

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES
DEL COMPLEJO DE ESPECIES DE *Cnemidocarpa verrucosa*
(TUNICATA, ASCIDIACEA), DE PENÍNSULA ANTÁRTICA Y
SUDAMÉRICA.**

POR

Biól. Micaela Belén Ruiz
IDEA (CONICET-UNC)

DIRECTORES

Dr. Ricardo Sahade
IDEA (CONICET-UNC)

Dr. Christoph Held
AWI



FACULTAD DE CIENCIAS EXÁCTAS FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina 2021

COMISIÓN ASESORA DE TESIS

Alejandra Rumi Macchi Zubiaurre
Facultad de Ciencias Naturales y Museo (CONICET-UNLP)

Andrea Cosacov
IMVIB (CONICET-UNC)

Resolución nº 1779

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL EVALUADOR

Firma: _____ Aclaración: _____

Firma: _____ Aclaración: _____

Firma: _____ Aclaración: _____

Agradecimientos

A mis directores, por su guía en este proceso, cada uno desde sus fortalezas y debilidades, me han enseñado esto de ser científica.

To Andrea Eschabach my German mum, always there, in the lab but also in life, and Doris Abele, who guided me with her passion and talent.

A Natalia Servetto, Luciana Torre y Mariano Martínez, que han cumplido un excelente rol de guías y compañeros en mi doctorado.

A mis amistades, esparcidas por el mundo, que siempre me acompañan en cada paso.

A mi mamá y mi papá, que me impulsaron a seguir mis más grandes sueños.

A Santi, mi compañero, que me apoyó en el último tramo de la tesis, con lo que eso implica.

A mi abuela Chocha, que siempre me deseó viajes, experiencias, y aventuras, que me apoyó a por más y mejor, y que siempre la llevo conmigo.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Ruiz, M. B., Taverna, A., Servetto, N., Sahade, R., & Held, C. (2020). Hidden diversity in Antarctica: Molecular and morphological evidence of two different species within one of the most conspicuous ascidian species. *Ecology and evolution*, 10(15), 8127-8143.

Ruiz, M. B., Servetto, N., Alurralde, G., Abele, D., Harms, L., Sahade, R., & Held, C. (in prep). Molecular responses of a key Antarctic species to sedimentation due rapid climate change.

Servetto, N., Ruiz, M. B., Harms, L., Martínez, M., Held, C., Abele, D., & Sahade, R. (in prep). Southern Ocean Acidification impacts: calcifying vs non-calcifying species.

ÍNDICE

Resumen	9
---------	---

Capítulo 1: La ascidia *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato*, una especie clave en el ensamble bentónico antártico

1.1. Introducción general	11
1.2. Hipótesis generales	13
1.3. Objetivo general	13
1.4. Objetivos específicos	14

Capítulo 2: Dos especies y algo más

2.1. Introducción	15
2.2. Materiales y métodos	16
2.2.1. Análisis molecular	16
2.2.1.1. Muestreo	16
2.2.1.2. Extracción de ADN, secuenciación y alineamiento	17
2.2.1.3. Análisis filogenéticos	18
2.2.2. Análisis morfológico	20
2.3. Resultados	21
2.3.1. Análisis moleculares	21
2.3.1.1. Generalidades	21
2.3.1.2. Delimitación de especies	22
2.3.1.3. Análisis filogenéticos y estimación del tiempo de divergencia	22
2.3.2. Análisis morfológico	25
2.4. Discusión	28
2.4.1. Dos especies genéticamente diferentes	28
2.4.2. Dos especies morfológicamente distinguibles	30
2.4.3. Dos especies en simpatria	32
2.4.4. Patrón incongruente entre el gen mitocondrial y el nuclear	33
2.4.5. Tiempo y modo de especiación	34
2.5. Conclusiones	35

Capítulo 3: Genética de poblaciones e inferencias históricas de dos unidades evolutivas

3.1. Introducción	37
3.2. Materiales y métodos	38
3.2.1. Análisis de la diversidad genética, estructuración espacial y genealogía de haplotipos de los marcadores COI y 18S	38
3.2.1. Inferencias demográficas históricas	39
3.3. Resultados	40
3.3.1. Diversidad genética, estructuración espacial y genealogía de haplotipos de los marcadores COI y 18S	40
3.3.2. Inferencias demográficas históricas	44

3.4. Discusión	47
3.4.1. Inesperada estructura genética de las poblaciones	47
3.4.2. Reconstrucción de procesos demográficos: expansión y estabilidad	48
3.5. Conclusiones	51

Capítulo 4: Una aproximación a la respuesta a cambios en el Océano Antártico: Acidificación y Sedimentación

4.1. Introducción	53
4.2. Materiales y métodos	57
4.2.1. Experimentos	57
4.2.1.1. Experimento de Sedimentación	58
4.2.1.2. Experimento de Acidificación	58
4.2.2. Preparación de las librerías y secuenciación Illumina	60
4.2.3. Análisis bioinformático	62
4.2.4. Complementación con mediciones de enzimas	63
4.3. Resultados y discusión	65
4.3.1. Secuenciación y control de calidad	65
4.3.2. Análisis de expresión diferencial de los transcriptomas	66
4.3.3. Anotación y categorización de genes en respuesta a la sedimentación y a la acidificación	68
4.3.4. Vías activadas / desactivadas como respuesta a la sedimentación	73
4.3.4.1. Apoptosis	73
4.3.4.2. Transducción de señales	74
4.3.4.3. Respuesta inmune	75
4.3.4.4. Traducción y replicación / reparación de ADN	76
4.3.4.5. Movilización de energía	76
4.3.5. Mediciones de caspasa y superóxido dismutasa en respuesta a la sedimentación	77
4.3.6. Respuesta molecular a la sedimentación	79
4.3.7. Vías activadas / desactivadas como respuesta a la acidificación	81
4.3.7.1. Apoptosis	82
4.3.7.2. Respuesta inmune	83
4.3.7.3. Traducción y replicación / reparación de ADN	84
4.3.7.4. Metabolismo de lípidos	85
4.3.7.5. Sistema antioxidante	86
4.3.8. Mediciones de caspasa y superóxido dismutasa en respuesta a la acidificación	87
4.3.9. Respuesta molecular a la acidificación	88
4.4. Conclusiones: diferencias y similitudes entre las respuestas a la sedimentación y acidificación	91

Capítulo 5: Perspectivas de un patrón genético del pasado nos ayudan a entender respuestas del cambio climático del futuro

5.1. El escenario en el pasado	95
5.2. El escenario en el presente	96
5.3. El escenario en el futuro	97

Literatura citada	101
-------------------	-----

Figuras y tablas

Figura 2.1. Distribución de las estaciones muestreadas	17
Figura 2.2. Frecuencia de la divergencia de a pares de las secuencias COI y 18S	22
Figura 2.3. Árboles filogenéticos obtenidos con Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana	24
Figura 2.4. Escalamiento multidimensional no métrico de caracteres morfológicos	26
Figura 2.5. Fotos	27
Figura 2.6. Distribución de las putativas especies crípticas	30
Tabla 3.1. Estaciones de muestreo, profundidad, y análisis de polimorfismo de sp. A	40
Tabla 3.2. Estaciones de muestreo, profundidad, y análisis de polimorfismo de sp. B	41
Figura 3.1. Red de haplotipos del gen mitocondrial COI	42
Figura 3.2. Análisis de aislamiento por distancia	42
Figura 3.3. Red de ribotipos del gen nuclear 18S	43
Figura 3.4. <i>Skyline-plot</i>	45
Tabla 3.3. Análisis de <i>mismatch</i> para <i>C. verrucosa</i> sp. A	46
Tabla 3.4. Modelo de expansión geográfica del análisis de <i>mismatch</i>	47
Tabla 4.1. Condiciones físico-químicas del agua para el experimento de acidificación	59
Figura 4.1. Esquema de trabajo de los experimentos de sedimentación y acidificación	61
Tabla 4.2. Estadísticas de lecturas de RNA-seq antes y después del filtrado	65
Tabla 4.3. Transcritos obtenidos luego del ensamblado <i>de novo</i> y alineamiento	66
Tabla 4.4. Genes expresados diferencialmente y anotados	66
Figura 4.2. <i>Heatmap</i> de genes diferencialmente expresados	67
Figura 4.3. Porcentaje de términos GO de la categoría procesos biológicos	68
Figura 4.4. Porcentaje de términos GO de la categoría componente celular	69
Figura 4.5. Porcentaje de términos GO de la categoría función molecular	70
Figura 4.6. <i>TreeMap</i> de términos GO enriquecidos, herramienta REVIGO	71
Figura 4.7. Representación esquemática de los genes y vías involucradas en respuesta a la sedimentación	77
Figura 4.8. Mediciones de caspasa y superoxidodismutasa en respuesta a la sedimentación	78
Figura 4.9. Representación esquemática de los genes y vías involucradas en respuesta a la acidificación	87
Figura 4.8. Mediciones de caspasa y superoxidodismutasa en respuesta a la acidificación	88

Material suplementario

Tabla 1. Análisis FST para <i>Cnemidocarpa verrucosa</i> sp. A	141
Tabla 2. Análisis FST para <i>Cnemidocarpa verrucosa</i> sp. B	142
Figura 1. Mapa de Haplotipos del gen mitocondrial COI	142
Figura 2. Mapa de Ribotipos del gen nuclear 18S	143

Tabla 3. Categorías de ontología de genes para el experimento de sedimentación	144
Tabla 4. Categorías <i>Reconstruct Pathway</i> (KEGG) para el experimento de sedimentación	151
Tabla 5. Categorías de ontología de genes para el experimento de acidificación	158
Tabla 6. Categorías <i>Reconstruct Pathway</i> (KEGG) para el experimento de acidificación	166

RESUMEN

La Antártida y su océano han estado aislados efectivamente del resto de océanos y continentes del planeta por más de 20 millones de años. El Océano Austral es uno de los ecosistemas marinos más diversos y ricos, compuesto por un ensamble biótico adaptado a condiciones sumamente estables y extremas de vida. Sin embargo, en los últimos 60 años la Península Antártica ha experimentado una de las más altas tasas de calentamiento regional del planeta, superando incluso a cualquier período interglaciar del Pleistoceno. Este calentamiento ha tenido efectos muy marcados en la criósfera, registrándose colapsos de barreras, disminución del hielo marino y una marcada retracción de glaciares. Comprender cómo la biodiversidad antártica respondió a los cambios climáticos pasados, nos ayudará a predecir su respuesta a cambios del clima en el futuro. La reciente y rápida difusión de las técnicas basadas en la genómica en las ciencias ecológicas y evolutivas ha aumentado nuestra capacidad para explorar y comprender los efectos históricos y contemporáneos del cambio climático en la diversificación, la historia demográfica, y la adaptación de la biodiversidad antártica. La ascidia *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato*, es una especie muy abundante y de gran distribución en la plataforma Antártica, resulta así, un buen modelo para el estudio de procesos que afectan al sistema bentónico. Es así que el objetivo de esta tesis es estudiar los patrones filogeográficos en el Océano Antártico, para analizar los procesos históricos que determinaron las distribuciones actuales de la fauna bentónica, como así también predecir cuál va a ser la respuesta a factores ligados al cambio climático predicho para el futuro; utilizando como modelo de estudio a *Cnemidocarpa verrucosa*.

La primera aproximación de esta tesis fue evaluar la posible existencia de entidades crípticas dentro de la hoy llamada *Cnemidocarpa verrucosa*, mediante la evaluación de la genética (marcadores COI y 18S) y la morfología. Encontramos así, dos especies y algo más, ya que la distribución de la distancia genética sugirió la existencia de, al menos, dos especies dentro de *C. verrucosa sensu lato* (*C. verrucosa* sp. A y *C. verrucosa* sp. B); además, la presencia de disco basal en uno de los genotipos podría ser un rasgo morfológico diagnóstico para diferenciar las especies. Luego, se describió la estructura genética de las poblaciones en estudio; y se realizaron inferencias de los procesos históricos que la determinaron. Así, *C. verrucosa* sp. A presentó poblaciones estructuradas genéticamente, estructura no relacionada con la distancia geográfica entre las poblaciones; asimismo, la especie sufrió una expansión demográfica luego del último máximo glacial. Por otro lado, *C. verrucosa* sp. B presentó poblaciones sin estructura genética y estabilidad demográfica. Por último, al analizar las respuestas a estresores vinculados al exceso de CO₂ atmosférico, acidificación y sedimentación mediante un análisis transcriptómico y enzimático de la respuesta de *C. verrucosa* sp. A a tales factores. Se encontró que la especie responde de manera diferente al estrés por sedimentación y acidificación, activando en el primer caso una respuesta de depresión metabólica, mientras que a niveles de pH ácido la ascidia activó la típica respuesta de estrés. Esto podría indicar una adaptación a altas concentraciones de sedimentos en agua, y no así a niveles bajos de pH. Finalmente, se realizó una discusión acerca de las perspectivas del patrón genético del pasado, para poder entender respuestas del cambio climático del futuro de la conspicua *C. verrucosa sensu lato*.

CAPÍTULO I: La ascidia *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato*, una especie clave en el ensamble bentónico antártico

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Impulsado por una fuerte disminución del CO₂ atmosférico en el límite del Eoceno / Oligoceno y la apertura del Pasaje de Drake, el Frente Polar Antártico junto a la Corriente Circumpolar Antártica (CCA) han estado funcionando como una barrera geográfica, climática, térmica y oceanográfica entre el Océano Austral (OA) y los demás océanos, constituyendo la barrera biogeográfica más efectiva del planeta (Martinson, 2012; Pollard & DeConto, 2009; Rintoul et al., 2001). Este aislamiento permitió el progresivo y rápido enfriamiento de la Antártida y el OA que desarrolló una biota particular con escasa conexión con el resto de los océanos y un importante proceso de evolución *in situ* (Cristini et al., 2012; Hewitt, 2004a, 2004b; Petit et al., 1999; Soler-Membrives et al., 2017). En consecuencia, el Océano Austral presenta un ecosistema caracterizado por un alto número de endemismos y alta diversidad, comparable a la de sistemas templados y tropicales. De hecho, esta característica hace que no se verifique un gradiente de diversidad en el hemisferio sur como el que se registra en el hemisferio norte. La biota del OA se ha desarrollado por más de 15 a 20 millones de años (Ma) en un ambiente estable con marcados picos de ingreso de energía en verano y bajas y constantes temperaturas. Los períodos glaciales e interglaciales que se sucedieron luego del Mioceno generaron fundamentalmente una oscilación en el alcance de las barreras de hielo, permitiendo que la biota se refugiara a mayores profundidades o en áreas que no se congelaron totalmente generando refugios aislados entre si durante los períodos glaciales. Esto pudo haber generado una fragmentación e incrementado el proceso de especiación (Allcock & Strugnell, 2012; Halanych & Mahon, 2018; Rogers, 2007). Sin embargo, la Península Antártica ha experimentado una de las más altas tasas de calentamiento regional del planeta en las últimas décadas. Este calentamiento ha producido una masiva pérdida de hielo marino, barreras y glaciares (Cook et al., 2005, 2016; Stammerjohn et al., 2012). Estos procesos producen grandes alteraciones en las condiciones físico-químicas del agua (turbidez, salinidad, pH, etc.) y aumentan la perturbación de ecosistemas antárticos, particularmente a través de la pérdida de la diversidad, biomasa y generando cambios en la estructura de los ensambles bióticos (Sahade et al., 2015). Comprender cómo la biodiversidad antártica respondió a los cambios climáticos pasados, nos ayudará a predecir su reacción a cambios del clima en el futuro. La reciente y rápida difusión de las técnicas basadas en la genómica en las ciencias ecológicas y evolutivas ha aumentado nuestra capacidad para explorar y comprender los efectos históricos y contemporáneos del

cambio climático en la diversificación, la historia demográfica y la adaptación de la biodiversidad antártica (Beheregaray & Caccone, 2007; Croucher et al., 2009; Palumbi, 1994). Dichos avances nos ayudan a comprender la respuesta y la capacidad de recuperación de la biota antártica y sub-antártica frente a los desafíos del cambio climático y ambiental, y por lo tanto a predecir alteraciones en escenarios a futuro.

Estudios moleculares sugieren que eventos ocurridos en los últimos 70 Ma dieron como resultado la fragmentación y vicarianza (por deriva continental y aislamiento térmico) de las poblaciones gondwánicas. Algunas poblaciones se desarrollaron en refugios y otras se extinguieron. Luego, cada población sufrió deriva génica y, una vez fuertemente seleccionadas para las condiciones ambientales nuevas, la especiación alopátrica fue la norma (Hewitt, 2004; Rogers, 2007). En algunos casos las nuevas especies se expandieron, y experimentaron contacto secundario durante los ciclos interglaciares del Mioceno en adelante. La disposición limitada de hábitats jugó un rol importante en la estructuración de las poblaciones, generando muchas veces, especies geográficamente estructuradas con linajes genéticamente diferentes, radiación, e incluso complejos de especies crípticas (Clarke et al., 2004; Cornils & Held, 2014; Gili et al., 2006; Held & Wägele, 2005; Rogers, 2007).

La fauna bentónica antártica de plataforma, se caracteriza por la falta de grandes predadores durófagos, y la dominancia de epifauna sésil filtradora fijada al sustrato (Clarke et al., 2004; Gili et al., 2006). Estas comunidades mientras más someras, se encuentran más afectadas por factores ambientales como el disturbio de hielo, turbidez, salinidad, etc., donde los organismos dominantes son en general esponjas, anémonas, ascidias, gorgónidos, hidrozoos, briozoos, cirripedios, crinoideos, y corales que se desarrollan hasta profundidades de 300-500 m (Gambi et al., 2000; Gutt, 2000). Se han descrito numerosas especies crípticas en el Océano Antártico, esto es, especies genéticamente distintas que han sido previamente clasificadas como una sola especie dada su similitud en la morfología (Bickford et al., 2006; Held & Wägele, 2005; Held, 2003). Es así que, el número real de especies en Antártida ha de ser significativamente mayor a la descripta hasta el momento; donde se estima que especies aún no descriptas son una importante porción de la biodiversidad (Dömel et al., 2015; Galaska et al., 2017; Havermans et al., 2011; Riesgo et al., 2015; Wilson et al., 2007).

En las comunidades bentónicas antárticas las ascidias pueden ser un grupo importante, llegando incluso a ser los organismos dominantes (Gili et al., 2006; Sahade et al., 1998, 2015). El género *Cnemidocarpa* (Huntsman, 1913) es uno de los más ricos en especies antárticas y sub-antárticas, compuesto por más de 10 especies descriptas (Monniot & Monniot, 1983). *Cnemidocarpa verrucosa* (Lesson, 1830) (Chordata, Tunicata) es el estiélido más grande y abundante del Océano Antártico. Puede

habitar fondos rocosos o lodosos, y profundidades entre 5 y 770 m (Monniot et al., 2011; Ramos-Esplá et al., 2005; Tatián et al., 1998). *Cnemidocarpa verrucosa* es una ascidia solitaria, libera sus larvas lecitotróficas al agua y tiene una fuerte estacionalidad en la reproducción (Bowden et al., 2009; Sahade et al., 2004; Strathmann et al., 2006). Esta especie fue descrita inicialmente en las Islas Malvinas por Lesson (1830), pero más tarde fue ampliamente reportada en la plataforma antártica y se considera que tiene una distribución tanto circumpolar como Subantártica (Herdman, 1881; Kott & Mather, 1969; Monniot & Monniot, 1983; Monniot et al., 2011; Sluiter, 1905; Turón et al., 2016b). Tanto en la descripción original como en otros manuscritos, *C. verrucosa* se reporta con una alta variabilidad de color, forma, y tamaño (Kott, 1971; Tatián et al., 2005; Turón et al., 2016).

1.2. HIPÓTESIS GENERALES

Cnemidocarpa verrucosa es un complejo de especies con al menos dos en la Península Antártica.

El complejo de especies de *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato*, experimentó ciclos de contracción y expansión de sus poblaciones, ligados a los ciclos glaciares e interglaciares que se sucedieron en la Península Antártica.

Cnemidocarpa verrucosa sensu lato presenta una respuesta activa frente a la variación de factores ambientales ligados al cambio climático y la acidificación del océano.

Predicción: *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato* mostrará un aumento en la expresión de genes relacionados al metabolismo energético y a la respuesta de estrés, ante el incremento de estas variables ambientales de cambio.

1.3. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este proyecto es estudiar patrones filogeográficos en el Océano Antártico, para analizar los procesos históricos que determinaron las distribuciones actuales de la fauna bentónica, utilizando como modelo de estudio a *Cnemidocarpa verrucosa* (Lesson, 1830). Asimismo, se plantea contribuir desde la perspectiva genómica a predecir cuál va a ser la respuesta de la especie frente al cambio climático futuro, contribuyendo así al conocimiento de perspectivas genéticas y genómicas sobre la biodiversidad antártica pasada y presente.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la posible existencia de entidades crípticas dentro de la especie hoy llamada *Cnemidocarpa verrucosa*, mediante la evaluación de marcadores genéticos y caracteres morfológicos.
2. Describir la estructura genética y demográfica de las poblaciones genéticas que se detecten y su patrón filogeográfico.
3. Inferir los procesos históricos que determinaron la estructura genética de las poblaciones en estudio.
4. Analizar la respuesta de *C. verrucosa* y de entidades crípticas, si se detectaran, frente a factores ambientales ligados a cambio climático, como incremento en la sedimentación, temperatura y acidificación, mediante la obtención de su transcriptoma y la medición de enzimas.

CAPÍTULO 2: Dos especies y algo más

2.1. INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de entender la evolución de la biodiversidad, es necesario reconocer especies. Existen diferentes definiciones de especie, un concepto unificado debe lidiar con el problema de la inferencia de los límites de las especies, y conceptos tales como especies crípticas o pseudo-crípticas que aún deben ser ampliamente discutidas. Es necesaria la implementación de un abordaje interdisciplinario que involucre tanto datos genómicos como atributos fenotípicos para tratar esta problemática (Heethoff, 2018; Struck et al., 2018). Algunos estudios moleculares han revelado complejos de especies crípticas en ascidias, tal son los casos de *Ciona intestinalis* (Caputi et al., 2007), *Botryllus schlosseri* (Bock et al., 2012; Nydam et al., 2017; Yund et al., 2015) y *Diplosoma listerianum* (Pérez-Portela et al., 2013). Sin embargo, solo una pequeña porción de Unidades Taxonómicas Moleculares Operacionales (MOTUS, por sus siglas en inglés) han sido verificadas utilizando caracteres morfológicos, por ejemplo, *Ciona intestinalis* (Brunetti et al., 2015).

La filogeografía se ocupa de principios y procesos que gobiernan las distribuciones geográficas de los linajes genéticos, especialmente aquellos entre especies cercanamente emparentadas (Avice, 2000). La estructura genética de una población se puede entender como la arquitectura genética de las especies (Gaffney, 2000) o distribución no aleatoria de la variación genética dentro y entre poblaciones (Slatkin, 1994). En este marco se intenta explicar cómo los procesos micro evolutivos que delinean la historia evolutiva de las especies generan los patrones que hoy caracterizan la estructura genética de las poblaciones (Avice, 2000; Beheregaray & Caccone, 2007; Palumbi, 1994).

