 1.5-2.5 U Tth DNA polymerase (Biotools) and ddH₂O. The final reaction volume was 52 µl. The following PCR conditions were used: in the COI amplification, 94°C (4min), 40 cycles of 94°C (1min), 45°C (1min), 72°C (1min), and a final extension at 72°C (10min); and in the ITS amplification, 94°C (5min), 30 cycles of 94°C (45 s), 57.5°C (1min), 72°C (1min), and a final extension at 72°C (10min). Amplified fragments (approximately 700 bp) were purified by ethanol precipitation prior to sequencing both strands using "BigDye Terminator" (Applied Biosystems) sequencing reactions. Sequence gels were run on an ABI 3730 genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequence analysis

Following removal of the primer regions, DNA sequences obtained for each specimen and marker were aligned and checked using Sequencher 4.6 (Gene Code Corporation). All alignments were validated by eye. A Blast search was performed on GenBank sequences in order to determine the most similar sequences to use as outgroups; *Porites astreoides* for COI (GenBank Accession No. AY451379) and *Tubastrea aurea* for ITS (GenBank Accession No. AY722796) were chosen as outgroups. In analyses using both genes, we used *Tubastrea* sp. as the outgroup (GenBank Accession No. DQ 445807 for COI and AY722796 for ITS).

The analyses were first performed for each gene separately. The congruence among tree topologies of COI and ITS genes was assessed by the partition homogeneity test in PAUP* (Swofford 1998). Nucleotide saturation was evaluated by plotting transition and transversion changes against uncorrected (p') divergence values. Sequence analysis was based on the principles of maximum parsimony (MP), neighbour-joining (NJ) and maximum likelihood (ML), as well as Bayesian principles. The evolutionary model that best fit our data was selected using Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998). Maximum likelihood analysis was performed by Quartet Puzzling (using 1000 replicates) or heuristic search. Support in the phenetic and parsimony analyses was estimated by bootstrapping (1000 repetitions) (Felsenstein 1985).

To test the genetic structure of the observed variation, we used nested clade phylogeographic analysis (NCPA) software (Panchal, 2006) to relate genetic structure to the geographic distribution of the samples. The haplotype network was manually converted into a series of nested clades, following the rules provided by Templeton (2004) and applied by the NCPA program (Panchal 2006). A chi-squared test of geographical association of clades and biological inference from nested clades was applied as the basis for the biological interpretation, according to Templeton (2004).

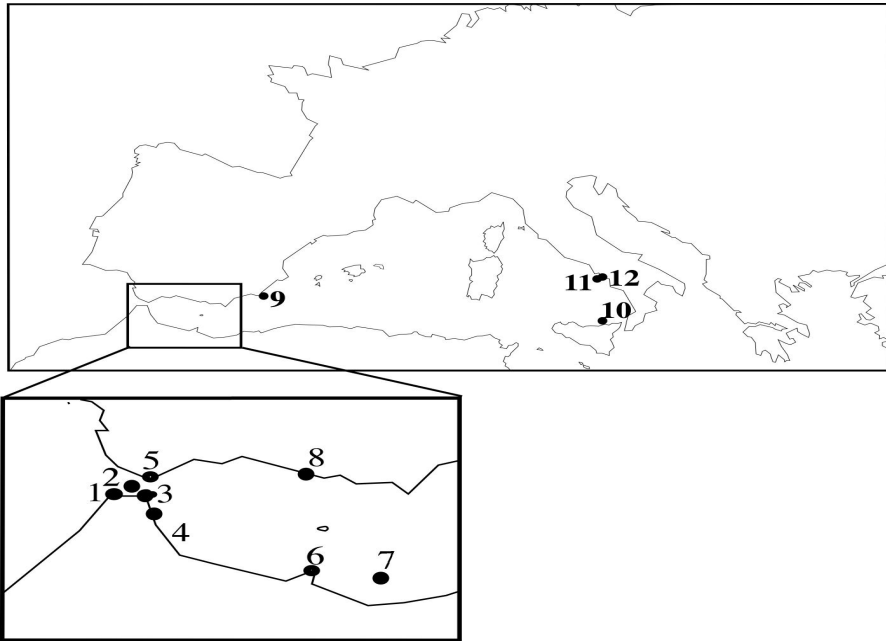


Figure 1. Map of sampling sites. Numbers are referred to in Table 1.

Table 1. Populations analysed for each locus.

POPULATION	REFERENCE	DATE OF SAMPLING	N	
			COI	ITS
Tanger/Marruecos	1	September 2006	10	9
Perejil Island/Spain	2	October 2005	8	9
Hacho Mount /Spain	3	October 2005	7	7
Negro Cape/Maruuecos	4	December 2005	8	8
Tarifa/Spain	5	July 2006	2	2
Tres Forcas Cape/Spain	6	November 2005	10	10
Chafarinas Islands/Spain	7	September 2005	4	3
Coast of Granada/Spain	8	March 2006	8	9
Murcia/Spain	9	August 2005	2	2
Eolie/Italy	10	July 2005	2	2
Capri/Italy	11	October 2005	4	2
Massa Lubrense/Italy	12	October 2005	2	2

Results

Genetic structure

The obtained sequences (a total of 67 for COI and 65 for ITS) were submitted to Genbank with the accession numbers JQ343061 to JQ343125 for ITS and JQ343126 to JQ343192 for COI. Of the 1334 characters included in the matrices (658 for the COI gene and 676 for the ITS region), 1201 characters were constant, 100 variable characters were uninformative, and only 33 characters were informative. According to COI codon positions, the most informative position was the third, and all of the substitutions were synonymous. Base composition was homogenous in all of the taxa analysed. The empirical proportions of the different nucleotides were as follows: A=0.232, C=0.209, G= 0.251 and T= 0.306.

Within the ingroup, the ITS region showed more variability than the COI gene. In the concatenated matrix, the most variable regions occurred in the positions (in the ingroup alignment) 374-390, 480-493 and 568-588, and in other positions, such as 783, 819, 849, 882, 936, 1008, 1026, 1062 and 1120. The first intervals corresponded to the ITS region and the rest to COI. We obtained 67 sequences for COI and 55 sequences for ITS. In total, we obtained sequences for both genes from 45 specimens. The divergence between the outgroup (*Tubastrea*) and ingroup ranged from 1.28% (for COI, with respect to specimens from Italy) to 7.33% (for ITS). The percentage of divergence between the 8 different *A. calycularis* haplotypes, excluding the outgroup, ranged from 0% for specimens belonging to the same population to 1.39% (for COI) and 2.06% (for ITS) between the Italian Massa Lubrense samples and the Murcia samples. Within the western samples (i.e., those from Morocco and the Iberian Peninsula), the population of Murcia presented the highest distances with respect to the other populations.

Given that the partition homogeneity test showed no significant differences ($p=0.29$) between individual data corresponding to COI and ITS, the data from those sequences was analysed and presented together. The best-fit model for this global matrix was the "Transversional model with equal base frequencies" (TVM+I, where $I=0.84$).

The phylogenetic tree showed the relationships among the 8 different haplotypes found in this study (Fig. 2). The main cluster (Fig. 3, node 6) represented samples collected along the Iberian Peninsula coasts and in North Africa. At the base of this group, the population from southeastern Spain (Murcia) was found to be most divergent with respect to the other populations. The Italian samples, which clustered together based on their geographical origin, grouped a greater number of haplotypes in a smaller area, that is, both Eolie and Massa Lubrense samples were grouped together while the two samples from Capri appeared in different groups. Support values for the main nodes were strong for the terminal branches only (Fig. 2). The lack of support for other branches is likely due to the

scarce variation of characters (only 33 informative characters including gaps or 23 characters excluding gaps).

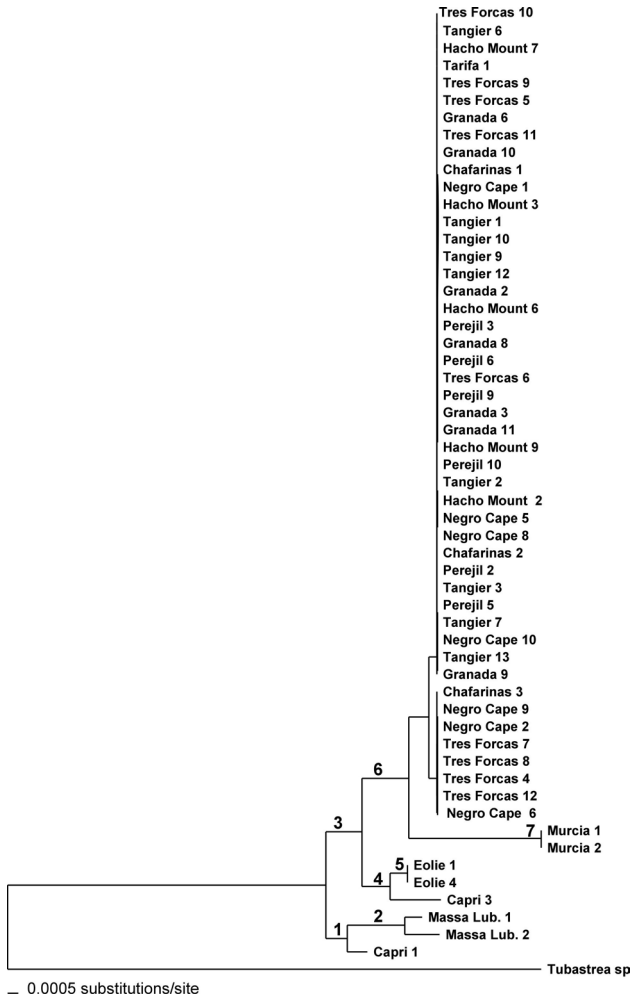


Figure 2. Phylogenetic hypothesis based on COI and ITS sequences. Numbers on branches indicate the posterior probability (in percentage) or bootstrap values. Those values were: 1: --, 61, --, --; 2: 100, 78, 87, 83; 3: 92, --, --, 65; 4: 77, 97, 65, --; 5: 96, 94, 75, 67; 6: 96, 57, 84, 82; 7: 100, 100, 99, 100, for Bayesian inference, maximum parsimony, neighbour-joining and maximum likelihood, respectively (-- represents values under 50 or not recovered by such method).

The nested clade analysis (NCA) on the genetic haplotype network is shown in Fig. 3. Eleven different haplotypes were detected; 8 of these haplotypes corresponded to the ones previously defined in the phylogenetic trees. Three new haplotypes were detected when gaps were considered as a fifth character state,

thus accounting for the discrepancy between analyses. The null hypothesis of no association between the position of haplotypes in the network and geographical location was rejected ($P < 0.05$) for several clades (Fig. 4).

The results of NCA showed a network of haplotypes and haplotypes/missing intermediate steps, which were organised in different levels ranging from level 1 (the most simple) to level 5 (the complete set of haplotypes). Based on the final phylogeographic network (Fig. 3), in level 1, we found that all of the haplotypes in the western group (Morocco and Spain) were directly related, thus forming a homogeneous group with no intermediate steps, except for haplotypes K (Tangier 4) and F (Murcia), which had 1 and 8 intermediate steps, respectively. The largest difference was observed in the eastern group (Italian populations) haplotypes in which from 5 to 14 intermediate steps were found. The two haplotypes most closely related between the two geographical areas had 10 intermediate steps.

In level 2, we found association between the haplotypes from Eolie (D) and one of the haplotypes from Capri (C). Some clusters included haplotypes from both sides of the Gibraltar Strait, such as cluster 2-13, which included haplotypes G (a widely distributed haplotype in the western group) and H (from the Moroccan locality Negro Cape 4), and cluster 2-4, which included two minority haplotypes observed in samples taken from around the Strait of Gibraltar (Tangier, Tarifa, Ceuta) and Tres Forcas.

In level 3, all of the haplotypes from the western group, except for haplotypes I and F, appeared in cluster 3-6. The eastern group was divided into three different sets: the 5 clades grouped into clusters 3-1, 3-2 and 3-4.

The association observed in level 4 interestingly showed a geographical split. Although nearly all of the western haplotypes appeared in cluster 4-3, haplotype I was found in cluster 4-1, even though only one step differentiates haplotype I from haplotypes H or J, both of which are found in the same area as haplotype I. In fact, haplotype I was in cluster 4-1 with haplotypes D (from Eolie) and C (from Capri). Therefore, two of the three clusters represented haplotypes found only in Italy or only in Morocco/Spain, while the third cluster included samples from both of these geographical areas.

The chi-squared test of geographical association of clades and biological inference from the NCA supported statistically significant differences only for clades 3-6 (haplotypes K, J, H and G from sites in of northeast Morocco and Tarifa), 4-1 (haplotypes C, D and I from sites in the Tyrrhenian basin and Charafinas Islands) and 4-3 (haplotypes K, J, H, G and F from sites in northeast Morocco, Tarifa and Murcia) (Table 2). The inferred pattern of biological interpretation for all of the clades was allopatric fragmentation, except in the case of clade 3-6, which remained inconclusive. Overall restricted gene flow or dispersal was found (Table 2).

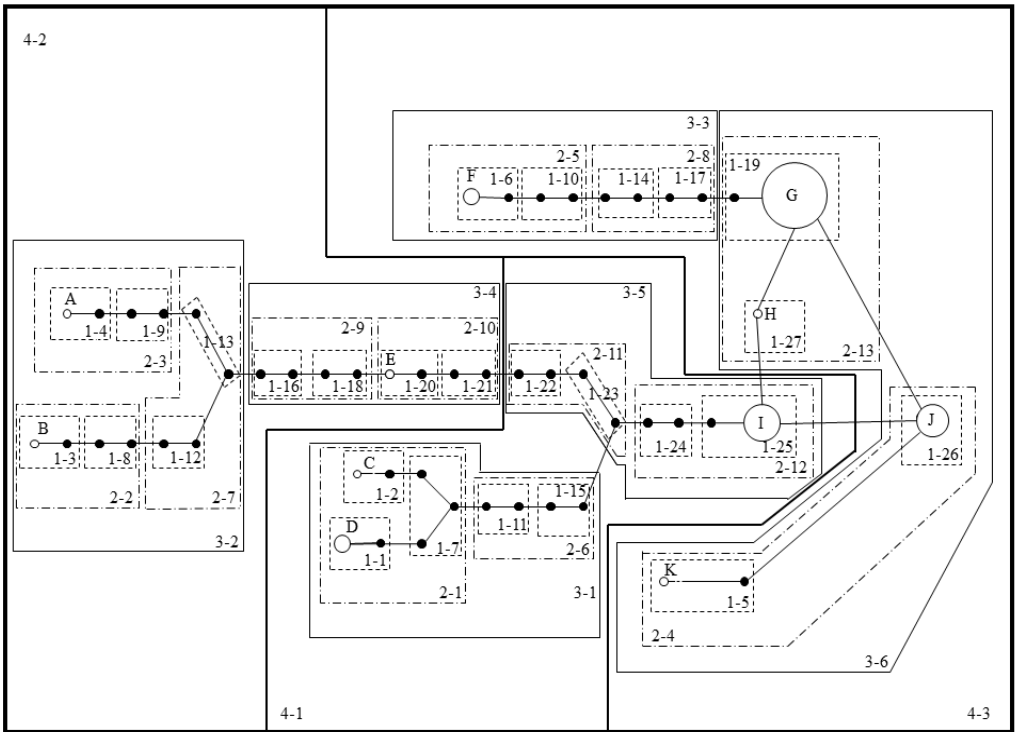


Figure 3. White circles indicate samples haplotypes and black circles are missing intermediate haplotypes inferred by a program such as TCS. We represented all clades, numbers indicating their levels in the total network. The letter inside the boxes identifies the haplotypes. A: Massa Lubrense1; B: Massa Lubrense2; C: Capri3; D: Eólidias1, Eólidias4; E: Capri1; F: Murcia1, Murcia2; G: Chafarinas1, Chafarinas2, Tres Forcas6, Tres Forcas11, Monte Hacho2, Monte Hacho3, Monte Hacho6, Monte Hacho9, Perejil2, Perejil3, Perejil5, Perejil6, Perejil9, Perejil10, Cabo Negro1, Cabo Negro8, Cabo Negro9, Cabo Negro10, Granada2, Granada3, Granada6, Granada 8, Granada9, Granada 10, Granada11, Tanger1, Tanger2, Tanger3, Tanger7, Tanger9, Tanger10, Tanger12, Tanger13; H: Cabo Negro6; I: Chafarinas3, Tres Forcas4, Tres Forcas7, Tres Forcas8, Tres Forcas12, Cabo Negro2, Cabo Negro9; J: Tarifa1, Tres Forcas5, Tres Forcas9, Tres Forcas10, Monte Hacho7; K: Tanger6.

Table 2. Chi-squared test of geographical association of clades and biological inference from nested clade. P is the probability of obtaining a chi-squared statistic larger than or equal to the observed statistic by randomly permuting the original contingency 10000. For each clade with significant geographical associations as detected by permutation test, it is indicated the biological interpretation according to Templeton (2004).

Clade	Permutational chi-squared statistic	P	Chain of inference	Inferred pattern
2-1	3.00	0.332		Null hypothesis cannot be rejected.
2-4	6.00	0.494		Null hypothesis cannot be rejected.
2-13	5.97	0.387		Null hypothesis cannot be rejected.
3-6	17.34	0.015	1-2 IO	Inconclusive outcome.
4-1	9.00	0.034	1-19 NO	Allopatric fragmentation.
4-2	3.00	0.333		Null hypothesis cannot be rejected.
4-3	42.00	0.003	1-19 NO	Allopatric fragmentation.
Total clade	68.68	0.0001	1-2-3-5-6*-7-8 YES	Restricted gene flow/dispersal.

Discussion

Overall, the results obtained in this study suggest a scarce genetic structure of *A. calycularis* among the samples analysed. Both the phylogenetic inferences and the networks generated from NCA showed a slight differentiation between the Italian samples and the samples from the westernmost Mediterranean, and within the westernmost Mediterranean samples, between those from Murcia (southeastern Spain) and the rest of the samples (from the Alboran Sea coast along the southern Iberian Peninsula and northern Morocco).

The population of Murcia is placed in the Algerian Basin and northeast of the Almeria-Oran oceanographic Front (AOF), which constitutes the eastern boundary of the Alboran Sea. The AOF is a thermohaline density front generated by the convergence between the inflow of Atlantic water through the Strait of Gibraltar and the Mediterranean water (Tintore et al. 1988). It has been regarded as an oceanographic barrier for dispersal of some species (Patarnello et al. 2007; Mokhtar-Jamaï et al. 2011). This oceanographic front appears to be more efficient in population isolation than the strong current of the Gibraltar Strait, which purportedly should prevent gamete interchange between the northern and southern parts of the Gi-

braltar Strait (Zane et al. 2000). However, in this study, we found that several clusters contained haplotypes originated from both sides of the Gibraltar Strait, such as clusters 2-13 and 2-4, which had two minority haplotypes observed in samples taken near the Strait of Gibraltar (Tangier and Ceuta on the African side and Tarifa on the European side).

Indeed, the westernmost populations (from the Alboran Sea and other nearby localities) shared haplotypes, including between those from the Gibraltar Strait and the rest of the Moroccan and Iberian populations, thus showing no significant barriers for gamete interchange. Thus, is difficult to determine a genetic structure in this area for *A. calycularis*, despite being a barrier or transition zone for numerous species (Lo Brutto et al. 2004; Baus et al. 2005; González-Wangüemert et al. 2006; Atarhouch et al. 2007). Recent life histories of such populations may explain the low variation in the species studied here. For instance, the reduction in the effective size or regressions/expansions of populations may be due to previous glaciations (Duran et al. 2004; Lemaire et al. 2005) and present-day human activities.

Another factor that may explain this low level of variation is the selection of markers for analysis. Our genetic studies were based on the analysis of two commonly used genes: one nuclear region (ITS) (Diekmann et al. 2001) and one mitochondrial gene (COI) (Medina et al. 1999; van Oppen et al. 2002). Genetic data for scleractinian coral populations remains surprisingly limited, mainly due to the lack of adequate markers (Ridgway & Gates, 2006). Mitochondrial DNA of anthozoans is known to have a slow evolutionary rate (Hellberg 2006; Costantini et al. 2010). Studies in octocorals (Alcyonacea) suggest that the slow evolution of the mitochondrial genome may be due to a mitochondrial DNA mismatch-repair system encoded by the gene mtMSH (France & Hoover 2002). In addition, ITS sequence markers may display intra-individual rDNA variation (Wei et al. 2006). Problems related to the ITS-1 level of intraspecific variability have been previously addressed in the Mediterranean red coral *Corallium rubrum* (Costantini et al. 2007). In our study, ITS sequences had three times more changes compared to the sequences of the COI fragment, despite having sequenced similar length for both regions. Several taxonomical and phylogeographical questions have been addressed with the use of this nuclear marker (Wörheide et al. 2002; Lam & Morton 2003), in some cases using its secondary structure as a character (Chen et al. 2004).

Even though the variation rate of mitochondrial genes can be as much as 10 or 20 times slower than single-copy nuclear genes (McFadden et al. 2004), these genes continue to be used for phylogenetic and phylogeographical analysis (Medina et al. 1999; van Oppen et al. 2001), mainly in combination with other markers (Cuif et al. 2002; Romano & Palumbi 1997), due to their usefulness or possible comparison with other studies.

Regardless, the near lack of genetic structure found in this study should be re-

examined using other variable markers, such as microsatellites (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* 2010), which will confirm if the observed lack of structure is real or derived of the genetic markers used.

Given the genetic data presented here (even with remarkably low variation), conservation strategy policies must necessarily focus on maintaining the continuity of the species habitat (threatened by human development) to ensure connectivity between adjacent populations. Some distinguished populations, such as in Murcia, have to be especially protected due to their isolation and unique genetic characteristics.

Acknowledgements

We thank the managers and people who contributed to the sampling collections, directly or by the corresponding sampling permits. This study was supported by the BBVA Foundation, the Spanish Ministry of Science and Innovation (CTM2008-00496/MAR and CGL2011-23306) and the “Organismo Autónomo Parques Nacionales”. PMS was funded by the project “Biología y divulgación para la conservación y mejor gestión de la especie *Astroides calycularis* y sus hábitats en los litorales de Ceuta y Melilla”, granted by the Spanish Environment Ministry. PCA was funded by a grant from the Spanish Research Council (CSIC). We also are grateful to Pepe Fernández for image quality assistance and to Melinda Buckley for for her conscientious revision of the English.

References

- Atarhouch T, Rami M, Naciri M, Dakkak A (2007) Genetic population structure of sardine (*Sardina pilchardus*) off Morocco detected with intron polymorphism (EPIC-PCR). *Marine Biology*, **150**, 521-528.
- Baus E, Darrock DJ, Bruford MW (2005) Gene-flow patterns in Atlantic and Mediterranean populations of the Lusitanian sea star *Asterina gibbosa*. *Molecular Ecology*, **14**, 3373-3382.
- Bianchi CN, Morri C (1993) Range extension of warm-water species in the northern Mediterranean: evidence for climatic fluctuations? *Porcupine Newsletter*, **5**, 156-159.
- Bianchi CN (2007) Biodiversity issues for the forthcoming tropical Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, **580**, 7-21.
- Cairns SD (2001). A generic revision and phylogenetic analysis of the Dendrophylliidae (Cnidaria: Scleractinia). *Smithsonian Contributions to Zoology*, **615**, 1-75.
- Casellato S, Masiero L, Sichirollo E, Soresi S (2007) Hidden secrets of the Northern Adriatic: “Tegnúe”, peculiar reefs. *Central European Journal of Biology*, **2**, 122-136.
- Chen CA, Chang C, Wei NV, Chen CH, Lein YT, Lin HE, Dai CF, Wallace CC

- (2004) Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal Internal transcribed spacer 2 (ITS) in Scleractinian corals. *Zoological Studies*, **43**, 759-771.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007) Genetic structuring of the temperate gorgonian coral (*Corallium rubrum*) across the western Mediterranean Sea revealed by microsatellite and nuclear sequences. *Molecular Ecology*, **16**, 5168-5182.
- Costantini F, Taviani M, Remia A, Pintus E, Schembri PJ, Abbiati M (2010) Deep-water *Corallium rubrum* (L., 1758) from the Mediterranean Sea: preliminary characterisation. *Marine Ecology*, **31**, 261-269.
- Cuif JP, Lecointre G, Perrin C, Tillier A, Tillier S (2002) Patterns of septal biomineralization in Scleractinia compared with their 28S rRNA phylogeny: a dual approach for a new taxonomic framework. *Zoologica Scripta*, **3**, 459-473.
- Diekmann OE, Bak RPM, Stam WT, Olsen JL (2001) Molecular genetic evidence for probable reticulate speciation in the coral genus *Madracis* from a Caribbean fringing reef slope. *Marine Biology*, **139**, 221-233.
- Duran S, Palacín C, Becerro, MA, Turon X, Giribet G (2004) Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology*, **13**, 3317-3328.
- Esteban M (1996) An overview of Miocene reefs from Mediterranean areas: General trends and facies models. In: E.K. Franseen, M. Esteban, W.C. Ward & J.M. Rouchy (eds.). Models for carbonate stratigraphy from Miocene Reef Complexes of the Mediterranean regions. SEPM (Society for Sedimentary Geology). *Concepts in Sedimentology and Paleontology Series*, no. 5: 3-53.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
- 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*, **39**, 294-299.
- France SC, Hoover LL (2002). DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiologia*, **471**, 149-155.
- Goffredo S, Mezzomonaco L, Zaccanti F (2004) Genetic differentiation among populations of the Mediterranean hermaphroditic brooding coral *Balanophyllia europaea* (Scleractinia: Dendrophylliidae). *Marine Biology*, **145**, 1075-1083.
- Goffredo S, Di Ceglie S, Zaccanti F (2009) Genetic differentiation of the temperate-subtropical coral *Leptosammia pruvoti* in the Mediterranean Sea. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, **55**, 99-115.
- Goffredo S, Gasparini G, Marconi G, Putignano MT, Pazzini C, Zaccanti F (2010) Gonochorism and planula brooding in the Mediterranean endemic orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia: Dendrophylliidae). Morphological aspects of gametogenesis and ontogenesis. *Marine Biology Research*, **6**, 421-436.
- Goffredo S, Caroselli E, Gasparini G, Marconi G, Putignano MT, Pazzini C et

- al. (2011) Colony and polyp biometry and size structure in the orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia: Dendrophylliidae). *Marine Biology Research*, **7**, 272-280.
- González-Wangüemert M, Perez-Ruzafa A, García-Charton JA, Marcos C (2006) Genetic differentiation and gene flow of two sparidae subspecies, *Diplodus sargus sargus* and *Diplodus sargus cadenati* in Atlantic and south-west Mediterranean populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, **89**, 705-717.
- Grubelic I, Antolic B, Despalatovic M, Grbec B, Beg Paklar G (2004) Effect of climatic fluctuations on the distribution of warm-water coral *Astroides calycularis* in the Adriatic Sea: new records and review. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **84**, 599-602.
- Hellberg ME (2006) No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evolutionary Biology*, **6**, 24-32.
- Hugall A, Stanton J, Moritz C (1999) Reticulate evolution and the origins of the ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 157-164.
- Lacaze-Duthiers H (1873) Développement des coralliaires. Actinaires à Polypiers. *Archives de Zoologie Expérimentale Générale*, **2**, 269-348.
- Lam K, Morton B (2003) Morphological and ITS1, 5.8S, and partial ITS2 ribosomal DNA sequences distinctions between two species *Platygyra* (Cnidaria: Scleractinia) from Hong Kong. *Marine Biotechnology*, **5**, 555-567.
- Lemaire C, Versini JJ, Bonhomme F (2005) Maintenance of genetic differentiation across a transition zone in the sea: discordance between nuclear and cytoplasmic markers. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 70-80.
- Lo Brutto S, Arcuelo M, Parrinello N (2004) Congruence in genetic markers used to describe Mediterranean and Atlantic population of European hake (*Merluccius merluccius* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, **20**, 81-86.
- Machordom A, Araujo R, Erpenbeck D, Ramos M A (2003) Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **78**, 235-252.
- McFadden CS, Tullis ID, Hutchinson MB, Winner K, Sohm JA (2004) Variation in coding (NADH Dehydrogenase Subunits 2, 3, and 6) and noncoding intergenic spacer regions of the mitochondrial genome in Octocarallia (Cnidaria: Anthozoa). *Marine Biotechnology*, **6**, 516-526.
- Medina M, Weil E, Szmant AM (1999) Examination of the *Monastrea annularis* species complex (Cnidaria: Scleractinia) using ITS and COI sequences. *Marine Biotechnology*, **1**, 89-97.
- Mokhtar-Jamaï K, Pascual M, Ledoux JB, Coma R, Féral JP, Garrabou J et al. (2011) From global to local genetic structuring in the red gorgonian *Paramunicea clavata*: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Molecular Ecology*, **20**, 3291-3305.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al. (2010)

- Permanent genetic resources added to the molecular ecology resources database 1 August 2009-30 September 2009. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 232-236. <http://tomato.bi.trinity.edu/manuscripts/10-1/mer-09-034>.
- Moreno D, de la Linde A, Arroyo MC, López-González PJ (2008) *Astroides calycularis* (Pallas, 1766). In: J.M. Barea-Azcón, E. Ballesteros-Duperón & D. Moreno (coords.). Libro rojo de los invertebrados de Andalucía. Tomo 1. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla: 281-287.
- Ocaña O, Opresko DM, Brito A (2007) First record of the black coral *Antipathella wollastoni* (Anthozoa: Antipatharia) outside of Macaronesian Waters. *Revista de la Academia Canaria de Ciencias*, **18**, 125-138.
- Ocaña O, Ramos MA, Templado J (2009) Los paisajes sumergidos de la región de Ceuta y su biodiversidad. Museo del Mar de Ceuta, Ceuta, 254 pp.
- Panchal M (2006) The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics*, **23**, 509-510.
- Patarnello T, Volckaert FAMJ, Castilho R (2007) Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, **16**, 4426-4444.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817-818.
- Ridgway T, Gates RD (2006) Why are there so few genetic markers available for coral population analysis? *Symbiosis*, **41**, 1-7
- Romano SL, Palumbi SR (1997) Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16S ribosomal gene region in scleractinian corals. *Journal of Molecular Evolution*, **45**, 397-411.
- Swofford DL (1998) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other Methods). Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Templado J, Calvo M, Luque AA, Garvía A, Maldonado M, Moro L (2004). Guía de los invertebrados y peces marinos españoles protegidos por la legislación nacional e internacional. Ministerio de Medio Ambiente, Serie Técnica, Madrid. 214 pp.
- Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, **13**, 789-809.
- Tintore J, Violette PE, Blade I, Cruzado A (1988) A study of an intense density front in the eastern Alboran Sea: the Almeria-Oran Front. *Journal of Physical Oceanography*, **18**, 1384-1397.
- van Oppen MJH, Wörheide G, Takabayashi M (2002) Nuclear markers in evolutionary and population genetic studies of scleractinian corals and sponges. In K. Moosa (ed.). *Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium*. Bali, Indonesia, 339-346.
- van Oppen MJH, McDonald BJ, Willis B, Miller DJ (2001) The evolutionary history of the coral genus *Acropora* (Scleractinia, Cnidaria) based on a mitochondrial and nuclear marker: reticulation, incomplete lineage sorting, or morphological

- convergence? *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 1315-1329.
- Wei NWV, Wallace CC, Dai CF, Pillary KRM, Chen CA (2006) Analyses of the ribosomal internal transcribed spacers (ITS) and the 5.8S gene indicate that extremely high rDNA heterogeneity is a unique feature in the scleractinian coral genus *Acropora* (Scleractinia; Acroporidae). *Zoological Studies*, **45**, 404-418.
- Wörheide G, Hooper JNA, Degnan BM (2002) Phylogeography of western Pacific *Leucetta* `chagosensis' (Porifera: Calcarea) from ribosomal DNA sequences: implications for population history and conservation of the Great Barrier Reef World Heritage Area (Australia). *Molecular Ecology*, **11**, 1753-1768.
- Zane L, Ostellari L, Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cuzin-Roudy J, Buchholz Fet al (2000) Genetic differentiation in a pelagic crustacean (*Meganyctiphanes norvegica*: Euphausiacea) from the North East Atlantic and the Mediterranean Sea. *Marine Biology*, **136**, 191-199.
- Zibrowius H (1980) Les scléactiniaires de la Méditerranée et de l'Atlantique nord-oriental. *Mémoires de l'Institut Océanographique (Monaco)*, **11**, 1-284.
- Zibrowius H (1995) The "Southern" *Astroides calycularis* in the Pleistocene of the northern Mediterranean - an indicator of climatic changes (Cnidaria, Scleractinia). *Geobios*, **28**, 9-16.

Development of microsatellite markers for the threatened orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia, Dendrophylliidae)

Resumen

En este estudio, se describe el desarrollo de trece marcadores microsatélite para el coral amenazado *Astroides calycularis*. El polimorfismo de los marcadores desarrollados se testó en 24 pólipos de diferentes colonias. Los resultados muestran que el número de total alelos es de 2-14 (promedio $N_a=5,1$), la heterocigosidad observada es de 0,47 ($H_e=0,45$). Estos nuevos marcadores microsatélite serán de utilidad para estudios sobre genética de la conservación de esta especie, así como para mejorar la resolución a nivel de individuo. Los cebadores diseñados se testaron también en 4 especies diferentes del género *Tubastrea*, el género de la familia Dendrophylliidae mas cercano filogeneticamente a *A. calycularis*, con amplificaciones exitosas para la mayoría de los loci.

Abstract

Thirteen microsatellite loci for the threatened orange coral, *Astroides calycularis* have been designed. The polymorphism of these thirteen loci was tested in 24 polyps from different colonies. The results show that the allele numbers for each loci ranged from 2 to 14 (mean $N_a=5.1$), with an average observed heterozygosity of 0.47 ($H_e=0.45$). These new loci could be useful for studies on conservation genetic research on populations of this species and help improve the resolution of individual identification. Primers were also tested in four different species of *Tubastrea*, the Dendrophillyd genus more phylogenetically close to *Astroides*, with successful amplifications for the majority of the loci.

Astroides calycularis (Pallas, 1766) is an emblematic Mediterranean stony coral, currently restricted to the Southwestern Basin, where it forms deep orange color colonies. This species resembles, both ecologically and morphologically, *Tubastrea* species, a Dendrophyllid genus that is widely distributed in tropical seas (Zibrowius 1995). Due to its limited geographic distribution, its regression in historical times and the destruction of most of the coastal shores where it occurs, *A. calycularis* is considered under protection, and it is included in Annex II of the Barcelona Convention. Moreover, this species is included in the Spanish Catalog of Endangered Species under the category of “vulnerable” (Templado *et al.* 2004).

The aim of this study is to provide informative molecular markers to help promote population genetic studies for this endangered species of coral, in order to better manage and conserve its populations. Here, we report the development of 13 microsatellite loci for the orange coral *Astroides calycularis*.

A partial DNA library was generated using hybridization capture for enrichment of repeat DNA sequences. DNA was extracted from tissue from a single polyp of *A. calycularis* following a phenol-chloroform procedure, and 4 to 5µg of DNA were digested with 50U of MboI endonuclease (Promega). Digested fragments were ligated with SauL1 (5'-GGCCAGAGACCCCAAGCTTCG-3') and SauL2 (5'-PO₄-GATCCGAAGCTTGGGGTCTCTGGCC-3') linkers. Fragments from 250 to 1200bp were excise from 2.5% agarose gel, purified (Biotools gel purification kit) and amplified using SauL1 as primer. The resultant polymerase chain reaction (PCR) product was used for the repeat sequences enrichment using eight different 3'biotin labeled probes: (AT)_{10'} (CT)_{10'} (AC)_{10'} (AAC)_{8'} (AAG)_{8'} (ATA)_{8'} (GAT)_{8'} (ACAG)_{6'} bound to streptavidin-coated beads (Dynabeads M-280, Invitrogen). Fragments that hybridized with the repeat sequences were ligated to pGEM-T vector (Promega) and transformed into TOPO; the bacteria were grown over night at 37°C on LB agar plates supplemented with X-Gal-IPTG and ampicillin. Recombinant colonies were identified by blue/white screening and clones containing microsatellites were identified by colony PCR as described in Bloor *et al.* (2006). Positive clones were PCR amplified with M13 primers and sequenced on an ABI PRISM 3730 Sequencer (Applied Biosystems). Sequences were edited using the program SEQUENCHER 4.6 (GeneCode Corporation). Of a total of 326 sequenced positive clones, 115 contained repeat sequences and 39 were regarded as useful. Amplification primers, were designed for those sequences that were considered useful, using the program Primer 3 (Rozen & Skatletsky 2000), and were then tested in 8 polyps that belonged to different colonies from 4 different sampling localities. Products were fluorescently labeled by re-amplification as described in Acevedo *et al.* (2009) (Table 1). PCR amplifications were performed with 0.3ng DNA (extracted using the Invitrogen ChargeSwitch gDNA Micro Tissue Kit or BioSprint[™] 15DNA Blood Kit (45) Qiagen), 1x standard reaction buffer [75 mM Tris HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄], 0.2mM dNTPs, 0.5µM of each primer and 0.25U Taq polymerase (Biotools). The cycling

profile was 94°C for 5min then 35 cycles at 94°C for 30s, 56°C for 30s and 72°C for 30s and a final extension at 72°C for 10min. Fluorescently labeled PCR products were run on an ABI PRISM 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems) with the GeneScan-500 (LIZ) internal size standard and analyzed with the GeneMapper software (Applied Biosystems).

Twenty four coral polyps from different colonies were collected from Isabel II Islet at Chafarinas Islands (off the African coast of the Alborán Sea). The colonies were at least distant 1.5m from each other. Individual polyps from each colony were typed (using above PCR conditions) to determine levels of polymorphism. Number of alleles (N_a), observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) and Probability of Identity (PI) value were calculated using GeneAlex 6.0 software (Peakall & Smouse, 2006) (Table 1). A test of Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were carried out using the program GenePop 3.4 (Raymond and Rousset, 1995), using 1000 dememorizations with 100 batches (1000 iterations per batch).

Thirteen loci were considered to amplify adequately and give interpretable chromatograms. A total of 66 alleles (2 to 14 alleles per locus) were detected across the thirteen loci in the 24 single polyps sampled from *A. calycularis* colonies. Observed and expected heterozygosities ranged from 0.083 to 0.958 and 0.080 to 0.864, respectively (Table1). Only locus Ac-L25 showed a significant heterozygote deficit, the other loci showing allele frequencies in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium. None of the loci showed significant linkage disequilibrium. The possible existence of null alleles for locus Ac-L25 was explored by testing six different primer pair combinations. Five combinations gave the same genotyping profile, and one combination gave fewer numbers of heterozygotes than the original primer set. This result suggests that the deficit of heterozygotes is due to other causes than null alleles (e.g. linkage of this microsatellite region with a gene under selection).

The probability of identity (Peakall & Smouse 2006) reached zero when combining the two most polymorphic microsatellites. Moreover, eleven of these thirteen characterized microsatellites are needed if the probability of identity is going to be calculated among siblings. These data show that the characterized loci would help to improve individual resolution at population level which could be very useful for conservation studies of this endangered species.

Primers were also tested in 4 species of the genus *Tubastrea* from Espiritu Santo island (Vanuatu). PCR conditions used were those for *A. calycularis*, with no specific optimization of the PCR parameters. Successful amplifications were obtained for the majority of the loci (Table 2). This is in concordance with the findings of an earlier phylogenetic study (Cairns 2001) that shows *A. calycularis* to be phylogenetically close to species of the genus *Tubastrea*.

Table 1. Description of thirteen microsatellite loci isolated from *Astroides calycularis* based on a sample of 24 polyps from different colonies (N=24). Primer sequence, repeat motif, size of cloned alleles, number of alleles (N_a), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and GenBank accession number.

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	Allele size range (bp)#	N_a	H_o	H_e	P-value	GenBank accession n.
Ac-7E-AC	(AC) ₁₃	F: NED-TGTTGTGAAACCCAAACCAA R: GTCGGCTCCCTGAAAAATA	210-220	6	0.750	0.644	0.957	GQ292717
Ac-L7	(GAT) ₁₅	F: 6-FAM-CCGAAAGCTGGTGAATATGACAAAATG R: GAAGTCGAAAGTIGCATGT	154-196	8	0.333	0.334	0.322	GQ292718
Ac-L10	(GAT) ₁₁ GGT(GAT) ₄	F: 6-FAM-GCTTTCGTGGAGCAGTTCAT R: CTGCCCAAATGTACAATGC	260-278	3	0.083	0.081	1.000	GQ292719
Ac-L11	(TCA) ₁₄	F: 6-FAM-TCAACCACCTGCTGTATGAGAGT R: CCCAATTGACTCACTGGTTT	260-308	2	0.375	0.430	0.638	GQ292720
Ac-L18	(CA) ₁₇ CG(CA) ₄	F: NED-CGTACTGCCCTACACCGC R: AAGCACCTTCCTCTCAAACG	270-302	12	0.875	0.859	0.107	GQ292721
Ac-L20	(TG) ₂₃	F: 6-FAM-AGCAAAAAGCTCGTGGACTCT R: CAAGAGGATTGACCCAGGAA	356-386	14	0.958	0.864	0.514	GQ292722
Ac-L22	(AGAC) ₉	F: PET-TGGCCGTATTTCTACCCAAA R: TCCCGCTCATAATTTATCCA	215-219	2	0.083	0.080	1.000	GQ292723
Ac-L23	(AGAC) ₇ AGTC(AGAC) ₂ AGAAA(AGAC) ₂	F: VIC-ACCGTCTTACCCACAGCAC R: GGGCTTGGCCCTTTTATACC	291-299	3	0.333	0.385	0.655	GQ292724

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	Allele size range (bp)#	N _a	H _o	H _e	P-value	GenBank accession n.
Ac-L25	(CAT) ₁₈	F1: PET-TGCCCTGGCTTAAAGTGA F2: PET-CCAGAAAAATGGGAAAAGG F3: PET-AATGTTCCGATGAGAGGTCTGG F4: PET-ATAAGTAGGCCAGAAAAATG R1: CGTTCGCATCTGACATCATT R2: CGCATAAAACGTGTCGCATC	123-144	6	0.375	0.500	0.026*	GQ292725
Ac-L31	(GT) ₄ GC(GT) ₂ AT (GT) ₅ GC(GT) ₂ AT GTCT(GT) ₁₁	F: 6-FAM-CTACCCGATGCACITGCTTT R: AAGAAATAGCCACCGTGCAGT	265-267	2	0.217	0.194	1.000	GQ496302
Ac-L33	(GAYA) ₁₁ GACGCACA (GAYA) ₅ CAGTA(GYA) ₅ TACAYA) ₁₁	F: VIC-AGAAACATGATCAAGCGAGGA R: CAGTACAGCACATGTC AAGCA	336-412	3	0.600	0.520	0.504	GQ496303
Ac-L34	(GAT) ₁₀ N ₁₉ (GAT) ₄	F: 6-FAM-GCTGTTACCCGGAGCAATAC R: AAGCTTCGGGCTTGGTTT	221-224	2	0.636	0.500	0.382	GQ496304
Ac-L37	(GRT) ₁₀ GAC(GRT) ₂ GTTGAC(GRT) ₂ GTT (GRT) ₁₂	F: PET-GCAATGGAGAAAACCTGTGGA R: ACACGTTCAITTTGTGCGATGC	210-231	3	0.565	0.490	0.835	GQ496305

Based on the GeneScan-500 (LIZ) size standard.

*Significant heterozygote deficit.

F: All primers were fluorescently end-labeled with 6-FAM, NED, VIC or PET by reamplification with the oligonucleotide primer PaulAnn (5'-TGACGACCCCAATGCTACG-3') (Acevedo et al. 2009).

R: All reverse primer was 'DIG-Tailed' with 5'-GTTTCTT-3' (Brownstein, 1996) to facilitate genotyping.

(1) Good primer combinations for typing locus Ac-L25 were: F1/R1 (123-144bp), F2/R1 (186-203bp), F2/R2 (194-215bp), F4/R2(211-220bp), F1/R2(171-192bp), F3/R1(172-187bp), F2/R2(194-215bp), F3R2(171-192bp).

Table 2. Cross-amplification test of the markers developed for *Astroides calycularis* in four different species of *Tubastrea*, a closely related genus. Three of the four *Tubastrea* species were not individually identified. Plus (+) and minus (-) signs correspond to successful and unsuccessful amplification, respectively.

Species/ locus	Ac-7E-AC	Ac-L7	Ac-L10	Ac-L11	Ac-L18	Ac-L20	Ac-L22	Ac-L23	Ac-L25	Ac-L31	Ac-L33	Ac-L34	Ac-L37
<i>Tubastrea micrantha</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tubastrea</i> sp. 1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Tubastrea</i> sp. 2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Tubastrea</i> sp. 3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge to Luis Sánchez Tocino and Javier Guallart for their help with samples collection and José Templado, for his ideas on this study and finally, the director and staff of the Biological Station of Refugio Nacional de Caza de las Islas Chafarinas for their valuable collaboration. This study was founded by the Fundación BBVA.

References

- Acevedo I, Bloor P, Cabezas P, Toledo C, Calvo M, Machordom A (2009) Development of tetranucleotide microsatellite markers for the cushion star, *Asterina gibbosa*, and cross-species amplification. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 274- 277.
- Brownstein MJ (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques*, **20**, 1004-1010.
- Bloor P, De Laguna HB, Kemp SJ (2006) Highly polymorphic tetranucleotide microsatellite loci for the eastern Canary Island lizard, *Gallotia atlantica*. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 737-739.
- Cairns S (2001) A generic revision and phylogenetic analysis of the Dendrophylliidae (Cnidaria: Scleractinia). *Smithsonian contributions to Zoology*. N° 615.
- Peakal R, Smouse PE (2006) GENEALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols* (eds. Misener S, Krawtez S), pp.365-386. Humana Press, Totowa, New Jersey,
- Templado J, Calvo (eds.) (2004) Guía de invertebrados y peces Marinos protegidos por la legislación nacional e internacional. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Madrid. 214pp.
- Zibrowius H (1995) The "Southern" *Astroides calycularis* in the pleistocene of the northern mediterranean- an indicator of climatic changes (Cnidaria, Scleractinia). *Geobios*, **28**, 9-16.

Genetic assessment of population structure and connectivity in the threatened Mediterranean coral *Astroides calycularis* (Scleractinia, Dendrophylliidae) at different spatial scales

Resumen

Comprender los patrones de dispersión, estructura de las poblaciones y conectividad entre éstas es de gran utilidad a la hora de establecer estrategias de manejo y conservación de especies amenazadas. Los marcadores moleculares son herramientas útiles como estimadores indirectos de estas características. En este estudio evaluamos la estructura genética de las poblaciones del coral naranja *Astroides calycularis* en el mar de Alborán a escalas regional y local, y en tres localidades fuera de esta cuenca. Utilizamos métodos bayesianos de agrupación y técnicas tradicionales de estadística de la F y D_{est} para determinar la estructura y conectividad entre poblaciones de este coral. Enfoques de verosimilitud y coalescencia se utilizaron para inferir los patrones de migración y tamaños efectivos de la población. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto un alto nivel de conectividad entre las localidades separadas no más de un kilómetro y moderados niveles de diferenciación genética entre localidades más distantes, lo que corresponde con un modelo de dispersión y flujo génico “paso a paso”. Los datos obtenidos sugieren que la conectividad entre las poblaciones de este coral se debe principalmente a la biología de la larva plánula de la especie, con escasa capacidad de dispersión; además los procesos hidrográficos, frentes oceanográficos y la distribución del sustrato rocoso a lo largo de la costa pueden influir en la dispersión de éstas plánulas.

Abstract

Understanding dispersal patterns, population structure and connectivity among populations is helpful in the management and conservation of threatened species. Molecular markers are useful tools as indirect estimators of these characteristics. In this study we assess the population genetic structure of the orange coral *Astroides calycularis* in the Alboran Sea at local and regional scale, and at three localities outside of this basin. Bayesian clustering methods, traditional F-statistics and D_{est} statistics were used to determine the patterns of genetic structure. Likelihood and coalescence approaches were used to infer migration patterns and effective population sizes. The results obtained reveal a high level of connectivity among localities separated by as much as one kilometer and moderate levels of genetic

differentiation among more distant localities, somewhat corresponding with a stepping-stone model of gene flow and connectivity. These data suggest that connectivity among populations of this coral is mainly driven by the biology of the species, with low dispersal abilities; in addition, hydrodynamic processes, oceanographic fronts and the distribution of rocky substrate along the coastline may influence larval dispersal.

Introduction

Population dynamics and structure of marine organisms reflect the historical and contemporary interaction at different spatial and temporal scales among a complex set of ecological, demographic, behavioral, oceanographic, climatic and geological processes (Grosberg & Cunningham 2001). Within this general framework, it is worth mentioning that population connectivity plays a fundamental role from local to metapopulation dynamics and in structure, genetic diversity, demographic structure and the resilience of populations (Botsford et al. 2001). Therein, all those features are linked with species life history traits, such as species dispersal capacity at any stage of its life cycle, and its interaction with associated biotic and abiotic factors (DiBacco et al. 2006). Among the latter, dispersal among populations can be affected by physical barriers to larval dispersal (hydrographic fronts, upwelling systems, eddies or counter currents) (Pineda et al. 2007), or enhanced by oceanographic features such as global and local water currents (Thiel & Gutow 2005) or drafting events (Fraser et al. 2011). Most marine benthic invertebrates have restricted adult movement, so their larval stages represent their main, and likely their only, opportunity for dispersal (Hellberg 2009). Since, in general, the larval phase of marine invertebrates is difficult to track molecular tools provide an ideal technique for indirect estimation of population structure and connectivity (Cowen & Sponaugle 2009). Besides, defining the scale and processes that affect connectivity among marine populations and the identification of barriers to gene flow are fundamental tasks for understanding their genetic structure and establishing appropriate management and conservation plans for threatened species (Botsford et al. 2001).

Within the generally high diversity found throughout the Mediterranean Sea (Coll et al. 2010), some studies suggest that the Alboran Sea, the westernmost sub-basin of the Mediterranean Sea, harbors one or more hotspots of biodiversity due to the co-existence of species from three marine biogeographic provinces (Mediterranean, Lusitanian and Mauritanian regions) and to the endemic species restricted to this zone (Coll et al. 2010; Aguilar et al. 2011). The eastern boundary of the Alboran Sea is delimited by the Almeria-Oran Front (AOF). The AOF is a strong, large-scale density front extending between Cabo de Gata (SE corner of Spain) and Oran (Algeria), formed by the convergence of two distinct water masses and controlled by the geographic position and strength of the Eastern Alboran

Gyre (Tintoré et al. 1988). Physical and biochemical data indicate that this front is limited to the upper 300 m, with a strong southward baroclinic jet. This front acts as an effective barrier for many planktonic organisms and larvae likely due to the presence of a zone of turbulences and to pronounced changes in salinity and temperature gradients associated with water currents. Some molecular studies have shown noticeable genetic differences between populations on either side of the front (see Patarnello et al. 2007 for a review).

The scleractinian coral *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) is an azooxanthellate colonial species, characterized by the bright orange color of its coenosarc and polyps (Zibrowius 1995). It is a typical shallow water species that usually lives close to sea level, from the intertidal fringe to a depth of 40m, with lower abundances of the species below this level (Zibrowius 1995; Kruzic et al. 2002). This coral is considered a warm-water species with a narrow temperature tolerance (Bianchi 2007). Even though it was widely distributed in the western Mediterranean during the Pleistocene, climatic fluctuations occurred during that period leading to a regression of the species (Zibrowius 1995). Its current distribution range is limited to rocky coastal areas of the southwestern basin of the Mediterranean, presently undergoing a net regression due to several anthropogenic factors (Moreno et al. 2008). Because of its limited geographic distribution, and the historical and current regression of the species, *A. calycularis* is considered under protection, and catalogued as “vulnerable” under different national and international legislative assessments (Templado et al. 2004).

A. calycularis has been characterized as a brooder coral (Lacaze-Duthiers 1873; Goffredo et al. 2010). Once released, its planula larvae show negative buoyancy and demersal behavior, crawling along the vertical rocky wall before finding a substrate on which to settle (Goffredo et al. 2010). Hence, it is predicted that the species' larvae will show low dispersal capabilities. Limited larval dispersal, and the subsequent restricted gene flow and connectivity, can lead to a low degree of local genetic variability, and increased differentiation among populations as a result of isolation by distance (Goldson et al. 2001). The relationship between the dispersal ability of organisms and the genetic differentiation of their populations at multiple scales provides a fundamental link between ecology and evolution (Bohonak 1999). These features of *A. calycularis* may reveal different historical patterns and migration routes than populations of high dispersal species, in which local genetic variability may be enhanced by random mixing of alleles from other populations (Slatkin 1993), thus, contributing to a more complete knowledge of the relationships between evolutionary history and contemporary distribution of genetic variation (Marshall & Morgan 2011).

Taking into account all of the above, the main aims of this study were to assess the genetic structure and connectivity patterns among populations of *A. calycularis* in the Alboran Sea at local and regional scales. In addition, we aimed to compare structure and connectivity with more distant localities through the inclusion of

three populations outside of this basin which correspond to two distal limits within its overall range.

Material and Methods

Sample collection

We focused our study on the Alboran Sea, the westernmost basin of the Mediterranean Sea. Moreover, in order to get a more complete picture of the population genetics of *A. calycularis* throughout its distribution range, we included three additional localities outside of the Alboran Sea: one in the Algerian Basin and two more in the Tyrrhenian Sea. These three localities correspond to the known limits of the distribution range of *A. calycularis* (Fig. 1, Table 1). Therefore, the sampling design followed a hierarchical approach, allowing the study of genetic structure, connectivity and gene flow patterns of the species considering a local scale with six sites at the Chafarinas Islands and two sites at Alboran Island (distance among localities range from 0.6 to 1.4 km); a regional scale that is within all the localities of the Alboran Sea (distance between localities range from 18.5 to 471.7 km); and three distant localities outside of the Alboran Basin distant up to 1500 km from its limit, the AOF: Portman Bay (Algerian Basin), Panarea Island and Palinuro (Tyrrhenian Basin) allowing the study the above mentioned parameters at more distant localities and the effect of putative barriers among the different marine areas involved in the study.

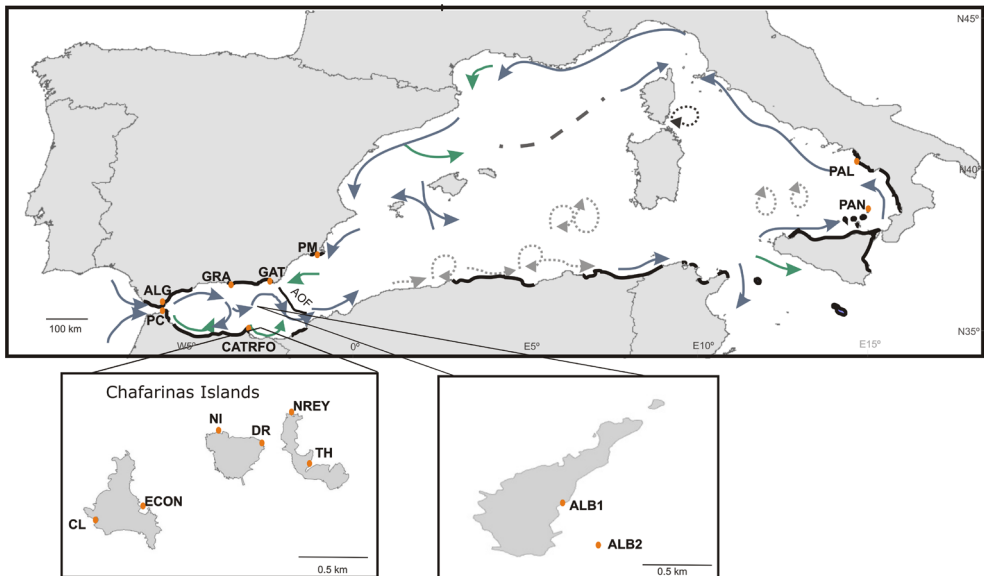


Figure 1. Geographic location of the sixteen localities where *Astroides calycularis* was sampled. The black line indicates the coasts and nearby islands where the species is known. (+) symbols represent the places where fossils of the species have been found. Sea surface currents are included. Blue arrows, main currents; green arrow, secondary paths/ temporal; grey circles, mesoscale instability. (modified from Millot 1999) (for locality codes see Table 1).

Three of the sampled localities corresponded with Marine Protected Areas (MPAs): Cabo de Gata, Chafarinas Islands and Alboran Island (see table 1), that allowed us to establish an initial survey on the genetic condition of this areas and its relation to nearby localities.

At each of the sampled localities, individual polyps from 18-31 adult colonies were randomly collected by SCUBA diving. Sampled colonies were randomly collected but a minimum distance of 1-2m was considered in order to avoid sampling the same colony twice. In order to minimize the damage to the sampled colonies and taking into account the “vulnerable” status of the coral and the scarcity of colonies in several localities, 1-2 polyps were cut with scissors from each colony. Samples were immediately stored in a vial in absolute ethanol until laboratory analyses.

Table 1. Sampling localities of *Astroides calycularis*

Basin	Locality	Code	Geographical coordinates		Sample size
			Latitude	Longitude	
Alboran Sea	Algeciras	ALG	36°06'42.18"N	05°24'52.56"W	25
Alboran Sea	Ceuta	PC	35°53'45.13"N	5°16'47.71"W	25
Alboran Sea	Granada	GRA	36°43'40.50"N	3°41'38.10"W	20
Alboran Sea	Cape Tres Forcas	CATRFO	35°25'56.50"N	2°59'34.61"W	23
Alboran Sea	<i>Alborán Island</i>				
	Limpets Cave	ALB1	35°56'59.11"N	3°2'17.72"W	18
	South of Alboran Island	ALB2	35°56'53.84"N	3°2'25.59"W	24
Alboran Sea	<i>Chafarinas Islands</i>				
	Congreso Island. Cuevas del Lobo	CL	35°10'40.67"N	2°26'37.03"W	22
	Congreso Island. East face of the island	ECON	35°10'40.73"N	2°26'21.72"W	22
	Isabel II Island. North face of the island	NI	35°11'0.66"N	2°25'45.26"W	20
	Isabel II Island. Dique Roto	DR	35°10'53.63"N	2°25'34.98"W	24
	Rey Francisco Island. North face of the island	NREY	35°11'5.78"N	2°25'23.15"W	22
	Rey Francisco Island. Tajo del Halcón	TH	35°10'53.84"N	2°25'23.75"W	22
Alboran Sea	Cabo de Gata	GAT	36°43'34.08"N	2°11'45.60"W	25
Algerian Basin	Portman Bay	PM	37°34'42.96"N	0°50'31.77"W	23
Tyrrhenian Basin	Panarea Island	PAN	38°38'10.67"N	15°04'15.21"E	31
Tyrrhenian Basin	Palinuro	PAL	40°1'43.58"N	15°16'4.36"E	24

DNA extraction, microsatellite amplification and genotyping

Total DNA was extracted from a total of 381 polyps, using Qiagen BioSprint IT 15DNA Blood Kit (45). Thirteen microsatellite loci specifically developed for *A. calycularis* (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al. 2010), were amplified with fluorescently labeled primers following the PCR conditions described in Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al. (2010). PCR products were visualized with an automated sequencer (ABI PRISM 3730 DNA Sequencer, Applied Biosystems) with the GeneScan-500 (LIZ) internal size standard. Electropherograms were analyzed for allele scoring with Genemapper software 3.0 (Applied Biosystems).

Data analysis

Genetic diversity

We quantified genetic diversity as allelic richness (N_a , number of alleles) per sample for each locus and over all loci and private allele richness (P_a) per locality and overall loci. Both analyses were performed using GenAlEx 6.0 (Peakall & Smousse 2006). The number of alleles standardized to those of the population sample with smallest size ($N=18$) was calculated with the rarefaction method implemented in FSTAT ver. 2.9.3.2 (Goudet 1995).

Analyses of departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) within populations for each locus and over all loci were quantified as the observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities using GenAlEx 6.0 software (Peakall & Smousse 2006). Estimations of the inbreeding coefficient, F_{IS} , an estimate of the deficit or excess of heterozygotes, within each population for each locus and over all loci were computed with Genetix software (Belkhir et al. 2004). Significance of the estimation analysis was tested with 10 000 permutations.

MICRO-CHECKER v.2.2.3 software (van Oosterhout et al. 2004) was used to check for scoring errors due to stuttering, large allele dropout and to estimate null allele frequencies.

Linkage disequilibrium (LD) was tested among all pairs of loci at each of the sampled locations with a permutation test using GenePop version 3.4 (Raymond & Rousset 1995a). Analysis of significance was tested with Markov chain Monte Carlo (MCMC that was run using 1000 dememorizations with 100 batches and 1000 iterations per batch).

Step-down Bonferroni (Holm 1979) correction was applied to P-values in all the statistical analyses that included multiple comparisons.

Neutrality of the markers was tested using LOSITAN software (Antao et al. 2008), which performs an F_{ST} -outlier analysis (Beaumont & Nichols 1996) to identify microsatellite loci under selection. 50 000 simulations of the software

were generated. Significance was estimated with a 95% confidence interval. Two rounds of the analysis were performed, one across the whole data set and a second one removing from the analysis the two more distant localities (PAN and PAL, for these and the following localities codes, see Table 1) in order to avoid the effect of random drift and historical events that can affect gene flow and drift, that could potentially bias the relative influence of natural selection on the studied markers (Hellberg 1995, Luikart et al. 2003). Both rounds were conducted for both the infinite alleles (IAM) and the stepwise mutation model (SMM) (Kimura & Crow 1964).

Sampling benthic sessile invertebrates may result in the collection of closely related individuals. That would lead to non-independent genotypes and violation of HWE and LD assumptions. Therefore, the software ML-RELATE (Kalinowski et al. 2006) was used to calculate which of four levels of relatedness (unrelated, half-siblings, full-siblings and parent-offspring) had the highest likelihood for each pair of individuals within populations. Also, in order to ensure that duplicate samples (e.g. polyps sampled twice) were not included in the analyses, the software Cervus (Kalinowski et al. 2007) was used for detecting duplicated genotypes.

Population genetic structure analysis

We estimated population genetic structure using three different approaches: (i) a Bayesian clustering method; (ii) a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA); and (iii) traditional measures of genetic differentiation (F_{ST}) among a priori defined populations (indicating the genetic subdivision among populations) and D_{est} , an estimator of actual differentiation (Jost 2008).

The number of genetically differentiated *A. calycularis* populations, K , was estimated by employing the Bayesian approach implemented in the software STRUCTURE (Pritchard et al. 2000), without a priori information on the geographical location of each sample. A hierarchical approach was used for this analysis, running the “admixture ancestry model” (because even though the planula stage of *A. calycularis* has been characterized as demersal, connected populations could occur through surface currents) under the assumption of “correlated allele frequencies” to improve clustering of closely related populations. MCMC consisted of 50 000 burn-in iterations followed by 500 000 sampled iterations. To check the consistency of the results, 20 replicated runs were launched for each K . The K value that better fit the data set was inferred by plotting the log probability of the data ($\text{Log } P(X|K)$) as a function of K across the 20 runs, corresponding to the selected K value with the point at which the curves plateau (Pritchard et al. 2000). The software was run three times. On a first run the likelihood of the data and following probabilities for the different number of populations were calculated with K (1-16), where K is the different number of populations. After plotting $\text{Log } P(X|K)$ as a function of K , there was no clear plateau but a weak increase in $\text{Log } P(X|K)$; thus, as no

single K value provided a full description of population structure because of the additional substructure (Mokhtar-Jamaï *et al.* 2011), the values between 2 and 14 were discussed. As K=2 corresponded to the two localities in the Tyrrhenian Basin *versus* those in the Alboran Sea-Algerian Basin, on a second run, only the localities across the Alboran and Algerian Basins were taken into account for the analysis K (1-14). In this second run the peninsular locations north of Morocco, PC and CATRFO (Table1; Fig. 1), were found to have high degrees of admixture within two of the identified clusters. Therefore, samples from both localities were designated as “unknown” and STRUCTURE was a third time to assign these genotypes to their place of origin with the PopInfo option.

ARLEQUIN 3.1.1 (Excoffier *et al.* 2005) was used to perform hierarchical spatial analysis of molecular variance (AMOVA, n= 1000 permutations), using the groups defined by STRUCTURE in each of the runs.

For the measures of genetic differentiation, sample sites were used as a population unit. We estimated F_{ST} values and their statistical significance with 10 000 bootstrap replicates (Weir & Cockerman 1984) using ARLEQUIN 3.1.1 software (Excoffier *et al.* 2005). As null alleles can induce overestimation of genetic distances (Chapuis & Estoup 2007), pairwise estimates were computed with and without correction for null alleles (Brookfield 1996).

Recently, the use of F_{ST} statistics to assess differentiation with hypervariable markers has been questioned as it depends on within-population heterozygosity tending to underestimate the differentiation between populations as variation increases (Jost 2008). Therefore, the estimator of actual differentiation (D_{est}) was also calculated. The package DEMETics (Gerlach *et al.* 2010) within the statistical package R v2.12.2 (R Development Core Team 2009) was used to estimate pairwise population D_{est} values and bootstrapping (1000 iterations) was used to calculate P values. Nevertheless, as Whitlock (2011) recently maintain F_{ST} estimations should still be reported as they better convey the evolutionary and demographic processes that lead to differentiation among populations.

We calculated the influence of geographic distance on population genetic differentiation with two models: Rousset (1997) model for two-dimensional habitats with the correlation between pairwise population linearized F_{ST} ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) and the logarithm of the geographical distance (in meters); and Slatkin (1993), which used the logarithm of \hat{M} calculated separately for pairs of populations, (where $\hat{M} = (1-F_{ST})/4F_{ST}$) as a measure of similarity, versus the logarithm of the geographical distance. This parameter corresponds to the number of migrants required to account for observed genetic differences if migrants could move directly between populations. In both cases, Mantel tests (10000 permutations) were used to assess the statistical significance. The strength of the isolation by distance (IBD) relationship was quantified with the slope and intercept of genetic similarity (\hat{M}) or distance (linearized F_{ST}) against geographic distance. Both parameters were calculated using reduced major-axis regression (RMA) (Sokal &

Rohlf 1981). Asymmetric 95% confidence intervals around the RMA regression coefficient were calculated with 10 000 bootstraps around individual population pairs. All the analyses were done with IBDWS software (Jensen et al. 2005).

We used PopTools software (Hood 2010) with $n=1000$ randomizations to perform a Mantel test with the D_{est} parameter and the logarithm of the geographical distance.

At first instance, the IBD patterns among the different parameters for measuring genetic distance and the geographical distance were assessed on the whole data set. As a second step, in order to ensure that the three most distantly localities outside of the Alboran Basin did not impact the significance of the IBD analysis, the analysis was repeated taking into account only the thirteen sampling localities in the Alboran Basin. Geographical distances among localities along the same coast were measured as the minimum coastal distance, generalized at the scale of 1:25 000, and distances between sampling sites of different coastal areas were determined by means of dead-reckoning distances.

Detection of migrants, migration rates and effective population sizes

We estimated first-generation migrants, individuals not born in the corresponding sampled population, with GENECLASS 2.0. (Cornuet et al. 1999). The detection of migrants was estimated under the option "L_home", the likelihood of finding a given individual in the population in which it was sampled, which is the most appropriate estimation to use when not all potential source populations have been sampled (Paetkau *et al.* 2004). The method used was a Bayesian approach (Rannala & Mountain 1997) and Monte-Carlo resampling of 10 000 individuals per locality (Paetkau *et al.* 2004). The analysis was run between pairwise sampling localities along the entire dataset.

We used the software Migrate 2.1.3. (Beerli & Felsenstein 2001) to infer the population size parameter Θ ($4N_e\mu$) (where N_e is the effective population size and μ is the mutation rate per site), and migration rates (m/μ) (where m is the immigration rate per generation). We used the software under the maximum likelihood strategy to build a full migration matrix model with a Brownian motion approximation to the stepwise mutation model. As suggested by the program author, Markov chain parameters were set as short chains = 10 (10 000 genealogies sampled) and long chains = 3 (100 000 genealogies sampled), with a burn-in of 10 000 genealogies for each chain. We ran the software twice to verify consistency of results. The program was run on a set of data structured according to the five clusters inferred by the Bayesian STRUCTURE analysis.

Results

Genetic diversity

Overall allelic richness ranged from 2.1 (Ac-L22) to 10.6 (Ac-L20) (Table S1, Supporting Information). At each locality, allelic richness ranged from 2.92 (PM) to 7.15 (PAL). Mean value was 4.70 ± 0.22 (mean \pm SD, here and hereafter) (Table 2). Private allelic richness ranged from 0 (ALG) to 1.92 (PAN) (mean value of 0.35 ± 0.60). Allelic richness after rarefaction ranged from 2.55 (PM) to 6.15 (PAN), with a mean value of 4.54 ± 1.13 (Table 2). Over all loci, significant heterozygote deficiencies were found in six localities out of sixteen (Table 2). Multilocus F_{IS} values ranged from -0.028 (DR) to 0.188 (PM). Observed heterozygosities (H_o) ranged from 0.21 (PM) to 0.59 (PAL), unbiased expected heterozygosities (H_e) were on the range of 0.27 (PM) to 0.63 (PAN and PAL). Mean value of $H_o = 0.47 \pm 0.02$ and $H_e = 0.49 \pm 0.02$ (Table 2). Examining each locus separately, F_{IS} values ranged from -0.533 for Ac-L11 (PAN) to 1.000 for Ac-L31 (PM) (Table S1, Supporting Information).

Departures from HWE equilibrium were not generalized in all loci for each sampled site. In cases of heterozygote deficiencies, evidence for null alleles was checked and their frequencies were computed at each locus for each sampled site (Table S1, Supporting Information). No evidence of allele dropout or scoring errors due to stuttering was found. The analysis detected the possibility of null alleles in several loci across different localities (Table S1, Supporting Information). Over all the localities and loci analyzed, 7.2% of the F_{IS} values were statistically significant due to a deficit of heterozygotes and all showed different estimated frequencies of null alleles, from 0.03 for Ac-L25 (PM) to 0.19 for Ac-L23 (PAN). However, applying the corresponding correction for null alleles (Brookfield 1996, in all cases) did not qualitatively affect the results, as 4.3% of the F_{IS} values were still significant.

Overall, LD among loci was found ($P < 0.05$ after step-down Bonferroni correction) in only four of the seventy-eight pairwise comparisons per sampling locality, involving different loci. Only the LD analyses of loci Ac-L10 and Ac-L37 were significant for two localities at the same time (ALB2 and PAN). Physical linkage can therefore be discarded.

On the first run, a neutrality test carried out under the IAM model, the analysis showed loci Ac-7E-AC, Ac-L18 and Ac-L20 to be candidates for exhibiting balancing selection. Under the SMM model, only locus Ac-7E-AC appeared as an outlier. On the second run, after removing the most distant localities (PAN and PAL) no loci were found to be under selection for both the IAM and the SMM models. Therefore it is possible to assume that no loci used deviate from neutrality.

An average number of $85.9\% \pm 4.7$ of paired individuals of all the collected polyps were assigned as unrelated in the likelihood analysis. Parent-offspring relations were found in 0.7 (PAN and PAL) to 11.6% (PM) of the pairwise comparisons.

Full-siblings were found in 0.7% (ALB1) to 6.0% (PM) and half-siblings were found in 7.3% (PAN and PAL) to 12.6% (NREY) of the individual pairwise comparisons (Fig. S1, Supporting Information). All individuals examined had a distinct genetic identity, and none were clone mates, indicating that individuals were not sampled twice even though all reproduce sexually.

Population genetic structure

On the first STRUCTURE run after plotting $\text{Log } P(X|K)$ as a function of K , we did not find a clear plateau but rather a weak increase in $\text{Log } P(X|K)$ values from $K=2$ to $K=16$ (Fig. 3Sa, Supporting Information). For $K=2$, a clear separation appeared between samples from the Tyrrhenian Sea (PAN and PA, hereafter “Tyrrhenian Sea cluster”) and the Alboran Sea-Algerian Basin localities (Fig. 2a). On the second STRUCTURE run, eliminating populations from the “Tyrrhenian Sea cluster”, a plot of $\text{Log } P(X|K)$ against the number of K , revealed clear $\text{Log } P(X|K)$ increments in $K=4$, $K=6$ and $K=8$. $K=4$ had the highest likelihood mean ($\text{Log } P(X|K) = -8665.05 \pm 1.5$) (Fig. 3Sb, Supporting Information) with less standard error throughout the 20 replicates, being considered the most consistent analysis. We then took into consideration parameter $K=4$, where samples from ALG, GRA and GAT were grouped in cluster 1 (hereafter “South Iberian Peninsula cluster”), ALB1 and ALB2 in cluster 2 (hereafter “Alboran Island cluster”), the six localities of Chafarinas Islands in cluster 3 (hereafter “Northwest Morocco cluster”) and the locality in the Algerian Basin, PM, was separated in a single cluster (cluster 4) (hereafter “Algerian Basin cluster”). On the third run, using the PopInfo parameter, designating PC and CATRFO localities as “unknown”, both localities showed mixed ancestry, with unequal likelihood of both localities even though they were located on the same coast. Membership coefficients for PC were common between three different clusters with proportions of 0.48, 0.22 and 0.29 for clusters “South Iberian Peninsula”, “Alboran Island” and “Northwest Morocco”, respectively. In the case of admixture patterns for CATRFO, membership coefficients were mainly shared between the South Iberian Peninsula and Northwest Morocco clusters with proportions of 0.27 and 0.62, respectively (Fig. 2b).

The AMOVA analysis revealed a highly significant genetic structure among the clusters explained by the first and second STRUCTURE runs ($P < 0.01$; $K=2$, Table 3a). In the first instance, 30.58 % of the variance was explained by genetic differences among clusters. When the analysis was done within the clusters inferred by the second run of STRUCTURE, this value was 12.49 % ($P < 0.01$; $K=4$, Table 3b).

The global F_{ST} value was high (0.236 ± 0.020), with a highly significant differentiation. Pairwise F_{ST} values (Table S2, Supporting Information) ranged from 0.004 (ECON-DR distant 1.2 km) to 0.526 (PM-PAN distant 1,395 km). After correction for null alleles, no significant differences between pairwise F_{ST} values and pairwise F_{ST} values corrected for null alleles were observed (T-test, $P=0.348$).

Therefore, it is possible to assume that the presence of null alleles did not affect the analyses. Pairwise D_{est} values ranged from 0.006 (ECON-DR) to 0.835 (ALB1-PAN) (Table S2, Supporting Information). Population pairwise F_{ST} estimates were lower than D_{est} . However, in both cases, most of the values were statistically significant, except for F_{ST} and D_{est} values corresponding to pairwise comparisons among three of the Chafarinas Island localities at distances of 0.6 km (DR-NREY), 0.8 km (NI-DR) and 1.2 km (DR-ECON). Other pairwise comparisons from distances ranging from 0.6-0.8 km, showed slight but significant F_{ST} values in the range of 0.027-0.042, however these were the lower values across the whole dataset.

When considering the whole dataset, the IBD analysis provided positive and significant relationships between $F_{\text{ST}}/(1-F_{\text{ST}})$ values and the logarithm of the geographical distance (computed as the minimum coastal distance between localities located on the same coast and by means of dead-reckoning distances between sites on different coasts) ($R^2=0.45$, $P<0.0001$; $F_{\text{ST}}/(1-F_{\text{ST}})=-1.07+0.26\log(\text{dist})$) (data not shown). The correlation remained significant when only the localities in the Alboran Sea were taken into account ($R^2=0.37$, $P=0.001$) (Fig. 3a), indicating that the correlation between geographical and genetic distance was not an artifact caused by the strong differentiation of the samples from the Tyrrhenian and Algerian Basins that were the most distant. Slatkin's (1993) model correlation between the genetic similarity (\hat{M}) and the logarithm of the geographic distance was also significant but negative, when considering both approaches; in the first instance $R^2=0.64$, $P<0.001$; $\log(\hat{M})=3.14-0.58\log(\text{dist})$ (data not shown); at the regional scale (Fig. 3b) $R^2=0.46$, $P=0.006$. The slope of the RMA regression between \hat{M} and the geographical distance was -0.58 when considering the whole data set, and -0.57 when considering only the localities in the Alboran Basin (Fig. 3b). Asymmetric 95% confidence intervals around the RMA regression coefficient ranged from -1.09 to -0.36 in the former case and -1.03 to 1.25, thus including both times -0.5, falling within the range of values for simulated two-dimensional stepping-stone dispersal models. Considering distances measured by way of dead-reckoning distances among localities, correlation analysis gave similar values in both analyses (data not shown).

When considering D_{est} estimates, the Mantel test analysis showed a similar pattern; there was a significant correlation ($R^2=0.54$, $P<0.001$) among all the sampled localities (data not shown). For the Alboran Sea localities, this correlation was also significant ($R^2=0.42$, $P<0.001$, Fig. 3c). This was also true when considering distances determined by way of dead-reckoning among the whole dataset and Alboran Sea localities (data not shown).

Table 2. Summary statistics for each sampled site of *Astroides calycularis*.

	Population															
	ALG	PC	GRA	ALB1	ALB2	CATRFO	CL	ECON	NI	DR	NREY	TH	GAT	PM	PAN	PAL
N	25	25	20	18	24	29	22	22	20	24	22	22	23	31	24	30
N _a	3.92	4.92	3.77	4.08	4.31	5.92	4.62	5.08	4.23	5.15	4.54	4.92	3.08	2.92	6.62	7.15
N _s	3.75	4.68	3.69	4.08	4.08	5.31	4.32	4.74	4.08	4.67	4.25	4.67	2.98	2.55	6.15	6.13
P _a	0.00	0.08	0.08	0.15	0.08	0.15	0.23	0.08	0.15	0.08	0.08	0.23	0.15	0.23	1.92	1.85
H _o	0.57	0.55	0.50	0.47	0.45	0.54	0.41	0.43	0.49	0.48	0.41	0.44	0.41	0.21	0.55	0.59
H _e	0.56	0.59	0.51	0.48	0.52	0.58	0.43	0.47	0.45	0.47	0.47	0.45	0.42	0.27	0.63	0.63
F _{IS}	-0.027	0.065	0.021	0.008	0.146	0.068	0.059	0.075	-0.087	-0.028	0.133	0.019	0.025	0.188	0.131	0.066

N= number of collected individuals. N_a = number of alleles per locality. N_s = mean allelic richness standardized to the smallest sample size (18) using the rarefaction method of FSTAT 2.9.3. P_a = number of private alleles per site. H_o = observed heterozygosity. H_e = expected heterozygosity. F_{IS} = inbreeding coefficient. Bold F_{IS} values are significant probability estimates. (for locality codes see Table 1).