Para describir la filogenia de una especie y su estructura genética, es necesario producir más de un árbol de genes independientes (Hewitt, 2001), para lo cual es obligatorio el uso de loci que presenten polimorfismo en la población. Existen diferentes métodos que puedan identificar polimorfismo en el ADN, desde marcadores universales (fragmentos altamente conservados en la mayoría de los taxa), hasta marcadores especie-específicos (Gaffney, 2000). El marcador molecular ideal debe poseer variabilidad, no estar ligado a otro locus, presentar herencia biparental y estar distribuido por todo el genoma (Held & Leese, 2007). Tradicionalmente se han utilizado marcadores universales (mitocondriales y nucleares) para estudios filogenéticos, dada su fácil identificación (Avice, 2000). Los marcadores mitocondriales han sido empleados en una gran cantidad de estudios filogeográficos por poseer ciertas ventajas (haploides, no recombinan, elevada tasa de mutación, gran número de copias por célula) (Hebert et al., 2003a, 2003b). Pero, la utilización de marcadores mitocondriales para la genética de poblaciones es limitado, ya

que presenta herencia materna y no se puede asumir que muestra una evolución neutral, debido a que todos sus genes se comportan como un único locus por la falta de recombinación (Ballard & Whitlock, 2004). Por esta razón los estudios con marcadores mitocondriales deben complementarse con la información de marcadores nucleares (Pérez-Portela & Turón, 2008) y marcadores hipervariables (Held & Leese, 2007). Además, el uso de regiones conservadas del ADN nuclear como marcador molecular provee una buena fuente de información filogenética por encima del nivel de especie, ya que están compartidas por un amplio rango de taxones (Gaffney, 2000; Hewitt, 2001). Los estudios de filogenia y filogeografía de ascidias han sido llevados a cabo principalmente mediante el uso del gen mitocondrial del citocromo c oxidasa I (COI) y el gen nuclear 18S rDNA (18S) (Pérez-Portela et al., 2009; Stach & Turbeville, 2002; Stefaniak et al., 2009; Tsagkogeorga et al., 2009).

El objetivo de este capítulo es evaluar la posible existencia de entidades crípticas dentro de la hoy llamada *Cnemidocarpa verrucosa* (objetivo específico 1). En este marco, es de interés también resolver si las posibles especies crípticas son morfológicamente diferenciables; como así también evaluar si las presuntas especies crípticas coocurren, y si es así, probar si la coocurrencia puede ser explicada por un proceso de contacto secundario. En relación con esto, en este capítulo también se abordará en parte el objetivo específico tres, inferir los procesos históricos que determinaron la estructura genética de las poblaciones en estudio, estudiando puntualmente el modo y tiempo de especiación.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Análisis molecular

2.2.1.1. Muestreo

El muestreo de las poblaciones de *C. verrucosa* para el análisis molecular se realizó en diferentes campañas: (a) *Mission Antartique*, a bordo del Sedna IV (2006); (b) la Campaña Antártica de Verano en Caleta Potter, Isla Rey Jorge (2007/2008); (c) la campaña BENTART-06, a bordo del “B.I.O. Hespérides” (2006); (d) la campaña ANT XXIX/3, a bordo del “R/V Polarstern” (2013); y (e) la campaña - PD BB abr 17, a bordo del “R/V A.R.A. Puerto Deseado”, en el Banco Burdwood / MPA Namuncurá 2017 (MPAN-BB). En las campañas a y b el muestreo se realizó mediante buceo, mientras que en las campañas c, d, y e, se realizó mediante Rastra Epibentónica o Red Piloto (ver profundidades de los nuestros en las tablas 3.1 y 3.2). Las estaciones de muestreo cubren un rango geográfico de 14° de latitud, desde Bahía Margarita, al sur de la Península Antártica, hasta las Islas Shetland del Sur, al norte de la Península; y

luego en el Banco Burdwood (Argentina) (ver distribución del muestreo en la figura 2.1). La nomenclatura de las estaciones sigue aquella establecida por el “SCAR *Composite Gazetteer of Antarctica*” (1992, updated 2020). Durante el muestreo, para la identificación de la especie se tomaron en cuenta las descripciones de Kott (1971), y Monniot & Monniot (1983). Se extrajo tejido del manto (de aproximadamente 1 cm³ de tamaño) de los individuos recolectados, y se conservó en etanol 97% (Sigma-Aldrich) hasta la extracción de ADN. No fue posible la recolección de animales enteros en el marco de los muestreos a, b, c, d, y e.

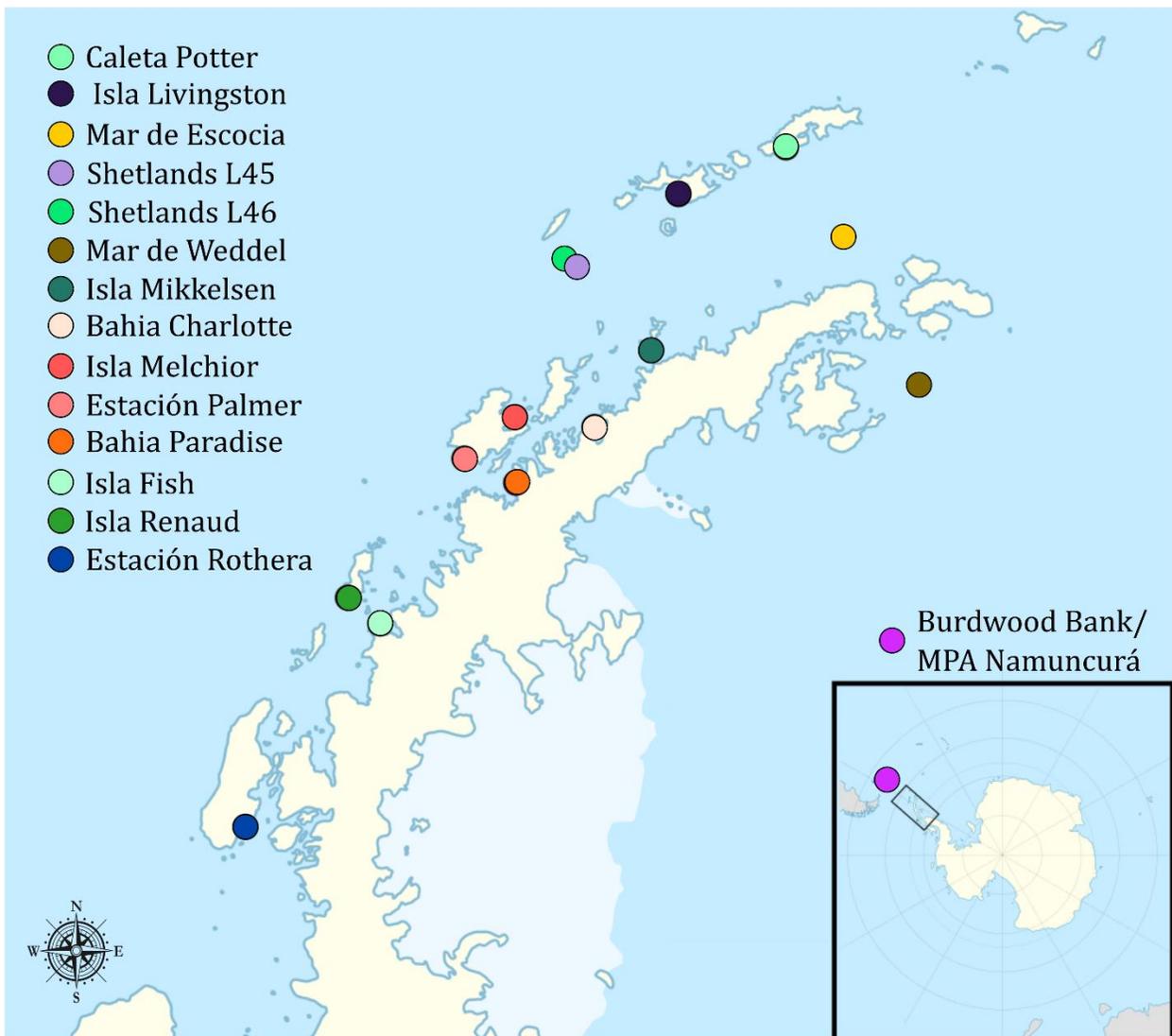


Figura 2.1. Distribución de las estaciones muestreadas en Sudamérica y Península Antártica.

2.2.1.2. Extracción de ADN, secuenciación y alineamiento

Para la extracción de ADN, se usó aproximadamente 25 mg de tejido muscular del manto, y se utilizó el protocolo de extracción para tejido del Kit DNeasy Mini Kit (Qiagen), utilizando un volumen de

elución final de 100 µl. Para evitar la contaminación con ADN de otros organismos o alimentos, la disección se llevó a cabo con fórceps y bisturís esterilizados, aislando el manto del resto de tejidos como intestino y túnica.

Para la determinación de especies crípticas, se analizó el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI); la amplificación se llevó a cabo con los cebadores para tunicados Tun_reverse2 (Rev) (Stefaniak et al., 2009) y Cve-CO1-F54 (Fwd) 5' AGTGTTTAAATTCGAACAGA 3', diseñado en este trabajo con el programa Geneious (Kearse et al., 2012); y el par de cebadores Deg COI F2 (Fwd) and Deg COI R2 (Rev) (Reem et al., 2017). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se realizó en un volumen final de 25 µl, usando 0,025 U/µl de Promega GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase, 30 ng de DNA, 0,5 µM de cada cebador, 2 mM de dNTP y 2 mM de MgCl₂. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, seguido por 36 ciclos de 60 s a 94°C, 50 s a 46°C, 50 s a 72°C, y un paso final de elongación de 8 min a 72°C. Por otro lado, se utilizó el gen nuclear 18S, el cual se amplificó con los cebadores para tunicados 18S1 (Fwd) y 18S4 (Rev) (Tsagkogeorga et al., 2009). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, usando 0,03 U/µl of TaKaRa LA Taq HS, 30 ng de ADN, 0,5 µM de cada cebador, 0,26 mM de dNTP y 0,05 mM de Betaina. El protocolo de amplificación consistió en un primer paso de desnaturalización de 1 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 10 s a 98°C, 50 s a 50°C, 2 min a 72°C, y un último paso de elongación de 10 min a 72°C. Los productos de la PCR fueron secuenciados en un secuenciador ABI3730 XL automático, utilizando para ambos marcadores el mismo par de cebadores descritos para la PCR (Eurofins MWG Operon, Alemania).

Las secuencias de nucleótidos fueron editadas y alineadas utilizando el algoritmo de Muscle, con el programa Code Code Aligner (v. 5.1.5, Codon Code Corporation). Las secuencias del marcador COI fueron traducidas a aminoácidos, luego se buscaron mutaciones de cambio de marco de lectura y codones *stop*, con el programa Code Code Aligner. Con el fin de descartar la amplificación de secuencias de nucleótidos que no pertenecieran a ascidias, se realizó una búsqueda "BLASTn" en GenBank.

2.2.1.3 Análisis filogenéticos

La delimitación de especies se llevó a cabo recurriendo a la versión online de "Automatic Barcode Gap Discovery", ABGD (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>), utilizando la distancia 2KP de Kimura. ABGD delimita una "brecha" (*barcode gap*) en la distribución de la diferencia de a pares entre las secuencias, esta brecha puede ser observada siempre y cuando la divergencia entre los organismos dentro de la misma especie es menor que la divergencia entre organismos de diferentes especies (Puillandre et al., 2012).

Para la reconstrucción filogenética se calculó el modelo más adecuado para los datos, utilizando todas las secuencias obtenidas para el marcador COI y 18S, empleando el programa jModeltest 2.1.9 v20160115 (Darriba et al., 2012; Guindon & Gascuel, 2003), con 88 modelos candidatos. Para las secuencias de COI el modelo que mejor se ajustó a los datos fue HKY+G+I según el Criterio de Información de Akaike (AIC) y el Criterio de Información Bayesiano (BIC). En cuando a las secuencias de 18S, el modelo que más se ajustó a los datos fue HKY+G+I según el criterio AIC y JC según el criterio BIC, por lo tanto, se utilizó el modelo HKY+G+I para ambos marcadores. Los análisis de Máxima Verosimilitud (MV) se realizaron con el programa PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010), con un bootstrap de 1000 para ambos sets de datos (COI y 18S) por separado. Los análisis de Inferencia Bayesiana (IB) usando el programa MrBayes v3.2 (Ronquist et al., 2012). Se corrieron simulaciones de la Cadena Markov Monte Carlo (MCMC, por sus siglas en inglés), muestreando cada 100 generaciones, se verificó así en muestras de los parámetros del modelo de sustitución, si las probabilidades alcanzaron la estabilización, y si la desviación estándar de las frecuencias divididas estaba por debajo de 0,05, para ambos sets de datos (COI y 18S) por separado. El gen mitocondrial COI alcanzó la estabilidad luego de 500000 generaciones MCMC (Split=0,04), mientras que el gen nuclear 18S la alcanzó con un total de 200000 generaciones MCMC (Split=0,02). El 25% inicial se descartó como *burnin*. Los árboles muestreados fueron utilizados para inferir las probabilidades posteriores del método bayesiano (BPP), para los nodos y producir un árbol consenso. Para enraizar los árboles se utilizó la secuencia del marcador COI de *Botryllus schlosseri* y la secuencia del marcador 18S de *Styela plicata*, como grupos externos en cada caso.

Para estimar el tiempo de divergencia desde la especiación, se utilizó el paquete BEAST 1.8.0 usando todas las secuencias del gen mitocondrial COI, sin la utilización de un grupo externo (Drummond et al., 2012). Como primer paso, se generaron los archivos xml utilizando BEAUti, para ejecutar luego tales archivos en BEAST. Dado que no existen registros fósiles adecuados, y/o tasas de mutación calibradas para ascidias, se utilizaron datos de otros invertebrados marinos. Nydam & Harrison (2011) estimaron la tasa de mutación del gen COI para invertebrados (de acuerdo con datos obtenidos en cangrejos, erizos, y krill), y obtuvieron un rango de entre 0,016 y 0,026 sustituciones por sitio por millón de años. Así, se corrieron dos análisis independientes: uno utilizando un modelo de reloj estricto, con una tasa de sustitución de $0,016 \times 10^6$ sustituciones por sitio por millón de años, y otro utilizando también un modelo de reloj estricto con una tasa de $0,026 \times 10^6$ sustituciones por sitio por millón de años. Para ambas corridas se usó un *burnin* de 20%. Para la construcción del árbol se utilizó en la especiación de Yule como

prior. Se utilizó el modelo de sustitución GTR+G. Finalmente, los resultados se analizaron usando Tracer v1.6.0 para corroborar la estabilización de los parámetros continuos (cuando gráficamente se ven como un peine recto sin tendencias obvias hacia arriba o hacia abajo o saltos repentinos).

2.2.2. Análisis morfológico

Un total de 25 especímenes enteros, presuntamente pertenecientes a la especie *Cnemidocarpa verrucosa*, fueron analizados morfológicamente (y genéticamente con el marcador COI) con el objetivo de poner a prueba si existen diferencias fenotípicas entre las propuestas especies crípticas. Las muestras se recolectaron durante la campaña de verano 2018 en Caleta Potter, mediante buceo entre 20 y 30 metros de profundidad. Los especímenes fueron relajados con la utilización de cristales de mentol (TodoDroga) diluidos en agua de mar, los animales se colocaron en bandejas, donde se sumergieron en la solución, luego de dos horas de baño, se probó si las ascidias respondían a un estímulo en los sifones. Si había respuesta aún, los animales se exponían al mentol por una hora más. Una vez alcanzada la relajación, los animales fueron fijados en etanol 96%. El material examinado se encuentra depositado en la colección del Instituto de Diversidad y Ecología Animal, IDEA, CONICET y UNC.

Se realizó la identificación de los principales caracteres morfológicos internos y externos para *C. verrucosa* desarrollados en estudios previos (Millar, 1960; Monniot & Monniot, 1983; Turón et al., 2016b; VanName, 1945). Para la examinación externa se midieron tres dimensiones: 1- largo total del cuerpo, 2- ancho total del cuerpo, 3- distancia entre el centro de ambos sifones; y otras características externas: presencia de disco basal y forma de las verrugas.

Las disecciones fueron realizadas bajo lupa (Labomed CZM4 y CZM6) equipada con cámara fotográfica. Luego de la disección se identificaron las siguientes estructuras internas: 1- número de tentáculos orales, 2- número de vasos entre pliegues longitudinales del saco branquial, 3- número de vasos en los pliegues longitudinales del saco branquial, 4- número de gónadas a cada lado del cuerpo, y 5- número de pliegues en el estómago. Con todos los datos morfológicos obtenidos se construyó una matriz. Se realizaron Correlaciones Lineales de Pearson entre los caracteres para probar redundancia y así eliminar caracteres si es necesario.

Para el análisis estadístico se creó una matriz de datos mixtos con todos los caracteres morfológicos analizados. El alto y ancho de los ejemplares no se utilizaron para este análisis, ya que estos dos caracteres son muy variables debido a la naturaleza elástica del animal y la cantidad de agua que puede contener el mismo. Sin embargo, se comprobó la correlación entre estos dos caracteres y el resto de los estudiados, y no se encontró una relación significativa. Se utilizaron análisis multivariados para

determinar las afinidades entre muestras de *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato* en función de una matriz de caracteres morfológicos. Para el análisis se realizó una transformación logarítmica de las variables cuantitativas (número de tentáculos orales, número de vasos longitudinales en pliegues del saco branquial, número de vasos longitudinales entre los pliegues del saco branquial, número de gónadas y número de pliegues estomacales). Se realizó un escalado multidimensional no métrico (NMDS) utilizando tres dimensiones y la distancia de Gower. El análisis de varianza multivariada no paramétrico (PERMANOVA) se utilizó para evaluar las diferencias entre los grupos obtenidos en el NMDS, cada término del análisis se probó utilizando 9999 permutaciones. El programa estadístico gratuito PAST 3.16 se utilizó para todos los análisis de datos morfológicos (Hammer et al., 2001).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Análisis moleculares

2.3.1.1. Generalidades

El fragmento alineado para COI fue de 503 pb excluyendo los cebadores, en total se secuenciaron 253 individuos de 14 estaciones de muestreo (<https://doi.org/10.1594/PANGAEA.909707>). El alineamiento no presentó *gaps*, y la traducción a aminoácidos no reveló ningún codón *stop* o mutaciones de cambio de marco de lectura. La composición nucleotídica del fragmento COI fue T=40,6%, C=15%, A=28,3%, G=16,1%. El análisis de las secuencias reveló 28 haplotipos, 70 sitios polimórficos, y de ellos 56 parsimoniosamente informativos.

El fragmento alineado para 18S fue de 878 pb de largo excluyendo los cebadores, en total se secuenciaron 312 individuos (<https://doi.org/10.1594/PANGAEA.909707>). El alineamiento no presentó *gaps*. La composición nucleotídica fue T=25.4%, C=21.6%, A=24.4%, G=28.7%. De los 70 sitios polimórficos, solo un sitio, en la posición 444, contuvo dos variantes que fueron congruentes con la división de los grupos formados por el gen mitocondrial (grupos A y B, ver figura 2.3). Un único individuo (con el código de colección 291), mostró ambos nucleótidos (timina y citosina), lo cual puede interpretarse como heterocigosis o hibridación (ver la sección de discusión de este capítulo).

Los datos de las secuencias se pueden encontrar en NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), las secuencias completas del marcador 18S se encuentran con los números de acceso MN700311-MN700622, y las secuencias completas del marcador COI, con su respectiva traducción a proteínas, se encuentran con números de acceso MN714370-MN714622. Los datos morfológicos y genéticos se pueden encontrar en PANGAEA (<https://www.pangaea.de/>), <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.909707>.

2.3.1.2. Delimitación de especies

El análisis ABGD mostró una distribución bimodal en la similitud de las secuencias de COI. La distancia genética entre secuencias dentro de los grupos fue $<1,41\%$, y la distancia genética entre secuencias de diferente grupo fue $>10,20\%$ sin distancias intermedias observadas (figura 2.2). El análisis ABGD para las secuencias del marcador 18S, mostró seis grupos denominados de la A, a la F. La distancia genética entre secuencias dentro de los grupos fue 0,00. Dos grupos (llamados aquí A y B) fueron congruentes con los grupos identificados en el análisis ABGD de las secuencias del gen COI. La distancia genética entre el grupo A y B fue mayor a 0,11%, sin valores intermedios observados. La distancia entre el grupo C y los grupos A - B fue mayor a 2,79%; la distancia entre el grupo D y los grupos A - C fue mayor a 4,85%; la distancia entre el grupo E y los grupos A - D fue mayor a 4,11%; y la distancia entre el grupo F y los grupos A - E fue mayor a 4,49%. Esto indica que los grupos C, D, E, y F podrían corresponder a otras especies crípticas (no A, no B), aún más distantes. Cabe aclarar que la secuenciación del gen mitocondrial COI no fue posible para los individuos asignados a los grupos C, D, E, y F, en el análisis ABGD del gen nuclear 18S.

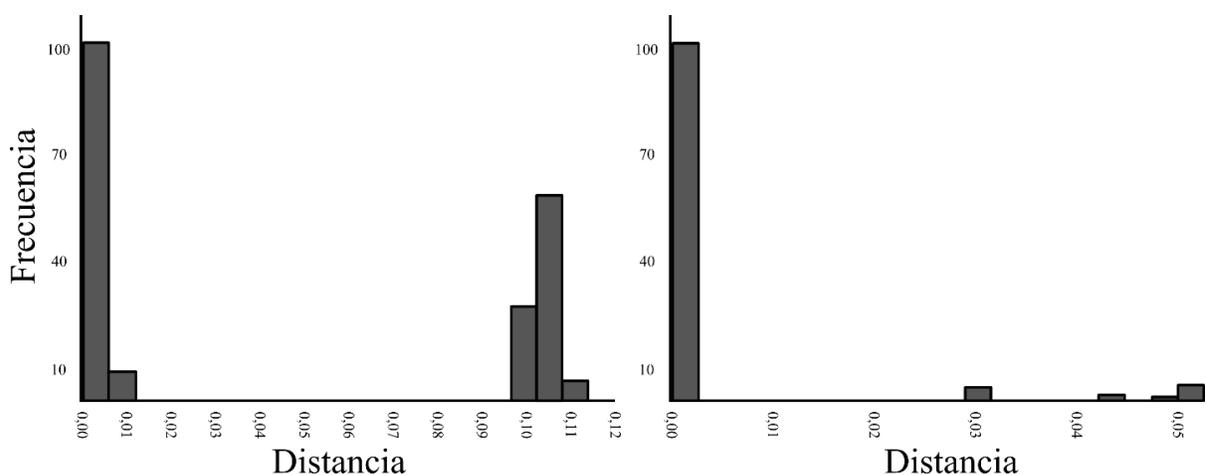


Figura 2.2. Frecuencia de la divergencia de a pares de las secuencias dentro y entre putativas especies crípticas. Marcador COI a la izquierda, marcador 18S a la derecha.

2.3.1.3. Análisis filogenéticos y estimación de tiempo de divergencia

Los árboles filogenéticos basados en los marcadores moleculares (COI y 18S), y utilizando los métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana mostraron topologías idénticas para cada marcador, y separaron dos grupos congruentes de muestras, bien soportados y recíprocamente

monofiléticos, entre los árboles obtenidos con el marcador COI y el marcador 18S (probabilidad posterior, $PP \geq 0,99$; probabilidad *bootstrap*, $BP = 99$) (figura 2.3). Estos dos clados congruentes definidos por ambos marcadores, coinciden también con los agrupamientos definidos por los análisis ABGD de ambos genes (grupos A y B del 18S). El “grupo A” se distribuyó en todas las estaciones a lo largo de la Península Antártica, mientras que el “grupo B” no estaba presente en algunas estaciones (figura 2.6). Además, los árboles reconstruidos con el marcador nuclear separaron cuatro grupos extra, congruentes con los grupos C – F delimitado en el análisis ABGD (en gris en la figura 2.6). Uno de los grupos abarcó exclusivamente individuos de MPAN-BB ($PP = 1$, $BP = 100$; grupo D en el análisis ABGD), un segundo grupo compuesto únicamente por dos muestras de Caleta Potter ($PP = 1$, $BP = 98$; grupo E en el análisis ABGD), un tercer grupo compuesto por una única muestra de MPAN-BB (grupo F en el análisis ABGD), y un cuarto grupo constituido por muestras del Mar de Escocia ($PP = 1$, $BP = 99$; grupo C en el análisis ABGD). Sin embargo, dos individuos fueron asignados a diferentes grupos dependiendo de cuál marcador se analizó. Por un lado, el individuo 291 de Caleta Potter fue asignado al grupo A de con el gen 18S, pero al grupo B de acuerdo con COI. Por otro lado, el individuo 116 de Estación Palmer fue asignado al grupo B de con el gen 18S, pero al grupo A de acuerdo con COI. Este patrón cruzado es incompatible con la diversificación congruente de los genes nucleares y mitocondriales (ver discusión más adelante en este capítulo).

La estimación del tiempo de divergencia entre los grupos A y B, utilizando las secuencias de marcador COI, se calculó entre los 3,58 Ma (95% *high posterior density* [HPD]: 2.331–4.935 Ma) y 2,20 Ma (95% *high posterior density* [HPD]: 1.423–3.028 Ma).

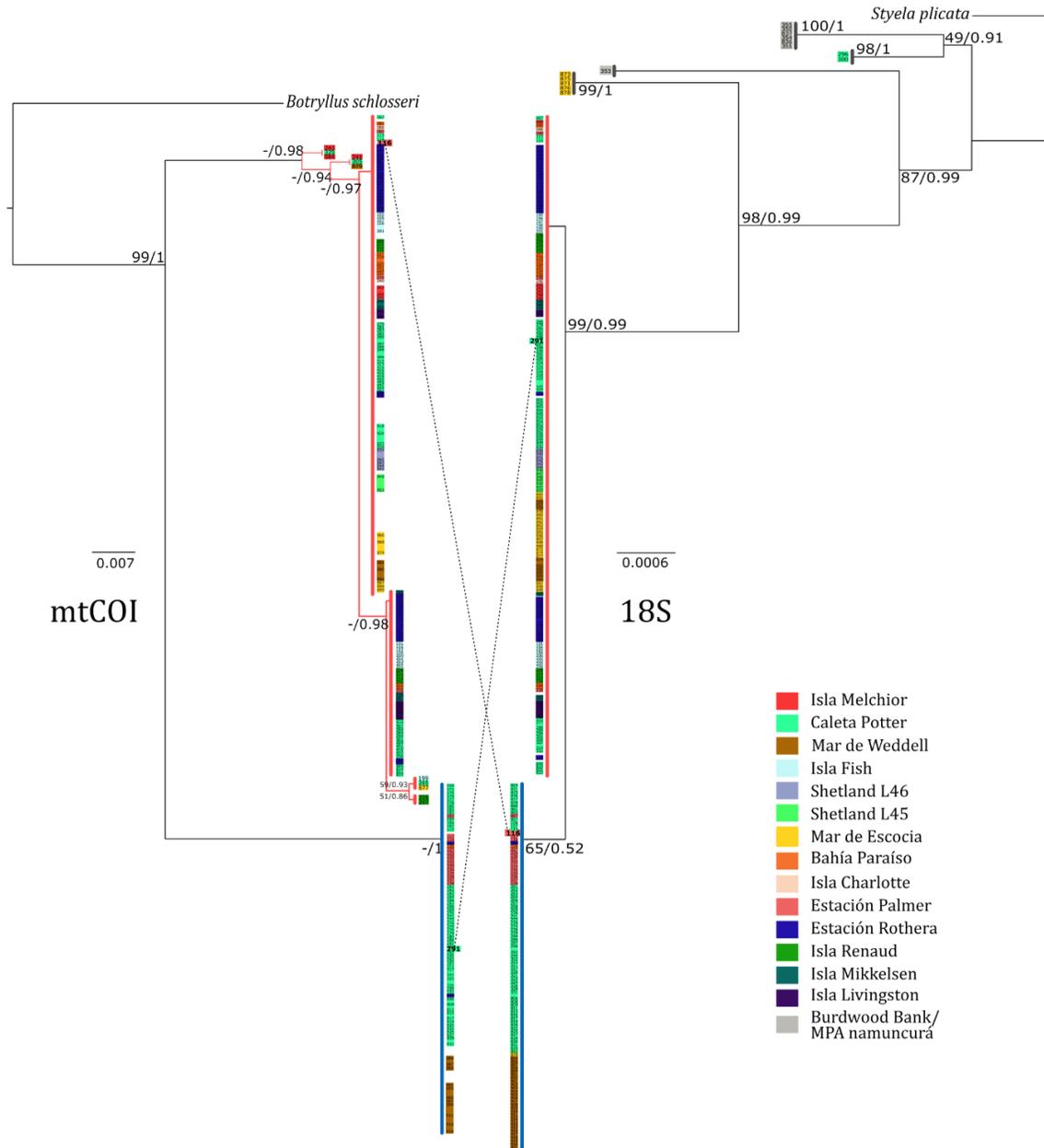


Figura 2.3. Árboles filogenéticos obtenidos con los métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. A la izquierda, filogenia construida con el gen mitocondrial COI. A la derecha, filogenia construida con el gen nuclear 18S. Se muestran únicamente los nodos que presentaron un valor de *bootstrap* ≥ 51 y de probabilidad posterior ≥ 0.86 . Se observa aquí un patrón de ramas espejado, las líneas punteadas indican las únicas dos muestras que no respetaron este patrón congruente. Las ramas en rojo corresponden al grupo A, las ramas azules corresponden al grupo B, grupos definidos en el análisis de delimitación de especies ABGD. Las ramas en gris corresponden a los grupos C, D, E, y F del análisis ABGD del gen 18S. Los números dan cuenta de los códigos de cada individuo secuenciado, los colores de fondo (para cada individuo) representan las diferentes estaciones de muestreo. Tener en cuenta que no todos los individuos fueron secuenciados para ambos marcadores.

2.3.2. Análisis morfológico

Según la bibliografía, la apariencia característica de *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato* es: cuerpo grande y robusto, ovado o elipsoidal; por lo general, no comprimido lateralmente. Los individuos analizados en este trabajo eran todos sexualmente maduros; variaron entre 5,8 cm y 17,3 cm de longitud, y 4,1 cm y 9,6 cm de ancho. Los sifones estaban ubicados en la parte anterior del cuerpo. De 25 especímenes, solo ocho presentaron sifones a diferentes alturas. Diez muestras presentaron disco basal. La túnica, aunque dura, se presentó bastante delgada y algo blanda y flexible, de color naranja, marrón o amarillo en especímenes vivos. En muestras fijadas, la túnica era amarillenta, marrón o gris. *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato* se caracteriza por la presencia de verrugas en la túnica. En este estudio, algunas muestras mostraron verrugas redondeadas y lisas, otras presentaron cónicas con múltiples puntas en forma de espina dorsal, y algunas mostraron ambos tipos distribuidos de diversas maneras en la túnica y sin un patrón claro. En cuanto a las características internas, las variaciones encontradas fueron las ya descritas dentro de la especie: el saco branquial tenía cuatro pliegues en cada lado del cuerpo, el número de vasos longitudinales en los pliegues del saco branquial oscilaba entre 7 y 21, el número de vasos longitudinales entre los pliegues del saco branquial varió de 1 a 5. Los tentáculos orales filiformes, alternando en tamaño (corto y largo), el número varió de 22 a 38. El intestino ubicado en el lado izquierdo ventral medio del cuerpo, se registraron de 19 a 30 pliegues estomacales. Las gónadas eran tubulares, con una membrana envolvente, y ubicadas sobre el manto. Los especímenes mostraron, en general, dos gónadas a cada lado del cuerpo, sin embargo, las muestras cv12 y cv16 presentaron dos en el lado derecho y una en el lado izquierdo, cv23 mostró una gónada en cada lado y cv25 dos gónadas en el lado derecho. Los especímenes presentan su extremo distal con gonoductos dirigidos hacia el sifón auricular (datos en bruto en <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.909707>).

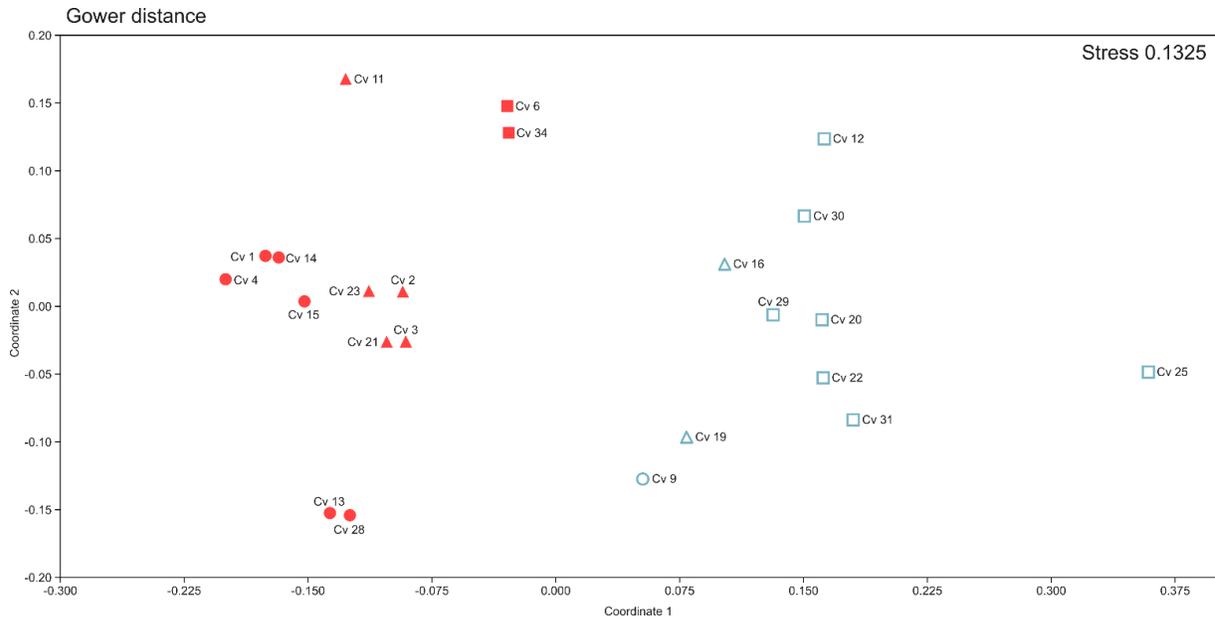


Figura 2.4. Escalamiento multidimensional no métrico de las características morfológicas de especímenes de *C. verrucosa sensu lato* de Caleta Potter. Los números se refieren a diferentes individuos analizados. El color rojo indica la especie genética *C. verrucosa* sp. A y el azul indica *C. verrucosa* sp. B. La forma de los símbolos indica el tipo de verrugas; círculo: redondeada y lisa, triángulo: cónica con múltiples puntas en forma de espina, cuadrado: ambos tipos de verrugas. Los símbolos rellenos indican la ausencia de disco basal, y los símbolos vacíos indican la presencia de disco basal.

El análisis NMDS separó dos grupos entre las muestras (figura 2.4). Los dos grupos identificados en el NMDS coincidieron con las muestras genéticamente identificadas como grupo A y B en los análisis de delimitación de especies. PERMANOVA reveló diferencias significativas entre los grupos conformados en el análisis de NMDS ($F = 17,17$; $p = 0,0001$). Todas las muestras del grupo B delimitado genéticamente mostraron disco basal, mientras que todas las muestras del grupo A no lo hicieron (figura 2.5). Casi todos los individuos del grupo genético A presentaron un tipo de verrugas, mientras que la mayoría de los individuos del grupo genético B mostraron ambos tipos de verrugas (cónicas y lisas). Los otros caracteres morfológicos analizados en este estudio no mostraron tendencia a prevalecer en uno u otro grupo.

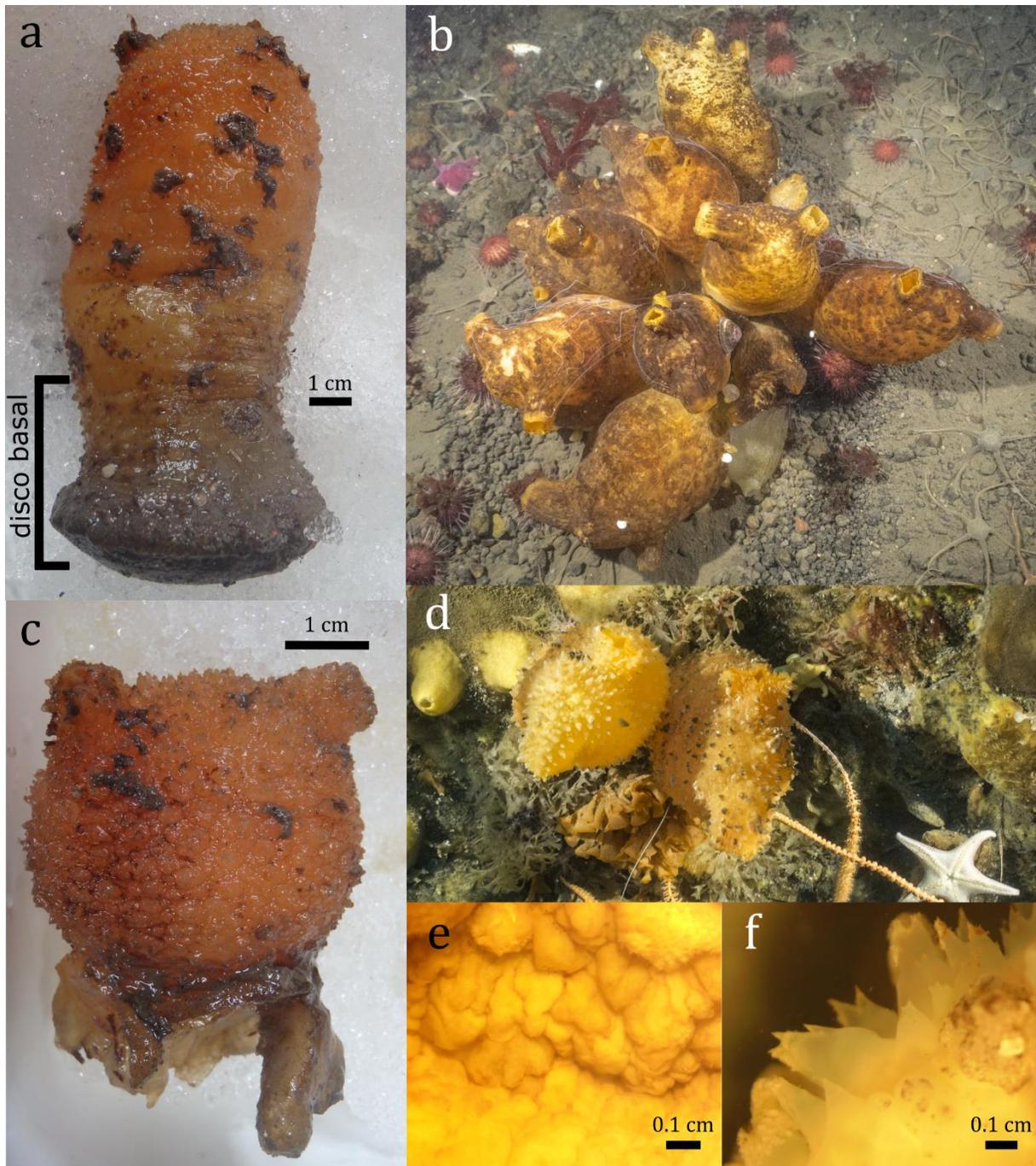


Figura 2.5. Foto a, individuo con disco basal; foto c, ejemplar sin disco basal. Fotos b y d tomadas en el ensamble de bentos de Caleta Potter, donde se observa una gran variabilidad de características morfológicas en *C. verrucosa sensu lato*. Foto e, verrugas lisas; foto f, verrugas cónicas con múltiples puntas.

2.4. DISCUSIÓN

En este capítulo, se mostró que la ascidia antártica *Cnemidocarpa verrucosa* comprende, al menos, dos especies genéticamente divergentes distribuidas a lo largo de la Península Antártica Oeste; *C. verrucosa* sp A y *C. verrucosa* sp. B. Además, los resultados de los análisis morfológicos de individuos provenientes de Caleta Potter, sugieren que el disco basal podría ser un carácter que diferenciaría a las dos especies.

2.4.1. Dos especies genéticamente diferentes

Ambos marcadores moleculares analizados en este trabajo (el gen mitocondrial COI y el gen nuclear 18S) distinguieron dos grupos congruentes de especímenes, es así que, se cuenta con evidencia suficiente como para reconocer a dos especies genéticamente divergentes dentro de *C. verrucosa sensu lato* distribuida a lo largo de la Península Antártica Oeste: *C. verrucosa* sp. A y *C. verrucosa* sp. B. Los genes nucleares y mitocondriales evolucionan de manera independiente dado que se diferencian en el modo de herencia, en la ploidía, la cantidad de recombinaciones, la presencia de intrones, la tasa de mutación, los mecanismos de reparación, y el tamaño poblacional efectivo (Hill, 2015). Es entonces que, el estudio de un solo tipo de marcador molecular puede conducir a sesgos sistemáticos en la inferencia de los procesos evolutivos (Ballard & Whitlock, 2004; Seehausen et al., 2003). En este capítulo, ambos marcadores mostraron el mismo patrón evolutivo, lo cual indica que ambas moléculas fueron impactadas de la misma manera por los mismos mecanismos evolutivos y que transcurrió suficiente tiempo para que pueda observarse la monofilia recíproca en ambos marcadores, haciendo así un caso sólido a favor de la existencia de conjuntos genéticos mutuamente aislados.

Dentro de los resultados obtenidos en el trabajo, algunos individuos no pudieron ser secuenciados para el gen mitocondrial COI, mientras que el nuclear 18S sí fue secuenciado. Puntualmente para estas muestras, la filogenia basada en el gen 18S resolvió ramas basales que comprenden clados presentaron una divergencia genética aún más profunda con el resto de los individuos, que la diferencia observada entre *C. verrucosa* sp. A y sp. B (ver figura 2.3, y sección de resultados 2.3.1.2. donde se muestra la delimitación de especies arrojada por el análisis ABGD). Se sabe que los genes nucleares evolucionan a una tasa más lenta que los mitocondriales (Allio et al., 2017; Havird & Sloan, 2016). Además, se ha descrito, para el genoma mitocondrial de ascidias, una alta tasa de sustitución y de reordenamientos genéticos, que a su vez han sido propuestas como las causantes de dificultades técnicas en la PCR, debido a la presencia de mutaciones en los sitios donde hibridan los cebadores (Delsuc et al., 2018; Denoëud et al., 2010; Gissi et al., 2010; Yokobori et al., 1999, 2003).

Asimismo, las ramas basales obtenidas en este trabajo con el gen 18S, y los grupos C al F obtenidos con el mismo gen a partir del análisis ABGD, son congruentes, y se componen de individuos pertenecientes a MPAN-BB, el Mar de Escocia, y Caleta Potter (estaciones localizadas en la punta de la Península Antártica oeste y el Sur de Sudamérica; ver figura 2.6). Es así que estos grupos podrían representar otras especies crípticas dentro de *C. verrucosa sensu lato*, aparte de las especies descritas aquí (sp. A y B), y estar constituidos por individuos en los que el sitio de unión del cebador COI se ha mutado o reordenado.

Los marcadores moleculares universales, es decir, los ampliamente utilizados, tales como el COI y el 18S, son útiles a la hora de caracterizar grupos escasamente estudiados (Hebert et al., 2003). En este capítulo, aplicando el método ABGD en ambos marcadores, se observó un *barcode gap*, sin valores intermedios, en la distribución de las frecuencias de las diferencias entre individuos de la llamada *C. verrucosa*. Según los autores que proponen la utilización de este método para la delimitación de especies, este *gap* se observa cuando la divergencia entre organismos que corresponde a la misma especie es menor a la diferencia entre organismos que corresponden a diferentes especies (Puillandre et al., 2012).

Además, para la delimitación de especies, un abordaje robusto es la comparación de las distancias genéticas con pares de especies indiscutidas, relacionadas filogenéticamente a las especies en estudio, dado que la tasa de sustitución nucleotídica es ampliamente homogénea a nivel interespecífico en este grupo de organismos (Griggio et al., 2014; Held, 2003). Los análisis realizados en este trabajo, muestran que la distancia genética entre *C. verrucosa* sp. A y sp. B fue $> 10.20\%$ para COI, y $> 0.11\%$ para 18S. La divergencia nucleotídica del gen COI para especies de ascidias del mismo género oscilan entre 10% al 20% (Nydham & Harrison, 2007; Pérez-Portela & Turón, 2008), y entre especies dentro de la familia Styelidae están dentro del $10,8\%$ al $16,5\%$ (Lacoursière-Roussel et al., 2012; Reem et al., 2017). Con relación al gen 18S, se encontró que la divergencia nucleotídica entre especies del género *Diplosoma* varía entre el 0% y $0,58\%$ (Yokobori et al., 2006). Bock et al. (2012) encontró divergencias más grandes ($2,3\%$ - $10,1\%$) en el gen 18S entre especies crípticas putativas de *Botryllus schlosseri*. El número y delimitación de especies crípticas dentro de *B. schlosseri* está aún bajo discusión; es entonces que *B. schlosseri* se trata en la bibliografía como un complejo de especies (Lejeusne et al., 2011; Nydam et al., 2017; Reem et al., 2017; Yund et al., 2015). Toda esta evidencia indica que, entre las muestras estudiadas en este trabajo, la diferenciación genética es similar a aquella encontrada en otras especies de la misma familia, y de otros pares de especies de ascidias; entonces, podemos definir así dos especies genéticamente divergentes basándonos tanto en un gen mitocondrial como en uno nuclear. Al mismo

tiempo, los grupos C, D, E, y F definidos a través del análisis ABGD de las secuencias 18S, mostraron divergencias similares a las que presentan las especies de complejo *B. schlosseri*.