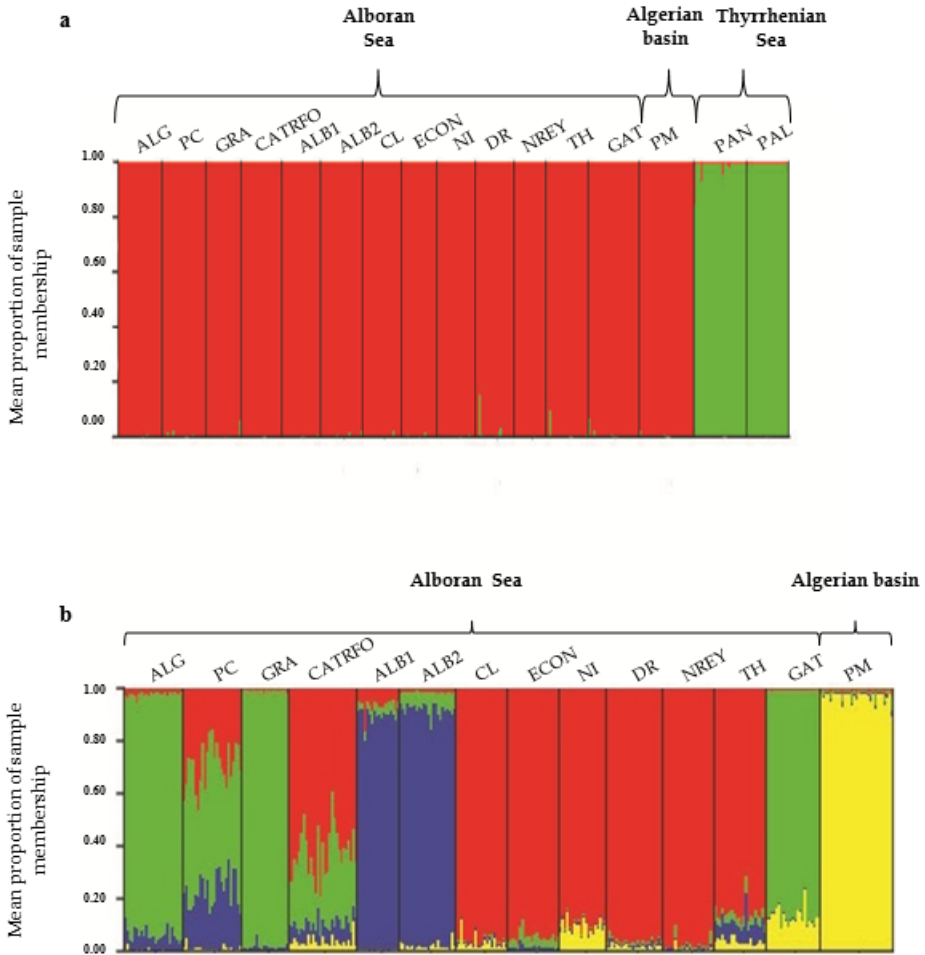


Figure 2. Bayesian assignment probabilities of individuals of *A. calycularis* to clusters estimated using STRUCTURE 2.3.3. a) Results for the first run of the software, separating the localities of the Tyrrhenian Sea cluster from Alboran sea-Algerian Basin. (green: “Tyrrhenian Sea cluster”; red: “Alboran Sea-Algerian Basin cluster”) b) Results after the third run, designating the samples collected in PC and CATRFO as “unknown” and all other samples assigned *a priori*. (green: “South Iberian Peninsula cluster”; blue: “Alboran Island cluster”; red: “Northwest Morocco cluster”; yellow: “Algerian Basin cluster”) (for locality codes see Table 1).

Table 3. a) Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of spatial genetic variation between the clusters 1 (Tyrrhenian Sea cluster) and 2 (Alboran Sea-Algerian Basin cluster), for thirteen microsatellite markers. b) AMOVA of spatial genetic variation between the four clusters defined by STRUCTURE after the second and third runs (K=4) among Alboran Sea-Algerian Basin samples

Source of variation	d.f.	% of variance	P-value
(a)			
Among clusters	1	30.58	<0.01
Among sampling sites within cluster	14	9.91	<0.01
Within sampling sites	746	59.661	<0.01
(b)			
Among clusters	3	12.49	<0.01
Among sampling sites within cluster	10	4.67	<0.01
Within sampling sites	640	82.84	<0.01

Detection of first-generation migrants, migration rates and effective population sizes

Assignment tests for first-generation migrants showed a very low number of individuals assigned to sampled localities different from their corresponding locality within the whole dataset (Table S3, Supporting Information); 79.17% to 96.00% of the individuals were assigned to their actual sampling location. In general, first generation-migrants were only found within STRUCTURE-defined clusters. At the local scale, among each sampling site located on each island of the Chafarinas archipelago, between islands and among Alboran Island locations, first-generation migrants were found but at very low percentages. Among these localities from 3.45% to 9.09% of the individuals were considered to belong to sites different from their sampling locality. The localities with higher percentages of individuals belonging to a different locality than the sampled one were ECON and TH with 9.09% of the individuals from DR. Regarding Alboran Island sampling localities, gene flow between ALB1 and ALB2 was detected by the analysis while both localities showed migrants from sites that had not been sampled for this study. In the case of first-generation migrants coming from unsampled, localities from 3.23% to 13.33% of migrants were found in the localities PM and PAL, respectively.

Maximum likelihood estimates of the values of Θ made with Migrate software ranged from 0.67 (“Alboran Island cluster”) to 1.51 (“South Iberian Peninsula cluster”) (Table S4, Supporting Information); these values were translated to effective population size values ($N_e = \Theta / 4\mu$) ranging from 1875 (“Algerian Basin cluster”)

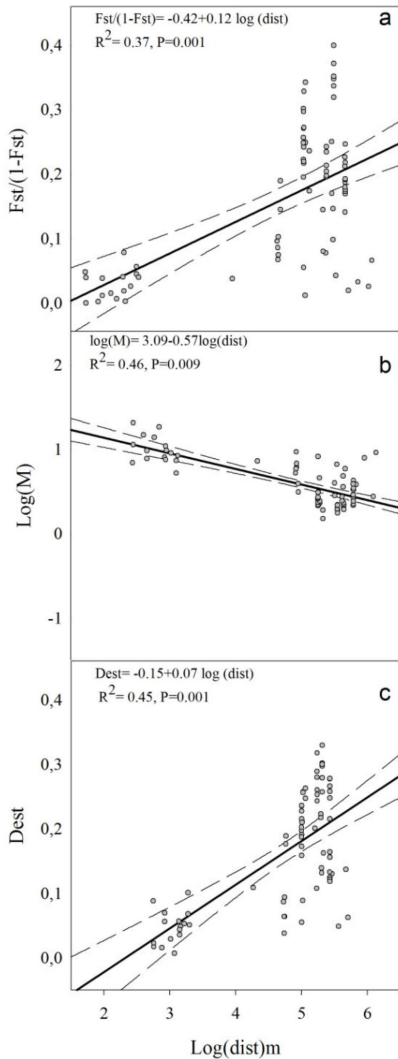


Figure 3. Correlation between genetic distances at the regional scale measured computed as: a) M (genetic similarity), b) $F_{ST}/(1-F_{ST})$, and c) $Dest$; and the logarithm of geographical distances (m). 95% Confidence Intervals are presented by dashed lines.

positive and statistically significant values of F_{IS} , null alleles were estimated from low to moderate levels, but this presence of null alleles was not generalized over all loci within these localities. The neutrality test did not find selection against the loci used. Biological factors may also contribute to explaining the observed heterozygote deficiencies. Partial inbreeding may occur in border populations with low population density (Astanei *et al.* 2005). PAL is located in the region close to the eastern limit of the distribution range of the coral. PM corresponds to the

to 3775 (“South Iberian Peninsula cluster”), assuming a microsatellite mutation rate of 10^{-4} per locus per generation (González & Zardoya 2007). In general, estimated migration rates were small, with values ranging from 0.74 to 1.37. We applied a one-way ANOVA to test the null hypothesis of equal rate of immigrants between pairwise samples. The analysis showed non-significant differentiation among pairwise samples ($F_{1,5}=0.84$, $P=0.67$), therefore indicating little immigration among sampling sites ordered according to STRUCTURE analysis.

Discussion

With the analysis of thirteen microsatellite loci, we found high levels of connectivity among localities placed no more than one kilometer apart, while at a greater distance a clear differentiation was found. We found significant heterozygote deficits in six out of sixteen localities. Other studies on tropical corals (e.g. Ridgway *et al.* 2008, Polato *et al.* 2010), as well as dendrophylliid species in the Mediterranean (Goffredo *et al.* 2004, 2009) and in other geographical areas (Hellberg 1994), suggest that heterozygote deficits are common in populations of these organisms. Though, we did not find this as abundant across the localities analyzed. Heterozygosity deficiencies may be caused by methodological or technical problems (e.g. presence of null alleles, Brookfield 1996), or genetic, historical and demographic events such as selection, population mixing and non-random mating (Raymond & Rousset 1995b; Luikart *et al.* 2003). In all cases in which populations showed

northern limit of the species range in the Iberian Peninsula. On the other hand, restricted gametes or larval dispersal, together with certain habitat conditions (e. g. instability, closed environment, etc.), and low colony density could cause mating among closely related individuals (Knowlton & Jackson 1993). The demersal and low dispersant character of *A. calycularis* planula may affect the degree of matting among relatives. In the case of PAL and NREY samples were taken from the entrance of a cave in the former and from the inner part of a crevice in the latter. Samples from PM were taken from a closed bay, and its colonies present the highest likelihood of offspring-parent relatedness. Such is the case of other anthozoan species commonly found in overhangs, caves and small crevices (e.g. the scleractinian coral *Leptosammia pruvotti* (Goffredo *et al.* 2009) and the red coral *Corallium rubrum* (Constantini *et al.* 2007)). The instability of the habitat such as in the case of PAN, an active volcanic island characterized by the presence of hydrothermal vents eruptions (Anzidei *et al.* 2005; Capaccioni *et al.* 2007), and ALB2, a rocky seabed continuously affected by local eddies (Templado *et al.* 2006), suggests that population abundance and therefore genetic diversity in both cases may have been historically affected.

Genetic structure and connectivity at different spatial scales

Genetic structure analyses using the Bayesian clustering approach showed discontinuities in the spatial distribution of genetic diversity congruent with the geographical locations of the samples. On the first run, dissimilarities among localities from the eastern and western limits of the distribution range were revealed, separating two distinct clusters one including the localities from the Tyrrhenian Sea, and the other including those samples from the Alboran Sea-Algerian Basin. This genetic differentiation between the regions was previously noted in an earlier study (Merino-Serrais *et al.* in press), which used nuclear (ribosomal internal transcribed spacers, ITS) and mitochondrial (cytochrome oxidase subunit I, COI) markers, with slight differences between the regions. Within the Alboran Sea-Algerian Basin cluster four different assemblages were highlighted in a second analysis. The “Algerian Basin cluster” hosted the locality PM, which is separated from the Alboran Basin by the Almeria-Oran Front (AOF). This front may act as a barrier to gene flow in synergy with the low dispersal behavior of the species, as is the case of the brooder gorgonian *Paramuricea clavata* (Mokhtar-Jamaï *et al.* 2011).

At a regional scale, within the Alboran Sea, the genetic structure of *A. calycularis* tended somewhat toward a stepping-stone model, in which localities are more likely to exchange individuals with adjacent localities rather than with more distant ones (Kimura & Weiss 1964, Kenchington *et al.* 2006). The Bayesian analyses at this scale shaped three clusters; the “South Iberian Peninsula cluster”; the “Alboran Island cluster”; and the “Northwest Morocco cluster”, therefore, showing certain homogeneity over all sampling localities, except for PC and CATRFO. These

localities, despite their location along the North African coast, showed different degrees of admixture from the three clusters delimited in the Alboran Sea. Whereas PC was seen to be admixed from the three above-mentioned Alboran Sea clusters, with the highest membership proportion from the “Southern Iberian Peninsula” cluster, CATRFO had the highest membership proportion from the “Northwest Morocco cluster”. Even though, in general, first generation migrants were found among sampling localities assigned to the same cluster, exceptions to this included the detection of migrants assigned to Alboran Island in the PC and GRA localities. As pointed out by Skliris & Beckers (2009), the Alboran Sea is characterized by particularly complex hydrological and oceanographic patterns, such as two large-scale quasi-permanent gyres, tidal motions, mesoscale eddies, and upwelling, which might limit or enhance gene flow in a nonlinear pathway. That could also explain the degree of admixture of PC with the “South Iberian Peninsula” and “Alboran Island” clusters. PC is located in the Strait of Gibraltar, an area subject to a strong incoming Atlantic current, which is first directed toward the south coast of the Iberian Peninsula, and then turns toward the north of Morocco (Millot 1999). This gyre, called the Western Alboran Gyre, is suggested to be the cause of some dispersal events in which planulae of this coral are dragged through it and eventually rafted along this route, linking the dispersal patterns of the species at a regional scale in the Alboran Sea. A similar case was found in the marine isopod *Stenosoma nadejda* (Xavier *et al.* 2011). Thus, this relationship could be the result of a historical connection or a consequence of contemporary water circulation patterns (Viudez & Tintoré 1995, Xavier *et al.* 2011). Nevertheless, in the case of the Alboran Island, its biogeographical affinities are far from understood as, in many cases, its fauna do not resemble the nearby localities on the Spanish or African shores (Templado *et al.* 2006).

The highest gene flow, measured either through F_{ST} or D_{est} , was observed at the local spatial scale corresponding with three localities in the Chafarinas Islands as much as one kilometer apart. At the nearby localities (e.g. CL, TH and NI), some of them at distances of less than one kilometer, small but statistically significant genetic differentiation was found. This fact is confirmed by the outliers present in the IBD plots. Surprisingly, despite the small distance (0.6 km) between sampling localities at Alboran Island, the F_{ST} value suggests low gene flow between them. This could be explained by the location of one locality on the coast of the island, while the second is about 0.8 km offshore, and the strong currents that sweep through the area (Templado *et al.* 2006) may prevent planula exchange between these two closely situated areas.

The observed genetic structure of *A. calycularis* suggests that, as in other brooder scleractinian species, its larval biology (demersal planulae) is the main factor driving the low connectivity between closely situated localities and therefore the high genetic structure within them. In addition, local hydrodynamic processes within the three sampled areas may contribute to eventual dispersal events out of the

place where larvae have been produced. Two other studies have been performed, with the use of allozyme loci, on related sympatric dendrophyllid species in the Mediterranean. In the case of the hermaphroditic brooder *Balanophyllia europaea* (Goffredo *et al.* 2004), gene flow measured as F_{ST} values, was only found between short distances (patches 8-40 m apart), meanwhile genetic fragmentation was found at large distances (36-1941 km). A study on the gonochoric brooder species *Leptosammia pruvotti* (Goffredo *et al.* 2009) showed highest genetic differentiation at short distances (5-10 m apart) compared to large distances (2-872 km). Nevertheless, in both species, no statistical relationship between geographical and genetic distances was found, and it is suggested that this is due to insufficient time to reach equilibrium following historical changes in gene flow or colonization events (Slatkin 1993). The biology of the larvae could also affect the results found. While *B. europaea* and *L. pruvotti* are characterized by swimming larvae with neutral buoyancy and pelagic dispersal (Goffredo & Zaccanti 2004, Goffredo *et al.* 2009), *A. calycularis* releases larvae that acquire negative buoyancy and demersal behavior. Such is also the case in the dendrophylliid brooder *Balanophyllia elegans*, from the NE Pacific coast, whose larvae have similar characteristics (Gerrodette 1981), and in which Hellberg (1995) found a strong correlation between genetic and geographic distances following the stepping-stone model.

Gene flow among populations of marine invertebrates is commonly characterized by occasional dispersal events over relatively long distances (Hellberg 2009; Nakajima *et al.* 2010). Those events include hydrographical conditions, attachment of larvae to small boulders or abalones, and rafting by sea grass, among others (Hellberg 1995). It is widely recognized that, in general, marine species with limited larval dispersal show genetic structuring over a much finer spatial scale (Sherman *et al.* 2008). This local genetic structure has been seen as a general character of most shallow water corals (e.g. Ayre & Hughes 2000) and other brooder species, such as *Clavularia koellikeri* (Bastidas *et al.* 2002), *Corallium rubrum* (Costantini *et al.* 2007), or *Paramuricea clavata* (Mokhtar-Jamaï *et al.* 2011), among others. Those species are known to have low larval dispersal, consistent with the hypothesis that brooders are more likely to exhibit restricted gene flow (Carlson 1999).

Implications for management and conservation strategies of Astroides calycularis

A. calycularis is a threatened species included under Annex II of the Berne Convention and Annex II of the Barcelona Convention. It is also listed in the Spanish Catalogue of Threatened Species (Templado *et al.* 2004). The species is regressing from some areas as a result of different human-related impacts, such as destruction of rocky shores where the species dwells resulting in the fragmentation of the populations due to habitat loss, seawater pollution, recreational scuba diving, angling or illegal harvesting of the endolithic date mussels *Lithophaga lithophaga* (Moreno *et al.* 2008). Thus, any knowledge on the dispersal abilities of the species

will help to know its potential capability to respond to these threats. Our genetic survey may also help to understand the genetic structure and connectivity patterns of the species as an argument for the design of Marine Protected Areas (MPAs) that cover its protection needs. Ideally, the effective design of reserves must account for the spatial scales of larval dispersal (Underwood et al. 2009), especially when MPA networks are planned (Jones et al. 2007). The genetic structure we found suggests that ecological connectivity is quite low between localities except over small scales. However, at a regional range, within each cluster, and even among clusters, sporadic gene flow may occur most probably depending on hydrodynamic conditions, configuration and continuity of rocky substrates along the coastline and other external factors. Therefore, taking into account the important genetic structure found within localities, we recommend that conservation plans are based on local or regional approaches. We have initiated the survey of these parameters in three MPAs in the Alboran Sea, Chafarinas Islands, Alboran Island and Cabo de Gata. All of them were connected by some degree of gene flow with the nearby localities included in their corresponding cluster, even with other clusters, such as in the case of Alboran Island, which shows some degree of connectivity with the "South Iberian Peninsula" cluster, with the localities of PC and GRA. Regardless, this evaluation is still in its beginning stages and further approaches need to be assessed. Furthermore, studies on larval dispersal at smaller scales, or at other relevant scales, using other direct and indirect approaches might be evaluated in order to ensure the correct management and conservation of this and other threatened species. Further studies of interdisciplinary research on larval dispersal at smaller scales, or at other relevant scales, using other direct and indirect approaches might be evaluated in order to ensure the correct management and conservation of this and other threatened endemic species.

Acknowledgements

The authors want to acknowledge to P. Cabezas, I. Acevedo, J. Guallart, L. Sánchez-Tocino, O. Ocaña, J. Martínez-Ródenas, A. Frías, S. Revenga, M. Calvo, G. Gasparini, A. Addamo, M.C. Arroyo, E. Caroselli and F. Prada for its valuable help on the field with samples collection. Also we would like to thank the directors and staff of the biological stations of Refugio Nacional de Caza de las Islas Chafarinas, Alboran Island and Cabo de Gata Marine Reserve, the Spanish General Secretary of Marine Fisheries and the Regional Governments for granting permits and for their valuable collaboration. We would like to thank R. García- Jiménez, T. Cuartero, E.G. Gonzalez, I.S. Magalhaes and M.H. Nielsen for the help done with the molecular lab and data analysis. We thank R. Barrientos, J. Pinzon and three anonymous reviewers for significantly improving this manuscript. S. Young significantly improve the English grammar and writing style. P. Casado-Amezúa was funded by a grant from the Spanish Research Council (CSIC). S. Goffredo

was funded by the European Research Council (CoralWarm, ERC grant agreement n° 249930). This research was supported by BBVA Foundation and the Spanish Ministry of Science and Innovation (CTM2008-00496/MAR).

References

- Astaneï I, Gosling E, Wilson J, Powell E (2005) Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Molecular Ecology*, **14**, 1655-1666.
- Ayre DJ, Hughes TP (2000) Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the great barrier reef, Australia. *Evolution*, **54**, 1590-1605.
- Aguilar R, Akissou M, Templado J, Romani M (2011) Scientific rationale for the proposed CIESM Near Atlantic Marine Peace Park (zone 1). In: *Marine Peace Parks in the Mediterranean – a CIESM proposal* (F. Briand Edit.). CIESM Workshop n° 41, Monaco. Pp. 43-49.
- Antao T, Lopes A, Lopes RJ, Beja-Pereira A, Luikart G (2008) LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on an Fst-outlier method. *BMC Bioinformatics*, **9**, 323-327.
- Anzidei M, Esposito A, Bortoluzi G, De Giosa F (2005) The high resolution bathymetric map of the exhalative area of Panarea (Aeolian Islands, Italy). *Annals of Geophysics*, **48**, 899-921.
- Bastidas C, Benzie JAH, Fabricius KE (2002) Genetic differentiation among populations of the brooding soft coral *Clavularia koellikeri* on the Great Reef. *Coral Reefs*, **21**, 233-241.
- Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Sciences*, **263**, 1619-1626.
- Beerli P, Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in *n* subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, **98**, 4563-4568.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, *Logiciel sous windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bianchi CN (2007) Biodiversity issues for the forthcoming tropical Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, **580**, 7-21.
- Bohonak AJ (1999) Dispersal, gene flow and population structure. *Quarterly Review of Biology*, **74**, 21-45.
- Botsford LW, Hastings A, Gaines SD (2001) Dependence of sustainability on the configuration of marine reserves and larval dispersal distances. *Ecological Letters*, **4**, 144-150.
- Brookfield, JFY (1996) A simple method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, **5**, 453-455.

- Capaccioni B, Tassi F, Vaselli O, Tedesco D, Poreda R (2007) Submarine gas burst at Panarea Island (southern Italy) on 3 november 2002: A magmatic versus hydrothermal episode. *Journal of Geophysical Research*, **112**, num. B05
- Carlson DB (1999) The evolution of mating systems in tropical reef corals. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 491-495.
- Chapuis M, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 621-631.
- Coll M, Piroddi C, Steenbeek J, Kaschner K, Lasram FBR, Aguzzi J et al. (2010) The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns, and threats, *PLoS ONE*, **5**, e11842.
- Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, **153**, 1989-2000.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007) Genetic structuring of the temperate gorgonian coral (*Corallium rubrum*) across the western Mediterranean Sea revealed by microsatellite and nuclear sequences. *Molecular Ecology*, **16**, 5168-5182.
- Cowen RK, Sponaugle S (2009) Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Reviews of Marine Science*, **1**, 443-466.
- DiBacco C, Levin LA, Sala E (2006) Connectivity in marine ecosystems: the importance of larval and spore dispersal. In: Crooks KR and Sanjayan M. eds. *Connectivity Conservation* Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 185-211.
- Excoffier L, Estoup A, Cornuet JM (2005) Bayesian analysis of an admixture model with mutations and arbitrarily linked markers. *Genetics*, **169**, 1727-1738.
- Fraser CI, Nikula R, Waters JM (2011) Oceanic rafting by a coastal community. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences*, **278**, 649-655.
- Gerlach G, Jueterbock A, Kraemer P, Deppermann J and Harmand P (2010) Calculations of population differentiation based on G_{st} and D : forget G_{st} but not all of statistics! *Molecular Ecology*, **19**, 3845-3852.
- Gerrodette T (1981) Dispersal of the solitary coral *Balanophyllia elegans* by demersal planula larvae. *Ecology*, **62**, 611-619.
- Goffredo S, Mezzomonaco L, Zaccanti F (2004) Genetic differentiation among populations of the Mediterranean hermaphroditic brooding coral *Balanophyllia europea* (Scleractinia: Dendrophylliidae). *Marine Biology*, **145**, 1075-1083.
- Goffredo S, Zaccanti F (2004) Laboratory observations of larval behavior and metamorphosis in the Mediterranean solitary coral *Balanophyllia europaea* (Scleractinia, Dendrophylliidae). *Bulletin of Marine Science*, **76**, 449-458.
- Goffredo S, Di Ceglie S, Zaccanti F (2009) Genetic differentiation of the temperate-subtropical stony coral *Leptosammia pruvoti* in the Mediterranean Sea. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, **55**, 99-115.
- Goffredo S, Gasparini G, Marconi G, Puntignano MT, Pazzini C et al. (2010) Gonochorism and planula brooding in the Mediterranean endemic orange coral

- Astroides calycularis* (Scleractinia: Dendrophylliidae): Morphological aspects of gametogenesis and ontogenesis. *Marine Biology Research*, **10**, 421-436.
- Goldson AJ, Hughes RN, Gliddon CJ (2001) Population genetic consequences of larval dispersal mode and hydrography: a case study with bryozoans. *Marine Biology*, **138**: 1037-1042.
- González EG, Zardoya R (2007) Relative role of life- history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardina pilchardus*). *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 197-209.
- Goudet J (1995) Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485-486.
- Grosberg R, Cunningham CW (2001) Genetic structure in the sea: from populations to communities. In: MD Bertness, S Gaines, ME Hay, eds. *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. Pp 61-84.
- Hellberg ME (1994) Relationship between inferred levels of gene flow and geographic distance in a phylopatric coral, *Balanophyllia elegans*. *Evolution*, **48**, 1829-1854.
- Hellberg ME (1995) Stepping-stone gene flow in the solitary coral *Balanophyllia elegans*: equilibrium and nonequilibrium at different spatial scales. *Marine Biology*, **13**, 573-581.
- Hellberg ME (2009) Gene flow and isolation among populations of marine animals. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **40**, 291-310.
- Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, **6**, 65-70.
- Hood GM (2010) PopTools version 3.2.5. Available on the internet. URL <http://www.poptools.org>.
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *BMC genetics*, **6**, 13. V3.21. <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Jones G, Srinivasan M, Almany G (2007) Population connectivity and conservation of marine biodiversity. *Oceanography*, **20**, 42-53.
- Jost L (2008) Gst and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, **17**, 4015-4026.
- Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 576-579.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, **16**, 1099-1106.
- Kenchington EL, Patwaty MU, Zouros E, Bird CJ (2006) Genetic differentiation in relation to marine landscape in a broadcast-spawning bivalve mollusk (*Placopecten magellanicus*). *Molecular Ecology*, **15**, 1781-1796.
- Kimura M, Weiss G (1964) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, **49**, 561-576.

- Kimura M, Crow JF (1964). Number of alleles that can be maintained in finite populations. *Genetics*, **49**, 725-738.
- Knowlton N, Jackson J (1993) Inbreeding and outbreeding in marine invertebrates. In: Thornhill N, Ed. *The natural history of inbreeding and outbreeding: theoretical and empirical perspectives*. The University of Chicago Press, Chicago, USA. Pp. 200-249.
- Kruzic P, Zibrowius H, Pozar-Domac A (2002) Actiniaria and Scleractinia (Cnidaria, Anthozoa) from the Adriatic Sea: First records, confirmed occurrences and significant range extensions of certain species. *Italian Journal of Zoology*, **69**, 345-353.
- Lacaze-Duthiers H (1873) Développement des coralliaires. Actinaires à Polypiers. *Archives de Zoologie Expérimentale Générale*, **2**, 269-348.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews*, **4**, 981-994.
- Marshall DJ, Morgan SG (2011) Ecological and evolutionary consequences of life-history stages in the sea. *Current Biology*, **21**, 1771-1778.
- Merino-Serrais P, Casado-Amezua P, Ocaña O, Templado P, Machordom A (2012) Slight genetic differentiation between western and eastern limits of *Astroides calycularis* (Anthozoa, Scleractinia, Dendrophylliidae) distribution inferred from COI and ITS markers. *Graellsia*. In press.
- Millot C (1999). Circulation in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems*, **20**, 423-442.
- Mokhtar-Jamaï K, Pascual M, Ledoux JB, Coma R, Féral JP, Garrabou J et al. (2011) From global to local genetic structuring in the red gorgonian *Paramuricea clavata*: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Molecular Ecology*, **20**, 3291-3305.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* (2010) Permanent genetic resources added to the molecular ecology resources database 1 August 2009-30 September 2009. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 232-236. <http://tomato.bi.trinity.edu/manuscripts/10-1/mer-09-034>.
- Moreno D, de la Linde A, Arroyo MC, López-González PJ (2008) *Astroides calycularis* (Pallas, 1766). In: Barea-Azcón J.M., Ballesteros-Duperón E. & Moreno D. (coords.). *Libro rojo de los invertebrados de Andalucía*. Tomo 1. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla, 281-287 pp.
- Nakajima Y, Nishikawa A, Iguchi A, Sakai K (2010) Gene flow and genetic diversity of a broadcast-spawning coral in Northern peripheral populations. *PLoS ONE*, **5**, e11149.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, and Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, **13**, 55-65.
- Patarnello T, Volckaert FAMJ, Castilho R (2007) Pillars of Hercules: is the Atlantic-

- Mediterranean transition a phylogeographical break?. *Molecular Ecology*, **16**, 4426-4444.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295.
- Pineda J, Hare JA, Sponaugle SU (2007) Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography*, **20**, 22-39.
- Polato N, Concepcion GT, Toonen RJ, Baums I (2010) Isolation by distance across the Hawaiian Archipelago in the reef-building coral *Porites lobata*. *Molecular Ecology*, **19**, 4661-4677.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **94**, 9197-9201.
- Raymond M, Rousset F (1995a) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Raymond M, Rousset F (1995b) Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, **140**, 1413-1419.
- Ridgway T, Riginos C, Davis J, Hoegh-Guldberg O (2008) Genetic connectivity patterns of *Pocillopora verrucosa* in Southern African Marine Protected areas. *Marine Ecology Progress Series*, **354**, 161-168.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219-1228.
- Sherman CDH, Hunt A, Ayre DJ (2008) Is life history a barrier to dispersal? Contrasting patterns of genetic differentiation along an oceanographically complex coast. *Biological Journal of the Linnean Society*, **95**, 106-116.
- Skliris N, Beckers JM (2009) Modelling the Gibraltar Strait/Western Alboran Sea ecohydrodynamics. *Ocean Dynamics*, **59**, 489-508.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry*, 2nd edition. New York: WH Freeman.
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*, **47**, 264-279.
- Templado J, Calvo M, Luque AA, Garvia A, Maldonado M, Moro L (2004) Guía de los invertebrados y peces marinos españoles protegidos por la legislación nacional e internacional. *Ministerio de Medio Ambiente, Serie Técnica*, Madrid, 214 pp.
- Templado J, Calvo M, Moreno D, Flores A, Conde F, Abad R et al. (2006) *Flora y Fauna de la Reserva Marina y Reserva de Pesca de la isla de Alborán*. Secretaría General de Pesca Marítima, Madrid, 269 pp.
- Thiel M, Gutow L (2005) The ecology of rafting in the marine environment. I. The floating substrata. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **42**, 181-264.
- Tintoré J, Violette PE, Blade I, Cruzado A (1988) A study of an intense density front in the eastern Alboran Sea: the Almeria-Oran Front. *Journal of Physical Oceanography*, **18**, 1384-1397.

- Underwood JN, Smith LD, van Oppen MJH, Gilmour JP (2009) Ecologically relevant dispersal of corals on isolated reefs: implications for managing resilience. *Ecological Applications*, **19**, 18-29.
- VanOosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.
- Viudez A & Tintore J (1995) Time and space variability in the eastern Alboran Sea from March to May 1990. *Journal of Geophysical Research-Oceans*, **100**, 8571-8586.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Whitlock MC (2011) G'_{st} and D do not replace F_{ST} . *Molecular Ecology*, **20**, 1083-1091.
- Xavier R, Zenboudji S, Lima FP, Harris JD, Santos AM, Branco M (2011) Phylogeography of the marine isopod *Stensotoma nadejda* (Rezig 1989) in North African Atlantic and western Mediterranean coasts reveals complex differentiation patterns and a new species. *Biological Journal of the Linnean Society*, **104**, 419-431.
- Zibrowius H (1995) The "Southern" *Astroides calycularis* in the Pleistocene of the northern Mediterranean-An indicator of climatic changes (Cnidaria, Scleractinia). *Geobios*, **28**, 9-16.

Data accessibility

Individual-by-individual sampling locations and microsatellites scoring can be found in the Data File "Microsatellite data set": DRYAD entry doi:10.5061/dryad.9rk8v438

Supporting Information

Table S1. Summary statistics for thirteen microsatellite loci of *Astroides calycularis* (for locality codes see Table 1, main text).

Locus	Population															
	ALG	PC	GRA	ALB1	ALB2	CATRFO	CL	ECON	NI	DR	NREY	TH	GAT	PM	PAN	PAL
Ac-7E-AC	N_a	6	5	5	6	5	5	7	4	6	6	6	3	4	15	15
	N_s	5.44	4.72	4.90	6.00	4.99	4.81	6.60	3.99	5.68	5.61	5.66	2.74	3.51	13.9	12.15
	H_o	0.72	0.52	0.65	0.67	0.67	0.59	0.59	0.85	0.75	0.68	0.55	0.04	0.23	0.63	0.77
	H_e	0.74	0.65	0.67	0.60	0.75	0.64	0.56	0.75	0.66	0.71	0.66	0.13	0.29	0.93	0.88
	F_{IS}	0.027	0.205	0.029	-0.105	0.112	0.143	-0.048	0.214	-0.200	-0.143	0.042	0.173	0.661 (0.07)	0.222	0.332 (0.08)
Ac-L17	N_a	3	5	4	2	4	7	8	7	8	9	5	2	2	3	6
	N_s	2.72	4.71	3.90	2.00	3.44	6.06	6.99	6.60	6.63	7.73	4.43	2.00	1.59	2.74	5.18
	H_o	0.40	0.48	0.60	0.06	0.13	0.41	0.32	0.36	0.33	0.55	0.23	0.35	0.03	0.04	0.60
	H_e	0.42	0.56	0.63	0.06	0.20	0.49	0.40	0.29	0.50	0.34	0.22	0.39	0.03	0.16	0.62
	F_{IS}	0.053	0.139	0.044	0.000	0.369	0.160	-0.081	0.094	-0.002	0.023	-0.110	-0.055	0.120	0.000	0.741 (0.09)
Ac-L10	N_a	3	3	3	3	3	1	3	5	4	3	3	3	1	4	4
	N_s	3.00	2.93	3.00	3.00	2.94	6.40	3.00	4.70	3.49	2.82	2.81	2.99	1	3.94	3.53
	H_o	0.54	0.52	0.50	0.56	0.38	0.48	0.00	0.27	0.25	0.21	0.18	0.22	0.00	0.67	0.22
	H_e	0.54	0.41	0.47	0.56	0.49	0.61	0.00	0.32	0.24	0.20	0.17	0.20	0.00	0.56	0.21
	F_{IS}	0.002	-0.273	-0.076	0.008	0.244	0.209	-	0.151	-0.061	-0.059	-0.056	-0.068	-	-0.189	-0.064
Ac-L11	N_a	3	3	3	4	3	4	4	3	2	2	3	4	3	2	4
	N_s	3.00	3.00	3.00	4.00	2.94	3.62	3.81	2.90	2.00	2.00	2.82	3.99	1.60	2.00	3.98
	H_o	0.76	0.60	0.60	0.61	0.46	0.72	0.14	0.59	0.25	0.38	0.32	0.65	0.03	0.71	0.73
	H_e	0.64	0.68	0.62	0.60	0.48	0.68	0.39	0.56	0.23	0.44	0.28	0.71	0.09	0.47	0.70
	F_{IS}	-0.192	0.118	0.027	-0.016	0.043	-0.062	0.653 (0.16)	-0.062	-0.092	0.148	-0.139	0.088	0.000	0.000	-0.533 (0.08)

Locus	Population																
	ALG	PC	GRA	ALB1	ALB2	CAIRFO	CL	ECON	NI	DR	NREY	TH	GAT	PM	PAN	PAL	
Ac-L18	N _a	7	10	8	10	8	13	11	13	7	12	11	11	6	10	9	
	N _s	6.64	9.85	7.69	10.00	7.44	11.97	10.23	12.02	6.79	10.87	9.85	10.51	5.70	4.74	7.93	
	H _o	0.88	0.92	0.70	1.00	0.67	0.93	0.77	0.86	0.85	0.88	0.68	0.95	0.78	0.52	0.75	0.87
	H _e	0.79	0.89	0.75	0.86	0.79	0.91	0.79	0.87	0.79	0.88	0.73	0.88	0.69	0.49	0.75	0.77
	F _{IS}	-0.115	-0.025	0.069	-0.174	0.154	-0.025	0.020	0.004	-0.076	0.002	0.069	-0.090	-0.133	-0.048	0.005	-0.130
Ac-L20	N _a	7	13	6	9	8	13	12	12	11	14	10	15	5	9	20	
	N _s	6.48	11.47	5.89	9.00	7.67	10.53	11.51	11.37	10.58	12.41	9.54	14.06	4.74	4.80	16.74	
	H _o	0.60	0.84	0.55	0.67	0.67	0.90	0.77	0.86	0.90	0.96	0.86	0.77	0.52	0.32	0.38	0.87
	H _e	0.63	0.88	0.71	0.81	0.81	0.85	0.89	0.89	0.84	0.88	0.84	0.89	0.63	0.48	0.65	0.95
	F _{IS}	0.052	0.046	0.233	0.177	0.184	-0.052	0.135	0.029	-0.077	-0.088	-0.035	0.135	0.178	0.331 (0.10)	0.428 (0.16)	0.085
Ac-L22	N _a	2	2	2	2	3	2	2	1	1	2	1	1	2	3	3	
	N _s	2.00	2.00	1.90	2.00	2.94	2.00	1.81	1.00	1.00	1.94	1.00	1.00	1.78	2.76	3.75	3.00
	H _o	0.20	0.28	0.05	0.06	0.33	0.17	0.05	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.04	0.10	0.46	0.83
	H _e	0.18	0.25	0.05	0.06	0.40	0.16	0.05	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.04	0.15	0.54	0.67
	F _{IS}	-0.090	-0.142	0.000	0.000	0.171	-0.076	0.000	-	-	-0.022	-	-	0.000	0.375	0.153	-0.256
Ac-L23	N _a	2	3	3	3	3	3	2	3	4	3	2	2	2	3	4	2
	N _s	2.00	2.96	2.99	3.00	3.00	3.00	2.00	2.82	3.80	2.75	2.00	2.00	2.00	2.58	3.77	2.00
	H _o	0.24	0.52	0.55	0.83	0.67	0.52	0.45	0.41	0.45	0.33	0.27	0.18	0.43	0.23	0.26	0.41
	H _e	0.51	0.46	0.51	0.67	0.63	0.48	0.49	0.39	0.50	0.39	0.30	0.17	0.49	0.49	0.58	0.46
	F _{IS}	0.534 (0.16)	-0.147	-0.071	-0.243	-0.065	-0.078	0.083	-0.038	0.100	0.154	0.106	-0.076	0.109	0.547 (0.16)	0.557 (0.19)	0.101
Ac-L25	N _a	5	6	5	5	8	6	6	6	4	6	4	6	4	3	6	6
	N _s	4.93	5.93	4.89	5.00	7.20	5.76	5.45	5.27	3.80	5.20	3.81	5.76	3.96	2.16	5.68	4.89
	H _o	0.92	0.71	0.75	0.50	0.63	0.66	0.73	0.55	0.50	0.38	0.45	0.64	0.52	0.03	0.67	0.33
	H _e	0.76	0.76	0.68	0.65	0.77	0.69	0.61	0.58	0.50	0.51	0.47	0.66	0.64	0.06	0.69	0.46
	F _{IS}	-0.210	0.071	-0.100	0.240	0.186	0.045	-0.200	0.063	-0.002	0.269	0.027	0.039	0.188	0.490 (0.03)	0.034	0.275

Locus	Population															
	ALG	PC	GRA	ALB1	ALB2	CATRFO	CL	ECON	NI	DR	NREY	TH	GAT	PM	PAN	PAL
Ac-L31	N_a	3	3	2	2	3	3	2	2	2	2	2	1	2	12	8
	N_s	2.99	2.72	2.00	2.00	2.91	2.66	1.97	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	1.83	11.43	6.68
	H_o	0.63	0.36	0.40	0.33	0.27	0.09	0.09	0.10	0.21	0.23	0.32	0.00	0.00	0.67	0.63
	H_e	0.56	0.40	0.33	0.36	0.35	0.09	0.09	0.10	0.19	0.33	0.27	0.00	0.06	0.90	0.70
	F_{IS}	-0.123	0.107	-0.225	0.064	0.242	-0.012	-0.024	-0.027	-0.095	0.322	-0.169	-	1.000 (0.06)	0.260 (0.08)	0.093
Ac-L33	N_a	3	4	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	4	6
	N_s	3.00	3.85	2.90	2.00	3.00	2.81	2.91	2.00	2.75	2.97	2.82	2.96	2.59	3.94	5.20
	H_o	0.52	0.44	0.15	0.11	0.38	0.50	0.41	0.65	0.54	0.45	0.27	0.39	0.55	0.67	0.73
	H_e	0.43	0.50	0.23	0.20	0.31	0.51	0.47	0.48	0.52	0.55	0.39	0.41	0.48	0.59	0.75
	F_{IS}	-0.223	0.128	0.352	0.460	-0.210	0.025	0.140	-0.364	-0.041	0.184	0.313	0.054	-0.153	-0.134	0.018
Ac-L34	N_a	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	5	3
	N_s	2.00	2.00	2.00	2.00	2.62	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	4.94	2.84
	H_o	0.40	0.36	0.60	0.22	0.24	0.36	0.23	0.55	0.67	0.45	0.68	0.61	0.26	0.58	0.40
	H_e	0.41	0.51	0.47	0.20	0.28	0.41	0.43	0.45	0.51	0.51	0.49	0.50	0.32	0.66	0.51
	F_{IS}	0.028	0.298	-0.295	-0.096	0.121	0.106	0.472	-0.229	-0.323	0.106	-0.418	-0.217	0.189	0.119	0.223
Ac-L37	N_a	5	5	3	3	6	2	2	3	3	4	5	3	2	8	7
	N_s	4.63	4.72	2.90	3.00	5.05	2.00	2.00	3.00	2.99	3.97	4.94	3.00	2.00	7.25	5.62
	H_o	0.60	0.60	0.40	0.56	0.62	0.50	0.41	0.50	0.54	0.32	0.59	0.78	0.48	0.67	0.23
	H_e	0.60	0.68	0.48	0.59	0.61	0.51	0.33	0.53	0.49	0.57	0.71	0.63	0.51	0.71	0.51
	F_{IS}	-0.001	0.120	0.176	0.052	-0.014	0.021	-0.235	0.052	-0.111	0.451 (0.16)	0.171	-0.247	0.048	0.066	0.544 (0.18)

N_s = number of alleles per population. N_s = mean allelic richness standardized to the smallest sample size (18) using the rarefaction method of FSTAT 2.9.3. H_o = observed heterozygosity. H_e = expected heterozygosity. F_{IS} = inbreeding coefficient. Bold F_{IS} values are significant probability estimates. Estimated null alleles frequencies are given in brackets (for locality codes see Table 1, main text).