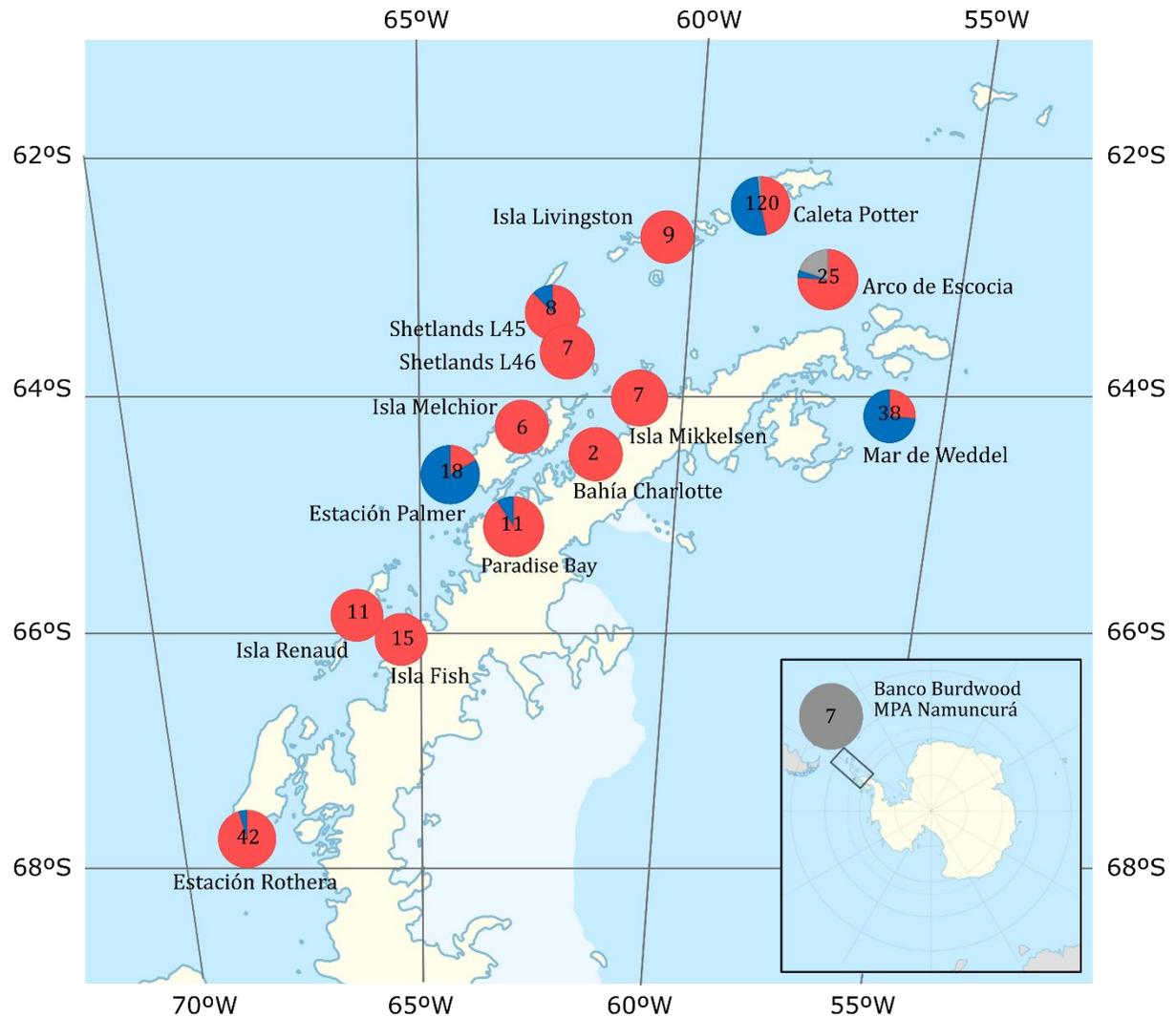


Figura 2.6. Distribución de las putativas especies crípticas a lo largo de la Península Antártica. Cada círculo representa una estación de muestreo, en rojo la proporción de *C. verrucosa* sp. A, en azul la proporción de *C. verrucosa* sp. B, en gris no A / no B. Los números representan el tamaño de la muestra.

2.4.2. Dos especies morfológicamente distinguibles

El género *Cnemidocarpa* pertenece a la familia Styelidae (Ascidiacea) (WoRMS, Shenkar et al., 2020), la cual se caracteriza por una alta variabilidad en sus caracteres morfológicos (Monniot et al., 1991). El género *Cnemidocarpa* incluye ascidias solitarias con túnica fina, pero coriácea; gónadas elongadas, tubulares, y ocasionalmente ramificadas, siempre unidas en una masa compacta contenida

en una membrana y adosada a la pared del cuerpo (Kott, 1985; Rocha et al., 2012). Para distinguir especies dentro del género, uno de los caracteres más utilizados es el número de gónadas a cada lado del cuerpo; sin embargo, *C. verrucosa sensu lato* presenta una alta variabilidad en este carácter, presentando de 1 a 4 gónadas, y en este trabajo no se encontró una variación significativa en este carácter. También se observó en los especímenes estudiados y a campo, una alta variabilidad en forma y color (ver figura 2.5), pero no se observó ningún carácter ya descrito o nuevo para discriminar entre grupos genéticamente diferentes. Sin embargo, encontramos que la presencia/ausencia de disco basal podría ser un carácter diagnóstico para la identificación de las dos especies genéticas en Caleta Potter (donde ambas especies coexisten): todos los especímenes de *C. verrucosa* sp. A no mostraron disco basal, mientras que todos los especímenes pertenecientes a *C. verrucosa* sp. B mostraron un disco basal bien desarrollado, como el que describió Kott (1971). Tatián et al. (1998) describieron con anterioridad diferencias en desarrollo del tallo (disco basal en este estudio) en *C. verrucosa* y *Molgula pedunculada* de Caleta Potter. En su trabajo, se sugirió que los requerimientos diferenciales de fijación podrían determinar un mayor desarrollo del tallo en aquellos especímenes que se distribuyen en fondos blandos, que en aquellos presentes en fondos duros. Se describió también en la literatura que la diferenciación morfológica de las especies depende de factores ecológicos/ambientales y del tiempo desde su divergencia (Fišer et al., 2018; Harmon et al., 2003; Losos, 2008; Schluter, 2000). Nuestros resultados sugieren que las dos especies seleccionan hábitats diferentes, entonces la sp. A se desarrollaría sobre sustratos duros y la sp. B sobre fondos blandos. Es decir que, la diferenciación morfológica determinada por la presencia/ausencia del disco basal en *C. verrucosa* no sería un caso de plasticidad fenotípica en respuesta a condiciones ambientales (ej. sustrato del fondo) como fue asumido anteriormente, sino un reflejo de la disposición genética divergente de dos especies reproductivamente aisladas. Si bien es posible que la presencia del disco basal pueda tener algún valor adaptativo (Givnish et al., 2014), nuestros resultados sugieren que el micro-ambiente podría ejercer una influencia al determinar la abundancia relativa de *C. verrucosa* sp. A o sp. B que tienen o carecen de un disco basal. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis es necesario evaluar el patrón morfológico de *C. verrucosa sensu lato* en un más amplio rango de muestreo.

La delimitación de especies morfológicas es clave, especialmente para el reconocimiento a campo cuando tales especies se distribuyen en simpatria. *Cnemidocarpa verrucosa* fue descrita inicialmente por Lesson (1830), y el espécimen modelo se recolectó en las Islas Malvinas. Tanto en la descripción original como en otros manuscritos, *C. verrucosa* se reporta con una alta variabilidad de color,

forma, y tamaño (Kott, 1971; Tatián et al., 2005; Turón et al., 2016b); un patrón compartido con otras ascidias (Dias et al., 2008; Viard et al., 2019; Wiernes et al., 2013). No obstante, un carácter (morfológico o molecular) podría describirse erróneamente como polimórfico cuando dos o más especies son tratadas de manera incorrecta como una sola. No es poco común que el aparente nivel de polimorfismo se vea fuertemente reducido una vez que las especies crípticas o pseudocrípticas son correctamente identificadas (Dietz et al., 2015; Janosik & Halanych, 2010; Korshunova et al., 2017; Montano et al., 2017).

2.4.3. Dos especies en simpatría

Las putativas especies *C. verrucosa* sp. A y *C. verrucosa* sp. B se distribuyeron en simpatría a lo largo de la Península Antártica Oeste. Ambas especies se encontraron en el Mar de Weddell, Mar de Escocia, Caleta Potter, Shetlands L45, Estación Palmer, Bahía Paraíso, y Estación Rothera (figura 2.6). La ausencia de *C. verrucosa* sp. B en algunas estaciones podría estar explicado por el bajo número de muestras que se obtuvieron en tales puntos de muestreo. Y aunque se ha descrito que las diferencias en profundidad que implican gradientes de luz, derretimiento y arrastre de hielos, y temperatura entre otros, podrían ser factores que afectan la distribución de especies, tal como el caso de un poliqueto antártico (Schüller, 2011); en este trabajo no podemos probar que la distribución de las sp. A y B sea a modo de zonación vertical, dado que ambas especies fueron encontradas en estaciones de muestreos tanto profundas, como más superficiales (ver las tablas 3.1 y 3.2, capítulo 3). Dado que ambas especies coexisten en simpatría y a su vez mantienen una diferenciación genética, alguna barrera reproductiva ha de estar jugando un papel importante en el aislamiento de los grupos genéticos. *Cnemidocrpa verrucosa sensu lato* libera sus gametas al agua, donde ocurre la fertilización; es así que la permeabilidad de las barreras reproductivas precigóticas, así como el aislamiento temporal, son claves para el aislamiento entre especies (Levitan et al., 2004). Otra barrera que podría estar explicando este aislamiento es la incompatibilidad de las gametas, dado que muchos estudios enfocados en la evolución del reconocimiento entre gametas han demostrado que las proteínas implicadas en este proceso tienden a evolucionar más rápidamente que otras y frecuentemente se encuentran bajo selección positiva (Kosman & Levitan, 2014; Vacquier & Swanson, 2011). Por ejemplo, en un par de especies de erizos marinos, solo 10 cambios en aminoácidos pueden conducir a completa incompatibilidad genética entre especies (Zigler et al., 2005). Por otra parte, un claro ejemplo de dos especies cercanamente emparentadas, viviendo en simpatría, y que muestran una eficiente barrera reproductiva, son *Ciona intestinalis* y *Ciona robusta*, las cuales presentan hibridación natural a una muy baja tasa (0,03%), y una distancia genética mitocondrial de entre 12 y 14%; distancia comparable con *C. verrucosa* sp. A y B (10,20%). Cabe aclarar que, en

condiciones de laboratorio, fue posible obtener híbridos fértiles entre *C. intestinalis* y *C. robusta*; y a campo, se observaron individuos sexualmente maduros, produciendo gametas al mismo tiempo, por lo que las barreras post-cigóticas estarían cumpliendo un rol importante en ese sistema (Bouchemousse et al., 2016a; Bouchemousse et al., 2016b; Nydam & Harrison, 2011; Sato et al., 2014).

2.4.4. Patrón incongruente entre el gen mitocondrial y el nuclear

Al realizar la delimitación de especies con ambos marcadores, encontramos un patrón interesante: dos individuos no fueron asignados al mismo grupo por ambos genes (ambos genes fueron re-secuenciados para tales individuos, pero se obtuvieron los mismos resultados). Por un lado, el individuo 291 fue asignado a *C. verrucosa* sp. A cuando se realizó la delimitación de especies con el gen 18S, pero se asignó a *C. verrucosa* sp. B con el gen COI; por otro lado, el individuo 116 fue asignado a *C. verrucosa* sp. B cuando se realizó la delimitación de especies con el gen 18S, pero se asignó a *C. verrucosa* sp. A con el gen COI. En ambos casos, la asignación incongruente a diferentes grupos taxonómicos dependiendo de la fuente de información (nuclear o mitocondrial), no se debió a la falta de resolución en ninguno de los genes. En la bibliografía, la incongruencia entre filogenias a partir de secuencias de 18S y COI, ya fue descrita para ascidias (Pérez-Portela et al., 2009; Stach & Turbeville, 2002). En los resultados obtenidos en este trabajo, *C. verrucosa* sp. A se caracterizó por poseer una timina en el único sitio variable del 18S, mientras que *C. verrucosa* sp. B por poseer una citosina. El espécimen 291 presentó dos picos superpuestos (timina y citosina) en el único sitio variable del 18S. Por consiguiente, ambas especies delimitadas en este trabajo, podrían retener alelos raros del estado de carácter típico de alguna especie hermana, como consecuencia de un polimorfismo ancestral en este sitio (polimorfismo ancestral con clasificación incompleta de linajes, ILS por sus siglas en inglés), entonces, el individuo 291 sería un heterocigota según esta interpretación (Hoy & Rodríguez, 2013; Rooney, 2004; Shapoval & Lukhtanov, 2015). Alternativamente, este patrón incongruente podría explicarse por una eventual hibridación entre *C. verrucosa* sp. A y sp. B. Los procesos de hibridación e introgresión ya fueron propuestos para ascidias (Bouchemousse et al., 2016b; Nydam et al., 2017). Dado que liberan las gametas al agua en donde se produce la fecundación, este grupo posee una alta probabilidad de presentar eventos de hibridación/introgresión. Aunque ya se probó que *C. robusta* y *C. intestinalis* hibridan, la descendencia se mantiene infértil (Caputi et al., 2007; Sato et al., 2014). Con todo esto, sería de interés probar experimentalmente la hibridación entre *C. verrucosa* sp. A and sp. B. Sin embargo, es difícil distinguir patrones de ILS de introgresión, dado que ambos producen patrones similares de discrepancias entre los árboles inferidos a partir de datos mitocondriales y nucleares genes (Zhou et al., 2017). Finalmente, existe

evidencia de que las ascidias se caracterizan por una elevada tasa de evolución molecular (Delsuc et al., 2006). Es entonces que, un evento de mutación convergente podría explicar que el individuo 116 presenta el alelo C (citosina que presenta la especie B) para 18S, pero que haya sido asignada a *C. verrucosa* sp. A para COI, dado que la timina haya mutado a citosina en el único sitio variable del marcador 18S.

2.4.5. Tiempo y modo de especiación

Con el objetivo de estimar el tiempo desde la especiación de *C. verrucosa* sp. A y sp. B, se utilizaron datos obtenidos a partir de cangrejos, erizos de mar, y krill, como *proxy* (tasa de mutación del gen COI en el rango de las 0,016 a 0,026 sustituciones por sitio, por millón de años) (Nydham & Harrison, 2011). Así, se obtuvo que la división de las especies propuestas en este trabajo habría acontecido entre 3,58 a 2,20 Ma. En ascidias, se han realizado algunas estimaciones de la tasa de mutación de todo el genoma (Berna & Alvarez-Valin, 2014; Denoeud et al., 2010), pero no puntualmente para el genoma mitocondrial, el cuál evoluciona más rápidamente que el nuclear (Havird & Sloan, 2016). En promedio, la tasa de sustitución en ascidias es 6,25 veces más rápida que en vertebrados, y 2,08 veces más rápida que en cefalocordados (Delsuc et al., 2018). Esto indicaría que, aunque nosotros podamos estimar el tiempo de especiación basándonos en datos de otros taxones de invertebrados marinos, hemos de tener en cuenta que podríamos estar sobre-estimando el tiempo de divergencia dado lo expuesto anteriormente, siendo así probable que el tiempo real de especiación sea más reciente. Con todo esto, se puede hipotetizar que la especiación se produjo luego del Mioceno, una vez que Antártida ya habría experimentado el proceso de enfriamiento (Zachos et al., 2001). Asimismo, muchos otros estudios han reportado procesos de radiación y especiación entre los 8 y 5 Ma; así como ciclos de constricción de poblaciones, aislamiento en refugios, y luego expansión, especiación, y dispersión transoceánica hace 1 Ma (Rogers, 2007). Algunos ejemplos para estos procesos en taxones antárticos son artrópodos, anélidos, equinodermos, y moluscos (Baird et al., 2011; Hemery et al., 2012; Linse et al., 2007; Raupach et al., 2010; Riesgo et al., 2015; Wilson et al., 2007). De la misma manera que estos taxones, se puede pensar que *C. verrucosa* haya experimentado especiación alopátrica seguida de contacto secundario (Mayr, 1963). Por otro lado, y a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, también se puede hipotetizar un proceso de especiación en respuesta a alguna oportunidad ecológica (Simpson, 1953). Bajo este tipo de especiación, evoluciona una nueva característica que afecta la versatilidad ecológica de los especímenes (Givnish et al., 2014; Liem, 1973). En nuestro caso, el desarrollo del disco basal podría representar el carácter adaptativo en respuesta a la oportunidad ecológica: colonizar diferentes sustratos.

2.5. CONCLUSIONES

La evidencia presentada en este capítulo permite reconocer dos especies dentro de la llamada *C. verrucosa*: se obtuvieron dos grupos monofiléticos, y a su vez se obtuvo una delimitación de especies congruentes entre datos mitocondriales y nucleares. La magnitud de diferencia entre las dos especies propuestas aquí, fue similar a aquella encontrada entre pares de especies indiscutidas, y ambas especies se distribuyen en simpatria. Los análisis morfológicos sugieren que la presencia/ausencia del disco basal, podría ser un carácter morfológico que distinga a las especies en cuestión. *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato* se distribuye, *a priori*, de manera circumpolar en Antártida y en el sur de Sudamérica. Sin embargo, la verdadera distribución del taxón es incierta, dada la existencia de dos, o posiblemente más especies, que hasta ahora han sido tratadas erróneamente como una sola. Las filogenias incongruentes entre datos mitocondriales y nucleares, se pueden explicar bajo diferentes hipótesis: introgresión, hibridación, o ILS. Los límites entre especies simpátricas son mantenidas por barreras al flujo génico, y estas restricciones podrían no ser uniformes en espacio, tiempo, o a lo largo del genoma. De hecho, se ha propuesto que tales barreras son semipermeables y que el proceso de especiación con algún nivel de flujo génico es posible (Nosil, 2008). Para lograr una mejor elucidación de la historia evolutiva de esta especie antártica tan ampliamente distribuida, es necesario estudiar más loci nucleares de muestras más ampliamente distribuidas. Es importante tener en cuenta que los patrones de diferenciación genética y morfológica que son subestimados, o simplemente no registrados sistemáticamente, pueden llevar a errores significativos a la hora de definir distribución de especies relacionadas con adaptaciones, preferencia de hábitat, competencia, y respuesta al cambio climático. Nuestros resultados enfatizan que las identidades de las especies, incluso de aquellos taxones muy abundantes y bien descritos, deben evaluarse en lugar de asumirse.

CAPÍTULO 3: Genética de poblaciones e inferencias históricas de dos unidades evolutivas

3.1. INTRODUCCIÓN

La genética de poblaciones intenta comprender los patrones de variación genética dentro de las poblaciones de una misma especie y a lo largo del tiempo. Las fuerzas principales que cambian la composición genética con el tiempo son la mutación recurrente, la selección natural o artificial, el flujo de genes entre subpoblaciones y la deriva genética, cambios aleatorios de las frecuencias genéticas de una generación a la siguiente en poblaciones finitas (Hedgecock, 2019). Puntualmente para las ascidias, la tasa de sustitución es 6,25 veces más rápida que en vertebrados y 2,08 veces más rápida que en cefalocordados (Delsuc et al., 2018). Además, presentan larvas lecitotróficas con una fase planctónica que dura hasta 16 días (Strathmann et al., 2006), característica que influye en el flujo de genes.

La estructura espacial del bentos antártico está dada por una historia de ciclos glaciales en interglaciales con cambios en la temperatura del aire y expansión/retracción de los hielos muy abruptos; y por lo tanto, de especies que se fueron ajustando a los cambios ambientales que se sucedieron (Clarke et al., 2004; Rogers, 2007). El último máximo glacial (UMG) que transcurrió hace entre 26.500 y 19.000 años atrás (Clark et al., 2009), es de importancia para la dinámica histórica de las poblaciones dado que pudo haber producido la extinción local de la fauna bentónica y/o cambiado drásticamente las condiciones físicas ambientales que estructuraron las poblaciones (Thatje et al., 2005).

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato* se distribuye alrededor de Antártida y en el Sur de Sudamérica, particularmente presenta poblaciones muy abundantes en la Península Antártica (Kott & Mather, 1969; Monniot et al., 2011; Tatián et al., 1998; Tatián & Lager, 2010; Turón et al., 2016b). En este capítulo se abordará la estructura genética de las poblaciones de *C. verrucosa* sp. A y sp. B, ya distinguidas en el capítulo dos; poblaciones distribuidas al Oeste de la Península Antártica. Esta sección de la tesis aborda tanto el objetivo específico dos: describir la estructura genética y demográfica de las poblaciones de *C. verrucosa* sp. A y sp. B en Península Antártica; como el objetivo específico tres: inferir los procesos históricos que determinaron la estructura genética de las poblaciones en estudio, puntualmente de los procesos demográficos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Análisis de la diversidad genética, estructuración espacial y genealogía de haplotipos de los marcadores COI y 18S

Las secuencias de los marcadores moleculares COI y 18S obtenidas a través de la metodología expuesta en el capítulo 2, fueron utilizadas también para los análisis de genética de poblaciones concernientes a este capítulo. Como ya se mencionó, las secuencias de nucleótidos fueron editadas y alineadas utilizando el algoritmo de Muscle, con el programa Code Aligner (v. 5.1.5, Codon Code Corporation). Dados los resultados de las delimitaciones genéticas y morfológicas de las especies expuestas en el capítulo 2, los análisis de la estructura de las poblaciones se realizaron por separado para *C. verrucosa* sp. A y *C. verrucosa* sp. B; a excepción de la construcción de la red de haplotipos.

Con el objetivo de explorar la diversidad genética de las especies, se calculó el número de haplotipos (Nh), la diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (π) utilizando el programa DnaSP versión 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009). Las secuencias de gen 18S fueron utilizadas para reconstruir haplotipos a partir de las múltiples opciones de combinación de las dos hebras (en inglés: *phased*) usando el algoritmo PHASE v2.1.1 (Scheet & Stephens, 2006) en DnaSP versión 5.10.01 utilizando los parámetros por defecto. Con los datos obtenidos de las secuencias de COI y de 18S (utilizando la matriz construida con PHASE) se realizó la construcción de una red de haplotipos mediante el programa “Haplotype Viewer” del Centro para la Investigación Bioinformática de Viena (www.cibiv.at/~greg/haploviewer), basado en alineamientos múltiples de las secuencias y en un árbol de “vecino más próximo” (*neighbor joining tree*) utilizando ClustalX (Thompson et al., 1997). Para probar si existe una estructura genética entre las poblaciones de cada especie, se calculó el estadístico F_{ST} de a pares entre todas las poblaciones y se realizó AMOVA, con el programa ARLEQUIN v. 3.5.2.2 (Excoffier et al., 2005). La significancia fue calculada por un test de permutación con 10000 réplicas.