Table S2. Pairwise F_{ST} (lower left) and D_{est} (upper right) values. No significant values after step-down Bonferroni correction, are highlighted in bold (for locality codes see Table 1, main text).

	ALG	PC	GRA	ALB1	ALB2	CATRFO	CL	ECON	NI	DR	NREY	TH	GAT	PM	PAN	PAL
ALG		0.109	0.049	0.223	0.217	0.163	0.277	0.215	0.266	0.258	0.278	0.248	0.134	0.389	0.802	0.811
PC	0.050		0.108	0.139	0.132	0.063	0.133	0.119	0.156	0.122	0.164	0.124	0.132	0.294	0.816	0.774
GRA	0.038	0.054		0.257	0.256	0.213	0.302	0.257	0.302	0.297	0.330	0.279	0.247	0.374	0.821	0.802
ALB1	0.150	0.092	0.175		0.088	0.189	0.216	0.267	0.236	0.235	0.210	0.212	0.263	0.369	0.835	0.777
ALB2	0.138	0.073	0.160	0.051		0.177	0.197	0.187	0.202	0.191	0.173	0.159	0.247	0.312	0.782	0.753
CATRFO	0.071	0.031	0.106	0.112	0.099		0.087	0.055	0.064	0.040	0.094	0.064	0.202	0.215	0.805	0.767
CL	0.178	0.101	0.210	0.174	0.143	0.065		0.052	0.048	0.053	0.100	0.067	0.243	0.183	0.820	0.759
ECON	0.133	0.086	0.177	0.163	0.137	0.034	0.036		0.029	0.006	0.035	0.044	0.253	0.254	0.819	0.803
NI	0.173	0.107	0.209	0.172	0.140	0.055	0.034	0.014		0.016	0.056	0.071	0.288	0.169	0.815	0.780
DR	0.155	0.087	0.197	0.160	0.130	0.033	0.037	0.004	0.010		0.023	0.017	0.280	0.196	0.806	0.759
NREY	0.167	0.106	0.213	0.164	0.133	0.051	0.072	0.020	0.027	0.005		0.056	0.318	0.225	0.808	0.773
TH	0.156	0.102	0.191	0.161	0.115	0.053	0.043	0.040	0.042	0.020	0.040		0.260	0.207	0.807	0.753
GAT	0.133	0.090	0.078	0.234	0.195	0.139	0.204	0.250	0.231	0.211	0.235	0.213		0.311	0.834	0.809
PM	0.342	0.255	0.363	0.376	0.302	0.201	0.208	0.262	0.193	0.199	0.227	0.207	0.351		0.827	0.826
PAN	0.354	0.342	0.377	0.393	0.373	0.338	0.417	0.391	0.403	0.396	0.389	0.403	0.425	0.526		0.487
PAL	0.345	0.327	0.361	0.366	0.350	0.320	0.400	0.377	0.389	0.379	0.376	0.384	0.408	0.508	0.192	

Table S3. Results of the assignment tests for first-generation migrants of *Astroides calycularis* as the percentage of individuals from the sampling site assigned to every location (for locality codes see Table 1, main text).

Sampled in	Assigned to (%)														Not sam-pled sites		
	ALG	PC	GRA	ALB1	ALB2	CATRFO	CL	ECON	NI	DR	NREY	TH	GAT	PM		PAN	PAL
ALG	96.00	0.00	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PC	0.00	96.00	0.00	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.00
GRA	5.00	5.00	85.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00
ALB1	0.00	0.00	0.00	88.89	5.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.56
ALB2	0.00	0.00	0.00	4.17	83.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.50
CATRFO	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	89.66	0.00	0.00	3.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.90
CL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.55	81.82	4.55	0.00	0.00	0.00	4.55	0.00	0.00	0.00	0.00	4.55
ECON	0.00	4.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	81.82	0.00	9.09	0.00	4.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
NI	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00	5.00	80.00	0.00	5.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.17	0.00	0.00	4.17	79.17	8.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.17
NREY	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.55	0.00	0.00	0.00	4.55	90.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TH	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.09	4.55	86.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GAT	0.00	0.00	4.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	86.96	0.00	0.00	0.00	8.70
PM	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.23	0.00	0.00	0.00	0.00	93.55	0.00	0.00	3.23
PAN	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	87.50	0.00	12.50
PAL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	86.67	13.33

Table S4. Gene flow estimates among the clusters defined by STRUCTURE, based on a maximum likelihood approach of migration rates and population sizes ($\Theta=4N_e\mu$). Θ values are displayed in bold on the diagonal. N_e (effective population size) was calculated assuming $\mu=10^{-4}$ per locus per generation. Rows and columns are source and sink populations, respectively.

	“South Iberian Peninsula”	“Alboran Island”	“North Morocco”	“Algerian basin”	“Tyrrhenian basin”	N_e
“South Iberian Peninsula”	1.51	0.91	0.95	1.09	1.14	3775
“Alboran Island”	1.11	0.67	1.37	0.89	1.20	1675
“North Morocco”	1.13	1.37	0.73	1.14	1.11	1825
“Algerian Basin”	0.74	1.22	0.80	0.84	0.98	2100
“Tyrrhenian basin”	0.84	0.87	1.08	1.18	0.75	1875

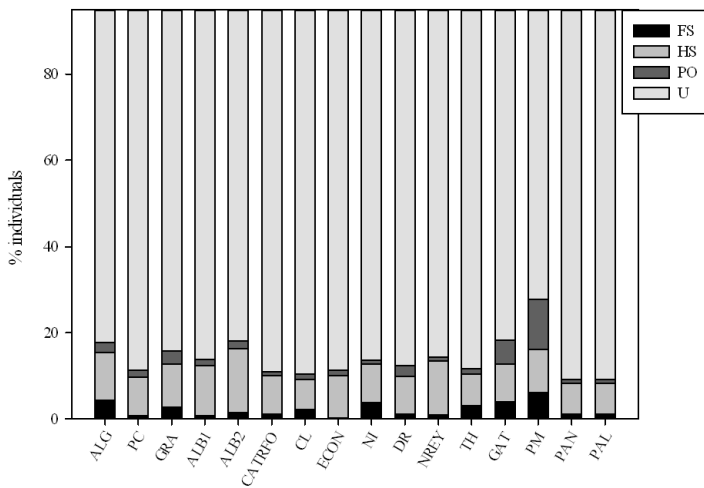


Fig S1. Percentage of related pair-wise individuals. FS= full siblings; HS= half siblings; PO= parent-offspring relation; U= unrelated (for locality codes see Table 1, main text).

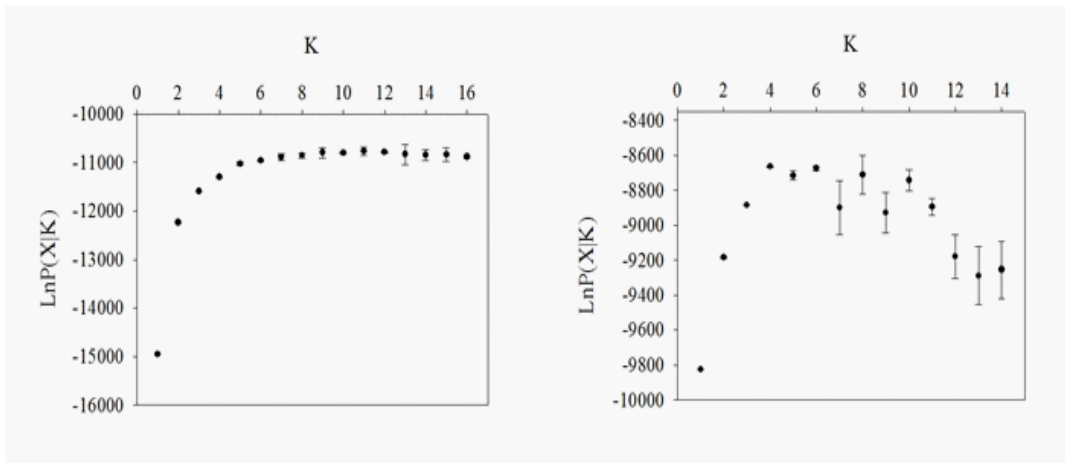


Fig.S2 Plot of $\text{LnP}(X|K)$ as a function of the number of clusters (K) across the 20 runs. a) First STRUCTURE runs along the whole data set. b) Second STRUCTURE run within Alboran Sea-Algerian basin samples.

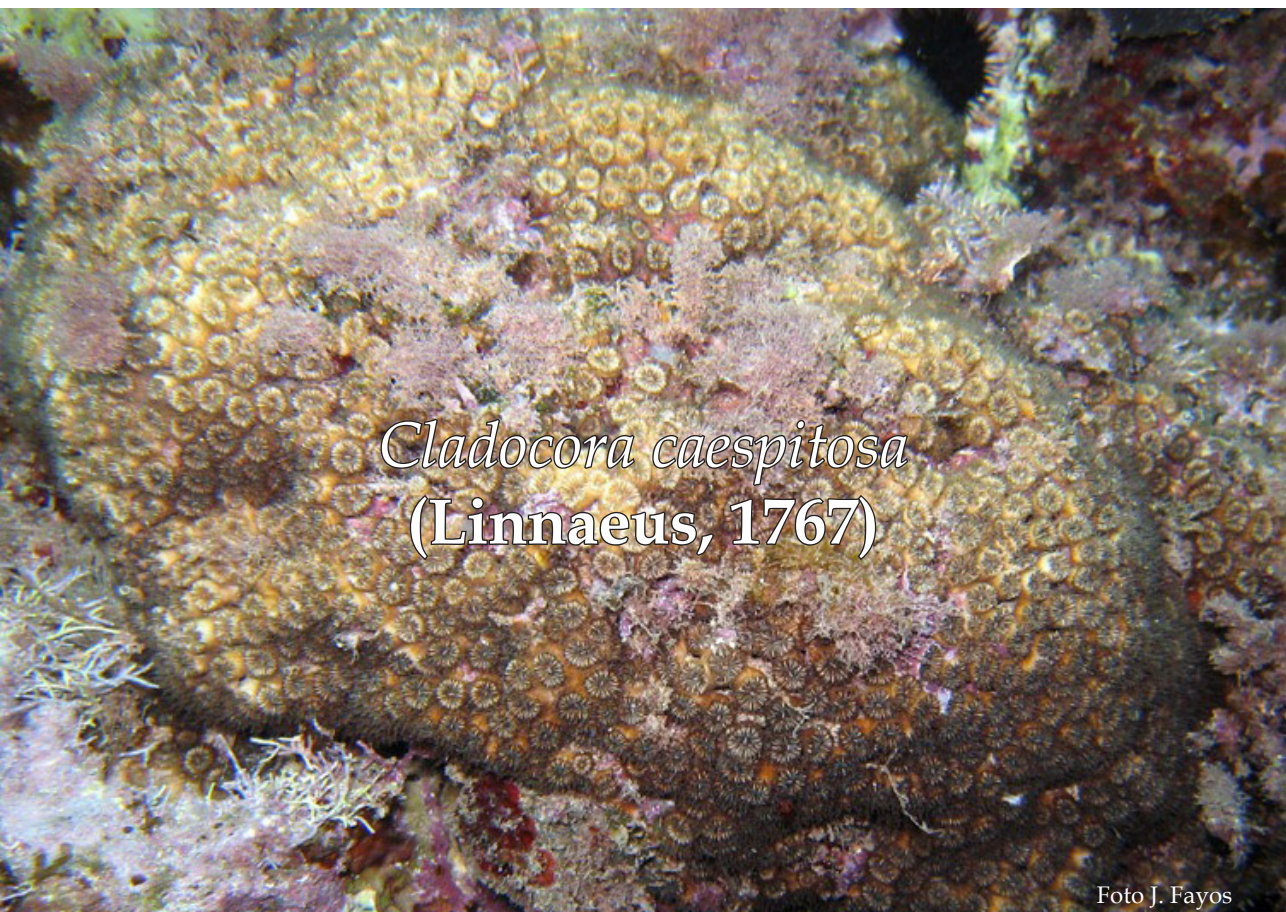
Capítulos incluidos en la sección

Capítulo V

Casado-Amezúa P, García-Jiménez R, Kersting DK, Templado J, Coffroth MA Merino P, Acevedo I, Machordom A (2011). Development of microsatellite markers as a molecular tool for conservation studies of the Mediterranean reef builder coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia). *Journal of Heredity*, 102, 622-626.

Capítulo VI

Casado-Amezúa P, Templado J, Machordom A. Genetic structure and gene flow of the broadcast-spawning coral *Cladocora caespitosa* in the NW Mediterranean.



Development of microsatellite markers as a molecular tool for conservation studies of the Mediterranean reef builder coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia)

Resumen

Cladocora caespitosa es un coral formador de arrecifes monoespecíficos endémico del Mediterráneo. Durante la última década eventos de mortandad masiva han afectado a este coral de forma recurrente. Así pues, el conocimiento de la estructura genética y conectividad de sus poblaciones es de gran utilidad a la hora establecer planes de conservación y gestión de la especie. Con la finalidad de obtener una mejor comprensión de la genética de poblaciones de este coral, se desarrollaron 13 marcadores microsatélite a partir de ADN de una colonia naturalmente blanqueada. Los cebadores desarrollados no amplificaron en ADN de zooxantelas, aisladas del tejido de *C. caespitosa*, verificando que estas secuencias son del coral y no de las microalgas simbiotas. El grado de polimorfismo de éstos loci fue probado en muestras de tejido de 28 colonias. El número de alelos varió entre 2 y 13 (promedio de $N_a=5,4$), con un promedio de heterocigosidad observada de 0.42 ($H_e=0,43$). Todos los loci cumplen el equilibrio de Hardy-Weinberg. Se sugiere que estos nuevos marcadores serán de utilidad para estudios de genética de la conservación en esta especie, así como ayudarán a mejorar la resolución a nivel individual de este coral. Los cebadores desarrollados fueron también probados en *Oculina patagonica* con amplificaciones exitosas de varios loci.

Abstract

Cladocora caespitosa is a reef-building zooxanthellate scleractinian coral in the Mediterranean Sea. Mortality events have recurrently affected this species during the last decade. Thus, knowledge of its genetic structure, population diversity and connectivity is needed to accomplish suitable conservation plans. In order to obtain a better understanding of the population genetics of this species, 13 highly variable microsatellites markers were developed from a naturally bleached colony. The developed primers failed to amplify zooxanthella DNA, isolated from *C. caespitosa*, verifying that these markers were of the coral and not algal symbiont origin. The degree of polymorphism of these loci was tested on tissue samples from 28 colonies. The allele number for each loci ranged from 2 to 13 (mean $N_a=5.4$), with an average observed heterozygosity of 0.42 ($H_e=0.43$) and all loci were in Hardy-Weinberg equilibrium. These new markers should be useful in future conservation genetic studies and will help to improve the resolution of the individual identifica-

tion within this coral species. Primers were also tested in *Oculina patagonica*, with successful amplifications of several loci.

Introduction

Cladocora caespitosa (L.), is a colonial and zooxanthellate species native to the Mediterranean Sea (Zibrowius 1980). Even though the species was considered as part of the Faviidae, this affiliation has been considered as dubious and this species has most recently been placed within Caryophylliidae (Romano & Cairns 2000, Cairns et al. 2001). However, the genus *Cladocora* has recently been included in Oculiniidae (Fukami et al. 2008).

This species forms large bioconstructions with a high diversity of associated micro and macrofauna. *Cladocora caespitosa* is found over a wide ecological range, from shallow waters to 50-m depth, in hard and soft bottoms under variable conditions of exposure to the wave action and turbidity. It is a zooxanthellate coral that hosts endosymbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyceae), that were identified by Visram et al. (2006) as belonging to the *Symbiodinium* type known as temperate A. When abundant, the colonies form beds of globose to hemispherical colonies (dense populations of numerous small colonies) or banks (colonies connected together in a large formation of more than 1 m high and covering several square meters) (Kruzic & Benkovic 2003). This species is a hermaphroditic broadcast spawning coral (Kruzic et al. 2008), which in the Adriatic Sea, releases gametes for a period of few days at the beginning of the summer, coinciding with increasing water temperature and correlated with the lunar cycle. Asexual reproduction may also occur by budding or fragmentation.

Since the Pliocene *C. caespitosa* has been the only coral species that develops monospecific reef-like structures in the Mediterranean Basin. This coral species became very common in some Quaternary peri-Mediterranean basins and diverse Holocene and Pleistocene fossil banks have been described in different areas (e.g. Fornós et al. 1996, Bernasconi et al. 1997). Nevertheless, according to Laborel (1987) the present geographical range of *C. caespitosa* "reefs" in the Mediterranean has decreased with respect to its fossil distribution. The species regression prompted Augier (1982) to include this coral in a list of marine species in danger of disappearance. Morri et al. (2001) pointed out that regression is still in progress and is likely caused by sea-water temperature changes. Additionally, recent episodes of mass-mortality events of *C. caespitosa* have been documented all over the Mediterranean (e.g. Balearic and Columbretes Islands and Gulfs of Genoa and Naples, as reviewed in Garrabou et al. 2009).

From this perspective, a more extensive knowledge of the reproductive biology of this coral, its dispersal abilities and the genetic structure and gene flow among different populations along its geographical range of distribution, could be informative for any conservation plan.

Microsatellite markers are hypervariable regions of the genome that are of particular interest of population genetics studies. The high levels of resolution given by these markers may help to understand the species processes of dispersal, recruitment and reproductive strategies (Underwood et al. 2006). Thus, the development of these markers is useful when working at the intraspecific level. Given the utility of these genetic markers, the aim of the present study was to develop a set of microsatellites to help to promote population studies in order to better understand the underlying genetic structure of extant populations of the species *C. caespitosa*.

Material and methods

A partial DNA library for *C. caespitosa* was generated using hybridization capture for enrichment of repeat DNA sequences. In order to reduce the risk of zooxanthella DNA contamination, a naturally bleached colony founded in the Columbretes Islands (Spain, NW Mediterranean) was used as tissue source. DNA was extracted, using a phenol-chloroform procedure, from tissue of a single polyp.

The absence of symbionts in the coral tissue was preliminary confirmed by negative PCR amplifications from an internal primer of the *psbA* gene in *Symbiodinium*: IA2F (GGA TGG GTA GAG AAT GGG AAT TCA G) and IA2R (CGA GAG TTA TTR AAG GAA CCA TAT TG) (Barbrook et al. 2006), and the 28S mitochondrial marker (F: CCC GCT GAA TTT AAG CAT ATA AGT AAG CGG; R: GTT AGA CTC CTT GGT CCG TGT TTC AAG A) (Zardoya et al. 1995). To generate the enriched library, 4-5 µg of DNA were digested with 50 U of MboI endonuclease (Promega). Digested fragments were ligated with *Sau*L1 (5'-GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG-3') and *Sau*L2 (5'-PO4-GAT CCG AAG CTT GGG GTC TCT GGC C-3') linkers. Fragments from 250 to 1200bp were excised from 2.5% agarose gel, purified (Biotools gel purification kit) and amplified using *Sau*L1 as primer. The resultant polymerase chain reaction (PCR) product was used for the repeat sequences enrichment using seven different 3' biotin labeled probes: (AC)_{12'}, (GAT)_{8'}, (ACAT)_{6'}, (AAG)_{8'}, (GATA)_{6'}, (AAC)_{8'}, (ATA)₈ bound to streptavidin-coated beads (Dynabeads M-280, Invitrogen). Fragments that hybridized with the repeat sequences were ligated to pGEM-T vector (Promega) and transformed into TOPO (TOPO TA Cloning, Invitrogen); the bacteria were grown over night at 37°C on LB agar plates supplemented with X-Gal-IPTG and ampicillin. Recombinant colonies were identified by blue/white screening and clones containing microsatellites were identified by colony PCR as described in Bloor et al. (2006). Positive clones were PCR amplified with M13 primers and sequenced on an ABI PRISM 3730 Sequencer (Applied Biosystems). Sequences were edited using the program SEQUENCHER 4.6 (GeneCode Corporation). Of a total of 568 putative positive clones sequenced from the genomic library, 130 contained repeat sequences and 45 were regarded as useful.

Amplification primers were designed for those sequences that were considered useful, using the program Primer 3 (Rozen & Skatletsky 2000), and were then tested in DNA extracted from tissue samples of 8 colonies collected from 4 different localities. Amplifications were carried out in 10 μ l reaction volumes using BIOTOOLS 1X standard reaction buffer with 2mM MgCl₂, 0.2mM of each dNTP, 0.75 U Taq polymerase, 0.5 μ M of each primer and approximately 0.30 ng of DNA (extracted Qiagen BioSprint™ 15DNA Blood Kit). The cycling profile was 94°C for 3min then 35 cycles at 94°C for 45 s, 50-56°C for 45 s (Table 1) and 72°C for 30 s and a final extension at 72°C for 10 min. Fluorescently labeled PCR products were run on an ABI PRISM 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Tissue samples were taken from 28 colonies in the vicinity of Puerto Tofiño (Illa Grossa, Columbretes Islands Marine Reserve, NW Mediterranean), which is the location of one of the most important bioconstructions of this species on the Mediterranean coasts (Kersting 2008). Colonies were at least 1.5 m apart, to ensure sampling of different colonies. Tissue samples from each colony were typed (using above PCR conditions) to determine levels of polymorphism. Number of alleles (N_a), observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) and Probability of Identity (PI) value were calculated using GeneAlex 6.0 software (Peakall & Smouse 2006). Tests of linkage disequilibrium and Hardy-Weinberg equilibrium were carried out using the program GenePop 3.4 (Raymond & Rousset 1995), using 1000 dememorizations with 100 batches (1000 iterations per batch).

To confirm the origin of each locus (i.e. coral or zooxanthellae), zooxanthella DNA was obtained by the degraded controls technique (Shearer et al. 2005), following a modified protocol from Coffroth et al. (1992). This technique allows separating zooxanthellae from coral tissue, with little contamination of one species tissue with the other. The designed microsatellite primers were then tested against this DNA.

Microsatellites developed for *C. caespitosa*, were also tested in the scleractinian species *Oculina patagonica* collected in Alcossebre (Castellón, Spain, NW Mediterranean). Ten specimens were used for the cross-amplification analysis. PCR conditions used were those for *C. caespitosa*, with no specific optimization of the PCR parameters.

Results and Discussion

Population genetic studies on Mediterranean scleractinian corals have been in general based on allozymes (e.g. Goffredo et al. 2004), with some constraints associated with the use of those markers (van Oppen et al. 2000). Different classes of molecular markers should yield complementary views of population structure within species, which allows investigating how evolutionary processes at different time scales had shaped patterns of genetic heterogeneity within populations (Buonaccorsi et al. 2001). Scleractinian corals population genetics information re-

mains surprisingly limited, mainly due by a lack of adequate markers (Ridgway & Gates 2006). Maier et al. (2001) report some of the first microsatellite sequences developed for the scleractinian corals. Yet studies that have utilized hypervariable microsatellite sequences to examine population structure and connectivity within scleractinian species have mainly focused on tropical species (Magalon et al. 2004; Baums et al. 2005, Wang et al. 2009). Only one study to date has utilized microsatellite markers on a scleractinian species (*Astroides calycularis*) endemic to the Mediterranean Sea (Casado-Amezúa et al. 2010).

In the present study, 13 microsatellite loci were developed for the scleractinian species *Cladocora caespitosa*. Ten of these were trinucleotides repeats, 2 were dinucleotide repeats, and also a hexanucleotide repeat was identified. Most common microsatellite repeats founded in scleractinian corals are di- and trinucleotides, with studies mainly focused on species within the widely studied tropical genus *Acropora* (Wang et al. 2009, Tang et al. 2010). Other repetitions such as tetra-, penta- and hexanucleotide repeats have been found to be much less common. López et al. (1999) identified for the first time a tetranucleotide repeat in the scleractinian species *Montastrea franksi*, and Miller & Howard (2004) found a hexanucleotide within the species *Goniastrea favulus*. At the time of genotyping, repeats higher than dinucleotides provide a better interpretation and assignment of the alleles, as well as detection of microvariants (alleles which size differs from common allelic variants in a number of bases different from the repeated motif, e.g. one base of any microsatellite, two bases for tri or tetranucleotide repeats, etc).

The designed primers were also tested on DNA from zooxanthella and coral extracted following the degraded control technique (Shearer and Coffroth 2005). Although this isolation procedure yields DNA that is enriched in symbiont (or host) DNA, small quantities of host (symbiont) DNA can be present. Thus, the weak to no amplification observed in the DNA samples enriched in zooxanthella DNA and the strong amplifications from the samples enriched with the coral DNA indicate that all the developed microsatellites belong to the coral tissue.

A total of 70 alleles (2 to 13 alleles per locus) were detected across the 13 loci in the 28 colonies sampled. H_o and H_e values ranged from 0.036 to 0.821 and 0.035 to 0.848, respectively (Table 1), figures on the range of other scleractinian species (e.g. Miller & Howard 2004; Underwood et al. 2009). None of the 13 microsatellite markers significantly deviate from Hardy-Weinberg equilibrium and none of the pairwise comparisons showed significant linkage disequilibrium. The calculated probability of identity (PI) (Peakall & Smouse 2006) reached zero when combining the two most variable of the thirteen microsatellites analyzed. Five of these thirteen characterized microsatellites are needed to calculate the PI among siblings.

In the cross amplifications analysis with *Oculina patagonica*, 4 of the 13 loci (Cc-L5, Cc-L16, Cc-L27 and Cc-L37) amplified all specimens, 3 loci (Cc-L13, Cc-L19, Cc-L42) amplified weakly in some of the specimens, and the remaining markers did not amplify under the given PCR conditions. This cross-amplification

study has shown the possibility to extend the use of these markers to closely related taxa.

By using F-statistics and other population genetic analyses, the characterized loci will provide data useful for studies of gene flow, connectivity and conservation within the species distribution range and will help to improve the individual resolution at the population level.

Table 1. Description of 13 microsatellite loci isolated from *Cladocora caespitosa* based in tissue samples from 28 different colonies of the species. Repeat motif, primer sequence, primer annealing temperature, size of cloned alleles, number of alleles (N_a), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and GenBank accession

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	Ta (°C)*	Allele size range	Na	Ho	He	P-value	GenBank accession n.
Cc-L2	(TG) ₃ CGAG(TG) ₂ GG(TG) ₇ AG(TG) ₇	F: 6-FAM-CGTGTAATAATGCCACCAACA R: TTACTTTGGGTGCCCATTA	56	182-184	2	0.143	0.133	0.684	HM469895
Cc-L4	(AAG) ₄ AAAT (AAG) ₁₆ GAG(AAG) ₉ (AAC) ₁₀ CAC(AAC) ₃	F: VIC-CAACAGGAAGCTGAAGCTGA R: CTTGGCTTGTTC	56	203-250	13	0.821	0.837	0.814	HM469896
Cc-L5	(AC) ₁₆	F: PET-CCTCTGCTGTGATATCCAAGT R: TGCCGAAATAACAAACCAA	56	149-179	11	0.607	0.784	0.084	HM469897
Cc-L13	(AAG) ₇ AAA (AAG) ₈ GAG (AAC) ₅	F: NED- AAGTTGTATATAAGGAGCTC R: TTGTTTAAATCAAAAGGTAG	50	300-350	7	0.357	0.371	0.907	HM469898
Cc-L16	(GGGGGT) ₅	F: NED-ITGCCATTTTAAACAGTTAC R: TCTGAGACTAGATGAGTGC	56	236-269	5	0.679	0.623	0.617	HM469899
Cc-L19	(AAC) ₇ ACCA GCTAC(AAC) ₂	F: 6-FAM-TTTGACGATTATTGTATGCT R: GTAATTGCTGTTTTTTTC	56	199-211	4	0.179	0.226	0.757	HM469900
Cc-L21	(AAC) ₁₆ AGCA ACAGC(AAC) ₄	F: PET-AACGTGAAGAATAACAAGTG R: AGAAAAGGACTTTTTATAACGA	56	161-188	10	0.821	0.848	0.110	HM469901
Cc-L27	(AAC) ₈	F: NED-CTTAAACTAATTGCAAAAAGG R: AAAAGTTCAGATAGCAAAAGGT	56	192-201	2	0.393	0.357	0.589	HM469902
Cc-L29	(AAC) ₁₂	F: VIC-TGTGGGAGCTGGGCCGAGTA R: AAATTCGACGGCAGCACATG	56	229-232	2	0.036	0.035	0.923	HM469903

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	T _a (°C)*	Allele size range	N _a	H _o	H _e	P-value	GenBank accession n.
Cc-L30	(AAC) ₃ AATAACTTA (AAC) ₇	F: NED-CTTAGGGCTAAAAATCTACG R: ATCAATTCITATAGATGGTGC	56	222-225	2	0.071	0.069	0.845	HM469904
Cc-L37	(AAC) ₃ (AAT) ₄ (AAC) ₄ (AAT) ₄ (AAC) ₄ (AAT) ₃ (AAC) ₇	F: VIC-GAATTGATGTCAGTCACTCTG R: GCATGAGAAAACGAAAGATAG	56	243-246	2	0.143	0.133	0.684	HM469905
Cc-L38	(AAC) ₁₃	F: NED-TTAAGCACITTTAAAAGAGGA R: TTCCCTTTTATTTCAAIGAC	54	340-361	6	0.571	0.647	0.090	HM469906
Cc-L42	(AAC) ₃ AAT(AAC) ₄ GGT(AAC) ₅ AAT	F: VIC-ACITIGCCCTGAAGAATATGGC R: TCTTCAAGTCTCTTTCAGC	56	155-164	4	0.607	0.585	0.918	HM469907

N_a, number of alleles; H_e, observed heterozygosity; H_o, expected heterozygosity; F, all primers were fluorescently end labeled with 6-FAM, NED, VIC, or PET by reamplification with the oligonucleotide primer PaulAnn (5#-TGACCGA CCCCATGCTTACG-3#) (Casado-Amezúa et al. 2010); R, all reverse primer was "Pig-Tailed" with 5#-GTTTCTT-3# (Brownstein 1996) to facilitate genotyping.

*Annealing temperatures for each of the primers.

Funding

This work was supported by BBVA Foundation; and a project from the Spanish Ministry of Science and Innovation (CTM2008-00496/MAR) and National Science Foundation (NSF-OCE-04-24996).

Acknowledgements

The authors want to acknowledge S. Varela, R. Barrientos and two anonymous reviewers that significantly improved this manuscript with their comments.

References

- Augier H (1982) Inventory and classification of marine benthic biocenoses of the Mediterranean. Council of Europe, Strasbourg. *Nature and Environment Series*, **25**, 1-57.
- Barbrook AC, Visram S, Douglas AE, Christopher JH (2006) Molecular diversity of dinoflagellate symbionts of Cnidaria: the psbA minicircle of *Symbiodinium*. *Protist*, **157**, 159-171.
- Baums IB, Hughes CR, Hellberg ME (2005) Highly polymorphic microsatellite markers for the Caribbean hard coral *Acropora palmata*. *Marine Ecology Progress Series*, **288**, 115-127
- Bernasconi MP, Corselli C, Carobene L (1997) A bank of the scleractinian coral *Cladocora caespitosa* in the Pleistocene of the Crati valley (Calabria, southern Italy): growth versus environmental conditions. *Bolletino Società Paleontologica Italiana*, **36**, 53-61.
- Bloor P, De Laguna HB, Kemp SJ (2006) Highly polymorphic tetranucleotide microsatellite loci for the eastern Canary Island lizard, *Gallotia atlantica*. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 737-739.
- Brownstein MJ (1996) Modulation of non-template nucleotide addition by Taq DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* **20**, 1004-1006.
- Buonaccorsi, VP, McDowell JR, Graves JE (2001) Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Molecular Ecology*, **10**, 1179-1196.
- Cairns SD, Hoeksema BW, van der Land J (2001) Scleractinia, in: Costello MJ; Emblow C et al., editors. European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. *Collection Patrimoines Naturels*, **50**. p. 109-110.
- Casado-Amezúa P, Acevedo I, García-Jiménez R, Machordom A (2010) Development of microsatellite markers for the orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia, Dendrophyllidae). In: Abdoullave et al. (2010). Permanent genetic

- resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2009- 30 September 2009. *Molecular Ecology Resources*, **10**,232-236.
- Coffroth MA, Lasker HR, Diamond ME, Bruenn JA, Birmingham E (1992) DNA fingerprints of a gorgonian coral: a method for detecting clonal structure in a vegetative species. *Marine Biology*, **114**, 317-325.
- Fornós JJ, Barón A, Pons GX (1996) Arrecifes de coral hermatípicos (*Cladocora caespitosa*) en el relleno Holoceno de la zona de Es Grau (Menorca, Mediterráneo Occidental). *Geogaceta*, **20**, 303-306.
- Fukami H, Chen CA, Budd AF, Collins A, Wallace C, Chuang Y et al. (2008) Mitochondrial and nuclear genes suggest that stony corals are monophyletic but most families of stony corals are not (Order Scleractinia, Class Anthozoa, Phylum Cnidaria). *PLoS ONE*, **3**, e3222.
- Garrabou J, Coma R, Bensoussan N, Bally M, Chevaldonné P, Cigliano M et al. (2009) Mass mortality in North-western Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Global Change Biology*, **15**, 1090-1103.
- Goffredo S, Mezzomonaco L, Zaccanti F (2004) Genetic differentiation among populations of the Mediterranean hermaphroditic brooding coral *Balanophyllia europea* (Scleractinia: Dendrophylliidae). *Marine Biology*, **145**, 1075-1083.
- Kersting DK (2008) *La població de Cladocora caespitosa de la bahía de L'Ílla Grossa, islas Columbretes (Mediterráneo Noroccidental): características, distribución y mortalidades masivas relacionadas con la temperatura del agua de mar*. Diploma d'Estudis Avançats en Ciències del Mar. Universitat de Barcelona.
- Kruzic P, Benkovic L (2003) Banks of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Adriatic Sea (Croatia). *Marine Ecology*, **29**, 125-139.
- Kruzic P, Zuljevic A, Nokolic V (2008) Spawning of the colonial coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Southern Adriatic Sea. *Coral Reefs*, **27**, 337-341.
- Laborel J (1987) Marine biogenic constructions in the Mediterranean: a review. *Scientific reports of the Port Cros National Park*, **13**, 97-126.
- López JV, Kersanach R, Rehner SA, Knowlton N (1999) Molecular determination of species boundaries in corals: genetic analysis of the *Montastrea annularis* complex using amplified fragment length polymorphism and a microsatellite maker. *Biological Bulletin*, **196**, 80-93.
- Magalon H, Samadi S, Richard M, Adjeroud M, Veuille M (2004) Development of coral and zooxanthella-specific microsatellites in three species of *Pocillopora* (Cnidaria, Scleractinia) from French Polynesia. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 206-208.
- Maier E, Tollrian R, Nurnberger B (2001) Development of species-specific markers in an organism with endosymbionts: microsatellites in the scleractinian coral *Seriatopora hystrix*. *Molecular Ecology Notes*, **1**,157-159.
- Miller KJ, Howard CG (2004) Isolation of microsatellites from two species of scleractinian corals. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 11-14.
- Morri C, Peirano A, Nike-Bianchi C (2001) Is the Mediterranean coral *Cladocora*

- caespitosa* an indicator of climatic change? *Archivio Di Oceanografia e Limnologia*, **22**, 139-144
- Peakal R, Smouse PE (2006) GENEALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Ridgway T, Gates RD (2006) Why are there so few genetic markers available for coral population analysis? *Symbiosis*, **41**,1-7
- Romano SL, Cairns SD (2000) Molecular phylogenetic hypothesis for the evolution of scleractinian corals. *Bulletin of Marine Sciences*, **67**, 1043-1068.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz S, editors. *Bioinformatics Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, p. 365-386.
- Shearer TL, Gutiérrez Rodríguez C, Coffroth MA (2005) Generating molecular markers from zooxanthellate cnidarians. *Coral Reefs*, **24**, 57-66.
- Tang PC, Weing NV, Chen CW, Wallace CC, Chen CA (2010) Comparative study of genetic variability of AAT and CT/GT microsatellites in elkhorn coral, *Acropora* (Scleractinia: acroporidae). *Zoological Studies*, **49**, 657-668.
- Underwood JN, Souter PB, Ballment ER, Lutz AH, van Oppen MJH (2006) Development of 10 polymorphic microsatellite markers from herbicide bleached tissues of the brooding pocilloporid coral *Seriatopora hystrix*. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 176-178.
- van Oppen MJH, Wörheide G, Takabayashi M (2000) Nuclear markers in evolutionary and population genetic studies of scleractinian corals and sponges. *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium; 2000 Oct 23-27; Bali, Indonesia*. Vol. 1.
- Visram S, Wiedenmann J, Douglas AE (2006) Molecular diversity of symbiotic algae of the genus *Symbiodinium* (Zooxanthellae) in cnidarians of the Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biology Association UK*, **86**, 1281-1283.
- Wang S, Zhang L, Matz M (2009) Microsatellite characterization and marker development from public EST and WGS databases in the reef-building coral *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia). *Journal of Heredity*, **100**, 329-337.
- Zardoya R, Costas E, Lopez-Rodas V, Garrido-Pertierra A, Bautista JM (1995) Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **41**, 637-645.
- Zibrowius H (1980) Les Scléactiniaux de la Méditerranée et de l'Atlantique nord-oriental. *Memories Institut Oceanographique Monaco*, **11**,1-284.