Para probar aislamiento por distancia se realizó la prueba de Mantel con 1000 permutaciones utilizando la aplicación IBD (*Isolation by Distance*) Macintosh (Bohonak, 2002). El diagrama de dispersión de la distancia geográfica y la distancia genética se realizó en R v3.6 para Microsoft Windows (R Development Core Team, 2020). Las distancias genéticas entre las poblaciones se expresaron como diferencias de a pares F_{ST} para los marcadores COI y 18S (ver tablas 1 y 2 en material suplementario). Las distancias geográficas entre las poblaciones se calcularon en kilómetros entre estaciones de muestreo bordeando la línea de costa (de ser necesario).

3.2.1. Inferencias demográficas históricas

Para la reconstrucción de procesos demográficos se utilizaron los programas DnaSP v5, BEAST v 1.8.0, y Arlequin v 3.5.2.2. Se utilizaron las pruebas de neutralidad D de Tajima (Tajima, 1989) y F de Fu & Li (Fu & Li, 1993) a partir de las secuencias obtenidas del marcador COI, se seleccionaron estos teste de neutralidad dado que se basan en el modelo de sitios infinitos sin recombinación y, por lo tanto, son apropiados para secuencias de ADN cortas como el COI. La significancia se estimó utilizando la distribución beta en DnaSP. Con los test de neutralidad evaluamos la probabilidad de observar una muestra neutral aleatoria con un número de alelos similar o menor al valor observado dado el número observado de diferencias por pares. Así, se espera un valor D negativo de Tajima si las poblaciones han experimentado una expansión. Por otro lado, y empleando las secuencias obtenidas del marcador COI dado que sólo se cuenta con información acerca de la tasa de mutación de COI, se realizó un análisis bayesiano *Skyline Plot*, que emplea un enfoque coalescente acoplado a un procedimiento de muestreo de MCMC para generar una distribución de probabilidad de tamaños de población pasados (Drummond et al., 2005; Drummond & Rambaut, 2007). La ejecución consistió 10^7 iteraciones, muestreando cada 1000 pasos de MCMC, y utilizando 0,026 sustituciones por sitio por millón de años en la tasa de sustitución, con reloj molecular estricto. El 10% inicial se descartó como *burnin*. La convergencia de datos y gráficos demográficos se realizó con TRACER v.1.7. Finalmente, en Arlequin se analizaron las distribuciones de la frecuencia de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias, utilizadas para detectar expansiones históricas poblacionales (Excoffier et al., 2009), y el cálculo del índice *Raggedness* y su probabilidad asociada. La posición de la media (τ) en distribuciones unimodales corresponde al inicio de la expansión poblacional. El momento de la expansión se puede calcular con la relación $\tau = 2 \mu t$, donde μ es la tasa de sustitución para todo el haplotipo por generación y t es el tiempo en generaciones. Los análisis de la distribución de frecuencias de mismatch de las diferencias por pares entre las secuencias (Rogers & Harpending, 1992; Slatkin & Hudson, 1991) son muy conservadores porque utilizan poca información del conjunto de datos (Felsenstein, 1992). En consecuencia, solo se realizaron para haplogrupos que tenían una señal de posible expansión demográfica basada en pruebas de neutralidad anteriormente realizadas, es decir solo para *C. verrucosa* sp. A. A partir de los valores de τ obtenidos, así como del límite superior e inferior de τ , se estimaron las expansiones de *C. verrucosa* sp A utilizando la tasa de sustitución de $2,6\% \text{ Ma}^{-1}$. Tanto en el análisis de distribución de *mismatch*, como en el *Skyline plot* se utilizó el valor más alto de tasa de mutación propuesto por Nydam & Harrison (2011), dado que, como se discutió en el capítulo anterior, la tasa de sustitución en ascidias es 6,25 veces más rápida que

en vertebrados, y 2,08 veces más rápida que en cefalocordados (Delsuc et al., 2018). Es entonces que hemos de tener en cuenta que podríamos estar sobre-estimando los cálculos obtenidos a partir de las tasas de otros invertebrados. Por otra parte, se sabe que la tasa de mutación (intraespecífica) es, al menos, un orden de magnitud mayor que la tasa de sustitución (interspecífica) (Ho et al., 2011); es entonces que para utilizar los valores propuestos por Nydam y Harrison (2011), en un estudio intraespecífico como lo es la estimación de los procesos demográficos de *C. verrucosa* sp A y sp B, se multiplicó por 10 la tasa de sustitución de 2,6% Ma⁻¹.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Diversidad genética, estructuración espacial y genealogía de haplotipos de los marcadores COI y 18S

A continuación (Tablas 3.1 y 3.2) se muestran los índices de diversidad genética estimados con el programa DnaSP

Tabla 3.1. Estaciones de muestreo y profundidad de los mismos, para *Cnemidocarpa verrucosa* sp. A. El análisis de polimorfismo genético se llevó a cabo para cada una de las poblaciones, calculando el número de haplotipos (Nh), la diversidad de haplotipos (h), y la diversidad nucleotídica (π) utilizando el programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009).

Estación de muestreo	Profundidad (m)	COI - <i>C. verrucosa</i> sp. A				18S - <i>C. verrucosa</i> sp. A			
		N	H	Hd	π	N	h	Hd	π
Burdwood Bank/MPA Namuncurá	91-460	1	1	0,0000	0,0000	1	1		
Caleta Potter	20-30	44	8	0,6290	0,0034	50	3	0,1156	0,0002
Isla Livingston	20-30	7	2	0,4286	0,0026	8	1	0,0000	0,0000
Mar de Escocia	171-428	7	2	0,2857	0,0017	19	2	0,3087	0,0004
Shetland L45	170-179	3	2	0,6667	0,0053	7	2	0,5275	0,0006
Shetland L46	120-129	4	2	0,5000	0,0050	6	2	0,5455	0,0006
Mar de Weddell	217-375	4	2	0,5000	0,0010	9	2	0,3660	0,0004
Isla Mikkelsen	20-30	7	3	0,6667	0,0034	6	1	0,0000	0,0000
Bahía Charlotte	20-30	2	1	0,0000	0,0000	2	1	0,0000	0,0000
Isla Melchior	20-30	6	3	0,7333	0,0023	6	1	0,0000	0,0000
Estación Palmer	20-30	4	2	0,5000	0,0030	3	1	0,0000	0,0000
Bahía Paraíso	20-30	10	3	0,5111	0,0032	10	1	0,0000	0,0000
Isla Fish	20-30	15	5	0,7048	0,0039	15	1	0,0000	0,0000
Isla Renaud	20-30	11	3	0,6909	0,0039	11	1	0,0000	0,0000
Estación Rothera	20-30	40	4	0,5603	0,0032	36	2	0,1311	0,0002
TOTAL		165	16	0,61508	0,00349	188	4	0,16584	0,0002

Tabla 3.2. Estaciones de muestreo y profundidad de los mismos, para *Cnemidocarpa verrucosa* sp. B. El análisis de polimorfismo genético se llevó a cabo para cada una de las poblaciones, calculando el número de haplotipos (Nh), la diversidad de haplotipos (h), y la diversidad nucleotídica (π) utilizando el programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009).

Estación de muestreo	Profundidad (m)	COI - <i>C. verrucosa</i> sp. B				18S - <i>C. verrucosa</i> sp. B			
		N	h	Hd	π	N	h	Hd	π
Caleta Potter	20-30	58	10	0,5348	0,0014	61	1	0,0000	0,0000
Mar de Escocia	171-428					1	1	0,0000	0,0000
Shetland L45	170-179					1	1	0,0000	0,0000
Mar de Weddell	217-375	12	2	0,1667	0,0003	28	1	0,0000	0,0000
Estación Palmer	20-30	14	5	0,5934	0,0023	15	1	0,0000	0,0000
Bahía Paraíso	20-30	1	1	0,0000	0,0000	1	1	0,0000	0,0000
Estación Rothera	20-30	2	2	1,0000	0,0040	1	1	0,0000	0,0000
TOTAL		86	12	0,5026	0,0014	108	1	0,0000	0,0000

La red de haplotipos obtenida con las secuencias de marcador mitocondrial COI (figura 3.1), consistió en 27 haplotipos en total, y dividió las secuencias en dos grupos separados por 50 sustituciones o pasos mutacionales, además de un haplotipo extra correspondiente a BB/MPAN. El grupo con más individuos contuvo 15 haplotipos, dos más abundantes (se corresponde con el grupo que corresponde a *C. verrucosa* sp. A en el análisis de delimitación de especies), el haplotipo más abundante de este linaje se distribuyó en todos los sitios muestreados; mientras que el segundo haplotipo más abundante se distribuyó en Caleta Potter, Isla Fish, Bahía Paraíso, Estación Palmer, Estación Rothera, Isla Renaud, Isla Mikkelsen e Isla Livingston. Por otra parte, el otro linaje contuvo 12 haplotipos, dos más abundantes (*C. verrucosa* sp. B en el análisis de delimitación de especies), el haplotipo más abundante para este linaje se distribuyó en Caleta Potter, Mar de Weddell, Bahía Paraíso, Estación Palmer y Estación Rothera; mientras que el segundo haplotipo más abundante se distribuyó en Caleta Potter, Mar de Weddell y Estación Palmer. Ambos grupos o linajes (A y B marcados en la figura 3.1.) están distribuidos en simpatria en Mar de Weddell, Mar de Escocia, Caleta Potter, Shetlands L45, Estación Palmer, Bahía Paraíso, y Estación Rothera (ver mapa en la figura 1 del material suplementario).

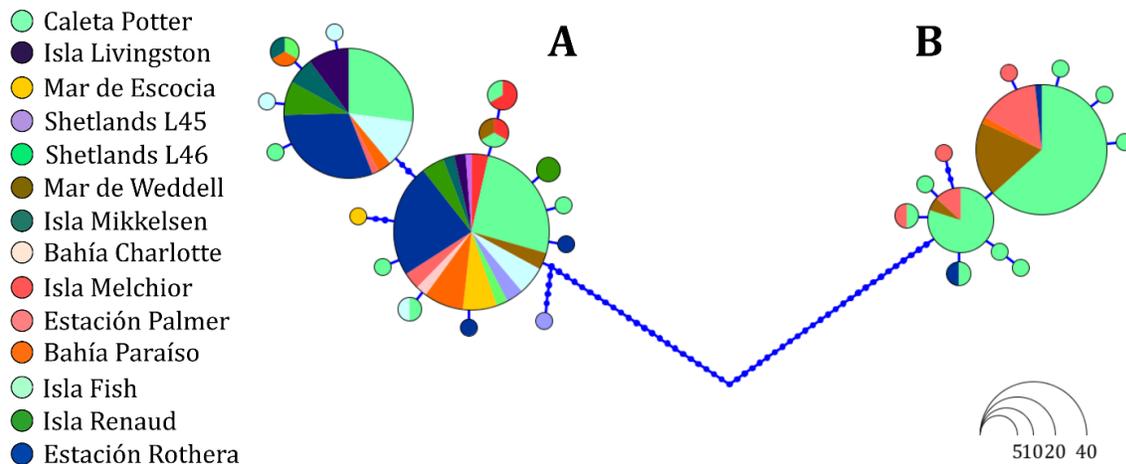


Figura 3.1. Red de haplotipos para el gen mitocondrial COI. Las áreas de los círculos están en proporción al número de individuos. Cada círculo representa un haplotipo, los puntos entre haplotipos simbolizan pasos mutacionales. El tamaño de los círculos hace referencia al número de individuos que tienen ese haplotipo, en la esquina inferior izquierda se encuentra la referencia. Las letras A y B en la figura hacen referencia a los linajes que se corresponden con putativas especies críticas obtenidas en el capítulo dos.

El índice de fijación general para *C. verrucosa* sp. A ($COI-F_{ST} = 0,072$, $p < 0,05$; $18S-F_{ST} = 0,154$, $p < 0,001$) calculado por AMOVA, indica una alta diversidad y una estructura fuerte entre todos los sitios de la Península Antártica. Los resultados del análisis de diferencia de a pares F_{ST} se muestra en la tabla 1 de la sección material suplementario, para las secuencias de COI los valores F_{ST} variaron entre -0,066 y 0,617, para las secuencias de 18S los valores F_{ST} variaron entre -0,304 y 0,578. Los resultados de la prueba de Mantel, para probar aislamiento por distancia, no mostraron correlación entre la distancia geográfica y genética ($r = 0,0165$, $p = 0,4510$ para COI; y $r = -0,0064$, $p = 0,4360$ para 18S, figura 3.2).

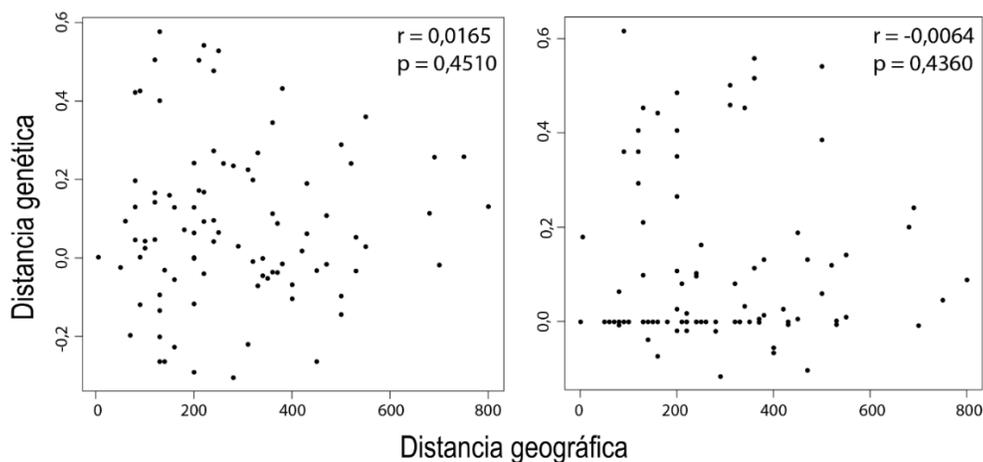


Figura 3.2. Análisis de aislamiento por distancia (IBD). Se muestran las distancias genéticas por pares (F_{ST}) y la distancia geográfica (km) entre todas las poblaciones. A la izquierda resultados de COI, a la derecha resultados de 18S.

La red de ribotipos obtenida con las secuencias de marcador nuclear 18S (figura 3.3), consistió en 10 ribotipos en total. La red consiste en dos ribotipos muy abundantes, separados por una sola mutación entre ellos, y otros ribotipos que se separan por más pasos mutacionales. En la figura 3.3 se marcó el con una letra B el ribotipo que presentan todos los individuos correspondientes a *C. verrucosa* sp B, y que se distribuye en Caleta Potter, Estación Palmer, Mar de Weddell, Estación Rothera, Mar de Escocia, Shetlands L45 y Bahía Paraíso. Por otra parte, se marcó con una letra A los 4 ribotipos que presentan los individuos correspondientes a *C. verrucosa* sp. A., y que se distribuyen a lo largo de todos los sitios de muestreo, excepto el Banco Burdwood (ver mapa en la figura 2 del material suplementario). Se puede apreciar en la red, que existen 5 ribotipos que se separan de los recién descritos por muchos pasos mutacionales (entre 24 y 45), haplotipos que se distribuyen en Caleta Potter, Mar de Escocia y Banco Burdwood, y que corresponden a los individuos representados en las ramas más basales de los análisis filogenéticos (ver figura 2.3). Por último, llama la atención aquí que uno de los alelos de individuo 291 comprendió el único ribotipo representado por un único alelo, mientras que el otro alelo se ubicó en el único ribotipo que representó a *C. verrucosa* sp. B.

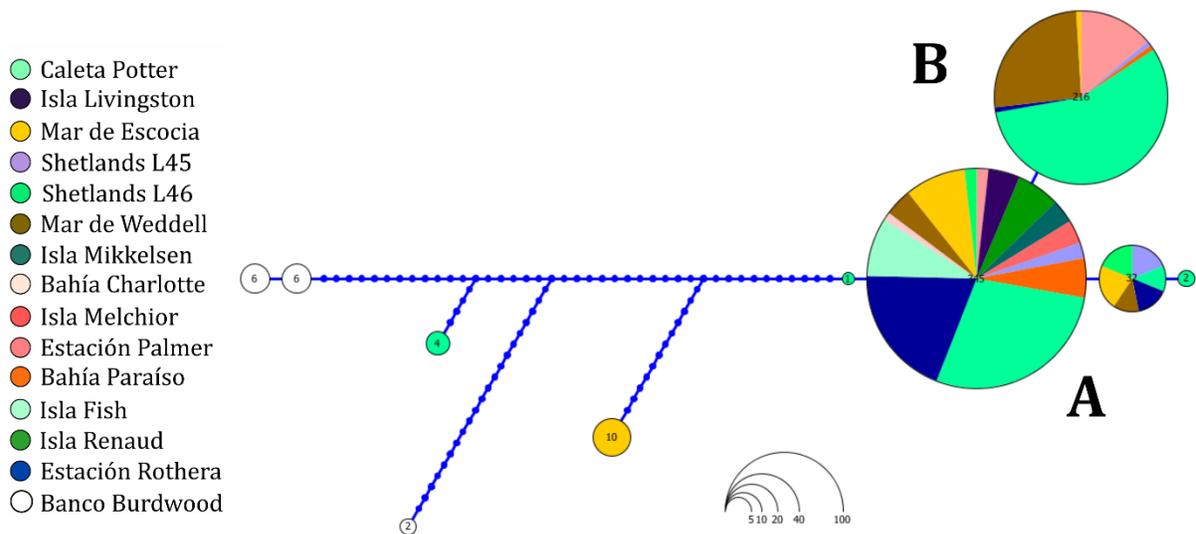


Figura 3.3. Red de ribotipos para el gen nuclear 18S. Las áreas de los círculos están en proporción al número de alelos representados (dos alelos por individuo). Cada círculo representa un ribotipo, los puntos entre ribotipos simbolizan pasos mutacionales. El tamaño de los círculos hace referencia al número de alelos que tienen ese ribotipo, en el margen inferior se encuentra la referencia. Las letras A y B en la figura hacen referencia a los linajes obtenidos aquí, y que se corresponden con putativas especies crípticas obtenidas en el capítulo dos.

Por otro lado, *C. verrucosa* sp. B no mostró estructura genética entre las poblaciones en el análisis de distancia genética F_{ST} de a pares, de secuencias del gen mitocondrial COI (tabla 2, material suplementario). Asimismo, las secuencias del gen nuclear 18S presentaron el mismo ribotipo. El índice de fijación general de AMOVA para COI ($COI-F_{ST} = 0,003$, $p > 0,05$) tampoco mostró estructura genética.

3.3.1. Inferencias demográficas históricas

La reconstrucción de procesos demográficos utilizando el programa DnaSP arrojó valores negativos y significativos para las pruebas de neutralidad de Fu & Li D^* y F^* (-4,41252, $P < 0,02$; -3,84046, $P < 0,02$; respectivamente) para *C. verrucosa* sp. A, lo cual indicaría una condición de desequilibrio debido a los efectos de selección o a una expansión demográfica y/o geográfica, por otro lado, D de Tajima arrojó un valor negativo, pero no significativo (-1,28970, $P > 0,10$). Los diagramas obtenidos con análisis bayesiano (*Skyline-plot*) mostraron estimaciones congruentes (figura 3.4), en donde el tiempo de expansión para *C. verrucosa* sp. A se sitúa hace aproximadamente 10.000 años atrás. En cuanto a *C. verrucosa* sp. B, las pruebas de neutralidad de Fu & Li D^* y F^* y D de Tajima arrojaron valores no significativos (-2,05454, $0,10 > P > 0,05$; -2,28571, $0,10 > P > 0,05$; -1,68806, $0,10 > P > 0,05$; respectivamente). Resultados congruentes con lo obtenido en el análisis bayesiano (figura 3.4).

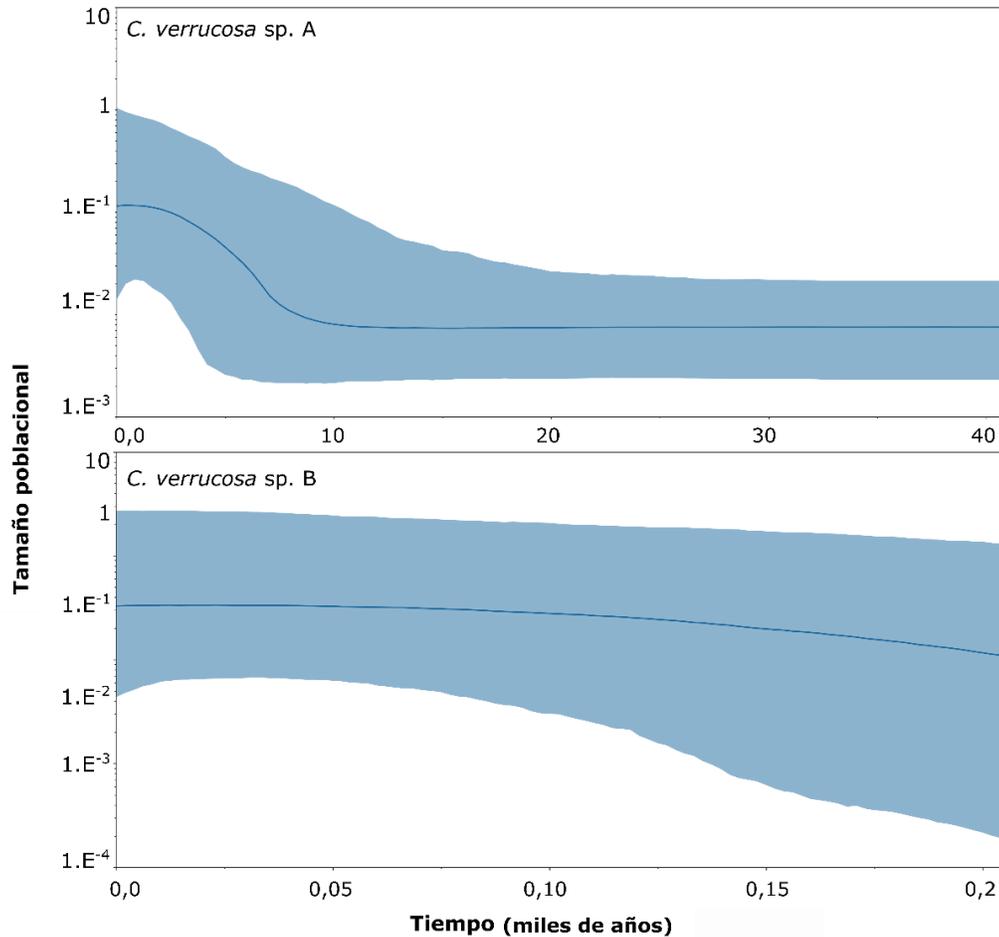


Figura 3.4. Análisis demográfico *Skyline-plot*. Se muestran los resultados arrojados por el análisis bayesiano, arriba *C. verrucosa* sp. A, abajo *C. verrucosa* sp. B. En el eje de las x se encuentra el tiempo en millones de años (Ma), y en el eje de las y el tamaño poblacional. La estimación del tamaño efectivo poblacional se marca con una línea azul, la superficie marcada en celeste representa el intervalo de credibilidad (95%).