Genetic structure and gene flow of the broadcast spawning coral *Cladocora caespitosa* in the NW Mediterranean

Resumen

Cladocora caespitosa es un coral endémico del Mediterráneo que se caracteriza por su capacidad de formar amplias bioconstrucciones similares a los arrecifes tropicales. Eventos de mortalidad de las especies se han registrado en general por todo Mediterráneo, posiblemente debido al incremento en la temperatura del mar. Por lo tanto el conocimiento sobre la conectividad y la estructura genética de las poblaciones de éste coral, es de utilidad para entender mejor el potencial de recuperación esta especie frente a ambientes fluctuantes. En este estudio, con el uso de marcadores de microsatélites, se evalúa la estructura y el flujo genético entre cuatro poblaciones situadas en el Mediterráneo noroccidental: Cabo de Palos, Menorca, Islas Columbretes y Tarragona. Utilizando análisis de parentesco se muestra la posibilidad de reproducción asexual y quimerismo en las poblaciones de la especie. Por medio de métodos bayesianos, se demuestra que las poblaciones estudiadas forman una unidad homogénea. Se encontraron valores de diferenciación genética pequeños pero significativos entre la mayoría de las comparaciones pareadas, excepto entre Tarragona-Cabo de Palos y Tarragona-Menorca. En general, se detectó un marcado flujo genético asimétrico entre localidades, con el mayor número de inmigrantes por generación en Cabo Palos. Esta evaluación podría ayudar a entender mejor la dinámica poblacional de la especie, y podría servir como una primera aproximación para realizar nuevos estudios sobre diferentes aspectos de su ecología.

Abstract

Cladocora caespitosa is an endemic Mediterranean coral characterized by its ability of forming extensive bioherms similar to the reefs in tropical areas. Mortality events of the species have been recorded overall the Mediterranean, possibly due to the increasing sea water temperature. Therefore knowledge on genetic structure connectivity is useful for better understanding the potential recovery of its populations to fluctuating environments. In this study, using microsatellite markers, we assess the genetic structure and gene flow among four populations of the species placed in the northwest Mediterranean: Cape Palos, Minorca, Columbretes Islands and Tarragona. Using parental approaches we show the possibility of asexual reproduction and chimerism within populations of the species. By means of Bayesian approaches, we show that the studied populations

form a homogenous unit. Small but significant genetic differentiation was detected among most of the pairwise comparisons, but Tarragona-Cape Palos and Tarragona-Minorca. Asymmetric gene flow was recorded with the highest number of migrants per generation encountered in Cape Palos. This assessment would help to better understand the population dynamics of the species, and could serve as an initial approach for further studies on different aspects of its ecology.

Introduction

Oceanic environmental changes, such as increasing sea surface temperatures, ocean acidification, and local disturbances (e.g. sediment pollution or nutrient influx), are expected to threaten the survival and growth of reef-building corals (Hoegh-Guldberg et al. 2007; Cantin et al. 2010). Recruitment processes are essential for the addition of new individuals to populations and for maintaining successive life-cycle stages within populations (Caley et al. 1996). New recruitment at the larval stage from local and external sources, along with re-growth of surviving coral colonies and colony fragments, strongly contribute to the recovery of coral populations (van Oppen et al. 2008), therefore, to estimate how coral populations will be affected by present and future environmental changes, dispersal distances and pathways are useful for understanding the recovery potential of those corals (van Oppen et al. 2008).

Broadcast spawner corals, have external fertilization and development. This leads to a planktonic larvae that develops in the water column (Harrison 1999), being planula dispersal responsible for most of the connectivity between populations (Hellberg 2009). This pelagic planula sometimes disperses over very long ranges and simply direct tracking larval trajectories from spawning to settlement is not easily accomplished (Palumbi 2003). In addition, such tracking is not sufficient for quantifying population connectivity because it is reduced by natural selection in environments where exogenous colonizers enter (Pineda et al. 2007; Marshall et al. 2010). Therefore, molecular markers provide an ideal tool for estimating larval dispersal (Hellberg 2009; Weersing & Toonen 2009). Recently, population analyses using neutral high-resolutive genetic markers such as microsatellites have become the mainstream method for population genetics surveys on reef-building coral species (e.g. Baums et al. 2005; Magalon et al. 2005; Nakajima et al. 2009; van Oppen et al. 2008).

Cladocora caespitosa (Linnaeus, 1767), is a colonial and zooxanthellate species. Physiologically, is similar to the tropical reef builder species, as it is a hermatypic species able to construct extensive bioherms (Zibrowius 1980). Even though it does not constitutes part of polispecific reefs. These characteristics together with the existent fossil register have lead various authors to classify *C. caespitosa* as the only scleractinian coral able to form monospecific reefs in the Mediterranean Sea (Aguirre & Jiménez 1998; Kruzic et al. 2008). When abundant, the colonies form

beds of globose to hemispherical colonies (dense populations of numerous small colonies) or banks (colonies in a large formation of more than 1m high and covering several square meters) (Kruzic & Benkovic 2008). *C. caespitosa* is a long-lived coral with slow growth rate (Periano et al. 1999). The known *C. caespitosa* range covers the entire Mediterranean basin and some spread colonies have been cited in the Atlantic coasts (Zibrowius 1983; López-González 1993; Moreno et al. 2008). In the areas where the coral is abundant, its colonies have two different morphologies leading into two kinds of seabed covering (Peirano et al. 1998): i) seabed with a high number of spread *C. caespitosa* colonies, normally globose in shape and small in size (less than 40cm length); ii) seabed with big and high colonies of 1 or more meters in length. The first were named by Peirano et al. (1998) “beds” and the latter “banks or monoespecific reefs”. It is still possible to find seabed covered by the two kinds of colonies.

The species became very common in the Quaternary, as evidenced by Holocene and Pleistocene fossils banks in different areas (e.g. Fornós et al. 1996; Bernasconi et al. 1997). According to Laborel (1987), the present range of *C. caespitosa* “reefs” has decreased in the Mediterranean with respect to its fossil distribution. The species regression prompted Augier (1982) to include this coral in a list of marine species in danger of disappearance. Morri et al. (2001) pointed out that its regression is still in progress and is likely caused by seawater temperature changes. Additionally recent episodes of mass mortality events have been documented all over the Mediterranean (reviewed in Garrabou et al. 2009). The species is listed in the IUCN Red List as “Data Deficient”.

In the Iberian Peninsula, even if colonies of the species have been described around most of this area, from Catalonia to Cadiz and in the north of Africa (Moreno et al. 2008), it is only possible to find spread colonies and small colonies, or aggregates of this colony small size. It is in the Columbretes Islands where the highest bioherms are found, even in form of big “banks” or “reefs” of the species or aggregated small colonies (Kersting & Linares 2012).

Some aspects of the sexual reproduction of the species have been described in the Adriatic Sea by Kruzic et al. (2008). These authors describe the coral as hermaphroditic at the colony level and with external fertilization. In situ observations conclude that colonies spawn male and female gametes at the beginning of the summer with the increment of seawater temperatures and coinciding with the lunar cycle. Asexual reproduction events of “polyp expulsion” have been recorded in laboratory observations by Kruzic (2007), even, a recent study, has showed how different members of the families Acroporidae, Faviidae, Mussidae, Fungidae and Oculiniidae are able of forming planulae clones via fragmentation of the embryos during the ontogenesis in the water column (Heyward & Negri 2012).

The Balearic Basin is a transition region between two different dynamic regions, the Liguro-Provençal and the Alboran sea/ Algerian basins (Fernández et al. 2005). This area is dominated by the Northern current, which flows southward along

the Iberian Peninsula (Figure 1). When this current reaches the Ibiza channel, it divides in two branches, one southward in the direction of the Algerian basin and the second one forms an anticyclonic gyre going back to the NE and forming the Balearic current (Pinot et al. 2002). Near the Balearic Islands, the flow through the sills of recent Atlantic water, partially deflected by anticyclonic eddies from the Algerian Current, creates the Balearic Front and contributes to its mesoscale variability. This front is clearly recognized as the westward continuation of the North Balearic Front, and defined in the open sea as the northern limit of the recent Atlantic water reservoir. The northern current is modified across the seasons, in winter it mainly flows along the eastern Iberian Peninsula coasts, while during spring and early summer, the formation of an anticyclonic gyre causes the deviations of the Northern Current, spreading over the whole Balearic Sea. The Gulf of Valencia is frequently influenced by water entering from the Algerian Basin, which appears to be important in the disruption of the Northern Current and the formation of the Balearic Current. Therefore, two potential barriers to gene flow have been described in this area, the Balearic front (BF), that is a temporal front more evident during the spring-summer seasons, still has shown to be a strong barrier for connectivity in littoral fish species (Galarza et al. 2009); and the Ibiza Channel rarely considered in genetic population studies, but assessed to be a barrier to gene flow in the gorgonian *Paramuricea clavata* (Mokhtar-Kamaï et al. 2011); and a directional barrier for the fish species *Serranus cabrilla* (Schunter et al. 2011).

The main aim of this study was to assess the genetic structure and connectivity of the broadcast spawner coral *Cladocora caespitosa* in the northwestern distribution limit of the species and to evaluate the potential permeability of oceanographic barriers to the gene flow described in this area.

Material and Methods

Studied area and samples collection

The studied area corresponds with the northwestern distribution range of the coral across its whole distribution range. Four populations were considered, two in coasts of the Iberian Peninsula, Tarragona and Cape Palos, and two in insular areas, Minorca and Columbretes Islands. While the populations from the mainland were constituted of spread and small (less than 40cm in size), globose in shape colonies, in the population of Minorca were found the two kinds of colonies above cited, small and globose, forming “beds” and big in shape forming “banks” some of them more than 1m in length. The locality of Columbretes Islands has been recorded as one of the most important in the Mediterranean Sea, as the seabed of the main island (Illa Grossa) is entirely

covered by big “banks” of the species, with some areas in which aggregations of small and globose colonies occur.

Tissue samples from individual polyps from different colonies of *Cladocora caespitosa* were collected by SCUBA diving at these four different localities around the distribution range of the species in the NW Mediterranean (Table 1, Fig. 1). At each locality, a random sampling was performed, collecting samples from each colony that was visualized and recording distances among sampled colonies. The minimum distance recorded distance between colonies was 0.5m and the maximum 10m. In the locality of Minorca, six big colonies and with the appearance of “banks” were sample twice (i.e. two polyps were taken from distant sites of the colony, considering differences in the contact zone among colony fragments), in order to establish an initial approach on the origin of these colonies (sexual or asexual reproduction). Samples were immediately stored in vials with absolute ethanol until laboratory analyses.

Table 1. Sampling localities of *Cladocora caespitosa*

Basin	Locality	Geographical coordinates		Sample size
		Latitude	Longitude	
Algerian Basin	Cape Palos	37°34'34.98''N	0°46'32.64''W	13
Balearic Sea	Minorca	39°52'52.62''N	3°59'31.20''E	36
Balearic Sea	Columbretes Islands	39°53'38.55''N	0°41'10.37''E	28
Balearic Sea	Tarragona	40°50'27.20''N	0°44'58.90''E	23

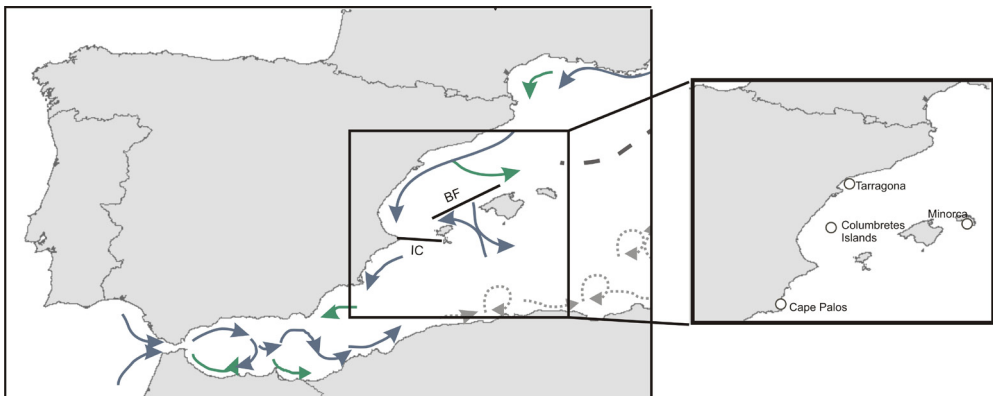


Figure 1 Sampling localities of *Cladocora caespitosa*. An scheme of seasurface currents and the main oceanographic barriers is included. **BF**, Balearic Front; **IC** Ibiza Channel. Blue arrows, principal currents; green arrows, secondary paths/ temporal currents.

Total DNA was extracted from a total of 108 polyps, using Qiagen BioSprint IT 15DNA Blood Kit. Thirteen microsatellite loci specifically developed for *C. caespitosa* (Casado-Amezua et al. 2011), were amplified with fluorescently labeled primers following the PCR conditions described in Casado-Amezua et al. (2011). PCR products were visualized with an automated sequencer (ABI PRISM 3730 DNA Sequencer, Applied Biosystems) with the GeneScan-500 (LIZ) internal size standard. Electropherograms were analyzed for allele scoring with GeneMapper software 3.0 (Applied Biosystems).

Data analysis

Genetic diversity

Allelic diversity (N_a) was quantified as number of alleles per locus overall loci and localities using GenAlEx 6.0 software (Peakall & Smousse 2006). Allelic richness and private allelic richness were estimated with a rarefaction procedure using HP-RARE software (Kalinowsky 2005), with the minimum number of genes set to 24 ($N_{S(24)}; P_{(24)}$).

Neutrality of the markers was tested using LOSITAN software (Antao *et al.* 2008), which performs an F_{ST} -outlier analysis (Beaumont & Nichols 1996) to identify microsatellite loci under selection. 50 000 simulations of the software were generated. Significance was estimated with a 95% confidence interval. In order to avoid the possible effect of random drift and historical events that could potentially bias the relative influence of natural selection on the studied markers (Luikart *et al.* 2003), jackknife overall localities as well as single pairwise comparisons were performed. All runs were conducted for both the infinite alleles (IAM) and the stepwise mutation (SMM) models (Kimura & Crow 1964).

Analyses of departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) within populations for each locus and over all loci were quantified as the observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities using GenAlEx 6.0 software (Peakall & Smousse 2006). Estimations of the inbreeding coefficient, F_{IS} , an estimate of the deficit or excess of heterozygotes, within each population for each locus and over all loci were computed with Genetix (Belkhir *et al.* 2004). Significance of the estimation analysis was tested with 10 000 permutations.

MICRO-CHECKER v.2.2.3 software (Van Oosterhout *et al.* 2004) was used to check for scoring errors due to stuttering, large allele dropout and to estimate null allele frequencies.

Linkage disequilibrium (LD) was tested among all pairs of loci at each of the sampled locations with a permutation test using GenePop version 3.4 (Raymond & Rousset 1995). Analysis of significance was tested with Markov chain Monte

Carlo (MCMC that was run using 1000 dememorizations with 100 batches and 1000 iterations per batch).

Step-down Bonferroni (Holm 1979) correction was applied to P-values in all the statistical analyses that included multiple comparisons.

The Cornuet & Luikart (1996) test implemented in BOTTLENECK v. 1.2.02 (Piry et al. 1999) was used to assess if populations were suffering any signal of bottleneck processes. The analysis was run following the recommendations of Piry et al. (1999), using the two-phased model (TMP) for microsatellite data with 90% single-steps changes, and the results were evaluated using the sign, standardized differences and one tailed Wilcoxon tests.

Asexual reproduction has been described in *C. caespitosa* (Kruzic 2007) as well as other scleractinian species (Heyward & Negri 2012), that would lead to non-independent genotypes and violation of HWE and LD assumptions. The extent of asexual reproduction was estimated from the genotypic richness of each population using GeneAIEx. Ng (number of unique multilocus genotypes) was used to represent an estimate of the minimum number of clones present in a population; Ng/N (where N indicates the number of analyzed individuals) provides an index of the effects of asexual reproduction and suggests genotypic richness (Coffroth & Lasker 1998). This index varies from 0, in case that all genotypes are identical, to 1, when all the different samples analyzed correspond to distinct clonal lineages. In addition, the software ML-Migrate (Kalinowski 2006) was used to calculate which of the four levels of relatedness (unrelated, half-sibling, full-siblings and parent-offspring) had the highest likelihood for each pair of individuals within populations.

Population genetic structure analysis

The number of genetically differentiated *C. caespitosa* populations, K, was estimated by employing the Bayesian approaches implemented in the softwares STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) and BAPS5 (Corander et al. 2003), without a priori information on the geographical location of each sample. The STRUCTURE software was run under the “admixture ancestry model” (because the pelagic larvae of the species would lead to connections among localities) under the assumption of “correlated allele frequencies” (Falush et al. 2003) to improve clustering of closely related populations. Simulations included 20 replicated runs for each K value (1-4), and a mean Log P(X|K) was calculated. MCMC of each run consisted of 50 000 burn-in iterations followed by 500 000 sampled iterations. ΔK values are an index for deciding the probable number of genetically clustering populations. ΔK values were calculated under the Evanno et al. (2005) method and visualized using Earl & vonHoldt (2011) software. The method implemented in BAPS5 (Corander et al. 2003) was used under the default option of the route “cluster groups of individuals” under K values from 1 to 4 simulated 20 times each.

For the measures of genetic differentiation, sample sites were used as a population unit. We estimated F_{ST} values and their statistical significance with 10 000 bootstrap replicates (Weir & Cockerman 1984) using ARLEQUIN 3.1.1 software (Excoffier *et al.* 2005). As null alleles can induce overestimation of genetic distances (Chapuis & Estoup 2007), pairwise estimates were computed with correction for null alleles (Brookfield 1996) and without. We also calculated the estimator of actual differentiation (D_{est}) with the package DEMETics (Gerlach *et al.* 2010) within the statistical package R v2.12.2 (R Development Core Team 2009). Bootstrapping resampling (1000 iterations) was used to calculate P values.

We calculated the influence of geographic distance on population genetic differentiation with two models: Rousset (1997) model for two-dimensional habitats with the correlation between pairwise population linearized F_{ST} ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) and the logarithm of the geographical distance (in meters); and Slatkin (1993), which used the logarithm of \hat{M} calculated separately for pairs of populations, (where $\hat{M} = (1-F_{ST})/4F_{ST}$) as a measure of similarity, versus the logarithm of the geographical distance. This parameter corresponds to the number of migrants required to account for observed genetic differences if migrants could move directly between populations. In both cases, Mantel tests (10000 permutations) were used to assess the statistical significance. The strength of the isolation by distance (IBD) relationship was quantified with the slope and intercept of genetic similarity (\hat{M}) or distance (linearized F_{ST}) against geographic distance. Both parameters were calculated using reduced major-axis regression (RMA) (Sokal & Rohlf 1981). Asymmetric 95% confidence intervals around the RMA regression coefficient were calculated with 10 000 bootstraps around individual population pairs. All the analyses were done with IBDWS software (Jensen *et al.* 2005). We used PopTools software (Hood 2010) with $n=1000$ randomizations in order to perform a Mantel test with the D_{est} parameter and the logarithm of the geographical distance. Geographical distances were measured by means of dead-reckoning distances using MatLab software.

Detection of migrants

Maximum likelihood estimation of bidirectional asymmetric gene flow rates were estimated with MIGRATE v. 2.1.3. (Beerli 2004) which was used to build a full migration matrix model with a Brownian motion approximation to the stepwise mutation model. As suggested by the software manual, Markov chain parameters were seen as short chains =10 (10 000 genealogies sampled) and long chains = 3 (100 000 genealogies sampled).

Results

Three of the thirteen loci were discarded for the analysis, Cc-L21, as, after trying with different conditions it did not amplify in most of the individuals from Cape Palos, Cc-L30 as it was almost monomorphic, and Cc-L38 as the analysis of its electropherograms showed multiple peaks in some individuals in the localities of Tarragona, Minorca and Cape Palos.

Mean allelic richness was 4.9 ± 0.55 (mean value \pm standard deviation (SD) here and hereafter), values ranged from $2.25 (\pm \text{average SD } 0.25)$ for Cc-L2, Cc-L29 and Cc-L42 to 13 ± 0.8 for Cc-L4 (Table 2).

Over all loci, allelic diversity ranged from 3.7 ± 0.94 (Tarragona) to 5.2 ± 1.3 (Columbretes Islands) (Table 3). After rarefaction, allelic diversity parameters ranged from 3.2 ± 2.3 (Tarragona) to 4.3 ± 3.6 (Cape Palos) and private allelic richness from 0.1 ± 0.2 (Tarragona) to 0.8 ± 1.3 (Columbretes Islands). Departures from HWE equilibrium, measured as F_{IS} , were not generalized in all loci for each sampled site. In cases of heterozygote deficiencies, evidence for null alleles was checked and their frequencies were computed at each locus for each sampled site (Table 2). No evidence of allele dropout or scoring errors due to stuttering was found. The analysis detected the possibility of null alleles in locus Cc-L5 in Tarragona, Minorca and Columbretes due to an excess of homozygotes in most allele size classes, as well as in locus Cc-L16 in Tarragona. Null alleles frequencies ranged from 0.10 for Cc-L5 (Columbretes) and Cc-L16 (Tarragona) to 0.26 for Cc-L5 (Tarragona). However, applying the corresponding correction for null alleles (Brookfield 1996, in all cases) did qualitatively affect the results only in the case of Cc-L5 from Columbretes and Cc-L16 from Tarragona, being the other single-locus F_{IS} values from the rest of the populations showing null alleles still significant. F_{IS} values for loci Cc-L5 and Cc-L16 after null allele correction, were still significant only for loci Cc-L5 in Tarragona and Minorca. Over all loci F_{IS} values ranged from -0.041 (Cape Palos) to 0.120 (Tarragona). Even if this heterozygote deficit may be due to other reasons than the presence of null-alleles, overall loci F_{IS} value from Tarragona was not significant after null allele correction, therefore demonstrating that the presence of such alleles could affect the analysis (Table 3).

The neutrality tests, either under the IAM or the SMM model, showed loci Ac-L4 and Ac-L16 to be candidate for positive and balancing selection respectively. However, the jackknife resampling showed that when removing Cape Palos from the analysis any of the loci deviate from neutrality. This locality was the one with smallest sample size, and was constituted by spread colonies. Therefore the possibility of a demographic impoverishment of the population cannot be discarded, and the associated loss of certain alleles mistaken for selection pressures.

The bottleneck analysis did not show evidence signals of recent drastic reduction of population sizes in any of the populations (One one tailed-Wilcoxon Test, $P > 0.05$).

Table 2. Summary statistics for ten microsatellite loci of *Cladocora caespitosa*.

Population	Ce-L2	Ce-L4	Ce-L5	Ce-L13	Ce-L16	Ce-L19	Ce-L27	Ce-L29	Ce-L37	Ce-L42	
Cape Palos	N	12	12	13	13	13	13	13	13	13	
	N _a	2	13	8	2	4	5	4	2	2	
	Ns(24)	2	13	7.6	2	4	4.8	3.9	2	2	
	P(24)	0.0	2.6	1.6	0.0	0.1	1.2	0.9	0.0	0.0	
	H _o	0.083	0.917	0.615	0.692	0.692	0.385	0.462	0.231	0.231	0.308
	H _e	0.083	0.859	0.797	0.471	0.652	0.351	0.532	0.212	0.212	0.271
	F _{IS}	0.000	-0.071	0.235	-0.500	-0.064	-0.100	0.138	-0.090	-0.091	-0.143
	Minorca	N	36	35	36	35	36	37	35	36	35
		N _a	3	15	10	3	4	4	3	4	2
		Ns(24)	1.9	10.5	7.3	3	3.7	3.0	3.0	1.6	2
P(24)		0.3	0.6	0.6	0.9	0.0	0.0	0.0	0.2	0.9	0.0
H _o		0.081	0.838	0.487	0.944	0.622	0.486	0.486	0.054	0.417	0.418
H _e		0.080	0.904	0.840	0.571	0.588	0.451	0.515	0.055	0.383*	0.366
F _{IS}		-0.019	0.073	0.426*	-0.669	-0.058	-0.079	0.058	-0.007	-0.089	-0.141

Population	Cc-L2	Cc-L4	Cc-L5	Cc-L13	Cc-L16	Cc-L19	Cc-L27	Cc-L29	Cc-L37	Cc-L42
Columbretes Islands										
N	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
N_a	2	13	11	8	5	4	2	2	2	3
$N_s(24)$	1.9	9.5	7.5	5.6	4.1	2.8	2.0	1.4	1.9	2.4
$P(24)$	0.3	0.6	0.6	0.9	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.4
H_o	0.143	0.821	0.607	0.429	0.679	0.179	0.393	0.036	0.143	0.357
H_e	0.135	0.852	0.799	0.474	0.634	0.230	0.363	0.035	0.133	0.305
F_{IS}	-0.059	0.037	0.243	0.113	-0.070	0.226	-0.084	0.000	-0.059	-0.177
Tarragona										
N	30	30	27	28	30	30	30	30	30	30
N_a	2	11	7	2	3	3	3	2	2	2
$N_s(24)$	1.9	8.1	6.5	2.0	3.0	2.8	2.4	14	2.0	2.0
$P(24)$	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
H_o	0.067	0.967	0.333	0.786	0.400	0.300	0.267	0.033	0.200	0.167
H_e	0.127	0.805	0.825*	0.486*	0.571	0.270	0.389	0.033	0.183	0.305
F_{IS}	0.478	-0.206	0.600	-0.636	0.303	-0.115	0.319	0.000	-0.094	0.457

N = Number of collected individuals. N_a = number of alleles per population. $N_{s(24)}$ = mean allelic richness standardized to the smallest sample size using the rarefaction method of HP-Rare. $P_{(24)}$ = number of private alleles per population standardized to the smallest sample size. H_o = observed heterozygosity. H_e = expected heterozygosity. F_{IS} = inbreeding coefficient. Bold F_{IS} values are significant probability estimates. Null alleles frequencies are showed in parentheses. * Significant F_{IS} values after Brookfield (1996) null allele correction.

Clones were found in the localities of Tarragona, Minorca and Columbretes Islands; the ratio Ng/N ranged from 0.93 to 1 (Table 3). In the case of Tarragona, four individuals were regarded as putative clones (17.39% of the population), in Minorca, five individuals (13.89% of the population) and in Columbretes two individuals were assigned as clones (7.14% of the population). Overall, LD among loci was found in 9 of the 45 pairwise comparisons per sampling locality ($P < 0.05$ after step-down Bonferroni correction). This LD occurred mostly between loci from Minorca and Tarragona, localities that were seen to have the lower clonality indexes (i.e. higher percentages of clones).

Table 3. Summary statistics for each sampled population of *C. caespitosa*. N_a = number of alleles per population (\pm standard deviation). $N_a(24)$ = mean allelic richness (\pm standard deviation) standardized to the smallest sample size using the rarefaction method of HP-Rare. $P_{(24)}$ = standardized number of private alleles per population (\pm standard deviation). H_o = observed heterozygosity. H_e = expected heterozygosity. F_{IS} = inbreeding coefficient. Bold F_{IS} values are significant probability estimates (values in parentheses correspond to F_{IS} values after null-allele correction).

Locality	Cape Palos	Minorca	Columbretes Islands	Tarragona
N_a	4.4 (1.4)	5.1 (1.3)	5.2 (1.3)	3.7 (0.94)
$N_a(24)$	4.3 (3.6)	3.9 (2.8)	3.9 (2.8)	3.2 (2.3)
$P_{(24)}$	0.7 (0.9)	0.4 (0.4)	0.8 (1.3)	0.1 (0.2)
H_o	0.46	0.48	0.38	0.35
H_e	0.44	0.48	0.40	0.40
Ng/N	1	0.95	0.96	0.93
F_{IS}	-0.041	-0.017 (-0.050)	0.046 (0.027)	0.120 (0.050)

Table 4. Percentage of related pair-wise individuals. PO= parent-offspring relation; FS= full siblings; HS= half siblings; U= unrelated

	PO	FS	HS	U
Cape Palos	11.5	1.3	3.8	83.3
Minorca	3.15	8.4	7.1	81.4
Columbretes Islands	2.1	2.6	10.8	84.4
Tarragona	4.13	4.8	12.2	78.9

The individual pairwise comparisons done in the relatedness maximum likelihood analysis, revealed parent-offspring relations in 2.1% (Columbretes Islands) to 11.5% (Cape Palos) of the individuals examined; full-siblings relations in 1.3% (Cape Palos) to 8.4% (Minorca), and half-siblings relations in 3.8% (Cape Palos) to 12.2% (Tarragona). The average proportion of unrelated individuals was $82.0 \pm 2.4\%$ paired individuals (Table 4). Care has to be taken as the analysis also considers clone colonies as full-sibling related.

In the experiment done in Minorca (“bank” colonies sampled twice), samples from 4 colonies were considered as full-sibling and 2 as unrelated. Still, none of the genotypes from the two polyps analyzed at each colony matched, therefore showing the possibility of the presence of genetically different individuals in the same colony (i.e. chimerism).

Population genetic structure and connectivity

The Bayesian clustering analysis detected the highest likelihood for the model with $K=4$. Nevertheless, the modal value of ΔK (Evanno et al. 2005) was shown at $K=3$, showing the existence of three possible populations but with very similar allele frequencies. Still, after running the software BPAS5, under the same K values conditions, the highest posterior probability (0.92) was found for a K value of 1.

Pairwise F_{ST} values (Table 5) ranged from 0.009 (Cape Palos-Tarragona) to 0.040 (Minorca-Columbretes). After correction for null alleles, no significant differences between pairwise F_{ST} values and pairwise F_{ST} values corrected for null alleles were observed (T-test, $P=0.560$). Therefore, it is possible to assume that the presence of null alleles did not affect the analyses. Pairwise D_{est} values

Table 5. Pairwise F_{ST} (lower left) and D_{est} (upper right) values. Significant values after step-down Bonferroni correction are highlighted in bold.

	Cape Palos	Minorca	Columbretes Islands	Tarragona
Cape Palos		0.025	0.054	0.037
Minorca	0.014		0.073	0.064
Columbretes Islands	0.023	0.040		0.038
Tarragona	0.009	0.019	0.024	

ranged from 0.025 (Minorca-Cape Palos) to 0.073 (Minorca-Columbretes) (Table 5). Population pairwise F_{ST} estimates were lower than D_{est} . In both cases, only F_{ST} or D_{est} pairwise calculations between Cape Palos-Tarragona and Cape Palos-Minorca were not statistically significant ($P>0.05$). The other comparisons showed slight but significant values. The highest F_{ST} values were found in relation to pairwise comparisons concerning Columbretes Islands and the other localities.

Both isolation by distance models, Slatkin and Rousset respectively, did not show any significant relations between genetic and geographic distances: ($F_{ST}/(1-F_{ST})=0.025-0.037*\log(\text{dist})$; $R^2=0.20$, $P=0.80$); $\log(M)=1.15-5.21\log(\text{dist})$; $R^2=0.15$; $P=0.82$). When considering D_{est} estimates, the Mantel test analysis showed a similar pattern: there was no significant correlation ($R^2=0.17$, $P>0.05$) among all the sampled localities.

Asymmetric gene flow was found among all the populations. The maximum likelihood approach estimated a number of successful migrants (N_m) among localities was on a range of 15.37 (Columbretes Island-Cape Palos) to 5.04 (Cape Palos-Tarragona) (Table 6).

Table 6. Gene flow estimates among localities, based on maximum likelihood approach of successful reproducing migrants per generation (N_m). Rows and columns are source and receiving populations respectively.

Place of origin (N_m)	Destination			
	Cape Palos	Minorca	Columbretes Islands	Tarragona
Cape Palos		9.18	10.60	5.04
Minorca	14.32		8.98	7.01
Columbretes Islands	15.37	6.50		4.78
Tarragona	15.16	10.93	7.25	

Discussion

With the analysis of 10 microsatellite markers, we show that *Cladocora caespitosa* forms a homogenous unit along the NW Mediterranean. Just Tarragona showed significant deficits of heterozygotes, by means of a statistically significant F_{IS} values. Null alleles are one of the main features affecting this (Brookfield 1996), and so it was found after correction for null alleles. Linkage disequilibrium (LD) was found among several loci, but only in the localities of Tarragona and Minorca. Biological processes that can cause this LD include population differentiation and isolation by distance, asexual reproduction and natural selection (Agapow & Burt 2001). Among these traits, the most plausible explanation for the relatively high degree of linkage disequilibrium found is the evidence of asexual reproduction in

both localities, which were the ones with smaller values of Ng/N (0.93 and 0.98 respectively). These values suggest that asexual reproduction via fragmentation or asexually produced larvae, even though showed in low proportions, could not be discarded, as it was shown by studies done with allozyme markers by Dai et al. (2000, *Mycedium elephantotus*), Nishiwaka (2005, for *Goniastrea aspera*), that found mean values for Ng/N of 0.98 and 0.94, respectively, and with the use of microsatellite markers (Nakajima et al. 2010, *Acropora digitifera*) that, found mean values of 0.99. By contrast, populations dominated by asexual reproduction (i.e., fragmentation or larvae of asexual origin) generally have low ratios for the number of multilocus genotypes to the number of individuals (Ng/N). For example, Stoddart (1984, *Pocillopora damicornis*) and Ayre & Willis (1988, *Pavona cactus*) found with the use of allozymes values for Ng/N of 0.40 and 0.27 respectively, concluding both studies that these low ratios are typical of coral populations dominated by asexual recruitment.

As is the case of other broadcast spawner corals, after fertilization, embryos are developed in the water column sensitive to waves and surface currents. A recent study done by Heyward & Negri (2012), which recorded, under laboratory conditions, fragmentation of embryos of the families Acroporidae, Faviidae, Mussidae, Fungidae and Oculiniidae, showed the presence of asexual planulae produced by fragmentation of the embryos during the ontogenesis process in the water column. Moreover, the phenomenon of polyp expulsion was observed in *C. caespitosa* (Kruzic 2007) that could also lead to the production of colony clones.

C. caespitosa is a modular and long-lived organism (Periano et al. 1999; Kruzic & Pozar-Domac 2003), able to form extensive banks in some localities. In the case of the six colonies sampled twice from Minorca, any of the examined pairs showed the same genotype therefore being possible that the banks of *C. caespitosa* are formed by different individuals, suggesting that the possibility of chimerism exists. Chimeras are organisms containing tissues or cells of two or more genetically distinct individuals which typically arise through fusion (Rinkevich & Weissman 1987). In some coral species, gregarious settlement of larvae and attachment to larvae to an original adult colony produce chimeras that result in colonies composed of different genotypes (Harrison 2011). Specifically, fusion provides a mechanism for increasing size more rapidly than growth alone (Raymundo & Maypa 2004), and could thus increase chances of survival for species where survivorship is size dependent (Jackson 1986). This phenomenon is common on reef builder species such as *Acropora palmata* (Baums 2005) and *Acropora millepora* (Puill-Stephan et al. 2009), even in tunicates such as *Botryllus schlosseri* (Ben-Shlomo et al. 2008). Nevertheless, we have just contributed to a preliminary approach to this mode of modular growth, as samples are scarce and therein a more intensive sampling has to be done.

Superficial currents and mesoscale eddies in the Balearic Sea, may contribute to the almost homogeneous genetic structure found in *C. caespitosa*. The Balearic

front (BF) is a shelf/slope produced by thermohaline differences between three water masses in the Balearic Sea. It has been showed to act as a barrier to gene flow between the Balearic Islands and the Iberian Peninsula coasts, for several fish species (Galarza et al. 2009), as well as for the gorgonians *Paramuricea clavata* (Mokhtar-Jamaï et al. 2011) and *Corallium rubrum* (Ledoux et al. 2010). Given the small but significant F_{ST} values found between Tarragona and Minorca (on the western and eastern side of the BF, respectively), that front may only act as a weak and directional barrier among those localities, since a relatively high number of migrants per generation (N_m) were found from Tarragona to Minorca ($N_m=10.93$) and a slight lower number from Minorca to Tarragona ($N_m=7.01$). This could be also explained because of the secondary upwards flow direction of the northern current when reaching the Balearic Islands. Downwards the Iberian Peninsula, another barrier to gene flow has been cited for some species: the Ibiza channel (IC) has been identified as a strong barrier for the brooder gorgonian *Paramuricea clavata* dispersal in synergy with the BF (Mokhtar-Jamaï et al. 2011). Nevertheless, in the fish *Serranus cabrilla*, IC acts as a directional barrier as gene flow was regarded from north to south and from the southern localities of this channel towards the Balearic Islands (Schunter et al. 2011). This barrier does not seem to greatly affect gene flow of *C. caespitosa*, as even if the highest N_m was observed from the northern to the southern populations, an average of 8.3 ± 2.9 migrants per generation was found between the southern locality (Cape Palos) to the other localities. Fact that could be explained due the Northern Current secondary branch that is formed after reaching the IC, allowing the water flow going upwards to the Balearic Islands. In any case, a certain restriction to gene flow is, in general, found from southern populations to the northern one, meaning that Tarragona populations always send more migrants to the other populations than its receives, just the contrary that occurs in Cape Palos population. Thus the currents seems to play a greater role that the barriers above mentioned.