En cuanto a los resultados del análisis de distribución de *mismatch* para *C. verrucosa* sp. A mostró valores de probabilidad más altos en el modelo de expansión geográfica (ver tabla 3.3), por lo tanto, se utilizaron los valores de tal modelo para calcular el tiempo de expansión de *C. verrucosa* sp. A. Para calcular el tiempo de expansión se utilizó la fórmula $\tau = 2 \mu t$ y los intervalos de confianza arrojados en el análisis de *mismatch* (tabla 3.3 y 3.4; para obtener t, se suplantó $\tau = 3,0070$, $\mu = 0,026$ multiplicado por el número de nucleótidos del marcador COI). Así, los resultados en millones de años para el tiempo de expansión geográfica son $t = 0,01149$ LI = 0,0046 LS = 0,02158. Es decir, que los resultados tanto para el test de neutralidad, el *skyline plot*, y el de distribución de *mismatch* apuntan a que *C. verrucosa* sp. A experimentó una expansión geográfica/demográfica hace aproximadamente 11.490 años (LI = 4600 LS = 21580), mientras que *C. verrucosa* sp. B. mantuvo una estabilidad demográfica/geográfica.

Tabla 3.3. Análisis para *C. verrucosa* sp. A. Resultados del análisis de *mismatch*.

Expansión demográfica	
Tau	3,8125
Tau qt 2.5%	0,7383
Tau qt 5%	1,1875
Tau qt 95%	7,1543
Tau qt 97.5%	8,5098
Theta0	0,0000
Theta0 qt 2.5%	0,0000
Theta0 qt 5%	0,0000
Theta0 qt 95%	0,1459
Theta0 qt 97.5%	0,5801
Theta1	2,3622
Theta1 qt 2.5%	1,0517
Theta1 qt 5%	1,3496
Theta1 qt 95%	23,3389
Theta1 qt 97.5%	47,5184
SSD	0,1136
Model (SSD) p-value	0,0580
Raggedness index	0,3163
Raggedness p-value	0,0410
Expansión geográfica	
Tau	3,0070
Tau qt 2.5%	0,8562
Tau qt 5%	1,1896
Tau qt 95%	5,6348
Tau qt 97.5%	6,3408
Theta	0,0007
Theta qt 2.5%	0,0007
Theta qt 5%	0,0007
Theta qt 95%	0,8060
Theta qt 97.5%	1,1498
M	1,9534
M qt 2.5%	0,1543
M qt 5%	0,3360
M qt 95%	11,2671
M qt 97.5%	20,0640
SSD	0,0763
Model (SSD) p-value	0,2050
Raggedness index	0,3163
Raggedness p-value	0,3450

Tabla 3.4. Análisis para *C. verrucosa* sp. A. Intervalos de confianza para el análisis de distribución de *mismatch* (alfa 0,100), basado en 1000 réplicas, utilizando el modelo de expansión geográfica.

Variable:	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Media
Tau:	3,0070	1,2080	5,6450	3,4550
M:	1,9530	0,3400	11,3640	63,0450
Theta:	0,0010	0,0010	0,8160	0,1090
Mean No. Of pairwise diff.	1,7500	0,6070	3,5990	2,0730
No. Pol. Sites:	19,0000	6,0000	23,0000	13,7300

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1. Inesperada estructura genética de las poblaciones

La estructura genética poblacional de ambas especies mostró un patrón inesperado, especialmente porque se trata de especies en gran parte simpátricas y que *a priori* no mostrarían un potencial de dispersión diferente. *Cnemidocarpa verrucosa* sp. A mostró un patrón de poblaciones estructuradas genéticamente, mientras que no se registró estructura genética entre las poblaciones de *C. verrucosa* sp. B (aunque los resultados obtenidos aquí para *C. verrucosa* sp. B han de ser tomados con cautela dado el bajo número de estaciones en las que se encontró la especie, y el bajo número de individuos muestreados en algunas estaciones). El análisis de la IBD para *C. verrucosa* sp. A, no mostró relación entre la distancia genética y la distancia geográfica (figura 3.2). *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato* presenta una amplia distribución, con registros de gran abundancia en todo el continente antártico (Kott, 1971; Monniot et al., 2011; Tatián & Lagger, 2010; Tatián et al., 1998; Turón et al., 2016b); así, la continuidad y el alto número de individuos en cada población podría permitir la conectividad genética, manteniendo un flujo genético activo en grandes distancias, sobre todo en la Península Antártica que es donde más abundancia se ha registrado. *Cnemidocarpa verrucosa a priori* se dispersa durante la etapa larvaria pelágica, que en laboratorio se describió con una duración de 16 días, con 8 días como embrión sin eclosionar y hasta 8 días o más como larva con cola (Strathmann et al., 2006). A su vez, y aunque no se han hecho estimaciones del potencial de dispersión de ascidias, se sabe que el transporte de larvas puede ser auxiliado por corrientes de agua, en la Península Antártica existe un conjunto de corrientes costeras a lo largo de la costa occidental que mueve el agua a lo largo de un gran giro ciclónico con algunos subgiros (Moffat & Meredith, 2018, figura 1; Smith et al., 1999).

En ausencia de conocimientos más específicos, se puede plantear la hipótesis de que *C. verrucosa* sp. B tiene un patrón de distribución más continuo a lo largo de su rango de distribución que permite un mayor flujo de genes, mientras que *C. verrucosa* sp. A presenta poblaciones discretas con un flujo de genes más restringido (ver otras consideraciones en la sección 3.4.1.). De hecho, se ha sugerido para ascidias que las altas tasas de mutación tanto del genoma nuclear como del mitocondrial permiten la acumulación de diversidad genética en poblaciones relativamente aisladas (Delsuc et al., 2006; Reem et al., 2013), proceso que puede explicar los resultados arrojados por el análisis IBD para *C. verrucosa* sp. A (falta de relación entre distancia genética y distancia geográfica). Por otra parte, *C. verrucosa* sp. B puede haberse propagado desde una fuente más homogénea que *C. verrucosa* sp. A. Por último, el patrón observado podría estar relacionado con diferentes capacidades para colonizar diferentes tipos de sustrato y / o con el potencial de dispersión diferencial entre las dos especies. Así, la capacidad reportada de habitar todos los sustratos de *C. verrucosa sensu lato* (Ramos-Esplá et al., 2005; Tatián et al., 1998) sería principalmente una propiedad de *C. verrucosa* sp. B, esta especie podría presentar un estadio larvario más largo y por tanto un potencial de dispersión más grande que su contraparte *C. verrucosa* sp. A.

3.4.1. Reconstrucción de procesos demográficos: expansión y estabilidad

Con los resultados obtenidos la segunda parte de este capítulo, sabemos que *C. verrucosa* sp. A ha sufrido una expansión demográfica reciente, hace aproximadamente 11.490 [LI = 4.600; LS = 21.580] años atrás, mientras que *C. verrucosa* sp. B mostró estabilidad demográfica (patrón poco robusto dado el bajo número de individuos muestreados en algunas estaciones). El último máximo glacial ocurrió antes de la expansión estimada para *C. verrucosa* sp. A. Entre los 26.500 y los 19.000 años atrás las plataformas de hielo estaban ocupando su máxima extensión (Clark et al., 2009). El avance de las masas de hielo sobre la plataforma pudo haber producido la extinción local de la fauna bentónica, y de hecho este factor es considerado uno de los mayores limitantes para la supervivencia del bentos marino en zonas someras (Thatje et al., 2005). Luego, el inicio de la deglaciación de la mayoría de las capas de hielo de Antártida occidental ocurrió entre los 14.000 y 15.000 años atrás mediante un rápido calentamiento (Heroy & Anderson, 2005). Luego un enfriamiento posterior, entre 13.000 y 6.500 años, disminuyó la temperatura del aire (Anderson et al., 2002; Pollard & DeConto, 2009; Strugnell et al., 2018). Parte de la costa de la isla King George, al Oeste de la Península Antártica, estuvo libre de hielo a partir de los 9.500 años atrás aproximadamente (Bentley et al., 2005; Hjort et al., 2003), este es un período que se caracterizó por una reducida cobertura de hielo, una mayor producción primaria, y un incremento de sedimentación proveniente de los deshielos, detectados en los sedimentos marinos (Bentley et al., 2009).

Fechas que se corresponden con la estimación de la expansión demográfica de *C. verrucosa* sp. A, en este trabajo.

La estructura espacial de la biodiversidad marina en Antártida está determinada, a pequeña escala, por la cobertura de hielo, el derretimiento del hielo marino y los glaciares, y los gradientes de salinidad que se producen en consecuencia (Convey et al., 2014). El derretimiento de los glaciares afecta la estratificación de la columna de agua, como así también la sedimentación de la misma en aguas costeras. Así, la calidad del agua y las características de la costa cambiaron después del UMG, lo que pudo generar grandes diferencias en la conectividad de las poblaciones, y por lo tanto afectar la dinámica y continuidad de las mismas (Dierssen et al., 2002; Thatje et al., 2005). Smale & Barnes, (2008) sugieren que, la fauna bentónica antártica pudo sobrevivir los períodos donde las capas de hielo se desarrollaron hasta cientos de metros en profundidad, dado que algunas especies poseen capacidad euribática, y larvas planctónicas pioneras en ambientes disturbados que lograron volver a colonizar la plataforma rápidamente (Thatje et al., 2005). En el caso de las especies estudiadas y obtenidas en este trabajo, podemos ver que ambas se desarrollan en la actualidad, tanto en aguas poco profundas (entre 20 y 30 m) como en profundidades de hasta 460 m para *C. verrucosa* sp. A y de 375 m para *C. verrucosa* sp. B (ver tablas 3.1 y 3.2).

Se sabe que, muchos taxa marinos experimentaron expansiones luego del UMG, mientras que otras, mantuvieron constantes sus tamaños poblacionales y/o geográficos (Haye & Muñoz-Herrera, 2013; Krebes et al., 2011; Marko et al., 2010). Dado que *C. verrucosa* sp. A se habría expandido y *C. verrucosa* sp. B habría mantenido sus poblaciones constantes según nuestros resultados, podemos decir que las diferentes especies han respondido a estímulos de cambio climático en el pasado, de manera desigual. El patrón recuperado en la red de haplotipos (COI) sugiere un aislamiento de mucho tiempo entre linajes, y baja diversidad de los mismos (*C. verrucosa* sp. A π -COI = 0,00349; Hd = 0,61508, y *C. verrucosa* sp. B π -COI = 0,0014; Hd-COI = 0,5026). Estos valores son bajos en relación a los índices de diversidad presentados por otras especies de ascidias como *Pyura chilensis* (Haye et al., 2013), *Ciona intestinalis* (Nydam & Harrison, 2007), y el género antártico *Synoicum* (Wiernes et al., 2013), en donde las poblaciones muestreadas coinciden con algunas de este trabajo. Este patrón apoya a las hipótesis planteadas en el capítulo 2, donde se estima que cada “especie” habría sobrevivido en refugios (especiación alopátrica) y recientemente se expandieron hacia zonas favorables donde habrían experimentado contacto secundario. Ahora bien, tomando en cuenta los resultados de este capítulo podríamos estimar que las poblaciones refugiadas habrían presentado relativamente bajo tamaño

poblacional. Asimismo, los resultados evidenciados por el análisis de aislamiento por distancia para *C. verrucosa* sp. A, van en concordancia con las redes de haplotipo y ribotipo obtenidas, y la baja diversidad, ya que una se trata del típico patrón de una especie que se ha expandido mucho en poco tiempo. Es decir, no se evidencia un patrón de aislamiento por distancia porque dado el evento de expansión demográfica / geográfica, causa una homogenización de las poblaciones porque comprenden uno o dos haplotipos / ribotipos que recolonizaron las áreas estudiadas. Así, los haplotipos que habrían colonizado las áreas se pueden apreciar en el mapa de la distribución de los haplotipos (material suplementario, figura 1), donde el haplotipo 4 (en amarillo), y el haplotipo 11 (en azul) que corresponden a *C. verrucosa* sp. A, son los más representados y más ampliamente distribuidos en la Península; mientras que sucede lo mismo para el haplotipo 18 (en verde) que corresponde a *C. verrucosa* sp. B. En cuanto a los ribotipos, se puede ver en el mapa de distribución de ribotipos (material suplementario, figura 2), donde el ribotipo 2 (en naranja) sería el tipo que se habría expandido y hoy representa a *C. verrucosa* sp. A, mientras que el ribotipo 1 (en celeste) a *C. verrucosa* sp. B. En este mapa de ribotipos también se puede apreciar que el Banco Burdwood está representado por ribotipos que no se distribuyen en la Península Antártica, estos individuos corresponden a las ramas basales construidas a partir de los métodos de MV e IB, en el capítulo 2; es decir evidencia de que, al menos para estos grupos la CCA comprende una barrera biogeográfica efectiva (ver también figuras 2.3 y 2.6 del capítulo 2).

Allcock & Strugnell (2012) proponen que durante las glaciaciones hubo especies que se refugiaron en la plataforma continental, experimentaron un cuello de botella y luego se expandieron dada su alta capacidad de colonización, mostrando redes de haplotipo tipo “estrella”; tal caso es el del erizo de mar *Sterechinus neumayeri* (Díaz et al., 2011), y el nemertino *Parbrolasia* (Thornhill et al., 2008). Por otro lado, las especies euribáticas, tendrían la habilidad de sobrevivir en refugios en el mar profundo, podrían mostrar una mayor diversidad haplotípica que aquellas especies que no, dado que el tamaño de sus poblaciones no se habría reducido tan drásticamente durante las glaciaciones, presentando así redes de haplotipos “difusas” (ver figura 1 de Allcock & Strugnell, 2012); ejemplos de este casi serían el camarón *Nematocarcinus lanceopes* (Raupach et al., 2010) y la araña de mar circumantártica *N. austral* (Soler-Membrives et al., 2017). En el caso de las especies estudiadas acá, ambas presentarían redes de haplotipos del tipo “estrella” (figura 3.1), cada una con dos haplotipos centrales. Evidencia que hace más plausible la hipótesis de que hayan sobrevivido en refugios del mar profundo durante la última glaciación y luego haber sufrido una expansión rápida y más recientemente haber empezado a diferenciarse las poblaciones.

Hasta aquí se puede decir que las dos especies estudiadas en este trabajo podrían haber respondido de manera similar a los cambios climáticos del pasado, sin embargo, como indican los resultados, *C. verrucosa* sp. A se habría expandido recientemente mientras que *C. verrucosa* sp. B no. Para explicar esto se puede plantear que, dada la alta tasa de mutación característica de las ascidias (Delsuc et al., 2006; Reem et al., 2013) *C. verrucosa* sp. A podría haber acumulado diferencias genéticas, luego de tal expansión, como para estructurar las poblaciones al grado que hoy presentan. Asimismo, podría esperarse que la diversidad y estructura genética de *C. verrucosa* sp. A, se explique por una diversidad ya característica de la especie antes del UMG, dado que la distancia genética no está relacionada con la distancia geográfica. Por otro lado, *C. verrucosa* sp. B no habría acumulado tales diferencias, quizás por haber mantenido un flujo genético más grande, o por poseer una tasa de mutación más lenta que *C. verrucosa* sp. A.

3.5. CONCLUSIONES

Cnemidocarpa verrucosa sp. A presentó poblaciones estructuradas genéticamente, estructura no relacionada con la distancia geográfica entre las poblaciones; asimismo, la especie habría sufrido una expansión demográfica luego del UMG. Por otro lado, *C. verrucosa* sp. B presentó poblaciones sin estructura genética y estabilidad demográfica. Estos resultados demuestran la importancia de diferenciar especies crípticas; ya que, como en este caso, responden a estímulos de cambio climático en el pasado, de manera diferente.

Para explicar estos patrones, se puede estimar que *C. verrucosa* sp. B presenta un patrón más continuo de distribución, y un flujo génico más grande que *C. verrucosa* sp. A. Además, podría pensarse que ambas especies tienen capacidades de colonización y/o preferencia de sustratos diferentes. Por otro lado, se puede hipotetizar que ambas especies podrían haber sobrevivido el UMG en refugios del mar profundo; que *C. verrucosa* sp. A haya acumulado diferencias genéticas durante este aislamiento, mientras que *C. verrucosa* sp. B haya mantenido cierto nivel de conectividad y estabilidad demográfica. Aunque estas sean hipótesis especulativas, llama la atención el hecho de que la variabilidad reportada en muchos rasgos biológicos y ecológicos de *C. verrucosa sensu lato* puede deberse, por lo revelado en este estudio, a características conjuntas de dos especies crípticas más que a una variabilidad real de una única especie.

CAPÍTULO 4: Una aproximación a la respuesta a cambios en el Océano Antártico: Acidificación y Sedimentación

4.1. INTRODUCCIÓN

La Península Antártica (PA) ha experimentado una de las más altas tasas de calentamiento regional del planeta en las últimas décadas, esto ha producido pérdida masiva de hielos marinos, como así también retracción y deshielo acelerado de glaciares continentales (Bentley et al., 2009; Cook et al., 2016; Pachauri et al., 2014; Pritchard & Vaughan, 2007; Stammerjohn et al., 2012). Las estimaciones en cuanto a los cambios físico-químicos que experimentaría el agua de mar, no sólo incluye un cambio en la temperatura, sino también en la salinidad, el pH, y la concentración de sedimentos inorgánicos en el agua (Jerosch et al., 2019; Morley et al., 2020; Smale & Barnes, 2008). Particularmente, con la retracción de los glaciares, se incorporan grandes cantidades de sedimentos que llegan a la columna de agua de los sistemas costeros (Gutt et al., 2015; Monien et al., 2011; Ruiz Barlett et al., 2021; Schloss et al., 2012). El aporte de sedimentos alcanza su punto máximo en verano y varía a lo largo de la Antártida; en Windmill Islands, al este de Antártida, el flujo de sedimentos es menor (Clark et al., 2017) que, en Livingston Island, Península Antártica (Isla et al., 2001), y Caleta Mariana, Isla 25 de Mayo (Khim et al., 2007; Yoo et al., 2015). Puntualmente en Caleta Potter, Isla 25 de Mayo, Shetlands del Sur (PA), la media total de material suspendido se ha incrementado de 5–10 a 20–30 mg L⁻¹ en aguas superficiales, en las últimas décadas (Monien et al., 2016; Neder et al., 2020; Schloss et al., 2012). Aquí, las corrientes de agua de deshielo descargan hasta 18 000 mg L⁻¹ (promedio de 283 mg L⁻¹) de partículas inorgánicas en la caleta, durante el verano. Durante esta descarga, fracciones significativas del sedimento inorgánico permanecen en la columna de agua superior (Eraso & Domínguez, 2007; Monien et al., 2016; Schloss et al., 2012). En general, los ensamblajes bentónicos poco profundos en la Antártida están estructurados por la dinámica del hielo y las tasas de sedimentación, sufriendo cambios estructurales significativos bajo el rápido cambio climático regional reciente, donde la carga de sedimentos en aguas someras se ha convertido en un factor de estrés importante para estos ensamblajes bentónicos polares dominados generalmente por filtradores sésiles (Barnes et al., 2018; Barnes & Conlan, 2007; Deregibus et al., 2017; Kim et al., 2021; Moon et al., 2015; Pasotti et al., 2015; Sahade et al., 2015; Torre et al., 2021). Se han realizado varios estudios para entender los efectos de la sedimentación en grupos o especies polares específicos; en organismos planctónicos como krill (*Euphausia superba*) y salpas (*Salpa thompsoni*) (Alurralde et al., 2019; Fuentes et al., 2016), y copépodos (*Calanus finmarchicus*, *Pseudocalanus sp.* y *Metridia longa*) (Arendt et al.,

2011); en fitoplancton (Ardelan et al., 2010) y macroalgas (Deregibus et al., 2016; Quartino et al., 2013); como así también en organismos bentónicos, como bivalvos (*Laternula elliptica*) (Philipp et al., 2011), ascidias y pennatuláceos (*Molgula pedunculata*, *Cnemidocarpa verrucosa*, *Ascidia challengegeri* y *Malacobelemnon daytoni*) (Torre et al., 2012, 2014).

Por otra parte, la acidificación de los océanos, es otro factor de estrés importante para los ensamblajes bentónicos polares. Los niveles atmosféricos actuales de CO₂ son alrededor de 410 ppm y vienen aumentando rápidamente, a tasas que no se han registrado en los últimos 56 millones de años de registro geológico (Gingerich, 2019). El CO₂, además de participar como gas invernadero en la atmósfera, se disuelve en el agua provocando el aumento de iones hidrógeno (H⁺) y la disminución de las concentraciones de iones carbonato (CO₃²⁻), induciendo así la disminución en el pH del agua, y reduciendo el estado de saturación del carbonato de calcio (CaCO₃) (Gatusso et al., 2014). Es así que, desde la revolución industrial, el pH ha disminuido 0,1 unidades de pH, dado que los océanos han absorbido el 31 ± 4% de la producción de CO₂ (Gruber et al., 2019). La disminución del estado de saturación del carbonato de calcio, es considerada una de las principales amenazas para los organismos marinos de todo el mundo (Doney et al., 2009, 2020). En las últimas décadas, el esfuerzo por entender los efectos de la acidificación en la fauna marina se ha hecho más extenso, prediciendo cambios desde el nivel de especie a comunidades enteras, y un aumento de la biomasa de productores primarios, acompañado por una disminución de la diversidad general (Doney et al., 2020; Gaylord et al., 2015; Nagelkerken & Munday, 2016). Se ha predicho que las regiones de altas latitudes como en el Océano Antártico van a ser particularmente afectadas por acidificación ya que las aguas frías presentan, naturalmente, bajos niveles de saturación de carbonato (Doney et al., 2009; McNeil & Mearns, 2008; Xue et al., 2018). De hecho, se prevé que para el 2030 el Océano Antártico se vuelva insaturado en aragonita, de acuerdo con el escenario de cambio climático RCP8.5 (IPCC-SROCC 2019). Además, los estudios de monitoreo de la química de carbonatos el Océano Antártico muestran una alta oscilación del pH en las áreas costeras (Kapsenberg et al., 2017; Stark et al., 2018). Los grupos taxonómicos considerados más susceptibles a la acidificación son aquellos que utilizan CaCO₃ para generar sus esqueletos, sin embargo, se ha demostrado que organismos sin estructuras de carbonato de calcio pueden también ser afectados (Doney et al., 2020; Fabry et al., 2009). Los estudios del efecto de la acidificación sobre los invertebrados marinos en la Antártida muestran que las respuestas son variadas, viéndose afectadas la fisiología, el crecimiento, el metabolismo y la homeostasis celular, así como el comportamiento, tanto en adultos como

de larvas (Bailey et al. 2017a; Bailey et al., 2017b; Bylenga et al., 2017, 2016; de Aranzamendi et al., 2021; Espinel-Velasco et al., 2018).