Another fact to take into account is the reproductive timing of the species. The currents we are relating with the possible larval dispersal change over seasons, and thus, their effect. In the Adriatic coasts *C. caespitosa* has been observed to spawn at the end of June, when seawater reaches its maximum temperature. Southwards gene flow of *Paramuricea clavata* (Mokhtar-Jamaï et al. 2011) is reduced due the seasonal behavior of the Northern Current flow, as this species reproduces between June and July. During this season is evident the formation of an anticyclonic gyre that causes the deviation of the Northern Current to the Balearic Sea, impeding water flow from crossing the Ibiza channel. From the results we have gotten, southwards gene flow is not impeded in *C. caespitosa*, or at least it higher than northwards, that could suggest a different reproductive timing of the species, as has been regarded in other reef former species (e.g. Glynn et al. 2008; Putron and Rylan 2009). Besides, studies on planulae abilities for dispersal are poor, but would be of interest in order to better understand the processes underlying

its populations dynamics, structure and connectivity. The data shown a sort of homogeneous metapopulation in the area of study and thus, the corresponding management policies could propose a unique MPA to conserve *C. caespitosa* gene pool. However, ignoring or misunderstanding the factors that can be involved in such genetic structure, may lead to ineffective or even damaging measures of conservation.

Acknowledgements

We want to acknowledge to DK Kersting, J Fayos, E Serrano and A. Addamo for their help either in the field or with samples collection. MH Nielsen for help on data analysis. P. Casado-Amezua was funded by a grant from the Spanish Research Council (CSIC). This study was supported by the Autonomous Organism of National Parks (Spanish Ministry of Environment) and project CTM2008-00496/MAR from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

References

- Agapow PM, Burt A (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 101-102.
- Aguirre J, Jiménez AP (1998) Fossil analogues of present-day *Cladocora caespitosa* coral banks: sedimentary setting, dwelling community, and taphonomy (Late Pliocene, W Mediterranean). *Coral Reefs*, **17**, 203-213.
- Antao T, Lopes A, Lopes RJ, Beja-Pereira A, Luikart G (2008) LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on an Fst-outlier method. *BMC Bioinformatics*, **9**, 323-327.
- Augier H (1982) *Inventory and classification of marine biocoenoses of the Mediterranean*. Council of Europe, Nature and Environment Series, 25, Strasbourg, 58 pp.
- Ayre DJ, Willis BL (1988) Population structure in the coral *Pavona cactus*: clonal genotypes show little phenotypic plasticity. *Marine Biology*, **99**, 495-505.
- Baums IB, Miller MW, Hellberg ME (2005) Regionally isolated populations of an imperiled Caribbean coral, *Acropora palmata*. *Molecular Ecology*, **14**, 1377-1390
- Bernasconi MP, Corselli C, Carobene L (1997) A bank of the scleractinian coral *Cladocora caespitosa* in the Pleistocene of the Crati Valley (Calabria, Southern Italy): growth versus environmental conditions. *Bolletino della Società Paleontologica Italiana*, **36**, 53-61.
- Beaumont MA, Nichols RA (2011) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Sciences*, **263**, 1619-1626.
- Beerli P, Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in *n* subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, **98**, 4563-4568.

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, *Logiciel sous windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Ben-Shlomo R, Motro U, Paz G, Rinkevich B (2008) Pattern of settlement and natural chimerism in the colonial urochordate *Botryllus schlosseri*. *Genetica*, **132**, 51–58.
- Brookfield JFY (1996) A simple method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, **5**, 453–455.
- Caley MJ, Carr MH, Hixon MA, Hughes TP, Jones GP, Menge BA (1996) Recruitment and the local dynamics of open marine populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **27**, 477–500
- Cantin NE, Cohen AL, Karnauskas KB, Tarrant AM, McCorkle DC (2010) Ocean warming slows coral growth in the central Red Sea. *Science*, **329**, 322–325
- Casado C (2011). Estudio de a reproducción del coral Mediterráneo *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia). Tesis fin de máster. Universidad de Barcelona, 34 pp.
- Casado-Amezúa P, García-Jiménez R, Kersting DK, Coffroth MA, Merino P, Acevedo I, Machordom A (2011). Development of microsatellite markers as a molecular tool for conservation studies of the Mediterranean reef-builder coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia). *Journal of Heredity*, **5**, 622–626.
- Chapuis M, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 621–631.
- Cofroth MA, Lasker H (1998) Population structure of a clonal gorgonian coral: the interplay between clonal reproduction and disturbance. *Evolution*, **52**, 379–393.
- Corander JP, Waldman P, Sillanpa MJ (2003). Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, **163**, 367–374.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001–2014.
- Dai CF, Fan TY, Yu JK (2000) Reproductive isolation and genetic differentiation of a scleractinian coral *Mycedium elephantotus*. *Marine Ecology Progress Series*, **201**, 179–187.
- Earl DA, vonHoldt BM (2011) STRUCTURE HARVESTER: a web site and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resources*. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Excoffier L, Estoup A, Cornuet JM (2005) Bayesian analysis of an admixture model with mutations and arbitrarily linked markers. *Genetics*, **169**, 1727–1738.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611–2620.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using

- multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567-1587.
- Fernández V, Dietrich DE, Haney RL, Tintoré J (2005) Mesoscale, seasonal and interannual variability in the Mediterranean Sea using a numerical ocean model. *Progress in Oceanography*, **66**, 321-340.
- Fine M, Zibrowius H, Loya Y (2001) *Oculina patagonica*: a non-lessepsian scleractinian coral invading the Mediterranean Sea. *Mar Biol*, 138:1195-1203.
- Fornós JJ, Barón A, Pons GX (1996) Arrecifes de coral hermatípicos (*Cladocora caespitosa*) en el relleno Holoceno de la zona de Es Grau (Menorca, Mediterráneo Occidental). *Geogaceta*, **20**, 303-306.
- Gerlach G, Jueterbock A, Kraemer P, Deppermann J and Harmand P (2010) Calculations of population differentiation based on G_{st} and D : forget G_{st} but not all of statistics! *Molecular Ecology*, **19**, 3845-3852.
- Galarza JA, Carreras-Carbonell J, Macpherson E *et al.* (2009). The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 1473-1478.
- Garrabou J, Coma R, Bensoussan N, Bally M, Chevaldonné P, Cigliano M *et al.* (2009). Mass mortality in North-western Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Global Change Biology*, **15**, 1090-1103.
- Harrison PL, Wallace CC (1990) Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. In: *Ecosystems of the World: Coral Reefs* (Dubinsky Z, Ed). Elsevier Science. Pp 133-207.
- Hellberg ME (2009) Gene flow and isolation among populations of marine animals. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **40**, 291-310.
- Heyward AJ, Negri AP (2012) Turbulence, cleavage and the naked embryo: a case for coral clones. *Science*, **335**, 1064
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hoten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E *et al.* (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and Freshwater Research*, **50**, 839-866.
- Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, **6**, 65-70.
- Hood GM (2010) PopTools version 3.2.5. Available on the internet. URL <http://www.poptools.org>
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, **6**, 13. V3.21. <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Jackson JBC (1986) Modes of dispersal of clonal benthic invertebrates: consequences for species distributions and genetic structure of local populations. *Bulletin of Marine Science*, **39**, 588-606.
- Kalinowsky ST (2005) HP-RARE: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 539-543.
- Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular*

Ecology Notes, **6**, 576–579.

- Kersting DK, Linares C (2012) *Cladocora caespitosa* bioconstructions in the Columbretes Islands Marine Reserve (Spain, NW Mediterranean): distribution, size structure and growth. *Marine Ecology*, doi:10.1111/j.1439-0485.2011.00508.x
- Kimura M, Weiss G (1964) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, **49**, 561-576.
- Kruzic P (2007). Polyp expulsion of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in extreme sea temperature conditions. *Natura Croatica*, **16**, 211-214.
- Kruzic P, Zuljevic A, Nokolic V (2008). Spawning of the colonial coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Southern Adriatic Sea. *Coral Reefs*, **27**, 337-341.
- Kruzic P, Benkovic L (2008). Bioconstructional features of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Adriatic Sea (Croatia). *Marine Ecology*, **29**, 125 -139.
- Laborel J (1961) Sur un cas particulier de concrétionnement animal: concrétionnement à *Cladocora caespitosa* dans le Golfe de Talante. *Rapports et Procès Verbaux des Réunions de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, **16(2)**, 430-432.
- Ledoux J, Mokhtar-Jamäi K, Roby C, Feral JP, Garrabou J, Aurelle D (2010) Genetic survey of shallow populations of the Mediterranean red coral *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758): new insights into evolutionary processes shaping nuclear diversity and implications for conservation. *Molecular Ecology*, **19**, 675–690
- Lo Brutto S, Arculeo M, Stewart Grant W (2011) Climate change and population genetic structure of marine species. *Chemistry and Ecology*, **27**, 107-119.
- López-González PJ (1993) *Taxonomía y zoogeografía de los antozoos del estrecho de Gibraltar y áreas próximas*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 568 pp.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews*, **4**, 981-994.
- Magalon H, Adjeroud M, Veuille M (2005) Patterns of genetic variation do not correlate with geographical distance in the reef-building coral *Pocillopora meandrina* in the South Pacific. *Molecular Ecology*, **14**, 1861–1868
- Marshall J, Monro K, Bode M, Keough MJ, Swearer (2011) Phenotype-environment mismatches reduce connectivity in the sea. *Ecology Letters*, **13**, 128-140.
- Mokhtar-Jamäi K, Pascual M, Ledoux JB, Coma R, Feral JP, Garrabou J et al. (2011) From global to local genetic structuring in the red gorgonian *Paramunicea clavata*: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Molecular Ecology*, **20**, 3291-3305.
- Monserrat S, López-Jurado J, Marcos M (2008) A mesoscale index to describe the regional circulation around the Balearic Islands. *Journal of Marine Systems*, **71**, 413–420.

- Morri C, Peirano A, Bianchi NC (2001). Is the Mediterranean coral *Cladocora caespitosa* an indicator of climatic change? *Archivio Di Oceanografia e Limnologia*, **22**, 139-144.
- Moreno D, Barrajon A, Gordillo I, López-González PJ (2008a). *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767). Pp. 256-262 en: Barea- Azcón JM, Ballesteros-Duperón E, Moreno D (eds). *Libro Rojo de los Invertebrados de Andalucía*. 4 Tomos. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Nakajima Y, Nishikawa A, Isomura N, Iguchi A, Sakai K (2009) Genetic connectivity of the broadcast-spawning coral *Acropora digitifera* analyzed by microsatellite markers in the Sekisei Reef, southwestern Japan. *Zoological Science*, **26**, 209–215
- Nakajima Y, Nishiwaka A, Iguchi A, Sakai K (2010) Gene flow and genetic diversity of a broadcast- spawning coral in northern peripheral populations. *PLoS ONE*, **5**, e11149.
- Nishiwaka A, Sakai K (2005) Genetic connectivity of the scleractinian coral *Goniastrea aspera* around the Okinawa Islands, *Coral Reefs*, **24**, 318-323.
- Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, **13**, 146-158.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENEALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295.
- Peirano A, Morri C, Bianchi CN (1999) Skeleton growth and density patterns of the temperature, zooxanthellate scleractinian *Cladocora caespitosa* from the Ligurian Sea (NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*, **185**, 195-201.
- Pineda J, Hare JA, Sponaugle SU (2007) Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography*, **20**, 22-39.
- Pinot JM, Lopez-Jurado JL, Riera M (2002) The CANALES experiment (1996-1998). Interannual seasonal and mesoscale variability of the circulation in the Balearic Channels. *Progress in Oceanography*, **55**, 335-370.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502–503.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Pritchard J, Wen W (2004) Documentation for structure software: version 2. Department of Human Genetics, University of Chicago, Chicago.
- Puill-Stephan E, Willis BL, van Herwerden L, van Oppen JH (2009) Chimerism in wild adult populations of the broadcast spawning coral *Acropora millepora* on the Great Barrier Reef. *PLoS ONE*, **4**, e7751.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Raymundo LJ, Maypa AP (2004) Getting bigger faster: mediation of size-specific mortality via fusion in juvenile coral transplants. *Ecological Applications*, **14**, 281–295.

- Rinkevich B, Weissman IL (1987) Chimeras in colonial invertebrates: a synergistic symbiosis or somatic- and germ-cell parasitism? *Symbiosis*, **4**, 117-134.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219-1228.
- Rozenfeld AF, Arnaud-Haond S, Hernández-García E, Eguiluz VM, Serrão EA, Duarte CM (2008) Network analysis identifies weak and strong links in a metapopulation system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 18824-18829.
- Schunter C, Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Tintore J, Vidal-Vijande E, et al. (2011) Matching genetics with oceanography: directional gene flow in a Mediterranean fish species. *Molecular Ecology*, **20**, 5167-5181.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry*, 2nd edition. New York: WH Freeman.
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*, **47**, 264-279.
- Stoddart JA (1984) Genetic structure within populations of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, **81**, 19-30
- van Oppen MJH, Lutz A, Death G, Peplow L, Kininmonth S (2008) Genetic traces of recent long-distance dispersal in a predominantly self-recruiting coral. *PLoS ONE* **3**: e3401
- VanOosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Weersing K, Toonen RJ (2009) Population genetics, larval dispersal and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, **393**, 1-12.
- Zibrowius H (1980) Les scleractiniaires de la Méditerranée et de l'Atlantique nord-oriental. *Mémoires de l'Institut Océanographique*. Pp 1-284.

Discusión general

La presente memoria de tesis se centra en el estudio de procesos recientes que subyacen a la estructura poblacional y conectividad de dos corales endémicos del mar Mediterráneo, el coral naranja *Astroides calycularis* (Pallas, 1766) y la madrepora mediterránea *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767). Estos procesos están generalmente ligados a diferentes características biológicas de las especies, tales como la densidad y distribución de las poblaciones, la fecundidad, el éxito reproductor, el tipo de desarrollo larvario, la capacidad de dispersión en cualquier etapa de su existencia, las variaciones demográficas y su interacción con otros factores bióticos y abióticos. Los corales tienen un ciclo de vida relativamente sencillo, que consiste en una fase predominante de pólipo y una fase larvaria más corta, denominada larva plánula. Por lo general, este estadio es difícil de estudiar por medio de metodologías de seguimiento activo y no hay datos disponibles acerca de la duración de la fase larval (PLD, por sus siglas en inglés). De todas formas, aunque se dispusiera de datos, un estudio reciente (Weersing & Toonen 2009) concluye que la PLD en el medio marino no siempre es buena predictora de la escala a la que las poblaciones se diferencian, ya que las larvas no son simples objetos pasivos, sino que su comportamiento interacciona con otros factores físicos (e.g. corrientes y barreras oceanográficas) y su asentamiento se puede ver afectado por la competencia por el hábitat con otras especies (Pineda et al. 2007; Marshall et al. 2010), o por otros factores. Así pues, los marcadores moleculares son de gran utilidad para la estimación indirecta del flujo génico y la estructura poblacional, y por tanto, del alcance de la conectividad entre poblaciones de estos corales (Cowen & Sponaugle 2009).

La larva plánula de los corales se forma generalmente como consecuencia de eventos de reproducción sexual, a pesar de la existencia de casos de producción asexual de larvas, que normalmente involucra la incubación de éstas (e.g. Ayre & Resing 1986; Lam 2000; Ayre & Miller 2004). Se han descrito cuatro patrones básicos de reproducción sexual en corales escleractinios: hermafroditas con fecundación externa, hermafroditas con fecundación interna (incubadores), gonocóricos con fecundación externa y gonocóricos con fecundación interna. A pesar de que los datos disponibles sugieren que los patrones de reproducción sexual son generalmente constantes en la mayoría de los corales (Harrison 2011), a nivel intraespecífico se han descrito cambios en la condición sexual y desarrollo larvario de ciertas especies. Tal es el caso del coral *Stylophora pistillata*, en el cual se ha observado protandria unidireccional relacionada con el tamaño y edad de las colonias (Rinkevich & Loya 1979). Además, algunos estudios llevados a cabo en corales de la familia Fungiidae, muestran un cambio bidireccional del sexo de éstas especies (Loya & Sakai 2008). Recientemente, el coral formador de arrecifes *Diploastrea heliophora*, inicialmente clasificado como gonocórico en la Gran Barrera

de Coral (Guest et al. 2005), se ha señalado como hermafrodita a nivel de pólipo en Singapur, mostrando simultáneamente gametos masculinos o femeninos (Guest et al. 2012). Incluso, algunos corales tienen diferentes patrones de fecundación (externa y/o interna) en función de la región geográfica. Por ejemplo, *Pocillopora verrucosa* se ha caracterizado como coral incubador en el mar de las Filipinas (Stimson 1978; Villanueva et al. 2008), mientras que en el océano Índico (Kruger & Schleyer 1998), Hawaii (Kinzie 1993) y el mar Rojo (Shlesinger et al. 1998) se ha descrito como coral con fecundación externa. Asimismo, *Caryophyllia smithii* se caracterizó como incubador en el golfo de León (Lacaze-Duthiers 1897) y en Inglaterra se definió como especie con fecundación externa (Tranter et al. 1982).

Para adquirir un mayor conocimiento de las características reproductoras que pudieran afectar al desarrollo de la plánula de *A. calycularis*, se llevó a cabo un estudio comparando el conocimiento actual sobre la reproducción del coral en el mar Tirreno con lo que sucede en el mar de Alborán (Capítulo I). Además, dado que se ha descrito la posibilidad de reproducción asexual en corales escleractinios (i.e. formación de organismos clónicos), se llevaron a cabo análisis de paternidad en los capítulos IV y VI, en los que se compararon los genotipos de los individuos colectados a fin de determinar si alguno de ellos así lo indicaba.

Comparación del periodo de maduración gonadal de Astroides calycularis entre dos localidades distantes.

La condición sexual y el patrón de fecundación de *A. calycularis*, fueron descritos por primera vez en las costas de Argelia por Lacaze-Duthiers (1873). Este autor, a partir de pólipos diseccionados y trabajando bajo la lupa, caracterizó al coral como hermafrodita a nivel de colonia, pero gonocórico a nivel de pólipo, con algunos casos de pólipos hermafroditas. Más recientemente, el ciclo de reproducción sexual de la especie ha sido estudiado en detalle por Goffredo et al. (2010, 2011) en una población al sur del mar Tirreno y utilizando técnicas histológicas. Estos autores caracterizaron al coral como gonocórico a nivel de pólipo y colonia. El capítulo I de la presente memoria, amplía el conocimiento actual acerca de la reproducción sexual de la especie comparando colonias tomadas durante los meses de primavera y verano (abril a septiembre) en una población del mar de Alborán. Este estudio se centró en la comparación del análisis histológico de los aspectos morfológicos y cuantitativos de la espermatogénesis y ovogénesis de esta especie entre ambas poblaciones.

En relación con la comparación de los aspectos cualitativos de la gametogénesis, en las localidades de los mares Tirreno y de Alborán, el coral se caracterizó como gonocórico y con fertilización interna (incubador). Esto contradice en parte el estudio llevado a cabo en 1873, que caracterizaba las colonias como hermafroditas. Aquí cabría destacar que estas diferencias podrían ser debidas a las distintas técnicas utilizadas, acorde con las épocas en las que los estudios se llevaron a cabo,

además de que no se detalla mucha información acerca de las colonias estudiadas a finales del siglo XIX. En lo que coinciden los tres estudios, a partir de observaciones llevadas a cabo *in situ*, es en que *A. calycularis* es una especie incubadora cuyas larvas se caracterizan por una flotabilidad negativa y comportamiento demersal, definiéndose como “plánulas reptantes”.

Tanto en ambos análisis histológicos llevados a cabo con anterioridad con material del Tirreno, como en los realizados en la presente memoria a partir de ejemplares del mar de Alborán, los embriones encontrados en el interior de pólipos hembra se caracterizaron por poseer un vitelo rico en vesículas, probablemente de naturaleza lipídica. La presencia de estas vesículas ha sido señalada por otros autores (Richmond & Hunter 1990, Vermeij et al. 2004), en corales de la familia Pocilloporidae, los cuales concluyen que posiblemente contribuyan a la energía disponible para la plánula, lo que podría contribuir a alargar la fase larvaria incrementando, por tanto, su capacidad de dispersión. Las observaciones llevadas a cabo en la presente tesis, así como el nivel de diferenciación genética que se encontró entre poblaciones descritas en el capítulo III, contradice esta hipótesis, ya que sugieren escasa capacidad de dispersión de la especie acorde con el comportamiento demersal de su plánula, que tiende a fijarse pronto en un lugar próximo al de su procedencia.

Por otra parte, se encontraron diferencias a la hora de comparar los aspectos cuantitativos de la reproducción de la especie entre la población del mar Tirreno y la de Alborán, con respecto a los meses de maduración de los gametos y consecuente fecundación y planulación. Acorde a las técnicas utilizadas y a los periodos estudiados, la población del mar de Alborán mostró un retraso de un mes en la maduración de los gametos con respecto a la población del Tirreno, lo que concuerda con un ligero retraso en el periodo en que se alcanza el máximo en la temperatura del agua durante el periodo estival entre ambas localidades. Cabe destacar que la localidad del mar de Alborán (Punta de la Mona, Granada) se ve influenciada por el afloramiento de aguas profundas (Cebrián & Ballesteros, 2004). Este fenómeno puede causar marcadas diferencias en la temperatura superficial del agua (SST, por sus siglas en inglés) y es más evidente, tal y como se ha observado con imágenes infrarrojas de satélites (La Violette 1984), a finales de la primavera-comienzos de verano, cuando el contraste térmico entre regiones es mayor. Además, este fenómeno es más pronunciado en la costa, debido a la presencia de fuertes vientos del oeste que transportan las aguas superficiales lejos del litoral (Sarhan et al. 2000).

Tradicionalmente, la SST se ha considerado como el factor ambiental más importante que controla el ciclo reproductor de los antozoos, ya que la época de liberación de los gametos se ha comprobado que la mayor parte de las veces se corresponde con el periodo en el que el agua alcanza el máximo anual (Harrison & Wallace 1990; Baird et al. 2009). Se ha observado que varias especies de corales escleractinios formadoras de arrecifes expulsan los gametos con una diferencia

de un mes en diferentes áreas geográficas, lo que se relaciona con diferencias en el incremento de la SST (Babcock et al. 1986). Específicamente, el papel de la SST como controlador del ciclo de reproducción sexual se ha documentado en corales del Pacífico con fecundación externa (e.g. Glynn et al. 2008; Putron & Rylan 2009) mostrando que, cuando otros parámetros abióticos parecen ser estables, el periodo de maduración de los gametos y fecundación corresponde con una respuesta específica de la especie a la variación latitudinal de la temperatura del agua. Sólo se ha descrito un estudio con la comparación geográfica de las características reproductoras de un coral escleractinio, *Oculina patagonica*, en el Mediterráneo (Fine & Loya 2001). Este estudio compara diferentes localidades en las costas de Israel, Francia y España, con diferentes medias de temperatura anual entre regiones. Concluye dicho estudio señalando una relación positiva entre la temperatura y el desarrollo gonadal en todas las regiones, un periodo de maduración de los gametos de mayo a agosto y la expulsión de éstos en septiembre, pero no demuestra ninguna diferencia en relación a las diferencias de temperaturas entre regiones. Por otro lado, un estudio que compara el ciclo de reproducción sexual entre dos poblaciones de las gorgonias incubadoras *Paramuricea clavata* y *Eunicella singularis*, concluye que, como es generalizado, el periodo de maduración gonadal y fecundación se alcanza en la primavera, pero demuestra la presencia de diferencias temporales en el periodo en que se alcanza el máximo de la SST entre ambas localidades, lo que se correlaciona con diferencias en el tiempo fecundación entre poblaciones de ambas especies (Gori et al. 2007). Otros factores descritos en la literatura como determinantes del momento de expulsión de los gametos son la actividad lunar y el fotoperiodo (Babcock 1994; Glynn et al. 2008). Estos factores son muy interesantes de estudiar, pero no se han llevado a cabo en la presente tesis, pues en *A. calycularis* se observó la presencia de plánulas durante un periodo extenso de tiempo (desde mediados de junio hasta mediados de julio) y no concentradas en unos pocos días. No obstante, sería necesarios estudios adicionales acerca de la reproducción de esta especie, no ya sólo a nivel intraespecífico, sino también en lo relativo al momento exacto de expulsión de los gametos masculinos.

Por otro lado, se observó una relación positiva entre la morfología de las colonias y la fecundidad. Esto se sugiere que es debido al mayor tamaño de los pólipos y a su densidad por colonia en la morfología masiva con respecto a la arbustiva, ya que no se encontraron diferencias significativas en cuanto al tamaño de las colonias, pese a su diferente morfología. Las colonias de *A. calycularis* que muestran una morfología masiva se caracterizaron por tener un número 6 veces mayor de ovocitos por área que las colonias con morfología arbustivas. Esto también se ha comprobado en gorgonias (Beiring & Lasker 2000; Tsounis et al. 2006). En general, se ha descrito que el tamaño de las colonias de los organismos modulares afecta al aporte de energía (Hall & Hughes 1996), sugiriendo que la inversión relativa en crecimiento decrece con el tamaño de la colonia, dejando un mayor aporte energético para la reproducción sexual (Goffredo & Lasker 2006). Éste es también

el caso de los corales formadores de arrecifes. Hall & Hughes (1996) encontraron, tras la comparación de diferentes corales de la Gran Barrera de Coral con distintos tamaños y formas a nivel intraespecífico, una relación positiva entre el tamaño de la colonia y la fecundidad.

Limitaciones en el uso de marcadores moleculares para las especies de antozoos: la necesidad de desarrollar marcadores hipervariables.

En el capítulo II de la presente memoria, se utilizaron marcadores nucleares y mitocondriales universales (ITS y COI) y métodos filogenéticos y de clados anidados (NCA) para caracterizar la estructura poblacional y conectividad de *A. calycularis*, a lo largo de doce localidades. En las localidades localizadas en el mar de Alborán, la región más occidental del área de distribución de la especie, se encontró cierta homogeneidad genética, mientras que al comparar estas localidades con las más lejanas, en la cuenca argelina y el mar Tirreno, se observó una ligera diferenciación genética con marcadores ITS.

Problemas asociados con el uso de COI e ITS a nivel intraespecífico se han documentado por Calderon et al. (2006), en el que ambos marcadores fallaron en la revelación de la estructura genética en cuatro gorgonias del Mediterráneo: *Eunicella cavolinii*, *Eunicella singularis*, *Paramuricea clavata* y *Corallium rubrum*. A la hora de estudiar la variación a nivel poblacional, se requieren marcadores relativamente variables, que aporten datos de diferenciación o aislamiento recientes. En la mayoría de las especies animales, el ADN mitocondrial resulta un marcador apropiado, no sólo por su característica de ser de 5 a 10 veces más variable que genes de copia única nucleares, pero además, por su tamaño, facilidad de aislamiento y número de réplicas por célula, su no recombinación y su herencia materna, se ha propiciado su estudio y así, la posibilidad de comparación de datos con muchos organismos (Avice 2004). A pesar de esto, el ADN mitocondrial de los antozoos se ha definido como altamente conservado (Hellberg 2006), posiblemente debido a la escasa capacidad de esta parte del genoma para la incorporación de mutaciones o a la reducción de la diversidad del genoma de estas especies a lo largo de la historia reciente (Huang et al. 2008). Estudios llevados a cabo con octocorales, explican que esta lenta evolución pudiera ser debida a la existencia del gen mtMSH, que podría afectar al sistema de reparación de esta parte del genoma, reduciendo el número de sustituciones (France & Hoover 2002). Por otra parte, en el genoma nuclear se han buscado regiones intergénicas o intrones (regiones que no están sometidas a selección) y se supone, por tanto, que pueden acumular más cambios para obtener, igualmente, un rango de variación que permita analizar diferencias entre taxones próximos o poblaciones de una misma especie. Principalmente, las regiones intergénicas ribosómicas (ITS) son buenas candidatas ya que se benefician de la conservación de ciertas partes de los genes ribosómicos para encontrar cebadores prácticamente universales. Pero por otro lado, en corales se ha comprobado que

estas regiones sufren de variación intraindividual (Wei et al. 2006), no siendo recomendable el uso en especies de este grupo y de cnidarios en general. Además, se ha comprobado que distintos taxones presentan tasas de variación para los ITS muy distintas, desde altamente variables a muy conservados, lo cual en ocasiones no permite recabar datos útiles.

Dada la necesidad de encontrar marcadores útiles para cubrir los objetivos de la presente tesis, se desarrollaron marcadores microsatélite para ambos corales. Los altos niveles de resolución de estos marcadores son de gran utilidad para estudios poblacionales y para dilucidar los procesos de dispersión y reclutamiento (Underwood et al. 2006). A partir del desarrollo de genotecas enriquecidas, se llegaron a aislar veintiséis secuencias microsatélite (cuatro secuencias de dinucleótidos, 6 de trinucleótidos y 3 de tetranucleótidos para *A. calycularis*, y dos secuencias de dinucleótidos, 10 de trinucleótidos y un hexanucleótido para *C. caespitosa*). Las repeticiones de di- y trinucleótidos son las más comúnmente encontradas en corales escleractinios (Wang et al. 2009; Tang et al. 2010). Otras repeticiones tales como tetra- o hexanucleótidos son más raras. López et al. (2010) aislaron por primera vez una secuencia con repeticiones de tetranucleótidos en *Montastrea franksi*; por otro lado, Miller & Howard (2004) encontraron un hexanucleótido en el genoma de *Goniastrea favulus*. A la hora de genotipar, fragmentos con repeticiones mayores que los dinucleótidos proveen de una mejor interpretación y asignación de alelos, así como una mejor detección de microvariantes (alelos cuyo tamaño difiera de una variante alélica comúnmente encontrada en un número de bases diferente a las del motivo de repetición, por ejemplo, una base de un microsatélite dinucleótido, 2 bases de un tri o un tetra, etc.).

Tras el análisis de tres poblaciones de *C. caespitosa* diferentes a la que se utilizó para aislar y caracterizar los marcadores microsatélite (la localidad de las Islas Columbretes), tres de estos marcadores fueron descartados ya que se encontraron características negativas. Así pues, en el capítulo VI se destaca que los loci Cc-L21, Cc-L30 y Cc-L38 fueron descartados del análisis, ya que Cc-L21 no amplificó en un elevado número de individuos de la localidad de Cabo Palos, Cc-L30 se mostró como monomórfico en las tres nuevas localidades, mientras que en Columbretes únicamente mostraba dos heterocigotos, y Cc-L38 presentó múltiples “picos” en los electroferogramas de origen desconocido, lo que dificultaba la asignación de alelos.

De esta forma, finalmente se han aportado 13 marcadores multivariados para *A. calycularis* y 10 para *C. caespitosa*, que han resultado de utilidad para el estudio intraespecífico de ambos corales escleractinios y que sin duda supondrán una herramienta fundamental para futuros estudios poblacionales de estas especies y de otras próximas.

La amplificación cruzada es una práctica habitual cuando se trabaja con microsatélites, ya que son marcadores que se ha demostrado que están bien conservados entre linajes próximos (Pinera et al. 2006). A pesar de que en corales escleractinios las amplificaciones cruzadas se han considerado sólo entre géneros de la misma familia (Ridgway & Gates 2006). La mayoría de los cebadores diseñados para *A. calycularis*, amplificaron en cuatro individuos de diferentes especies del género *Tubastrea*, el cual se considera como filogenéticamente más cercano al género *As-troides* en la filogenia de la familia Dendrophylliidae. Y siete de los cebadores diseñados para *C. caespitosa* amplificaron en *Oculina patagonica*, perteneciente a la familia Oculiniidae. Las relaciones filogenéticas de *C. caespitosa* son dudosas, ya que se incluyó inicialmente en la familia Faviidae (Veron & Stafford-Smith 2000) pero estudios moleculares recientes incluyen a este coral en la familia Caryophylliidae y a otra especie del género *Cladocora*, *C. arbuscula* previamente también descrita como perteneciente a la familia Faviidae, como perteneciente a la familia Oculinidae. La amplificación de marcadores desarrollados para *C. caespitosa* en *O. patagonica*, sugiere, que ambas especies son filogenéticamente cercanas, pudiendo ser que *C. caespitosa* también se incluya en la familia Oculinidae. Un trabajo más completo con caracteres moleculares y morfológicos permitiría esclarecer estas relaciones filogenéticas.

Corales hermatípicos, ¡hay que tener cuidado al aislar el ADN de los tejidos!

En el caso de *C. caespitosa*, una de las limitaciones a la hora de desarrollar secuencias microsatélite es la presencia de zooxantelas (dinoflagelados del género *Symbiodinium*) simbioses en el tejido de estas especies, por lo que es preciso poder identificar el AND que pertenece al coral y el correspondiente al simbiote. Estos simbioses se dividen en varios clados (A a H) en base a datos obtenidos a partir de diferentes herramientas moleculares (ITS, rRNA, electroforesis de gel gradiente desnaturalizado-DGGE por sus siglas en inglés- etc.). En especies de antozoos del Mediterráneo se ha caracterizado mayoritariamente un clado de este género, el clado "Templado A", y tan sólo una especie de anémona se ha señalado como hospedadora de un clado diferente, el "clado B"; *Buneodopsis strumosa*, especie que posiblemente sea de origen tropical (Visram et al. 2006). El coral escleractinio *C. caespitosa* también fue incluido en el estudio llevado a cabo por Visram et al. (2006), y paralelamente a la realización de la presente tesis se comprobó la identificación de su simbiote en la localidad de las Islas Columbretes (Apéndice II), coincidiendo ambos estudios con que el clado que hospeda esta especie es el "Templado A".

Para el aislamiento de los microsatélites de *C. caespitosa*, se partió de ADN de un fragmento de colonia naturalmente blanqueado, encontrado en la localidad de las islas Columbretes volteado y vivo, posiblemente por la reciente ruptura de esta fracción de colonia y posterior encajamiento entre otras colonias y rocas del fondo, lo que provocaría una expulsión natural de las zooxantelas por parte

del tejido de este fragmento de colonia, pero sin llegar a provocar la muerte de la misma. En un primer paso, la ausencia de simbiontes en el tejido del coral se confirmó mediante amplificación negativa de un cebador interno del gen psbA de *Symbiodinium* (Barbrock et al. 2006) y la secuencia parcial del marcador nuclear 28S ARNr (Zardoya et al. 1995). En una segunda etapa, tras el aislamiento de las secuencias microsatélite y diseño de los correspondientes cebadores, para confirmar el origen de cada locus (es decir, coral o zooxantelas), se obtuvo ADN de zooxantelas mediante la técnica de los controles degradados (Shearer et al. 2005), que permite separar las zooxantelas del tejido de coral. Los cebadores diseñados únicamente amplificaron en las fases correspondientes a ADN del coral, por lo que se confirmó con éxito que todos los marcadores aislados procedían del coral, y no del ADN de zooxantelas.

Reproducción asexual y quimerismo en Cladocora caespitosa.

Mediante análisis de parentesco, se comprobó la posibilidad y alcance de procesos de reproducción asexual en *A. calycularis* y *C. caespitosa*, justificándose la posibilidad de que los genotipos pertenecientes a los individuos colectados fueran idénticos (i.e. la existencia de individuos clónicos). En el caso de *A. calycularis*, ninguno de los individuos estudiados se registraron como clones, por lo tanto, sería posible descartar la posibilidad de producción asexual de plánulas. Por otro lado, algunos de los individuos colectados de *C. caespitosa* mostraron genotipos idénticos en tres de las cuatro poblaciones estudiadas. Esto se apunta también por el alto porcentaje de marcadores ligados observados en dos de las poblaciones en los que los índices de clonalidad dieron un menor ratio de genotipos únicos entre el total de individuos genotipados. Estos clones podrían ser producidos a partir del fenómeno descrito por Kruzic (2008) como “expulsión de pólipos” por parte de colonias de la especie, o por fragmentación de los embriones en la columna de agua durante el desarrollo larvario tal y como ha descrito un estudio reciente (Heyward & Negri 2012).

Por otra parte, la posibilidad de la presencia de colonias quimera en *C. caespitosa* se analizó en el capítulo VI, tomando dos pólipos en distintas colonias de “bancos” de este coral (colonias de 0,4 - 1 m de diámetro máximo) de la localidad de Menorca. A partir del análisis de los genotipos de estas colonias (i.e. si eran idénticos o no) se demostró que en ninguno de los casos los pólipos colectados mostraban genotipos idénticos. En el caso de organismo modulares, como es el caso de este coral colonial considerado como el único coral formador de arrecifes monoespecíficos en el Mediterráneo, las quimeras están constituidas por dos o más individuos de orígenes diferentes y suelen surgir a través de la fusión física del esqueleto de carbonato cálcico de ambos individuos (Rinkevich & Weissman, 1987). Este fenómeno es común en corales formadores de arrecifes, como *Acropora palmata* (Baums et al. 2005) y *Acropora millepora* (Puill-Stephan et al. 2009). Estas

colonias podrían ser constituidas a partir del asentamiento de plánulas en colonias adultas o por la fusión inicial de dos colonias cuyas plánulas (de origen sexual o asexual) se asentaron. En concreto, esta fusión proporciona un mecanismo para un incremento de tamaño más rápido de estos organismos modulares (Raymundo & Maypa 2004), incrementando así las posibilidades de supervivencia (Jackson 1986). En este capítulo se contribuye con una primera aproximación a esta modalidad de crecimiento modular, ya que las muestras son escasas y se necesitaría un muestreo más intensivo para poder esclarecer el número de individuos participantes en la formación de estas quimeras, así como el origen de las mismas. En el Mediterráneo, se han descrito únicamente 10 localidades donde *C. caespitosa* se ha visto como formadora de arrecifes. Por tanto, un estudio más detallado del alcance de este fenómeno, así como la identificación de cuantos individuos contribuyen a estas quimeras y su origen podría ayudar a obtener una mayor información de ésta especie tan emblemática del Mediterráneo.

Dos corales escleractinios con diferentes potenciales de dispersión

El grado de diferenciación genética y la conectividad entre las poblaciones de antozoos puede variar entre especies en función del potencial de dispersión de las plánulas, el cual viene principalmente determinado por el modo de reproducción sexual (i.e. fecundación interna -incubación- vs. fecundación externa) (Harrison & Wallace 1990; Nishiwaka et al. 2005). *A. calycularis* y *C. caespitosa* son representativos de estos dos modos de reproducción.

En el caso de corales con fecundación externa, se ha comprobado que las plánulas, liberadas una vez han completado la ontogénesis, tienen baja capacidad de dispersión y que generalmente se asientan en el sustrato en unas pocas horas. Esto es acorde con la hipótesis general de que este sistema de reproducción es más probable que determine un flujo génico restringido y en consecuencia una heterogeneidad genética entre poblaciones (Carlson 1999). Las plánulas originadas a partir de procesos de fecundación externa, requieren un promedio de 5 días después de la liberación de gametos para su desarrollo, pudiendo viajar largas distancias antes de asentarse (Harrison & Wallace 1990), lo que *a priori* implica una mayor conectividad entre poblaciones de la especie.

Incluso si las áreas elegidas para la comparación en ambas especies son diferentes, comparten dos potenciales barreras para el flujo génico: i) la distancia y ii) la presencia de barreras oceanográficas (en particular y principalmente, el frente Almería-Orán, el frente de Baleares y el canal de Ibiza). El frente Almería-Orán parece actuar como una barrera para el flujo génico de *A. calycularis*, en sinergia con su escasa capacidad de dispersión, mientras que las barreras oceanográficas caracterizadas en el Mediterráneo noroccidental no parece afectar a de manera sustancial la dispersión de *C. caespitosa*. El frente Balear podría actuar como una débil barrera direccional al flujo génico entre Tarragona y Menorca, pero también

se infirieron un alto número de migrantes en dirección Menorca-Tarragona, por lo que esto podría hacer pensar que es principalmente la direccionalidad de la corriente la que afecta la dispersión de las plánulas de la especie. Por otra parte el canal de Ibiza no supone barrera al flujo génico de la especie hacia el sur, habiéndose encontrado un alto número de migrantes entre las poblaciones situadas más al norte de esta barrera oceanográfica (Tarragona, Menorca e Islas Columbretes) y la localidad más sureña (Cabo Palos).

Para comparar el factor distancia geográfica, esta parte de la discusión se centra sólo en la escala regional del capítulo III, donde las distancias entre localidades analizadas son similares en ambos corales. La distancia entre las localidades de *A. calycularis* en el mar de Alborán es del rango de 18,5 a 471,7 km, mientras que las distancias entre localidades de *C. caespitosa* se encuentran en el rango de 90-367 km. En general, a escala regional, la estructura genética de *A. calycularis* tiende hacia un modelo de dispersión "paso a paso", en el que las poblaciones tienen mayor probabilidad de intercambiar individuos con las localidades adyacentes (Kimura & Weiss 1964; Kenchington et al. 2006), mientras que, en condiciones similares, entre poblaciones de *C. caespitosa* no se muestra un patrón de aislamiento por distancia. En el caso concreto de la comparación entre poblaciones alejadas la misma distancia, como Tarragona-Cabo Palos para *C. caespitosa* y Cabo Tres Forcas-Ceuta para *A. calycularis* (separadas por 360 km, respectivamente), se encontraron diferentes valores de F_{ST} . Mientras que entre Cabo Tres Forcas-Ceuta los valores de F_{ST} fueron 0,037 y estadísticamente significativos, entre Tarragona-Cabo Palos este valor fue de 0,009 y no significativo. Este ejemplo se centra en localidades situadas en la misma línea de costa, pero al comparar localidades en diferentes líneas de costas (por ejemplo, islas frente a continente), también se encontraron diferencias. Así es el caso de Cabo de Gata-Cueva de las Lapas (Isla de Alborán) cuya distancia es de 115,56 km, mientras que Tarragona-Islas Columbretes están separados por 90,17 kilómetros. En el primer caso, el valor de F_{ST} entre poblaciones de *A. calycularis*, fue 0,234, y altamente significativo, mientras que el valor de este parámetro entre las poblaciones de *C. caespitosa*, fue casi diez veces menor, 0,024 y ligeramente significativo.

Estudios similares disponibles en la literatura, pero en la misma región muestran resultados similares. En un estudio comparativo de genética de poblaciones de *Acropora tenuis* (fecundación externa) y *Stylophora pistillata* (fecundación interna) en el archipiélago de Ryukyu (Nishiwaka et al. 2005) encontraron que la dispersión a largas distancias de las plánulas era más probable en la especie con fecundación externa que en la especie con fecundación interna, con un número de migrantes por generación de 3,9 a 10,9 veces mayor en *A. tenuis* que en *S. pistillata*.

Aportaciones a la conservación de Astroides calycularis y Cladocora caespitosa

Uno de los principales objetivos de las AMP es el de preservar la diversidad genética, garantizando la variabilidad de las especies presentes en estas áreas, en especial de aquellas especies catalogadas como en peligro o amenazadas (Kelleher 1990). Recientemente, el diseño de las AMP se ha centrado en la necesidad de proteger el hábitat de especies de valor comercial, recreativo o por otras razones. Así, este estudio puede ayudar a obtener un mayor conocimiento sobre la ecología de otras especies amenazadas que no se hayan considerado antes, principalmente debido a su escaso conocimiento por parte de ciudadanos y gestores.

Un diseño activo de las reservas debe tener en cuenta la escala espacial de dispersión de las larvas (Underwood 2009). Por lo tanto, teniendo en cuenta la estructura genética encontrada en *A. calycularis*, se recomienda que los planes de gestión y conservación de esta especie se definan a escalas locales y regionales. Así, en el marco del debate actual sobre el diseño de la red áreas marinas protegidas (pocas y grandes versus muchas pequeñas, Halpern & Warner 2003), se sugiere que las AMPs deben considerar la conservación de esta especie a pequeña escala, y la creación de micro-reservas, por lo tanto, favoreciendo el auto-reclutamiento y permitiendo la dispersión a áreas no protegidas. Por otra parte, se debe tener en cuenta que la inestabilidad del hábitat (por ejemplo la existencia de vulcanismo o corrientes locales fuertes), o el grado de exposición del hábitat al hidrodinamismo y corrientes, al limitar el tamaño poblacional, están relacionados de forma positiva con la reducción de la heterocigosidad en la población y, por lo tanto, incrementan los procesos de endogamia.

Por otro lado, en el caso de *C. caespitosa*, se recomienda tener en consideración la escasa presencia de arrecifes mono-específicos de esta especie para su adecuada protección y la creación de redes de AMPs que permitan un adecuado flujo génico entre las mismas, teniendo en cuenta la posibilidad de reclutamiento de zonas no protegidas a partir de áreas protegidas de esta especie.

Los dos corales estudiados se encuentran actualmente en regresión, debido a causas climáticas, pero principalmente antropogénicas, bien sea directa o indirectamente causadas. *A. calycularis* ya cuenta con diferentes figuras de protección en diversas legislaciones nacionales e internacionales (ver introducción general), lo que está permitiendo un mayor acercamiento de la especie a gestores y entidades interesadas en la conservación, además de un incremento en el número de estudios acerca de la biología básica y la auto-ecología, así como a respuestas de este coral frente a ambientes cambiantes, estudios que son de gran utilidad a la hora de elaborar los planes adecuados de gestión activa de la especie para su conservación. Por otro lado, *C. caespitosa* se encuentra en regresión en todo el Mediterráneo, lo cual se demuestra por la abundancia de fósiles de grandes bancos en numerosas áreas, y numerosas observaciones a lo largo de su área de

distribución de la mortandad de la especie a nivel de pólipos aislados y a nivel de colonias enteras. Esto se supone que es debido al incremento actual que se está produciendo en la temperatura del agua y a episodios de calentamiento anormal de la temperatura superficial, sobre todo durante los meses estivales, como los registrados los veranos de 1999 y 2003 (Cerrano et al. 2000; Garrabou et al. 2009), y como consecuencia la reacción de las zooxantelas simbiotes de la especie, en sinergia con el incremento de organismos patógenos oportunistas (e.g. protozoos y hongos). Los conocimientos acerca de la biología básica y auto-ecología de este coral son escasos, tal y como indica la IUCN, por tanto, hacen falta mas estudios de esta especie con la finalidad de elaborar planes de gestión y manejo adecuados. Así pues, a nivel nacional y dadas la singularidad y creciente número de factores que están afectando a la regresión de esta especie, urge la necesidad de elaborar una propuesta al Comité Científico para el desarrollo del listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Nacional de Especies Amenazadas del Ministerio de Medio Ambiente a fin de incluir *C. caespitosa* en dicho, para llamar la atención sobre la necesidad de protección de este coral, para implementar las medidas necesarias para ello y con la finalidad de incentivar el conocimiento general de este coral endémico del Mediterráneo.

Estudios acerca de la estructura poblacional y conectividad en invertebrados marinos, son de gran utilidad a la hora de prever la respuesta de sus poblaciones antes perturbaciones externas e inestabilidades del ambiente. Éstas técnicas han sido principalmente aplicadas en el campo de las pesquerías, y es actualmente cuando está creciendo el número de trabajos que se centran en el estudio genético de especies de invertebrados clave para determinados ecosistemas marinos. Los dos corales objeto de estudio en esta tesis son organismos modulares, especies bioconstructoras que albergan gran diversidad de flora ya fauna asociadas, tanto en los entresijos del esqueleto de carbonato cálcico (e.g. pequeños poliquetos, algas, organismos perforadores, esponjas etc) como en el interior de los tejidos (e.g. zooxantelas en el caso de *C. caespitosa*, arqueas, bacterias etc); por tanto formando pequeños ecosistemas en si mismos (de ahí que los corales se hayan denominado como “holobiontes”). Con la presente tesis, se ha pretendido aportar un conocimiento general de la estructura genética y conectividad de ambas especies, permitiendo así esclarecer posibles factores que afectan negativamente a la estructura de las poblaciones llegando a incrementar la endogamia entre individuos, así como la inferencia de barreras oceanográficas al flujo génico entre poblaciones y factores físicos (i.e. corrientes) que afectan a la dispersión de las mismas, llegando a obtener una visión general de los patrones y procesos de la estructura genética y conectividad de ambos corales. Estos estudios son de gran utilidad a la hora de establecer planes de manejo y conservación, no ya solo de las especies estudiadas, si no de otras especies con ciclos de vida similares, aportando la presente tesis un modelo de aproximación a la conectividad de especies cuyas larvas son poco o muy móviles, haciendo además un llamamiento a incrementar el

número de estudios acerca de la biología reproductora de estas especies, modelos de dispersión de partículas en las áreas de estudio y estudios a escalas locales a fin de llegar a modelos multidisciplinarios que permitan esclarecer las conexiones entre poblaciones y finalmente una adecuada propuesta de elaboración de áreas de protección para éstas especies. Asimismo, se han aportado nuevos datos al conocimiento del efecto del incremento de la temperatura superficial del agua en la reproducción de *A. calycularis*, lo que incentiva nuevos estudios acerca de cómo este factor afecta a los corales con la finalidad de crear modelos que permitan prever la respuesta de estas especies ante el cambio climático y ante episodios anormales de calentamiento de la temperatura superficial del mar.

Conclusiones generales

- ▶ El estudio de la comparación de la biología reproductora de *Astroides calycularis* en dos poblaciones distantes, una localizada en el norte del mar de Alborán y otra en el sur del mar Tirreno, no reveló diferencias en cuanto a la condición sexual del coral entre ambas regiones, observándose en ambas que este coral es gonocórico e incubador.
- ▶ Con respecto a la población localizada al sur del mar Tirreno, se observó un retraso temporal de la maduración gonadal de *A. calycularis* en la población del norte del mar de Alborán, ligado al periodo en el que la temperatura superficial del mar alcanza el máximo en ambas localidades.
- ▶ El análisis genético de las poblaciones de *A. calycularis* con marcadores mitocondriales (citocromo oxidasa subunidad I, COI) y nucleares (espaciadores internos de genes ribosomales, ITS), muestra escasa diferenciación genética en las localidades del mar de Alborán, pero una ligera diferenciación entre estas poblaciones y las de la cuenca argelina y del mar Tirreno, respectivamente.
- ▶ Los marcadores COI e ITS no son recomendables para estudios a nivel intraespecífico de *A. calycularis*, en consonancia con lo que apuntan distintos estudios llevados a cabo en antozoos.
- ▶ Mediante la creación de una genoteca enriquecida en microsatélites, se llegaron a aislar trece de estos marcadores para *A. calycularis*, con un número de alelos por locus que variaba entre 2 y 14. Los cebadores diseñados para estas regiones del ADN se probaron en cuatro especies del género *Tubastrea*, también perteneciente a la familia Dendrophylliidae (y el género más cercano filogenéticamente a *Astroides*), con amplificaciones exitosas para la mayoría de los loci.
- ▶ El estudio genético de la estructura poblacional y conectividad de *A. calycularis* a diferentes escalas, reveló un alto grado de flujo génico únicamente entre localidades distanciadas no más de un kilómetro. A mayores distancias muestra un patrón de flujo génico y conectividad “paso a paso”.
- ▶ El frente Almería-Orán se ha mostrado como una barrera oceanográfica efectiva para el flujo génico de *A. calycularis*, habiéndose encontrado notables diferencias genéticas entre las localidades localizadas en el mar de Alborán y la población ubicada en la cuenca argelina. Ello se atribuye a la escasa capacidad de dispersión de la especie.
- ▶ Se aislaron trece marcadores microsatélite para *Cladocora caespitosa*, a partir del desarrollo de una genoteca enriquecida en microsatélites, con un rango de alelos que varió entre 2 y 13. Tras un estudio más detallado de las poblaciones de la especie, diez marcadores resultaron útiles para el análisis de su variabilidad.

Amplificaciones cruzadas de estos marcadores en *Oculina patagonica* dieron resultados positivos en siete de los loci.

► El análisis genético de *C. caespitosa* con marcadores microsatélite, reveló cierta homogeneidad entre poblaciones localizadas en el noroeste del Mediterráneo.

► Se encontraron genotipos idénticos en pólipos de *C. caespitosa* en las localidades de Tarragona, Menorca e Islas Columbretes, demostrando la posibilidad de existencia de eventos de reproducción asexual en este coral. También se sugiere la posibilidad de que colonias de gran tamaño, denominadas bancos, estén formadas por diferentes individuos con genotipos propios (i.e. sean quimeras).

► Las dos barreras oceanográficas señaladas en el noroeste del Mediterráneo, el frente balear y el canal de Ibiza, no parecen afectar a la conectividad entre poblaciones de este coral.

► Se estima que la estructura genética y conectividad de ambos corales está determinada principalmente por la biología de sus larvas. *A. calycularis* es un coral incubador, cuyas plánulas se han descrito como "reptantes", mostrando escasa capacidad de dispersión. Así pues, del estudio genético de las poblaciones de la especie se deduce que la dispersión a grandes distancias es debida a eventos muy esporádicos de propagación a través de corrientes y a procesos de "rafting". Por otro lado, la fecundación en *C. caespitosa* se produce en la columna de agua (fecundación externa). A pesar del escaso conocimiento acerca de la biología de las plánulas de este coral, el alto grado de conectividad encontrado entre sus poblaciones sugiere que éstas pueden dispersarse a grandes distancias, probablemente arrastradas por corrientes superficiales.

► Se recomienda la conservación de *A. calycularis* a escalas locales y regionales, y la planificación de redes de micro-reservas. En el caso de *C. caespitosa*, se recomienda tener en cuenta la escasa presencia de grandes bancos o arrecifes en el Mediterráneo y la creación de una sola área de protección lo suficientemente grande como para preservar su riqueza genética.

General conclusions

- ▶ The comparative study of colonies of *Astroides calycularis* from two distant localities, one located in the northern Alboran Sea and the other in the southern Tyrrhenian Sea, did not reveal differences in the reproductive pattern or condition of the coral among these regions, therefore gonochorism and planulae brooding coincides in both localities.
- ▶ A delay in the timing of the fertilization period of *A. calycularis* was observed in the northern Alboran Sea population, in comparison with the population in the southern Tyrrhenian Sea, linked to a shift in the period at which seawater reaches its maximum temperature in the two localities.
- ▶ The genetic analysis of mitochondrial (cytochrome oxidase I, COI) and nuclear markers (internal transcribed spacers, ITS) of *A. calycularis*, shows a general lack of population differentiation in the westernmost populations of the Mediterranean; however, a slight differentiation is seen when comparing these populations with those of the Tyrrhenian Sea and Algerian Basin.
- ▶ COI and ITS markers are not recommended for intraspecific studies on *A. calycularis*, as is also suggested in the literature for other anthozoan species.
- ▶ Following the development of an enriched microsatellite library, thirteen microsatellite markers were successfully isolated for *A. calycularis*; these loci showed a range of alleles from 2 to 14. Cross-amplifications of the designed microsatellites were performed with different species of a closely related dendrophylliid genus, *Tubastrea spp.*, with successful amplifications for most of the loci.
- ▶ The genetic assessment of population structure and connectivity of *A. calycularis* at different spatial scales revealed a high degree of gene flow only among localities separated by as much as one kilometer. At more distant localities, *A. calycularis* follows a stepping-stone model of gene flow and connectivity.
- ▶ The Almería-Orán Front acts as an oceanographic barrier among populations located in the Alboran Sea and Algerian Basin, in synergy with the low dispersal behavior of the planulae.
- ▶ Thirteen microsatellite markers were isolated from DNA of *Cladocora caespitosa*, following the development of an enriched microsatellite library; the developed loci showed moderate to high allelic diversity levels ranging from 2 to 13 alleles per loci. Ten useful markers remained after a more in-depth study of the species populations. Cross-amplifications of the markers with *Oculina patagonica* revealed successful results for seven of these markers.
- ▶ The genetic analysis with microsatellite markers revealed certain homogeneity in the northwest Mediterranean populations of *C. caespitosa*.
- ▶ Identical genotypes were found in individuals of *C. caespitosa* at the localities

of Tarragona, Minorca and Columbretes Islands, therefore indicating the possibility of asexual reproduction in the coral. The possibility of chimeric colonies exists in *C. caespitosa*, as shown by genotyping two individuals from six “banks” of the coral in Minorca.

► The two oceanographic barriers characterized in the northwest Mediterranean region, the Balearic Front and the Ibiza Channel, do not affect connectivity among populations of the coral.

► It is suggested that the genetic structure and connectivity of the two corals is mainly driven by their planulae behavior. *A. calycularis* planulae, have been described as “crawling larvae” and show low dispersal abilities, while eventual dispersal events through local and macro-scale currents and rafting on floating substrata, may affect gene flow over longer distances. *C. caespitosa* is a broadcast spawner, so its fecundation is carried out in the water column. Even though planulae of the coral have not been characterized, the high degree of connectivity among their populations suggests that they may have long distance dispersal abilities enhanced by sea surface currents.

► In the case of *A. calycularis* it is recommended the conservation of the coral at local and regional scale, and the planification of a network of micro-reserves; while in the case of *C. caespitosa* a single large MPA considering the places where the coral has been cited as forming monospecific reefs would be enough to preserve its genetic richness.

Referencias

- Adjeroud M, Tsuchiya M (1999) Genetic variation and clonal structure in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* in the Ryukyu Archipelago, southern Japan. *Marine Biology*, **134**, 735-760.
- Aguirre J, Jiménez PA (1998) Census Assemblages in Hard-Bottom Coastal Communities: A Case Study from the Plio-Pleistocene Mediterranean. *Palaios*, **12**, 598-608
- Allmann (1874) Las Islas de coral y sus arquitectos. *Revista Europea*, **5**, 148-152.
- Augier H (1982) Inventory and classification of marine benthic biocenoses of the Mediterranean. *Council of Europe, Strasbourg, Nature and Environment Series*, **25**, 1-57.
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history and evolution*. Segunda edición. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Ayre DJ, Resing JM (1986) Sexual and asexual production of planulae in reef corals. *Marine Biology*, **90**, 187-190.
- Ayre DJ, Dufty SL (1994) Evidence for restricted gene flow in the viviparous coral *Seriatopora hystrix* on Australia's Great Barrier Reef. *Evolution*, **48**, 1183-1201.
- Ayre DJ, Huges TP, Standish R (1997) Genetic differentiation, reproductive mode and gene flow in the brooding coral *Pocillopora damicornis* along the Great Reef Barrier, Australia. *Marine Ecology Progress Series*, **159**, 175-187.
- Ayre DJ, Hughes TP (2000) Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the Great Barrier Reef, Australia. *Evolution*, **54**, 1590-1605.
- Ayre DJ, Miller KJ (2004) Where do clonal coral larval go? Adult genotypic diversity conflicts with reproductive effort in the brooding coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Ecology Progress Series*, **277**, 95-105.
- Babcock RC, Bull GD, Harrison PL, Heyward AJ, Oliver JK, Wallace CC et al. (1986) Synchronous spawning of 105 scleractinian coral species on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, **90**, 379-394.
- Babcock RC, Wills BL, Simpson CJ (1994) Mass spawning of corals on a high latitude coral reef. *Coral Reefs*, **13**, 161-169.
- Baird AH, Guest JR, Willis BL (2009) Systematic and biogeographical patterns in the reproductive biology of scleractinian corals. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **40**, 551-571.
- Baker AC (2003) Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, ecology and biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **34**, 661-689.
- Barbrook AC, Visram S, Douglas AE, Christopher JH (2006) Molecular diversity of dinoflagellate symbionts of Cnidaria: the psbA minicircle of *Symbiodinium*. *Protist*, **157**, 159-171.

- Bas C (2009) The Mediterranean: a synoptic overview. *Contributions to Science*, **5**, 25-39.
- Baums IB, Hughes CR, Hellberg ME (2005) Highly polymorphic microsatellite markers for the Caribbean hard coral *Acropora palmata*. *Marine Ecology Progress Series*, **288**, 115-127.
- Baums IB (2008) A restoration genetics guide for coral reef conservation. *Molecular Ecology*, **17**, 2796-2811.
- Beerli P (1998) Estimation of migration rates and population sizes in geographically structured populations. En: *Advances in Molecular Ecology* (Carvalho GR, Ed.) pp. 39-53.
- Beerli P, Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **98**, 4563-4568.
- Beiring EA, Lasker HR (2000) Egg production by colonies of a gorgonian coral. *Marine Ecology Progress Series*, **196**, 169-177.
- Bernasconi MP, Corselli C, Carobene L (1997) A bank of the scleractinian coral *Cladocora caespitosa* in the Pleistocene of the Crati valley (Calabria, Southern Italy): growth versus environmental conditions. *Bolletino della Società Paleontologica Italiana*, **36**, 53-61.
- Bianchi CN, Morri C (2000) Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Marine Pollution Bulletin*, **40**, 367-376.
- Bianchi CN, Morri C (2002) La biografia marina del Mediterraneo (XXXIV Congresso della Società Italiana di Biogeografia). *Notiziario della Società Italiana di Biologia Marina*, **42**, 78-79.
- Bianchi CN (2007) Biodiversity issues for the forthcoming tropical Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, **580**, 7-21. (Bianchi 2007).
- Brachert TC, Vescogni A, Bosellini FR, Reuter M, Mertz-Kraus R (2007) High salinity variability during the Early Messinian revealed by stable isotope signatures from vermetid and *Halimeda* reefs of the Mediterranean region. *Geologica Romana*, **40**, 51-66.
- Bohonak AJ (1999) Dispersal, gene flow and population structure. *Quarterly Review of Biology*, **74**, 21-45.
- Botsford LW, Hastings A, Gaines SD (2001) Dependence of sustainability on the configuration of marine reserves and larval dispersal distances. *Ecological Letters*, **4**, 144-150.
- Brown BE (1997) Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs*, **16**, Suppl. S129-S138.
- Brookfield, JFY (1996). A simple method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, **5**, 453-455.
- Budd AF, Bosellini FR, Stemann TA (1996) Systematics of the Oligocene to Miocene reef coral *Tarbelastrea* in the northern Mediterranean. *Palentology*, **39**, 515-560.

- Cairns SD (2001) A generic revision and phylogenetic analysis of the Dendrophylliidae (Cnidaria: Scleractinia). *Smithsonian contributions to zoology*, **615**, 42pp.
- Cairns SD, Hoeksema BW, van der Land J (2001) Scleractinia. En: Costello MJ; Emblow C et al., editors. *European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification*. Collection *Patrimoines Naturels*, **50**; p. 109-110.
- Carlson DB (1999) The evolution of mating systems in tropical reef corals. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 491-495.
- Casado C (2011) Estudio de a reproducción del coral Mediterráneo *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia). Tesis fin de máster. Universidad de Barcelona, 34 pp.
- Casellato S, Masiero L, Sichirolò E, Soresi S (2007) Hidden secrets of the Northern Adriatic: Tegnùe, peculiar reefs. *Central European Journal of Biology*, **2**, 122-136.
- Cebrián E, Ballesteros E (2004) Zonation patterns of benthic communities in an upwelling area from the western Mediterranean (La Herradura, Alboran Sea). *Scientia Marina*, **68**, 69-84.
- Coffroth MA, Santos SR (2005) Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist*, **156**, 19-34.
- Coll M, Piroddi C, Steenbeek J, Kaschen K, ben Rais Lasram F, Aguzzi J et al. (2010) The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns and threats. *PlosOne*, **5**, e11842.
- Concepción GT, Medina M, Toonen RJ (2006) Noncoding mitochondrial loci for corals. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 1208-1211.
- Cowen RK, Sponaugle S (2009) Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Reviews of Marine Science*, **1**, 443-466.
- Crow JF, Kimura M (1970) *An introduction to population genetics theory*. Harper & Row, New York. 591 pp.
- Cuerda J, Antich S, Soler A (1986) Las formaciones cuaternarias marinas de Cala Pi (Mallorca). *Bolletí de la Societat d'Història Natural de les Balears*, **30**, 95-104.
- Cuif JP, Lecointre G, Perrin Ch, Tillier A, Tillier S (2002) Patterns of septal biomineralization in Scleractinian compared with their 28S rRNA phylogeny: a dual approach for a new taxonomic framework. *Zoologica Scripta*, **32**, 459-473.
- Daly M, Brugler MR, Cartwright P, Collins AG, Dawson MN, Fautin DG et al. (2007) The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*, **1668**, 127-182.
- Diekmann OE, Bak RP, Stam WT, Olen JL (2001) Molecular genetic evidence for probable reticulate speciation in the coral genus *Madracis* from a Caribbean fringing reef slope. *Marine Biology*, **139**, 221-233.
- Excoffier L, Estoup A, Cornuet JM (2005) Bayesian analysis of an admixture model with mutations and arbitrarily linked markers. *Genetics*, **169**, 1727-1738.

- Felsenstein J (2004) *Inferring phylogenies*. Sinauer associates, Inc.; Sunderland, Massachusetts. 664 pp
- Fine M, Zibrowius H, Loya Y (2001) *Oculina patagonica*: a non-lessepsian scleractinian coral invading the Mediterranean Sea. *Marine Biology*, **13**, 1195-1203.
- Font J (1987) Mesoscale activity in the Cataln current (N Mediterranean) from May 1987 to December 1989. Apport Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Mediterranee.
- Fornos JJ, Baron A, Pons GX (1996) Holocene hermatypic coral banks (*Cladocora caespitosa*) in Es Gran zone (Menorca, western Mediterranean). *Geogaceta*, **20**, 303-306.
- France SC, Rosel PE, Agenbrood JE, Mullineaux LS, Kocher TD (1996) DNA sequence variation of mitochondrial large-subunit rRNA provides support for two-subclass organization of the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **5**, 15-28.
- France SC, Hoover LL (2002) DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiologia*, **471**, 149-155.
- Fredj G, Bellan-Santini D, Menardi M (1992) État des connaissances sur la faune marine méditerranéenne. *Bulletin de l'Institut océanographique de Monaco*, **7**, 1-88.
- Fukami H, Dudd AF, Levitan DR, Jara J, Kersanach R, Knowlton N (2004) Geographic differences in species boundaries among members of the *Montastrea annularis* complex based on molecular and morphological characters. *Evolution*, **58**, 324-337.
- Galarza JA, Carreras-Carbonell J, Macpherson E et al. (2009) The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 1473-1478.
- García MJL, Millot C, Font J, García-Ladona E (1994) Surface circulation variability in the Balearic Basin. *Journal of Geophysical Research*, **99**, 3285-3296.
- Garrabou J, Coma R, Bensoussan N, Bally M, Chevaldonné P, Cigliano M et al. (2009) Mass mortality in North-western Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Global Change Biology*, **15**, 1090-1103.
- Glynn PW, Colley SB, Mate JL, Cortés J, Guzman HM, Bailey RL, Feingold JS, Enochs IC (2008) Reproductive ecology of the azooxanthellate coral *Tubastrea coccinea* in the Equatorial Eastern Pacific: Part V. Dendrophylliidae. *Marine Biology*, **153**, 529-544.
- Goffredo S, Menzomonaco L, Zaccanti F (2004) Geneic differentiation among populations of the Mediterranean hermaphroditic brooding coral *Balanophyllia europaea* (Scleractinia, Dendrophylliidae). *Marine Biology*, **145**, 1075-1083.
- Goffredo S, Lasker HR (2006) Modular growth of a gorgonian coral can generate predictable patterns of colony growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **336**, 221-229.
- Goffredo S, Di Ceglie , Zaccanti F (2009) Coral differentiation of the temperate subtropical stony coral *Leptosammia pruvotti* in the Mediterranean Sea. *Israel*

- Journal of Ecology and Evolution*, **55**, 99-115.
- Goffredo S, Gasparini G, Marconi G, Putignano MT, Pazzini C, Zaccanti F (2010) Gonochorism and planula brooding in the Mediterranean endemic orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia: Dendrophylliidae). Morphological aspects of gametogenesis and ontogenesis. *Marine Biology Research*, **6**, 421-436.
- Goffredo S, Gasparini G, Marconi G, Putignano MT, Pazzini C, Airi V et al. (2011) Sexual reproduction in the Mediterranean endemic orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia, Dendrophylliidae). *Bulletin of Marine Sciences*, **87**, 589-604.
- Godoy JA (2009) La genética, los marcadores moleculares y la conservación de las especies. *Ecosistemas*, **18**, 23-33.
- González EG (2003) Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, **59**, 377-388.
- Gori A, Linares C, Rossi S, Coma R, Gili JM (2007) Spatial variability in the reproductive cycle of the gorgonians *Paramuricea clavata* and *Eunicella singularis* (Anthozoa, Octocorallia). *Marine Biology*, **151**, 1571-1584.
- Grubelic I (2004) Effect of climatic fluctuations on the distribution of warm-water coral *Astroides calycularis* in the Adriatic Sea: new records and review. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **84**, 599-602.
- Guest JR, Baird AH, Goh BPL, Chou LM (2005) Seasonal reproduction in equatorial reef corals. *Invertebrate Reproduction and Development*, **48**, 207-218.
- Guest J, Baird A, Goh B, Chou LM (2012) Sexual patterns in scleractinian corals: an unusual pattern in the reef-building species *Diploastrea heliophora*. *Coral Reefs*, DOI: 10.1007/s00338-012-0881-4
- Hall A, Hughes T (1996) Reproductive strategies of modular organisms: comparative studies of reef-building corals. *Ecology*, **77**, 950-963.
- Halpern BS, Warner RR (2003) Matching marine reserve design to reserve objectives. *Proceedings of the Royal Society of London Series B- Biological Sciences*, **270**, 1871-1878.
- Hardy GH (1908) Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, **28**, 49-50.
- Harrison PL (2011) Sexual reproduction of scleractinian corals. En: Dubinsky, Z. and Stambler, N. (Eds.). *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Springer, pp 59-85.
- Harrison PL, Wallace CC (1990) Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. En: Dubinsky Z (Ed.). *Ecosystems of the World: Coral Reefs*. Elsevier Science, pp 133-207.
- Hellberg ME (1994) Relationships between inferred levels of gene flow and geographic distance in a philopatric coral, *Balanophyllia elegans*. *Evolution* **48**, 1829-1854.
- Hellberg ME (1995) Stepping-stone gene flow in the solitary coral *Balanophyllia elegans*: equilibrium and nonequilibrium at different spatial scales. *Marine Biology*, **123**, 573-581
- Hellberg ME, Taylor MS (2002) Genetic analysis of sexual reproduction in the

- dendrophylliid coral *Balanophyllia elegans*. *Marine Biology*, **141**, 629-637.
- Hellberg ME, Burton RS, Neigel JE, Palumbi SR (2002) Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Sciences*, **70**, 273-290.
- Hey J, Machado CA (2003) The study of structured populations- New hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 535-543.
- Heyward AJ, Negri AP (2012) Turbulence, cleavage and the naked embryo: a case for coral clones. *Science*, **335**, 1064
- Hofrichter R (2004) El Mediterráneo. Fauna, flora y ecología. Vol. I Parte General. Ediciones Omega. 592 pp.
- Hopkins T (1989) La física del mar. En Margalef R (Ed.) *The Western Mediterranean*. Omega, Barcelona. P. 102-127.
- Huang D, Meier R, Todd PA, Chou LM (2008) Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the Metazoan Tree and its implications for DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution*, **66**, 167-174.
- Jost L (2008) Gst and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, **17**, 4015-4026.
- Jover MA, Castillo-Agudo L, García-Carrascosa M, Segura J (2003) Random amplified polymorphic DNA assessment of diversity in Western Mediterranean Populations of the seagrass *Posidonia oceánica*. *American Journal of Botany*, **90**, 364-369.
- Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 576-579.
- Kelleher G (1999) Guidelines for Marine Protected Areas. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 107 pp.
- Kenchington EL, Patwaty MU, Zouros E, Bird CJ (2006) Genetic differentiation in relation to marine landscape in a broadcast-spawning bivalve mollusk (*Placopecten magellanicus*). *Molecular Ecology*, **15**, 1781-1796.
- Kersting DK, Templado J (2006) Evento de mortandad masiva del coral *Cladocora caespitosa* en las Islas Columbretes tras el calentamiento anormal del agua en el verano de 2003. Pp 80-81. *Resúmenes del XIV Simposio Ibérico de Biología Marina, Barcelona*. Universidad de Barcelona.
- Kersting DK, Linares C, Hereu B, Teixidó N, Zabala M (2010) La población de *Cladocora caespitosa* de la Bahía de L' Illa Grossa (Islas columbretes, Mediterráneo noroccidental). Pp 102-103. *Resúmenes del XVI Simposio Ibérico de Estudios en Biología Marina*. Alicante. España.
- Kersting DK, Linares C (2012) *Cladocora caespitosa* bioconstructions in the Columbretes Islands Marine Reserve (Spain, NW Mediterranean): distribution, size structure and growth. *Marine Ecology*. doi:10.1111/j.1439-0485.2011.00508.x
- Kimura M, Weiss G (1964) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, **49**, 561-576.
- Kinzie RA III (1993) Spawning in the reef corals *Pocillopora verrucosa* and *P. eydouxi*

- at Sesoko Island, Okinawa. *Galaxea*, **11**,93-105.
- Kyle CJ, Boulding EG (2000) Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp) with and without pelagic larval dispersal. *Marine Biology*, **137**, 835-845.
- Kruger A, Schleyer MH (1998) Sexual reproduction in the coral *Pocillopora verrucosa* (Cnidaria: Scleractinia) in KwaZulu-Natal, South Africa. *Marine Biology*, **132**, 703-710.
- Kruzic P, Zibrowius H, Pozar-Domac A (2002) Actiniaria and Scleractinia (Cnidaria, Anthozoa) from the Adriatic Sea: First records, confirmed occurrences and significant range extensions of certain species. *Italian Journal of Zoology*, **69**, 345-353.
- Kruzic P, Benkovic L (2003) Banks of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Adriatic Sea (Croatia). *Marine Ecology*, **29**, 125-139.
- Kruzic P, Zuljevic A, Nokolic V (2008) Spawning of the colonial coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Southern Adriatic Sea. *Coral Reefs* **27**,337-341.
- Kruzic P (2007) Polyp expulsion of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in extreme sea temperature conditions. *Natura Croatica*, **16**, 211-214
- Kruzic P, Benkovic L (2008) Bioconstructional features of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Adriatic Sea (Croatia). *Marine Ecology*, **29**, 125-139
- Kuhlmann K, Dietrich HH, Reitner J, Neuweiler Fritz, et al. (1996) Preliminary report on Holocene submarine accumulations of *Cladocora caespitosa* (L. 1767) in the Mediterranean). *Global and regional controls on biogenic sedimentation. 1. Reef Evolution*. pág. 65-69
- Laborel (1987) Marine biogenic constructions in the Mediterranean: a review. *Scientific reports of the Port Cross National Park*, **13**, 97- 126
- Lacaze-Duthiers H (1873). Développement des coralliaires. *Actinaires à Polypiers*. *Archives de Zoologie Expérimentale Générale*, **2**, 269- 348.
- Lam KKY (2000) Sexual reproduction of a low-temperature tolerant coral *Oulastrea crispata* (Scleractinia: Faviidae) in Hong Kong, China. *Marine Ecology Progress Series*, **205**, 101-111.
- LaJeunesse TC (2001) Investigating the biodiversity, ecology and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus ymbiodinium using the ITS region: in search of a "species" level marker. *Journal of Phycology*, **37**, 866-880.
- La Violette PE (1984) The advection of cyclic submesoscale thermal features in the Alboran Sea Gyre. *Journal of Physical Oceanography*, **14**, 550-565.
- Lewontin RC, Kojima K (1960) The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution*, **14**, 458-472.
- Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, **44**, 397-401.

- Loh WKW, Loi T, Carter D, Hoegh-Guldberg O (2001) Genetic variability of the symbiotic dinoflagellates from the wide ranging coral species *Seriatopora hystrix* and *Acropora longicuathus* in the Indo-West Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, **222**, 97-107.
- López-González PJ (1993) *Taxonomía y zoogeografía de los antozoos del estrecho de Gibraltar y áreas próximas*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 568 pp.
- López JV, Kersanach R, Rehner SA, Knowlton N (1999) Molecular determination of species boundaries in corals: genetic analysis of the *Montastrea annularis* complex using amplified fragment length polymorphism and a microsatellite maker. *Biological Bulletin*, **196**, 80-93.
- Loya Y, Sakai K (2008) Bidirectional sex change in mushroom stony corals. *Proceedings of the Royal Society B*, **275**, 2335-2343.
- Maier E, Tollrian R, Nurnberger B (2001) Development of species-specific markers in an organism with endosymbionts: microsatellites in the scleractinian coral *Seriatopora hystrix*. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 157-159.
- Magalon H, Samadi S, Richard M, Adjeroud M, Veuille M (2004) Development of coral and zooxanthellasppecific microsatellites in three species of *Pocillopora* (Cnidaria, Scleractinia) from French Polynesia. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 206-208.
- Margalef R (1997) Introduction to the Mediterranean. En: *The western Mediterranean*. Pergamon Press, Oxford. pp: 1-16
- Marshall DJ, Monro K, Bode M, Keough MJ, Swearer S (2010) Phenotype-environment mismatches reduce connectivity in the sea. *Ecology Letters*, **13**, 128-140.
- Medina M, Weil E, Szmant M (1999) Examination of the *Montastrea annularis* species complex (Cnidaria: Scleractinia) using ITS and COI sequences. *Marine Biotechnology*, **1**, 89-97.
- Metropolis N, Rosenbluth AW, Rosenbluth MN, Teller AH, Teller E (1953) Equation of state calculations by fast computing machines. *Journal of Chemical Physics*, **21**, 1087-1092.
- Miller KJ, Howard CG (2004) Isolation of microsatellites from two species of scleractinian corals. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 11-14.
- Millot C (1999) Circulation in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems*, **20**, 423-442.
- Mokhtar-Jamaï K, Pascual M, Ledoux JB, Coma R, Féral JP, Garrabou J et al. (2011) From global to local genetic structuring in the red gorgonian *Paramunicea clavata*: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Molecular Ecology*, **20**, 3291-3305.
- Montagna P, McCulloch M, Mazzoli C et al. (2007) The non-tropical coral *Cladocora caespitosa* as a new climate archive for the Mediterranean: high-resolution trace elements systematics. *Quaternary Sciences Review*, **26**, 441-462.
- Moreno D, Barrañón A, Gordillo I, López-González PJ (2008a) *Cladocora caespitosa*

- (Linnaeus, 1767). Pp. 256-262. En: Barea-Azcón JM, Ballesteros-Duperón E, Moreno D (eds). *Libro Rojo de los Invertebrados de Andalucía*. 4 Tomos. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Moreno D, de la Linde A, Arroyo MC, López-González PJ (2008b) *Astroides calycularis* (Pallas, 1766). Pp. 281-287 en: Barea-Azcón JM, Ballesteros-Duperón E, Moreno D (eds). *Libro Rojo de los Invertebrados de Andalucía*. 4 Tomos. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Morri C, Peirano A, Bianchi NC (2001) Is the Mediterranean coral *Cladocora caespitosa* an indicator of climatic change? *Archivio di Oceanografia e Limnologia*, **22**, 139-144.
- Nei M, Chesser RK (1983) Estimation of fixation indexes and gene diversities. *Annularies of Human Genetics*, **47**, 253-259.
- Nishiwaka A, Sakai K (2003) Genetic variation and gene flow of broadcast spawning and planula brooding coral, *Goniastrea aspera* (Scleractinia) in the Ryukyu Archipelago, southern Japan. *Zoological Sciences*, **20**, 1031-1038.
- Nishiwaka A, Sakai K (2005) Genetic connectivity of the scleractinian coral *Goniastrea aspera* around the Okinawa Islands. *Coral Reefs*, **24**, 318-323.
- Ocaña O, Ramos A, Templado J (2009) Los paisajes sumergidos del Región de Ceuta y u biodiversidad. Fundación Museo del Mar de Ceuta. 254pp.
- Özalp HB, Alparslan M (2011) The first record of *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767) (Anthozoa, Scleractinia) from the marmara Sea. *Turkish Journal of Zoology*, **35**, 701-705.
- Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, **13**, 146-158.
- Patarnello T, Volckaert FAMJ, Castilho R (2007) Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break?. *Molecular Ecology*, **16**, 4426-4444.
- Pearse DE, Crandall KA (2004) Beyond F(ST): Anlaysia of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, **5**, 585-602.
- Peirano A, Morri C, Bianchi CN (1999) Skeleton growth and density pattern of the zooxanthellate scleractinian *Cladocora caespitosa* (L.) from the Ligurian Sea (NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*, **185**, 195-201.
- Peirano A, Morri C, Bianchi CN, Rodolfo-Metalpa R (2001) Biomass, carbonate standing stock and production of the Mediterranean coral *Cladocora caespitosa* (L.). *Facies*, **44**, 75-80.
- Peirano A, Kruzic P, Mastronuzzi G (2009) Growth of Mediterranean reef of *Cladocora caespitosa* (L.) in the late Quaternary and climate inferences. *Facies*, **55**, 325-333.
- Pérès JM (1967) The Mediterranean benthos. *Oceanography and Marine Biology, an Annual Review*, **5**, 449-533.
- Perez T, Garrabou J, Sartoretto S, Hamlin JG, Francour P, Vacelet J (2000) Mortalité massive d'invertebrés marins: un événement sans precedent en Méditerranée nord occidentale. *Life Sciences*, **323**, 853-865.