Las ascidias son, en Antártida, epifauna bentónica diversa y abundante que domina agrupaciones tridimensionales heterogéneas; conformando ecosistemas que albergan una biodiversidad comparable a hábitats tropicales y templados bentónicos (Clark et al., 2015; Clarke et al., 2007; Gili et al., 2006; Gutt et al., 2013; Kim et al., 2021); y que juegan un papel importante en el acoplamiento energético de los ecosistemas bento-pelágicos (Alurralde et al., 2019; Gili et al., 2001). Las ascidias son filtradores no selectivos, que obtienen su alimento filtrando el agua en su saco branquial, que es también donde tiene lugar la respiración. Expuestas a eventos frecuentes de descarga masiva de agua de deshielo (Meredith et al., 2018), las ascidias como componentes clave de las comunidades megabentónicas han desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir a la sedimentación (Moon et al., 2015; Pasotti et al., 2015; Torre et al., 2021). Estas estrategias incluyen evadir la deposición de sedimentos eligiendo asentarse en paredes verticales de roca (Lagger et al., 2017), eliminando partículas sedimentarias mediante contracciones que evitan se obture el saco branquial (Torre et al., 2014), y adoptando un estilo de vida que ahorra energía para soportar episodios de sedimentación (Torre et al., 2012). Por otra parte, en cuanto a los estudios de acidificación realizados en ascidias, se ha encontrado una disminución en la mortalidad de larvas, un efecto positivo en la tasa de desarrollo, tolerancia en adultos, y resiliencia de los espermatozoides (Brown et al., 2018; Dupont & Thorndyke, 2009; Esposito et al., 2020; Gallo et al., 2019).

Cnemidocarpa verrucosa sensu lato se encuentra entre las especies más abundantes en áreas influenciadas por la sedimentación y el impacto del hielo (Kim et al., 2021; Lagger et al., 2017; Sahade et al., 2008). Durante las últimas décadas, se observaron cambios en la estructura de la comunidad bentónica de Caleta Potter, que ha sufrido una transición desde una comunidad caracterizada por la dominancia de ascidias filtradoras, a un ensamblaje mixto conformado por filtradores y aquellos que se alimentan de depósitos; estos cambios se relacionaron con el impacto del rápido retroceso del glaciar Fourcade y la descarga de sedimentos resultante durante la temporada de deshielo de verano (Lagger et al., 2017; Sahade et al., 2015). Intentando entender las causas de la disminución de las densidades de ascidias, y en particular de *C. verrucosa* en Caleta Potter, se encontró que la sedimentación afecta su equilibrio energético al aumentar la proporción de partículas inorgánicas en el contenido intestinal, y disminuir la biodeposición y la eficiencia de absorción (Alurralde et al., 2019; Torre et al., 2021). Se vio que *C. verrucosa* aumenta la frecuencia de *squirting* y el consumo de oxígeno hasta una concentración crítica de sedimento de 100 mg L⁻¹ (Torre et al., 2012). La exposición a una mayor concentración de

sedimentos (200 mg L^{-1}) provocó el cese de la actividad *squirting* y la disminución de las tasas de respiración, como así también el cierre de uno o ambos sifones para evitar el ingreso de sedimentos finos en la cavidad del manto y las branquias (Torre et al., 2012, 2014). Si bien se han realizado numerosos estudios acerca del efecto de un importante estresor como es la carga de sedimentos en *C. verrucosa*, no se han realizado aún estudios que evalúen el efecto de otro estresor que está cobrando cada vez mayor importancia como la acidificación del océano.

La secuenciación masiva de ARN es un enfoque innovador para explorar la respuesta fisiológica en términos de las principales vías moleculares y procesos celulares cruciales regulados en respuesta al cambio de factores ambientales en especies no modelo (Croucher et al., 2009; Nookaew et al., 2012). Se sabe que las respuestas al estrés celular abarcan la expresión de una serie de genes conservados evolutivamente involucrados en el ciclo celular, apoptosis, plegamiento y reparación de proteínas y lípidos, estabilización y reparación del ADN y ARN, regulación redox, y metabolismo energético (Bailey et al., 2017a; Huth & Place, 2016; Kaniewska et al., 2015; Li et al., 2018; Liu et al., 2013; Lopez et al., 2017; Nguyen et al., 2016; Smith et al., 2013; Srikanth et al., 2017; Zhang et al., 2019), siendo la depresión de la actividad metabólica, una respuesta común en los metazoos marinos (Peng et al., 2017; Rocker et al., 2015). Los estudios de transcriptómica han hecho un aporte importante para comprender la base genética para la adaptación a los cambios ambientales, y cómo las respuestas fisiológicas a factores estresantes pueden afectar los procesos de plasticidad fenotípica y la adaptación (DeBiasse et al., 2014; Doney et al., 2020; Migliaccio et al., 2019; Strader et al., 2020). Con este fin, la transcriptómica permite una visión imparcial de la respuesta al estrés de los invertebrados marinos antárticos que enfrentan el cambio climático en su hábitat natural, o expuestos al cambio de factor respectivo en el laboratorio. Asimismo, la teoría central de la biología molecular establece que la información fluye de ADN a ARN, y de ARN a proteína (Crick, 1970). Ahora bien, los detalles de cómo es ese proceso, cuánto y en qué tiempo se transfiere esa información a lo largo del genoma, aún está por responderse. Algunos trabajos afirman que hay una correlación positiva entre la cantidad de genes que se expresan (ARNm) para una proteína y la cantidad de esa proteína (Fu et al., 2009; Kosti et al., 2016). También se probó que RNAseq es un buen estimador del total de transcritos expresados, utilizando la proteómica para validar los resultados (Fu et al., 2009). Sin embargo, también se han registrado correlaciones pobres entre niveles de expresión de proteínas y ARN en células individuales expuestas a estrés (Darmanis et al., 2016). En este marco, y como complemento a los resultados obtenidos de RNAseq, nos propusimos evaluar si existe relación

entre algunos genes diferencialmente expresados e involucrados en vías más representadas, y las enzimas que de estos se traducen.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la respuesta de *C. verrucosa* sp. A (Ruiz et al., 2020) a la concentración crítica de sedimentos inorgánicos, como así también a la acidificación del agua según las previsiones para el año 2100 siguiendo el escenario RCP8.5-IPCC. Este capítulo aborda el objetivo específico número 4: analizar la respuesta de *C. verrucosa* y entidades crípticas frente a factores ambientales ligados al cambio climático, como incremento en la sedimentación, temperatura y acidificación, mediante la obtención de su transcriptoma y la medición de enzimas. Así es que, aplicamos un análisis transcriptómico por primera vez a esta especie. Con esto, nuestro objetivo es comprender qué genes se expresan y qué vías se activan / desactivan en la respuesta al proceso de sedimentación (a corto plazo; 36 horas) y de acidificación (a corto y largo plazo; 3 días, 10 días, y 54 días). Como así también analizar cómo se relacionan genes y vías para enfrentar el aumento de sedimentos y potencial descenso de pH en la columna de agua. Además, se investigó si las enzimas involucradas en la respuesta al estrés, como la caspasa y la superóxido dismutasa, se activan en respuesta a la sedimentación y a la acidificación, para probar si las proteínas y los genes responden en concordancia. Sobre la base de trabajos previos y estudios experimentales realizados mediante técnicas moleculares en respuesta a cambios ambientales, planteamos la hipótesis de que *C. verrucosa* sp. A activará genes relacionados con la disminución del metabolismo basal en respuesta a la sedimentación. Además, aumentará la actividad del sistema antioxidante, dada la obstrucción del saco branquial, órgano responsable de la nutrición y la respiración en las ascidias. Planteamos también que *C. verrucosa* sp. A activará genes relacionados con el balance redox en respuesta a la acidificación. Esperamos que esta parte del trabajo proporcione información importante sobre las respuestas de esta conspicua especie antártica al actual proceso de sedimentación, y acidificación debido al cambio climático y al incremento del CO₂ atmosférico.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Experimentos

Durante la Campaña de Verano 2015/2016 en Caleta Potter, Península Antártica se recolectaron ascidias que corresponden a la descripción morfológica de Lesson (1980), mediante buceo a 20-30 m de profundidad (58°39'37,86"O; 62°14'6,153"S), los animales fueron luego inmediatamente colocados en contenedores de agua de mar en el bote, y transportados al acuario experimental en la estación Carlini Argentina (en el laboratorio colaborativo alemán-argentino Dallmann). Los animales recolectados se colocaron en tanques (100L) con circulación de agua de mar natural abierta (0 ± 1 °C) durante diez días

de aclimatación. Posteriormente, se realizaron los experimentos de sedimentación y acidificación con ambas especies mezcladas, dado que aún no se había llevado a cabo la diferenciación de las mismas. El transcriptoma se estudió sólo en la especie *C. verrucosa* sp. A debido al reducido número de muestras de la especie *C. verrucosa* sp. B; para corroborar la identidad de las especies se secuenció el gen COI de muestras de manto de cada individuo, para esto se utilizó la metodología que se implementó en el capítulo dos de la tesis (sección 2.2.1.2. Extracción de ADN, PCR, y secuenciación). Ver figura 4.1.

4.2.1.1. *Experimento de Sedimentación* (ver fig. 4.1): luego de la aclimatación, se seleccionaron especímenes ($n = 10$) con tamaño corporal similar, y se colocaron al azar en seis acuarios (8 L), se aplicó tratamiento en tres acuarios. Los acuarios se mantuvieron en condiciones de luz natural. El sedimento utilizado para el tratamiento se obtuvo mediante draga a 20 m de profundidad en Caleta Potter, se secó a 70°C y se tamizó a través de una malla de sedimento de $50\ \mu\text{m}$. Luego, se siguió el procedimiento aplicado por Torre et al. (2012). El tratamiento consistió en aplicar $200\ \text{mg L}^{-1}$ de sedimento en un episodio único, el control no fue expuesto al sedimento. Después de 36 horas de tratamiento (tiempo que tardó el sedimento en llegar al fondo), se finalizó el experimento. La disección de los animales se realizó en hielo en condiciones estériles, las branquias, el manto y el intestino se separaron y se congelaron a -80°C y se transportaron al Instituto Alfred Wegener (Bremerhaven, Alemania) para su posterior análisis. Luego de la identificación específica por medio del gen COI de cada individuo, se obtuvieron, tanto para el tratamiento como para el control de las mediciones enzimáticas y RNAseq, 3 especímenes de *C. verrucosa* sp. A. La selección de los individuos para el análisis del transcriptoma se realizó evaluando la calidad del ARN (ver sección 4.2.2.).

4.2.1.2. *Experimento de Acidificación* (ver figura 4.1): el protocolo de experimentación se basó en el diseño experimental descrito por Movilla et al. (2012). Los acuarios se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura ($1.04 \pm 0.26^{\circ}\text{C}$) natural, el pH fue gradualmente ajustado en dos tanques (ácido y control) de 150 L cada uno. Se conectó a cada uno de los tanques a pequeños acuarios (6 L) donde fueron ubicados, al azar, animales de tamaño similar (ver el esquema de configuración experimental en Servetto et al., (2021), figura 2). El tratamiento de acidificación simuló las previsiones para el año 2100 siguiendo el escenario RCP8.5-IPCC 2019 de emisiones de CO_2 ilimitadas; se realizó por burbujeo de CO_2 , llegando a un valor de pH de $7,68 \pm 0,17$ ($\sim 1000\ \text{ppm}$); por otro lado, el control se mantuvo con un pH cercano a 8,05 (380 ppm). Ambos tanques fueron continuamente monitoreados por dos electrodos (SP10 T con PT1000) conectados a un controlador de pH (Consort R3610). Los electrodos fueron calibrados diariamente con Buffer Tris, siguiendo el protocolo (SOP6a de Dickson et al., 2007). De cada

uno de los tanques se obtuvieron periódicamente muestras de agua (50mL) que fueron fijadas con HgCl₂ para el subsiguiente análisis de alcalinidad, mediante titulación de Gran (Smith & Kinsey, 1978) con intercambiador de muestras y unidad de titulación (Titro-Line alpha plus, SI Analytics, Mainz, Alemania, con electrodo de pH A157 1 M-DIN-ID). Los parámetros químicos de carbonato, presión parcial de CO₂ [pCO₂] (µatm), concentración de iones bicarbonato [HCO₃⁻] (µmol / kg-SW), concentración de CO₂ en agua de mar [CO₂] ac (µmol / kg-SW), fracción molar de CO₂ en aire seco [χCO₂] (ppm), el estado de saturación de Calcita (ΩCa) y Aragonita (ΩAr) se calcularon utilizando una hoja de cálculo CO₂SYS (Pierrot et al. 2006) (https://cdiac.ess-dive.lbl.gov/ftp/co2sys/CO2SYS_calc_XLS_v2.1/). Se utilizaron constantes de disociación para carbonato determinadas por Mehrbach et al., (1973) y mejoradas por Dickson & Millero, (1987). El resumen de los datos fisicoquímicos del agua de mar se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resumen de las condiciones fisicoquímicas del agua de mar durante el experimento de acidificación. Se midió la salinidad (32,51 ± 0,67), la alcalinidad total, AT (µmol / kg-SW) y el pH en escala total [pH_T]. Presión parcial de CO₂ [pCO₂] (µatm), concentración de iones bicarbonato [HCO₃⁻] (µmol / kg-SW), concentración de CO₂ en agua de mar [CO₂] ac (µmol / kg-SW), el estado de saturación de ΩCa del agua de mar con respecto a la calcita y el estado de saturación de ΩAr del agua de mar con respecto a la aragonita se calcularon utilizando CO₂SYS (Lewis et al., 1998). Los datos se expresan como media ± DE. N = 9 para pCO₂ elevado y N = 12 en condición de control.

	Parámetro medidos		Parámetros calculados				
	AT	pH _T	HCO ₃ ⁻	pCO ₂	[CO ₂] _{aq}	Ω _{Ca}	Ω _{Ar}
pH ácido	2748 ± 669	7.72 ± 0.09	3065.5 ± 975.9	1009.3 ± 136	64.3 ± 8.15	1.37 ± 0.59	0.85 ± 0.37
pCO ₂ ambiental	2714 ± 640	8.03 ± 0.14	2442.8 ± 484.74	473.4 ± 129.36	30.06 ± 8.20	2.73 ± 1.43	1.71 ± 0.89

El muestreo para las mediciones enzimáticas (ver sección 4.2.4.) fue realizado en cuatro tiempos durante el experimento (T0: directamente de Caleta Potter; Ti: 3 días de experimento; T10: 10 días y Tf: 2 meses). Mientras que para el análisis del transcriptoma, se utilizaron muestras del tiempo final (54 días). La disección de los animales se realizó en hielo en condiciones estériles, las branquias, el manto y el intestino se separaron y se congelaron a -80 °C, para ser transportadas al Instituto Alfred Wegener (Bremerhaven, Alemania) para su posterior análisis. Luego de la identificación específica por medio del gen COI de cada individuo, se seleccionaron animales para las mediciones enzimáticas a los 3, 10 y 54 días: Ti-control: 3 individuos, tratamiento: 4 individuos; T10-control: 3 individuos, tratamiento: 7 individuos; Tf-control: 6 individuos, tratamiento: 9 individuos. Por otro lado, para el RNAseq se utilizaron para el

control 5 especímenes, y para el tratamiento 4 especímenes de *C. verrucosa* sp. A, la selección de los individuos para el análisis del transcriptoma se realizó evaluando la calidad del ARN (ver sección 4.2.2.).

4.2.2. Preparación de las librerías y secuenciación Illumina

Luego de la obtención de las muestras y su correspondiente almacenamiento se llevaron a cabo los procedimientos pertinentes para la obtención del transcriptoma. El primer paso para la obtención del transcriptoma fue la extracción del ARN total de 25 mg de tejido del manto, el saco branquial, y el intestino, usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemania), y de acuerdo con el protocolo de tejido estándar. La calidad del ARN se evaluó utilizando Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Alemania). Dado que la calidad del ARN del tejido branquial fue la mejor, las librerías se construyeron utilizando solo este tejido. Las librerías de RNA-seq se generaron utilizando Illumina® TruSeq® Stranded mRNA HT Sample Prep, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las librerías se etiquetaron individualmente para agruparlas antes de secuenciarlas y volverlas a mezclar después. Brevemente, para la obtención de la librería de cADN se procedió primero a la purificación del ARN mensajero (mARN) que contiene colas de poliadeninas utilizando oligonucleótidos de poli-timinas adheridas a “perlas” magnéticas. Luego se realizó una purificación, el mARN se fragmentó en pequeños segmentos utilizando cationes divalentes en altas temperaturas. El ARN fragmentado fue copiado a su primera hebra cADN utilizando una transcriptasa reversa y cebadores al azar. La especificidad de la hebra es alcanzada reemplazando los dTTP por dUTP en la segunda mix seguida por la síntesis de la segunda hebra del cADN utilizando una Polimerasa I y una ARNasa H. A estos fragmentos de cADN, una vez obtenidos, se les liga un adaptador que posee la información necesaria para poder identificar los fragmentos que pertenecen a cada muestra. Luego los productos son purificados y enriquecidos mediante una PCR para obtener la librería final de cADN. El tamaño y la calidad de las librerías se evaluaron con Agilent Bioanalyzer 2100. Finalmente, las librerías (n = 6 para el experimento de sedimentación, y n = 9 para el experimento de acidificación) se normalizaron y agruparon para secuenciarlas en cuatro líneas (réplicas) en el secuenciador Illumina HiSeq 2000 (AWI), se obtuvieron así lecturas de extremo apareado con el kit de Illumina “High” PE (*paired end*) 300 (2 x 150pb).

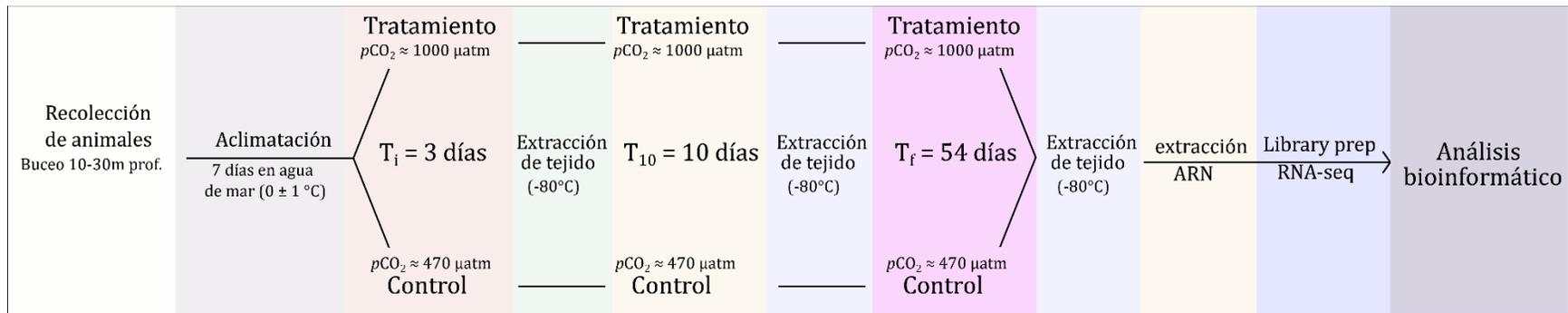
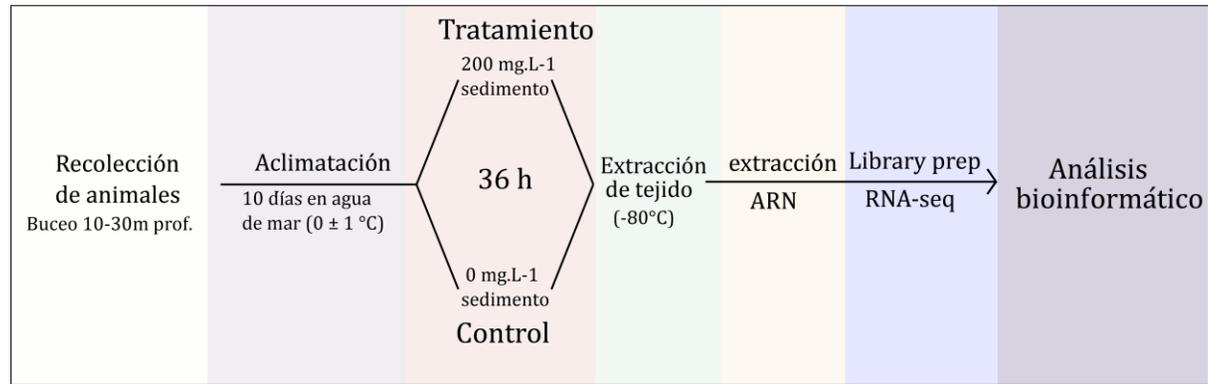


Figura 4.1. Esquema de trabajo y de diseño experimental de los experimentos de exposición a sedimentación (arriba) y exposición a acidificación (abajo).

4.2.3. Análisis bioinformático

La calidad de las lecturas Paired-End en formato fastq se controló mediante FastQC v. 0.11.7 (Babraham Institute, Cambridge, Reino Unido). Las secuencias del adaptador se eliminaron con `bbduk.sh`, del set de herramientas BBtools, versión 38.01 (Bushnell, 2015) con los siguientes parámetros: `ktrim = r`, `k = 23`, `mink = 11`, `hdist = 1`, `tpe, tbo`. Las secuencias restantes se rastrearon en busca de secuencias de ARNr mediante SortMeRNA versión 2.1 (Kopylova et al., 2012) que se eliminaron antes de su procesamiento posterior. Para filtrar las secuencias Illumina PhiX, se utilizó `bbduk.sh` con un tamaño de `kmer` de 31 y un `hdist` de 1. Se realizó un filtrado de calidad final con `bbduk.sh` utilizando Q10 como calidad mínima y 36 bases como longitud mínima. Todas las secuencias obtenidas se normalizaron usando `bbnorm.sh` (Bushnell, 2015) con una profundidad promedio de 100x y una profundidad mínima de 5x. Luego las secuencias fueron ensambladas *de novo* usando el ensamblador de transcriptomas independiente del genoma Trinity (versión 2.5.1; Grabherr et al., 2011) con una longitud mínima de transcripción de 300 bases. La representatividad y la integridad del ensamblaje se evaluó utilizando el paquete BUSCO v 3.0.0 (Seppey et al., 2019) y los ortólogos de la base de datos pública "eukaryota_odb9". El ensamblaje se filtró con `isopct` (porcentaje mínimo de isoforma 1%) y el nivel de expresión mínimo requerido para cada transcripto en cualquier muestra fue de 0,5. Para el análisis de expresión diferencial, lecturas cortas de cada muestra (tratamiento, $n = 3$ frente a control, $n = 3$) se alinearon por separado contra el transcriptoma de referencia *de novo* utilizando Bowtie2 v 3.3.4.1 (Langmead & Salzberg, 2012). Las abundancias relativas se estimaron mediante RSEM versión 1.2.26 (Li & Dewey, 2011) y la expresión diferencial de genes se evaluó utilizando el paquete Bioconductor R edgeR v 3.14.0 (Robinson et al., 2010), con un nivel estándar de significancia $p \leq 0.05$ y un *Fold Change* de al menos 2. Las herramientas se ejecutaron utilizando el paquete Trinity v 2.5.1. La anotación de los genes expresados diferencialmente se realizó utilizando el conjunto de anotaciones funcionales Trinotate v 3.1.1; (Bryant et al., 2017) incluyendo una búsqueda de homología contra la base de datos UniProt Swiss-Prot utilizando DIAMOND v.0.9.24 (Buchfink et al., 2021) y un valor $e < 1e-9$. Luego se ejecutó un análisis de enriquecimiento con el *script* del paquete Trinity, usando GOseq, GO.db y `qvalue` en R v3.6 para Microsoft Windows. Para la visualización y resumen de los términos de GO ($p < 0.05$) se utilizó la herramienta en línea REVIGO (Supek, 2011). Finalmente, se definieron categorías funcionales, la definición de dichas categorías se basó en el análisis de enriquecimiento de términos de GO, resultados visuales de REVIGO, reorganización manual basada en bases de datos UniProt (dentro de la categoría de procesos biológicos de GO), anotación KEGG (función de ruta de reconstrucción de mapa de KEGG),

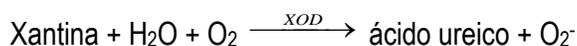
y en la búsqueda de literatura. Puntualmente Anderson et al. (2016), y Kültz (2005) definen una serie de procesos típicos que se ven afectados por el estrés, procesos ya registrados en algunos trabajos que se mencionarán en la discusión, y que funcionaron como marco para la definición de las categorías funcionales de este trabajo. Todos los genes anotados y expresados diferencialmente se designaron en una o más categorías funcionales; en consecuencia, cada gen puede estar involucrado en más de una categoría / función (ver lista de categorías funcionales, tablas 3 a 6 del material suplementario).