- Pineda J, Hare JA, Sponaugle SU (2007) Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography*, **20**, 22-39.
- Pinera JA, Bernardo D, Blanco G, Vazquez E, Sanchez JA (2006) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species amplification in *Spararus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Molecular Ecology resources*, **6**, 3-35.
- Pinot JM, Lopez-Jurado JL, Riera M (2002) The CANALES experiment (1996-1998). Interannual seasonal and mesoscale variability of the circulation in the Balearic Channels. *Progress in Oceanography*, **55**, 335-370.
- Polato NR, Concepción GT, Toonen RJ, Baums IB (2010) Isolation by distance across the Hawaiian Archipelago in the reef-building coral *Porites lobata*. *Molecular Ecology*, **19**, 4661-4677.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817-818
- Powers DA, Smith M, Gonzalez-Villsenor I, DiMichele L, Crawford D, Bernardi G et al. (1993) A multidisciplinary approach to the selectionist/neutralist controversy using the model teleost, *Fundulus heteroclitus*. En: Futuyma D, Antonivics J (eds). *Oxford surveys in Evolutionary Biology*, vol. 9, Oxford University Press: 44-107.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Puill-Stephan E, Willis BL, van Herwerden L, van Oppen MJH (2009) Chimerism in wild adult populations of the broadcast spawning coral *Acropora millepora* of the Great Barrier Reef. *PLoS ONE*, **4**, 1-8.
- Putron JS, Rylan JS (2009) Effect of seawater temperature on reproductive seasonality and fecundity of *Pseudoplexaura porosa* (Cnidaria: Octocorallia): latitudinal variation in Caribbean gorgonian reproduction. *Invertebrate Biology*, **128**, 213-222.
- Quijada A, Liston A, Robinson W, Alvarez-Buyalla, E (1997) The ribosomal ITS región as a marker to detect hybridization in pines. *Molecular Ecology*, **6**, 995-996.
- Rannala B, Yang ZH (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, **43**, 304-311.
- Richmond RH, Hunter CL (1990) Reproduction and recruitment of corals: comparissons among the Caribbean, the tropical Pacific and the Red Sea. *Marine Ecology Progress Series*, **60**, 185-203.
- Ridgway T, Hoegh-Gulberg O, Ayre DJ (2001). Panmixia in *Pocillopora verrucosa* from South Africa. *Marine Biology*, **139**, 175-181.
- Ridgway T, Gates D (2001) Why are there so few genetic markers available for coral population analyses? *Symbiosis*, **41**, 1-7.
- Ridgway T (2002) Testing the applicability of molecular genetic markers to population analyses of scleractinian corals. *Symbiosis*, **33**, 243-261.
- Ridgway T (2005) Allozyme electrophoresis still represents a powerful technique

- in the management of coral reefs. *Biodiversity and Conservation*, **14**, 135-149.
- Ridgway T, Riginos C, Davis J, Hoegh-Guldberg O (2008) Genetic connectivity patterns of *Pocillopora verrucosa* in southern African Marine Protected Areas. *Marine Ecology Progress Series*, **354**, 161-168.
- Rinkevich B, Loya Y (1979) The reproduction of the red sea coral *Stylophora pistillata*. I. Gonads and planulae. *Marine Ecology Progress Series*, **1**, 133-144.
- Robinson RA, Wayne GL, Theocharis A, Lascaratos (2001) Mediterranean Sea circulation. *Encyclopedia of Ocean Sciences*. Academic Press Ltd., London, 1689-1706. 1-19pp
- Rodolfo-Metalpa R, Bianchi CN, Peirano A, Morri C (2000) Coral mortality in NW Mediterranean. *Coral Reefs*, **19**, 24.
- Rodolfo-Metalpa R, Bianchi CN, Peirano A, Morri C (2005) Tissue necrosis and mortality of the temperate coral *Cladocora caespitosa*. *Italian Journal of Zoology*, **72**, 271-276.
- Romano SL, Palumbi SR (1996) Evolution of scleractinian corals inferred from molecular systematics. *Science*, **271**, 640-642.
- Romano SL, Cairns SD (2000). Molecular phylogenetic hypothesis for the evolution of scleractinian corals. *Bulletin of Marine Sciences*, **67**, 1043-1068.
- Rodriguez-Lanetty M, Hoegh-Guldberg O (2003) Symbiont diversity within the widespread scleractinian coral *Plesiastrea versipora*, across the northwestern Pacific. *Marine Biology*, **143**, 501-509.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219-1228.
- Rupert EE, Barnes D (1996) *Zoología de los invertebrados*, 5ta edición. Interamericana México DF. 1140pp.
- Saitou N, Nei M. (1987) The neighbour-joining method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Sarhan T, García Lafuente J, Vargas M, Vargas JM, Plaza F (2000) Upwelling in the northwestern Alboran Sea. *Journal of Marine Systems*, **23**, 317-331.
- Safner T, Miller M, mcRae BH, Fortin MJ, Manel S (2011) Comparison of Bayesian clustering and edge detection methods San Félix M (2000) *Guía submarina de Ibiza y Formentera*. Mediterrània, Eivissa. 130 pp.
- Shearer TL, van Oppen MJH, Romano SL, Wörheide G (2002) Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoan (Cnidaria). *Molecular Ecology*, **11**, 2475-2487.
- Shearer TL, Gutiérrez-Rodríguez C, Coffroth MA (2005) Generating molecular markers from zooxanthellate cnidarians. *Coral Reefs*, **24**, 57-66.
- Schumacher H, Zibrowius H (1985) What is hermatypic?- A redefinition of ecological groups in corals and other organisms. *Coral Reefs*, **4**, 1-9.
- Schunter C, Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Tintore J, Vidal-Vijande E, Pascual A et al (2011) Matching genetics with oceanography: directional gene flow in a Mediterranean fish species. *Molecular Ecology*, **20**, 5167-5181.
- Sherman CDH (2008) Mating system variation in the hermaphroditic brooding

- coral, *Seriatophora hystrix*. *Heredity*, **100**, 296-303.
- Shlesinger Y, Goulet TL, Loya Y (1998) Reproductive patterns of scleractinian corals in the northern Red Sea. *Marine Biology*, **132**, 691-701.
- Silenzi S, Bard E, Montagna P, Antonioli F (2005) Isotopic and elemental records in a non-tropical coral (*Cladocora caespitosa*): discovery of a new high-resolution climate archive for the Mediterranean Sea. *Global and Planetary Change*, **49**, 94-120.
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*, **47**, 264-279.
- Smith-Keune C, van Oppen M (2006) Genetic structure of a reef-building coral from thermally distinct environments of the Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, **25**, 493-502.
- Schiller Ch (1993) Ecology of the symbiotic coral *Cladocora caespitosa* (L.) (Faviidae, Scleractinia) in the Bay of Piran (Adriatic Sea): I. Distribution and Biometry. *Marine Ecology*, **14**, 205-219.
- Stimson JS (1978) Mode and timing of reproduction in some common hermatypic corals of Hawaii and Enewetak. *Marine Biology*, **48**, 173-184.
- Stoddart JA (1984) Genetic structure within populations of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, **81**, 19-30.
- Sunnucks J (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 199-203.
- Tabayashi M, Carter DA, Lopez JV, Hoegh-Guldberg O (2003) Genetic variation of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*, from the western Pacific reefs. *Coral Reefs*, **22**, 17-22.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, **105**, 437-460.
- Tang PC, Weing NV, Chen CW, Wallace CC, Chen CA (2010) Comparative study of genetic variability of AAT and CT/GT microsatellites in elkhorn coral, *Acropora* (Scleractinia: Acroporidae). *Zoological Studies*, **49**, 657-668.
- Templado J, Calvo M, Boisset F, García Carrascosa AM, Jiménez J (2002) *Flora y Fauna de la Reserva Marina de las islas Columbretes*. Secretaría General de Pesca Marítima, MAPA, Madrid, 263 pp
- Templado J, Calvo M, Luque AA, Garvía A, Maldonado M, Moro L (2004) *Guía de los invertebrados y peces marinos españoles protegidos por la legislación nacional e internacional*. Ministerio de Medio Ambiente, Serie Técnica, Madrid, 214 pp.
- Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, **13**, 789-809.
- Tintoré J, La Violette PE, Blade I, Cruzado A (1988) A study of an intense density front in the Eastern Alboran Sea: the Almeria-Oran front. *Journal of Physical Oceanography*, **18**, 1384-1397.
- Tranter PRG, Nicholson DN, Kinchington D (1982) A description of the spawning and post-gastrula development of the cold temperate coral *Caryophyllia smithii*. *Journal of the Marine Biological Association UK*, **62**, 845-854.

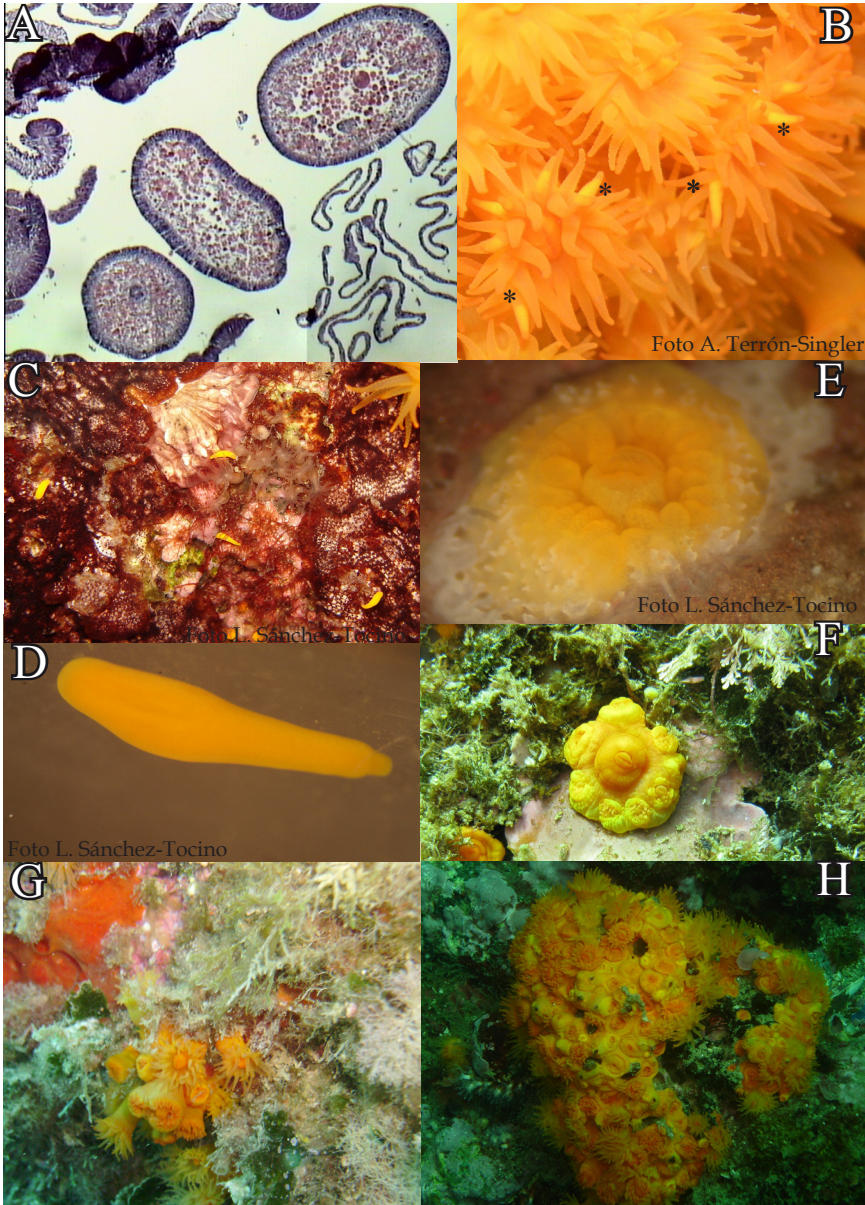
- Trench RK (1993) Microalgal-invertebrate symbioses- a review. *Endocytobiosis and cell research*, **9**, 135-175.
- Tsounis G, Rossi S, Aranguren M, Gili JM, Arntz W (2006) Effects of spatial variability and colony size on the reproductive output and gonadal development cycle of the Mediterranean red coral (*Corallium rubrum* L.). *Marine Biology*, **148**, 513-527.
- Underwood JN, Smith LD, van Oppen MJH, Gilmour JP (2009) Ecologically relevant dispersal of corals on isolated reefs: implications for managing resilience. *Ecological Applications*, **19**, 18-29.
- Valls JA (1989) Développement de *Cladocora caespitosa* (Linné, 1767) en aquarium. *Bulletin Institut Océanographique Monaco*, n° spécial **5**, 205-209.
- van Oppen MJH, Willis BL, Miller DJ (1999) Atypically low rate of cytochrome b evolution in the scleractinian coral genus *Acropora*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **266**, 179-183.
- van Oppen MJH, Wörheide G, Takayabashi M (2000) Nuclear markers in evolutionary and population genetic studies of scleractinian corals and sponges. Proceedings 9th International Reef Symposium, Bali, Indonesia. 23-27 October. Vol1.
- Vanvheghel MLJ, Bak RPM (1993). Intraspecific variation of a dominant caribbean reef building coral, *Montastrea annularis*, genetic, behavioral and morphometric aspects. *Marine Ecology Progress Series*, **92**, 255-265.
- Vermeij MJA, Sanpayo E, Bröker K, Bak RPM (2004) The reproductive biology of closely related coral species: gametogenesis in *Madracis* from the southern Caribbean. *Coral Reefs*, **23**, 206-214.
- Veron J, Stafford-Smith M (2000) Corals of the world III. En: Stafford-Smith (Ed.). Faviidae. Odyssey Publishing, Australia, pp 251-252.
- Villanueva RD, Yap HT, Montaña MNE (2008) Timing of planulation by pocilloporid corals in the northwestern Philippines. *Marine Ecology Progress Series*, **370**, 111-119.
- Visram S, Wiedenmann J, Douglas AE (2006) Molecular diversity of symbiotic algae of the genus *Symbiodinium* (Zooxatthellae) in cnidarians of the Mediterranean Sea. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, **86**, 1281-1283.
- Vollmer SV, Palumbi SR (2004) Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics. *Molecular Ecology*, **13**, 2763-2772.
- Wang S, Zhang L, Matz M (2009) Microsatellite characterization and marker development from public EST and WGS databases in the reef-building coral *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia). *Journal of Heredity*, **100**, 329-337.
- Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, **44**, 388-396.
- Weersing K, Toonen RJ (2009) Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, **393**, 1-12.

- Weinberg W (1908) Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg*, **64**, 368–382.
- Weis VM, Rynolds Ws, deBoer MD, Krupp DA (2001) Host-symbiont specificity during onset of symbiosis between the dinoflagellates *Symbiodinium* sp. and planula larvae of the scleractinian coral *Fungia scutaria*. *Coral Reefs*, **20**, 301-308.
- Whitaker K (2006) Non-random mating and population genetic subdivision of two broadcasting corals at Ningaloo Reef, Western Australia. *Marine Biology*, **144**, 593-603.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323-354.
- Yu K, Wang HY, Le C, Dai F (1999) Genetic structure of a scleractinian coral, *Mycedium elephantotus*, in Taiwan. *Marine Biology*, **133**, 21-28.
- Zardoya R, Costas E, Lopez-Rodas V, Garrido-Pertierra A, Bautista JM (1995) Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **41**, 637–645.
- Zibrowius H (1980) Les scleractiniales de la mediterranee et de l'atlantique nord-oriental. *Memoires de l'Institut Oceanographique (Monaco)*. pp 1-284.
- Zibrowius H (1983) Nouvelles données sur la distribution de quelques scleractiniales "méditerranéens" à l'est et à l'ouest du détroit de Gibraltar. *Rapports et Procès-Verbaux des Reunions Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Mediterranee Monaco*, **28**, 307-309
- Zibrowius H (1995) The southern *Astroides calycularis* in the Pleistocene of the Northern Mediterranean-an indicator of climatic changes (Cnidaria, Scleractinia). *Geobios*, **28**, 9 -16.
- Zubillaga AL, Márquez LM, Cróquer A, Bastidas C (2008) Ecological and genetic data indicate recovery of the endangered coral *Acropora palmata* in Los Roques, Southern Caribbean. *Coral Reefs*, **27**, 63-72.

Anexos

Anexo I

Astroides calycularis, del embrión a la colonia.



Detalles de diferentes etapas de la formación de una colonia (morfología “masiva”) en Punta de la Mona (Almuñecar, Granada)

- A. Embriones en el interior del celenterón, vitelo enriquecido en vesículas (posiblemente de naturaleza lipídica)
- B. Planulas en el interior de tentáculos (*)
- C. Plánulas “reptantes” en el sustrato y pólipos recién asentados
- D. Detalle de plánula
- E. Creación del esqueleto calcáreo de un pólipo asentado
- F. Reproducción asexual por gemación para dar lugar a la colonia
- G. Formación de nuevos pólipos en el interior de una colonia
- H. Colonia morfología “masiva”

Anexo II

Identification of *Symbiodinium* sp. clade of the alien scleractinian coral *Oculina patagonica* (De Angelis 1908): redefining the prevalent clade at the Mediterranean Sea

Abstract

The genus *Symbiodinium* is diverse and many scleractinian corals are relatively flexible in the type(s) of algal they contain, although one type is usually dominant in any given species and environment. In general, each clade includes a diversity of genetic “types” that exhibit distinctive biogeographical, ecological and host-specific patterns and can be usually differenced by different molecular techniques (ITS, rRNA sequencing, DGGE, etc.). At the moment, only the Temperate A clade has been described at different cnidarians species in the Mediterranean Sea. The lonely species that has been found as hosting a different clade is the sea anemone *Bunodeopsis strumosa*, an endemic Mediterranean species of ancient tropical origin, frequently found in lagoons with variable temperature and salinity, that hosts *Symbiodinium* Clade B. *Oculina patagonica* is a scleractinian species that has been cited as a Mediterranean alien species. In this study and with the use of LSU markers, it is showed that the alien coral *O. patagonica*, host *Symbiodinium* clade B supported by Bayesian, Maximum Parsimony (MP) and Maximum Likelihood analyses (ML) (Bayesian posterior probabilities 1; Bootstrap ML and MP values 100%). A more in detail study with the use of ITS *Symbiodinium* specific markers, approximates the clade of the species to B2, but with less than 95% bootstrap probabilities under the ML and MP analyses, and less than 70 posterior probabilities under the Bayesian analysis. Therefore it could be possible that, even though there is the chance of this symbiont belonging to Clade B2, some modifications were fixed since the divergence and isolation of this variant in the Mediterranean Sea.

Introduction

A lot of members of Cnidaria phylum have a symbiotic relation with photosynthetic dinoflagellates belonging to *Symbiodinium* (Freudenthal 1962) genus (Trench 1993). Those microalgae are also known as zooxanthellae, and they do contribute to host nutrition by providing it of fixed carbon, meanwhile the host provide those cells of inorganic nutrients, a high-light environment, and refuge from herbivory (Weis et al 2001). Most of the scleractinian species that have those algal cells as symbionts, have reduced growth, survivorship and fitness in the absence of the symbiosis (Brown 1997). The genus *Symbiodinium* includes numerous evolutionary lineages, also namely clades (A through H) (Baker, 2003; Coffroth & Santos 2005). In general, each clade includes a diversity of genetic “types” that exhibit distinctive biogeographical, ecological and host-specific patterns and are usually differentiated by different molecular techniques (ITS, rRNA sequencing, temperature gradient gel electrophoresis (DGGE), etc.). However, it is difficult to generalize about the specificity of algal clades and host taxa, in part because the study of zooxanthellae diversity is still on its beginnings.

Symbiont distributions in scleractinian corals vary in different parts of the world (Baker & Rowan 1997). Some symbiont taxa are widely distributed, both among different hosts and across geographic regions (Loh et al. 2001; Rodriguez-Lanetty & Hoegh-Guldberg 2003), whereas other taxa show high host specificity or appear regionally endemic (Baillie et al. 2000; Baker 1999; LaJeunesse et al. 2003; Santos et al. 2003). Community-level surveys of *Symbiodinium* in scleractinian corals have shown that members of *Symbiodinium* A, B, and/or F are more common at higher latitudes worldwide, with *Symbiodinium* C more abundant in tropical latitudes (Savage et al. 2002).

At the moment, only the Temperate A clade has been described at different species of cnidarians species in the Mediterranean Sea. The lonely species that has been seen as hosting a different clade is the sea anemone *Bunodeopsis strumosa*, an endemic Mediterranean species of ancient tropical origin, frequently found in lagoons with variable temperature and salinity that has been reported as host of *Symbiodinium* Clade B (Visram 2006). As it is mentioned by Visram et al. (2006) the appearance at the Mediterranean of *Symbiodinium* clades different than temperate A, could have been facilitated by human activity (e.g. navigation, Suez Canal opening, etc.), and extension of the species distribution ranges due to effects of climate change.

Cladocora caespitosa and *Oculina patagonica* are the two only Mediterranean scleractinian corals characterized by being hermatypic and modular. The former species is endemic to the Mediterranean Sea, while *O. patagonica* has been cited as a Mediterranean alien species. Transoceanic transport of planula of the species as a fouling organism via the Strait of Gibraltar to the western Mediterranean (first Spain, then Italy) has been considered to be the most probable means of introduction (Zibrowius 1974). Anyway, the origin of the species is still dubious.

Thus, this study was elaborated in order to i) corroborate the presence of Clade temperate A in *C. caespitosa* from an area different than the one studied by Visram et al. (2006) and ii) to characterize of the symbiont that *O. patagonica* hosts and unveil any differences with the study done by Visram et al. (2006).

Material and methods

Zooxanthellae DNA was isolated from ethanol fixed samples of *O. patagonica* and *C. caespitosa* following a modified protocol from Coffroth et al. (1992). One specimen from *C. caespitosa* from the locality of Columbretes Island and four specimens of *O. patagonica* corresponding with different localities (Murcia, Castellón and Tarragona) around the Iberian coasts were used for this study. Molecular variation was detected by polymerase chain amplification (PCR) of the LSU rRNA with primers 24D15F1 and 24D2R1 (Baker et al. 1997) and ITS1-5.8S-ITS2 region using primers ZITSUPM13 and ZITSDNM13 (Santos et al. 2001), under their correspondent reaction conditions. After PCR product amplification by ethanol/sodium acetate or by cutting bands, samples were cycle-sequenced using the ABI Prism BigDye Terminator, and subsequently run on a ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Phylogenetic analysis

DNA sequences were edited using SEQUENCHER 4.6 (Gene Codes) and aligned using Mafft (Katoh et al. 2002) and further revised by eye in SE-AL v2.0a11 (Rambaut 1996). Phylogenies were constructed using three different approaches.

The evolutionary molecular models that best fitted the data sets were determined using JModelTest (Posada 2008) under Bayesian criterion (BIC). Phylogenetic reconstructions were obtained using the Bayesian-inference (BI), maximum-parsimony (MP) and Maximum Likelihood (ML) methods. Bayesian

analyses were performed using MRBAYES v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), with two independent runs of four Metropolis-coupled chain with 5 000 000 generations each, to estimate the posterior probability distribution. Burn-in was determined after looking for the likelihood stability (usually around 10%). Parsimony procedures were performed through a heuristic search using PAUP* v4.0b10 (Swofford 2000). Maximum-likelihood analyses were conducted in PHYML v2.4.4. (Guindom & Gascuel 2003), using the evolutionary model selected by JModelTest v3.7. The robustness of the MP and ML inferred trees was tested by nonparametric bootstrapping (Bs) (Felsenstein 1985), with 1000 pseudoreplicates in each case. Bayesian posterior probabilities (BPPs) were used as a measure of the robustness of Bayesian trees.

Results and discussion

In this study and with the use of ITS and 28S markers, it is showed that, while *Symbiodinium* type A appeared as the symbiont of the native *Cladocora caespitosa*, as previously reported, the alien species *Oculina patagonica*, hosts *Symbiodinium* clade B2. With the highlight of the species to belong to a different site than the Mediterranean Sea. The LSU gene phylogeny identifies this symbiont as belonging to Clade B with 100% bootstraps of the Maximum-likelihood and parsimony analyses (Fig. 1). It is the first time that rDNA internal transcribed spacer region (ITS) is sequenced for *Cladocora caespitosa* (Fig. 2).

The analysis of the complete rDNA internal transcribed spacer region (ITS) and ITS2 regions, defined the Clade that *O. patagonica* hosts as close to Clade B2, but with less than 95% bootstrap probabilities under the ML and MP analyses, and less than 70 posterior probabilities under the Bayesian analysis (Fig. 2 and Fig. 3)). Therefore showing that, even though there is the possibility of this symbiont belonging to Clade B2, some modifications were fixed in the Mediterranean cluster.

Symbiodinium ITS2 type B2 represents a cold-tolerant lineage able to survive conditions inhospitable to most other *Symbiodinium* species. This type, has been previously reported only from northerly coral reefs habitats of the western Atlantic, including the Florida Keys and Bermuda (LaJeunesse 2001, Santos et al. 2001, Savage et al. 2002).

An experimental study conducted by Thornhill et al. (2008), concluded that while *Symbiodinium* type B2 remained only minimally functional at temperatures as low as 10°C, it rapidly recovered upon warming. Therefore, assuming the same

behavioral pattern in hospite??, this symbiont could remain photosynthetically inactive throughout the colder months of the year, persisting without making a major contribution to the nutrition of the host. During the warm season, the species likely increase its photosynthetic function and therefore would contribute more actively to its host's calcification and growth. The ability of this clade to survive extended periods of cold temperature stress and rapidly return to normal photosynthetic function when permissive conditions recur is undoubtedly critical for their survival in temperate environments and may play a key role shaping temperate coral communities (Jacques et al. 1983, Dimond and Carrington 2007).

The colonization of the Mediterranean basin by *Symbiodinium* clades different than Temperate A, is suggested to be facilitated by human activities and extension of the latitudinal limits of distributions associated with anthropogenic climate change. Following the possible dispersion route of the symbiont, the existence and origin of *O. patagonica* could also be estimated. More detailed studies both on symbionts and *Oculina* spp. in the area of northwestern Atlantic might clarify the alien origin of the genus in the Mediterranean Sea, and the divergences found may also be useful to estimate the time of such invasion, confirming a natural or human mediated biota transfer.

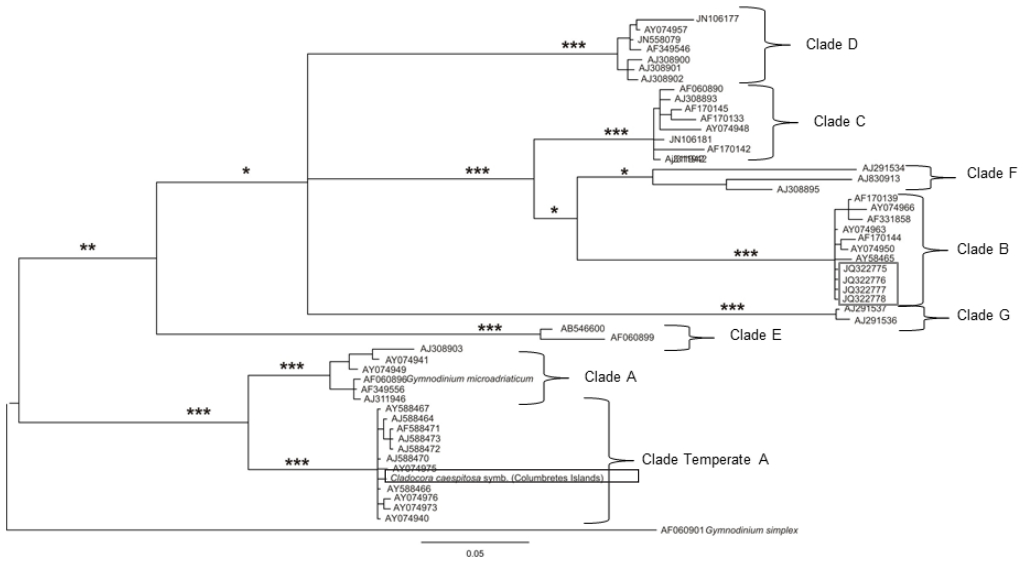


Figure 1. Phylogenetic tree of *Symbiodinium* LSU rRNA gene sequences. Labels indicate GenBank accession, open keys indicate clade groupings. Sequences from *Symbiodinium* of *O. patagonica* and *Cladocora caespitosa* are highlighted on a black square. ***BPP=1 and $Bs \geq 95$; ** BPP=1 and $Bs < 85$; *BPP<0.65 and BVs<50.

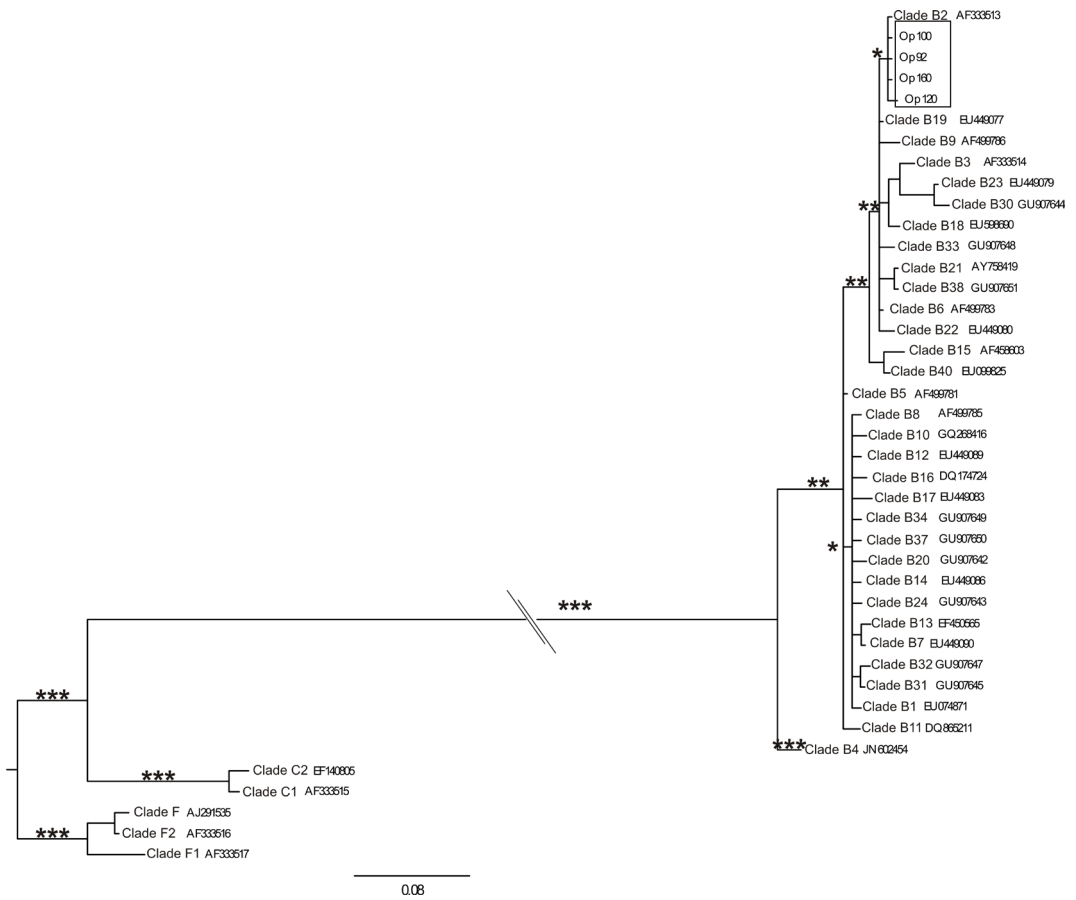


Figure 3. Phylogenetic tree of *Symbiodinium* ITS2 gene sequences. Labels indicate GenBank accession, open keys indicate clade groupings. Sequences from *Symbiodinium* of *O. patagonica* are highlighted on a black square. ***BPP=1 and Bs \geq 75; ** BPP>0.80 and Bs \geq 50; *BPP>60 and Bs>50.

References

- Baillie BK, Belda-Baillie CA, Marayuma T (2000) Conspecificity and Indo-Pacific distribution of *Symbiodinium* genotypes (Dinophyceae) from giant clams. *Journal of Phycology*, **36**, 1153-1161.
- Baker A, Rowan R (1997) Diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) in scleractinian corals of the Caribbean and eastern Pacific. Proceedings of the eight international symposium, Panama. June 24-29, 1996. Pp1301-1305.
- Baker AC (1999). The Symbiosis Ecology of Reef-Building Corals. Ph.D.dissertation. University of Miami, Miami, FL. 120 pp.
- Baker AC (2003) Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, ecology and biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **34**, 661-689.
- Coffroth MA, Santos SR (2005) Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist*, **156**, 19-34.
- Dimond, J. & Carrington, E. 2007. Temporal variation in the symbiosis and growth of the temperate scleractinian coral *Astrangia poculata*. *Marine Ecology Progress Series*, **348**,161-72.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
- Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **5**, 696-704.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**,754-755.
- Jacques, T. G., Marshall, N. & Pilson, M. E. Q. 1983. Experimental ecology of the temperate scleractinian *Astrangia danae*. II. Effect of temperature, light intensity and symbiosis with zooxanthellae on metabolic rate and calcification. *Marine Biology*, **76**,135-48.
- Katoh Kazutaka, Misawaka Kazuharu, Kuma Kei-ichi, Miyata Takashi (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acid Research*, **30**, 3059-3066.
- LaJeunesse T, Trench RK (2000) Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Biological Bulletin*, **199**, 126-134.
- LaJeunesse TC (2001). Investigating the biodiversity, ecology and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a "species" level marker. *Journal of Phycology*, **37**,866-880.
- LaJeunesse T, Loh WKW, vanWoesik R, Hoegh-Guldberg o, Schmidt GW, Fitt WK (2003). Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals relative to those of the Caribbean. *Limnology and Oceanography*, **48**, 2046-2054.
- Loh WKW, Loi T, Carter D, Hoegh-Guldberg O (2001) Genetic variability of the symbiotic dinoflagellates from the wide ranging coral species *Seriatopora*

- hystrix and *Acropora longicuathus* in the Indo-West Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, **222**, 97-107.
- Posada D (2008). JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Ecology and Evolution*, **25**, 1253-1256.
- Rambaut A (2002) Se-AL: sequence Alignment Editor, ver. 2.0a11. URL:<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal>.
- Rodriguez-Lanetty M, Hoegh-Guldberg O (2003) Symbiont diversity within the widespread scleractinian coral *Plesiastrea versipora*, across the northwestern Pacific. *Marine Biology*, **143**, 501-509.
- Rowan R, Powers DA (1991) Molecular genetic identification of Symbiotic dinoflagellates (Zooxanthellae). *Marine Ecology Progress Series*, **71**, 65-73.
- Santos SR, Taylor DJ, Coffroth MA (2001). Genetic comparisons of freshly isolated vs. cultured symbiotic dinoflagellates: Implications for extrapolating to the intact symbiosis. *Journal of Phycology*, **37**, 866-880.
- Santos SR, Taylor DJ, Kinzie RA, III, Hidaka M, Sakai K, Coffroth AM (2002) Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **23**, 97-111.
- Savage AM, Goodson MS, Visram S, Trapido-Rosenthal H, Wiedenmann J, Douglas AE (2002). Molecular diversity of symbiotic algae at the latitudinal margins of their distribution: dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* in corals and sea anemones. *Marine Ecology Progress Series*, **244**, 17-26.
- Swofford DL (1998). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other Methods). Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tornhill DJ, Kemp DW, Bruns U (2008). Correspondence between cold tolerance and temperate biogeography in a western Atlantic *Symbiodinium* (Dinophyta) lineage. *Phycological Society of America*, **44**, 126-1135.
- Trench RK (1993) Microalgal-invertebrate symbioses- a review. *Endocytobiosis and cell research*, **9**, 135-175.
- Visram S, Wiedenmann J, Douglas AE (2006). Molecular diversity of symbiotic algae of the genus *Symbiodinium* (Zooxanthellae) in cnidarians of the Mediterranean Sea. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, **86**, 1281-1283.
- Weis VM, Reynolds WS, deBoer MD, Krupp DA (2001) Host-symbiont specificity during onset of symbiosis between the dinoflagellates *Symbiodinium* sp. and planula larvae of the scleractinian coral *Fungia scutaria*. *Coral Reefs*, **20**, 301-308.
- Zibrowius H (1974) *Oculina patagonica*, scleractiniaire hermatypique introduit en Méditerranée. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, **26**, 153-173.