4.2.4. Complementación con mediciones de enzimas

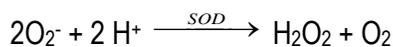
Para esta parte del trabajo se realizaron las mediciones en saco branquial, y se utilizaron las réplicas de todos los tiempos que constituyeron el diseño de ambos experimentos, figura 4.1 (T3, T10 y Tf).

La actividad de la caspasa se analizó como un indicador de la intensidad de la muerte celular apoptótica bajo exposición al estrés. El ensayo se realizó con el kit Caspase-Glo® 3/7 (Promega, EE. UU.), según el protocolo estándar. El ensayo Caspase-Glo® 3/7 se basa en la escisión de la secuencia DEVD de un sustrato luminógeno por las caspasas 3 y 7, lo que da como resultado una señal luminiscente. El tejido del saco branquial congelado (16-33 mg) se trituró en nitrógeno líquido y se pesó en tubos Eppendorf de 2 ml. Se añadió tampón de homogeneización (HEPES 25 mM, MgCl₂ 6H₂O 5 mM, EGTA 1 mM) en una proporción 1:50 (p / v) antes de homogeneizar las muestras con un Eurostar digital IKA® Werke (Staufen, Alemania) durante 2 minutos a 300 rpm. Los homogeneizados se centrifugaron (15 min, 15.682 g 4 °C) y se mezcló 50 µl de sobrenadante con 50 µl de reactivo Caspase-Glo® 3/7 en placas de 96 *well* (placa de microwell F96, PS de ThermoFisher Scientific, Roskilde, Dinamarca). La luminiscencia de esta mezcla se leyó usando un lector de microplacas TRISTAR LB941 (Berthold, Bad Wildbad, Alemania), después de 30 segundos de mezcla automática de la muestra a 350 rpm y un tiempo de reacción posterior de 30 min a 25 °C. Todas las muestras se midieron por triplicado con una muestra blanco (50 µl de sobrenadante, 50 µl de tampón de homogeneización) y un control negativo (50 µl de reactivo Caspase-Glo® 3/7, 50 µl de tampón de homogeneización). Dado que la luminiscencia es proporcional a la actividad de la caspasa-3/7, la actividad de la caspasa se expresa en luminiscencia (número de unidades de luz relativas; RLU).

Las mediciones de superóxido dismutasa (SOD) se realizaron según el protocolo propuesto por McCord & Fridovich (1969). El principio del ensayo se basa en que superóxido dismutasa (SOD) es un interceptor radical y existe como enzima en casi todas las células somáticas.



Los radicales de O_2^- reducen el citocromo-C oxidado, lo que resulta en un aumento de la extinción a 550 nm. Así, ajustando la cantidad de XOD (en una pendiente de 0.02 por minuto, 100% de actividad), se logra medir un valor definido de aumento. La SOD en la muestra atrapa los radicales O_2^- e inhibe el aumento de la extinción, por lo que así se puede calcular la concentración de SOD en la muestra:



Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso de extracción. Se homogeneizó tejido del saco branquial (aproximadamente 70 mg) en tampón de extracción (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) en una relación 1: 4 (p / v), manualmente utilizando un agitador IKA® (Staufen, Alemania) y mortero de plástico. Los homogeneizados se centrifugaron durante 3 min a 18.188 g 4°C. Luego se agregaron 870 μl de tampón de medición (K_2HPO_4 43 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,68), 100 μl de citocromo c (100 μM , Sigma C-2037), 10 μl Se añadieron xantina (5 mM, Sigma X-0626) y 10 μl de XOD (0,3 mU / μl de xantina oxidasa en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M, Sigma X-4875), a 10 μl de sobrenadante. La medición se realizó en un espectrofotómetro DU800 (Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof, Alemania) a 550 nm en una semicubeta termostatazada de vidrio óptico (Hellma, Munich, Alemania) a 20 ° C, durante 3 minutos, cada 10 segundos. Todas las muestras se midieron por triplicado, el blanco consistió en agua. Para los cálculos, se midió el contenido total de proteína de las muestras mediante el método de Bradford (1976). Los resultados se expresan en actividad en el extracto (mU) / cantidad de proteína (mg).

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los paquetes car v3.0-2 y agricolae v1.3-2, implementados en R v3.6 para Microsoft Windows (R Development Core Team, 2020). Para el análisis de los datos del experimento de sedimentación, se llevó a cabo un ANOVA (Análisis de la varianza) con las mediciones de SOD, mientras que para las mediciones de caspasa se realizó un ANOVA heterodástica que emplea la corrección *de Welch* (Welch test), dado que el supuesto de homocedasticidad no se cumplió. Por otro lado, los datos del experimento de acidificación se analizaron mediante un ANOVA anidado (los acuarios donde se ubicaron los individuos, fueron anidados en los tanques donde se llevó a cabo el ajuste de las condiciones del agua), y un test LSD (*Least significant difference*) de Fisher para comparación múltiple en cada actividad enzimática con diferencias significativas. Puntualmente, y debido a la falta de homocedasticidad para los datos de caspasa, se realizó una transformación logarítmica de los datos.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Secuenciación y control de calidad

Las estadísticas de secuenciación se muestran en la tabla 4.2. Después del filtrado, se retuvieron en promedio $14,82 \pm 2,55$ millones de lecturas por muestra con una longitud de $138,67 \pm 1,86$ pares de bases. Con el ensamblaje *de novo*, se obtuvieron un total de 52.929 genes “trinity” y 92.999 transcritos (genes y sus isoformas). Después de la construcción del índice, el 93% de las lecturas se alinearon con el ensamblaje *de novo*. Como resultado de la evaluación de la integridad del ensamblaje contra la base de datos de eucariotas (ver sección 4.2.3.), el 93,1% de los genes esperados se encontraron en el ensamblaje con ortología completa y el 5% con ortología fragmentada (las estadísticas de *ensamblaje de novo* se muestran en la tabla 4.3).

Tabla 4.2. Estadísticas de las lecturas obtenidas antes y después de los procesos de filtrado. Las muestras de los grupos Control-S y Tratamiento-S, corresponden al experimento de sedimentación; mientras que las pertenecientes a los grupos Control-A y Tratamiento-A, pertenecen al experimento de acidificación.

Muestra	Grupo	Número de lecturas crudas (millones)	Largo de lectura (pb)	Número de lecturas post filtrado (millones)	Promedio de largo post filtrado (pb)
698	Control-S	14,0	135,5	13,8	134,5
701	Control-S	14,8	141	14,5	140
707	Control-S	12,0	140	11,8	139
716	Tratamiento-S	17,1	140	16,8	139
719	Tratamiento-S	13,3	140	13,2	139
722	Tratamiento-S	18,9	141	18,8	140
644	Control-A	12,7	140	12,5	140
647	Control-A	11,8	140	11,6	139
650	Control-A	9,9	143	9,8	142
653	Control-A	14,8	140	14,5	140
656	Control-A	22,0	143	21,8	143
662	Control-A	24,1	142	23,7	141
668	Tratamiento-A	12,9	137	12,5	137
683	Tratamiento-A	15,0	139	14,6	139
689	Tratamiento-A	7,5	135	7,3	135
695	Tratamiento-A	16,9	137	16,4	136

Tabla 4.3. Estadísticas de las contigs y transcritos obtenidos a partir de los procesos de ensamblado *de novo* y alineamiento. El ensamblado se hizo con todas las lecturas (de ambos experimentos).

	Todos los transcritos	Isoforma más larga por “gen”
Promedio de contigs	1.130	1.058
Longitud media de contigs	633	599
Número total de bases ensambladas	105.077.471	55.992.943
Contig N50	1.849	1.664

4.3.2. Análisis de expresión diferencial de los transcriptomas

El análisis de expresión diferencial entre las muestras tratadas y sus respectivos controles, se realizó utilizando un valor de $p \leq 0,05$ y $\log FC \geq 2$. Para el experimento de sedimentación se obtuvo un mayor número de genes infra expresados, mientras que para el experimento de acidificación el mayor número de genes fueron sobre expresados (tabla 4.4). Para ambos experimentos el número de genes anotados fue menor al de expresados diferencialmente, es decir, un gran número de transcritos que se activaron durante la exposición a los estresores son genes que aún no se han descrito en la bibliografía, por lo tanto, existe una gran proporción de información que, luego de este paso en el análisis, se pierde y que es de interés para próximos estudios. Cabe aclarar aquí que, de cada gen es posible obtener más de un transcritos, debido al proceso de *splicing* alternativo principalmente. Así, cabe la posibilidad que diferentes transcritos se traduzcan en diferentes proteínas, entonces durante el procesamiento de los datos se corroboró este patrón y se llamaron de diferente manera en el caso que se encontrara más de un transcritos posible. Luego en el proceso de anotación este patrón se simplifica, ya que los diferentes transcritos se anotan en casi todos los casos a un mismo gen, es por esto que de ahora en más se va a utilizar el término “gen” y no transcritos para los pasos siguientes.

Tabla 4.4. Genes expresados diferencialmente con Fold Change ≥ 2 y valor $p \leq 0,05$. Se realizaron anotaciones utilizando la base de datos UniProt utilizando el programa DIAMOND.

Número de genes	Sedimentación		Acidificación	
	Sobre expresados	Infra expresados	Sobre expresados	Infra expresados
Expresados diferencialmente	167	245	224	111
Anotados	34	73	106	35

Los patrones de expresión diferencial se pueden notar en el mapa de calor o *Heatmap* (figura 4.2) donde se representa el análisis de agrupamiento jerárquico (las distancias entre los grupos se calculan mediante la fórmula de disimilitud de Lance-Williams), así se puede ver que el dendrograma agrupó los conjuntos experimentales en ambos casos. Esta métrica indica una clara respuesta rápida de las ascidias a la sedimentación después de 36 h de exposición, y una respuesta sostenida luego de 54 días de exposición a pH bajo.

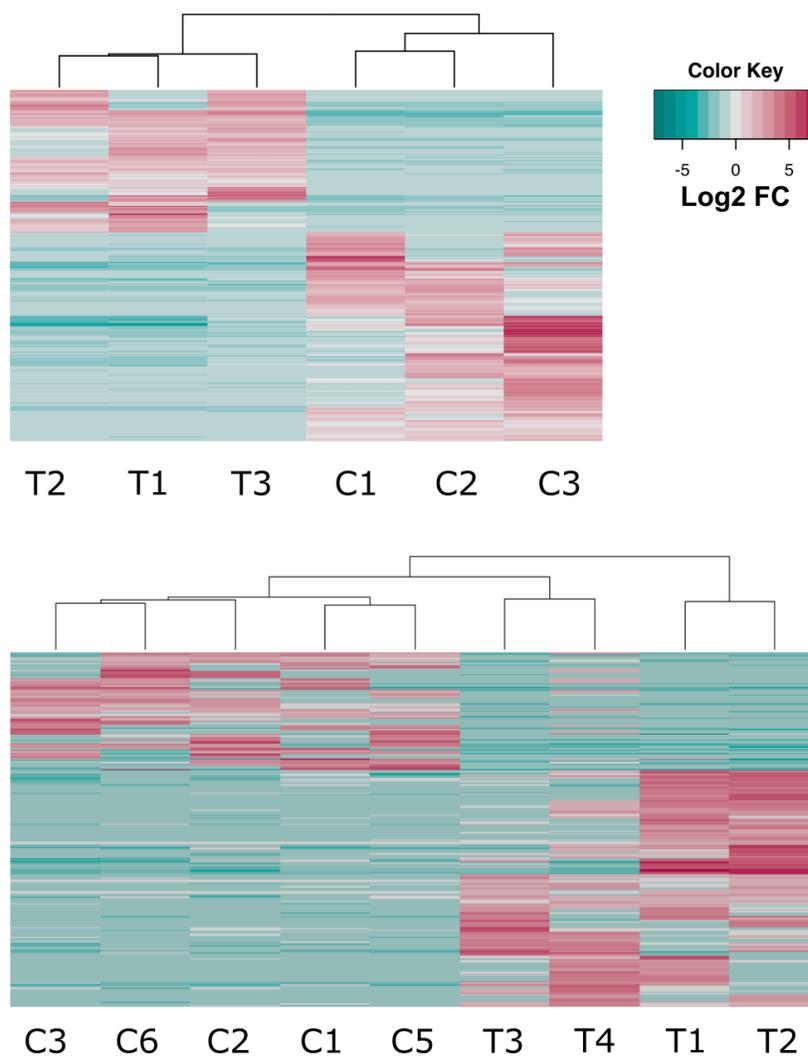


Figura 4.2. *Heatmap* de genes expresados diferencialmente ($FC \geq 2$, $p \leq 0,05$). Los valores positivos (rojizos) representan genes sobre expresados, mientras que los valores negativos (verdosos) representan genes infra expresados. Cada fila representa un gen diferencialmente expresado, cada columna representa una réplica de los tratamientos. El gráfico superior corresponde al experimento de sedimentación, mientras que el gráfico inferior al experimento de acidificación.

4.3.3. Anotación y categorización de genes en respuesta a la SEDIMENTACIÓN y ACIDIFICACIÓN

La anotación con la Ontología de Genes (GO, por sus siglas en inglés) y la Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas (KEGG, Kanehisa et al., 2014), se realizó utilizando la herramienta *Trinotate and Retrieve / ID Mapping* de *Universal Protein Resource* (UniProt). Los términos GO se aplican en la anotación de productos de genes o complejos de proteínas en bases de datos biológicas. Las anotaciones GO son asociaciones hechas entre productos de genes o complejos de proteínas y el término GO que los describe. Una anotación también incluye un código de evidencia y una referencia que respalda la asociación de productos genéticos y términos. Una vez anotados los genes diferencialmente expresados en ambos experimentos, se adjudicaron a una o más categorías GO (ver tablas 3 y 5 del material suplementario).

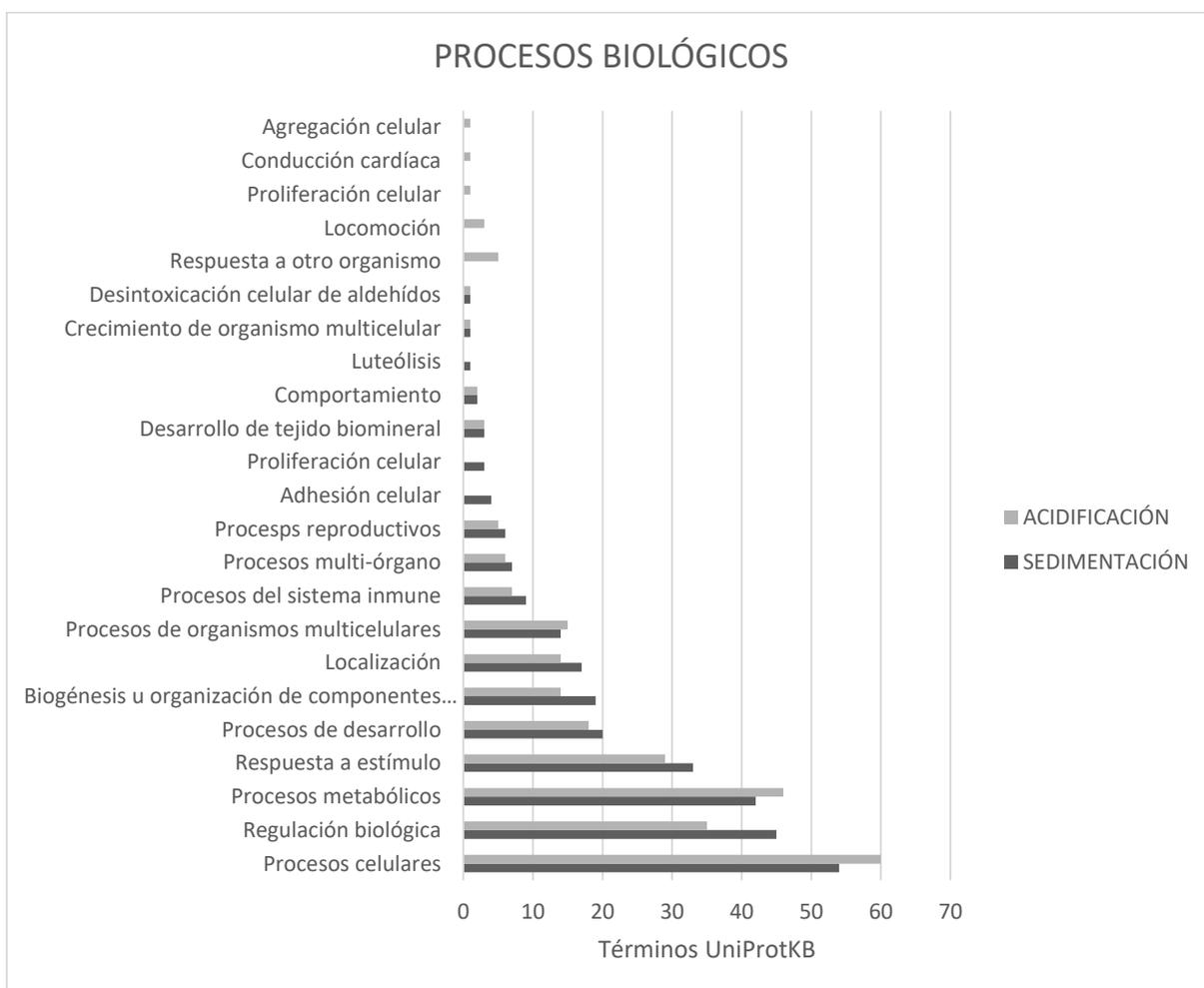


Figura 4.3. Porcentaje de términos GO pertenecientes a la categoría de procesos biológicos, de los genes diferencialmente expresados en los experimentos de acidificación (gris claro) y sedimentación (gris oscuro).

Los términos GO se agrupan en tres categorías: procesos biológicos, componentes celulares, y función molecular. Como se puede ver en la figura 4.3, en cuanto a la categoría de procesos biológicos, para ambos experimentos, los genes relacionados con procesos celulares, regulación biológica, procesos metabólicos, y respuesta a estímulos; agruparon a más del 30% de los genes anotados, que se expresan en forma de términos UniProtKB, dado que es esa la base de datos que usa la Ontología de Genes (ver <http://geneontology.org>). Para la categoría de componente celular (ver figura 4.4), que da cuenta de las ubicaciones relativas a las estructuras celulares en las que un producto génico realiza una función; se obtuvo para ambos experimentos que entre el 70% y el 80% de los genes anotados corresponden a componentes de entidad anatómica de la célula. Finalmente, con respecto a la categoría de función molecular (figura 4.5), los genes relacionados con la función de unión y actividad catalítica agruparon alrededor del 50% de los términos anotados, en ambos experimentos. Como se puede apreciar, haciendo una observación rápida de los resultados expuestos hasta ahora en esta sección, la respuesta de *C. verrucosa* sp. A a la sedimentación y acidificación afectó a similares grupos de genes o categorías GO (ver más adelante en la discusión sección 4.4).

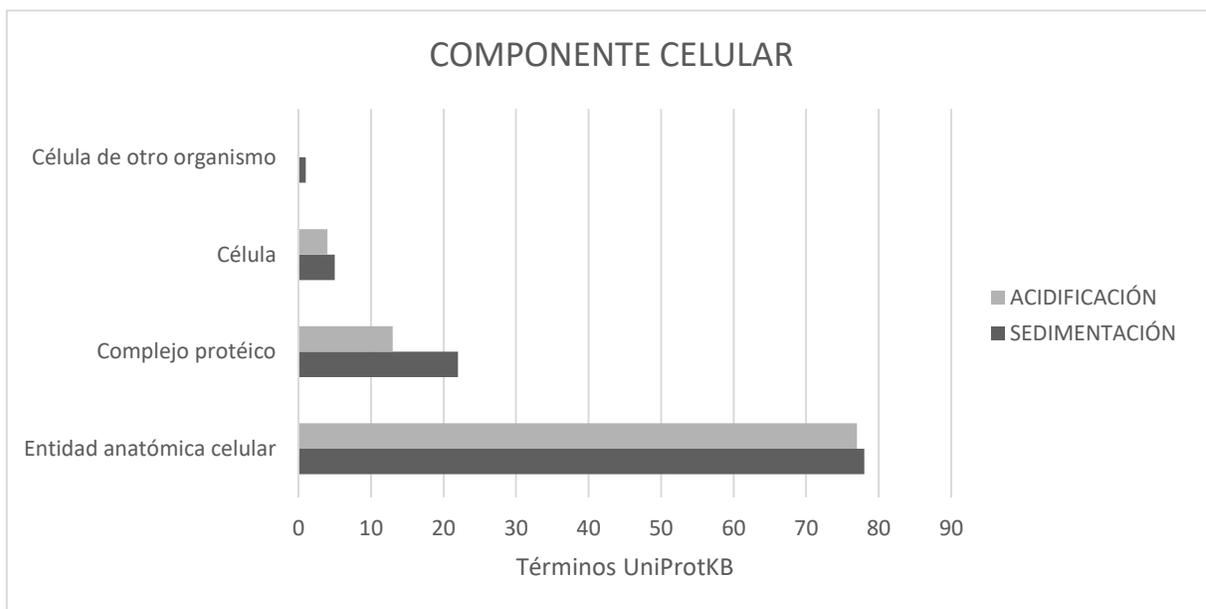


Figura 4.4. Porcentaje de términos GO pertenecientes a la categoría de componente celular, de los genes diferencialmente expresados en los experimentos de acidificación (gris claro) y sedimentación (gris oscuro).

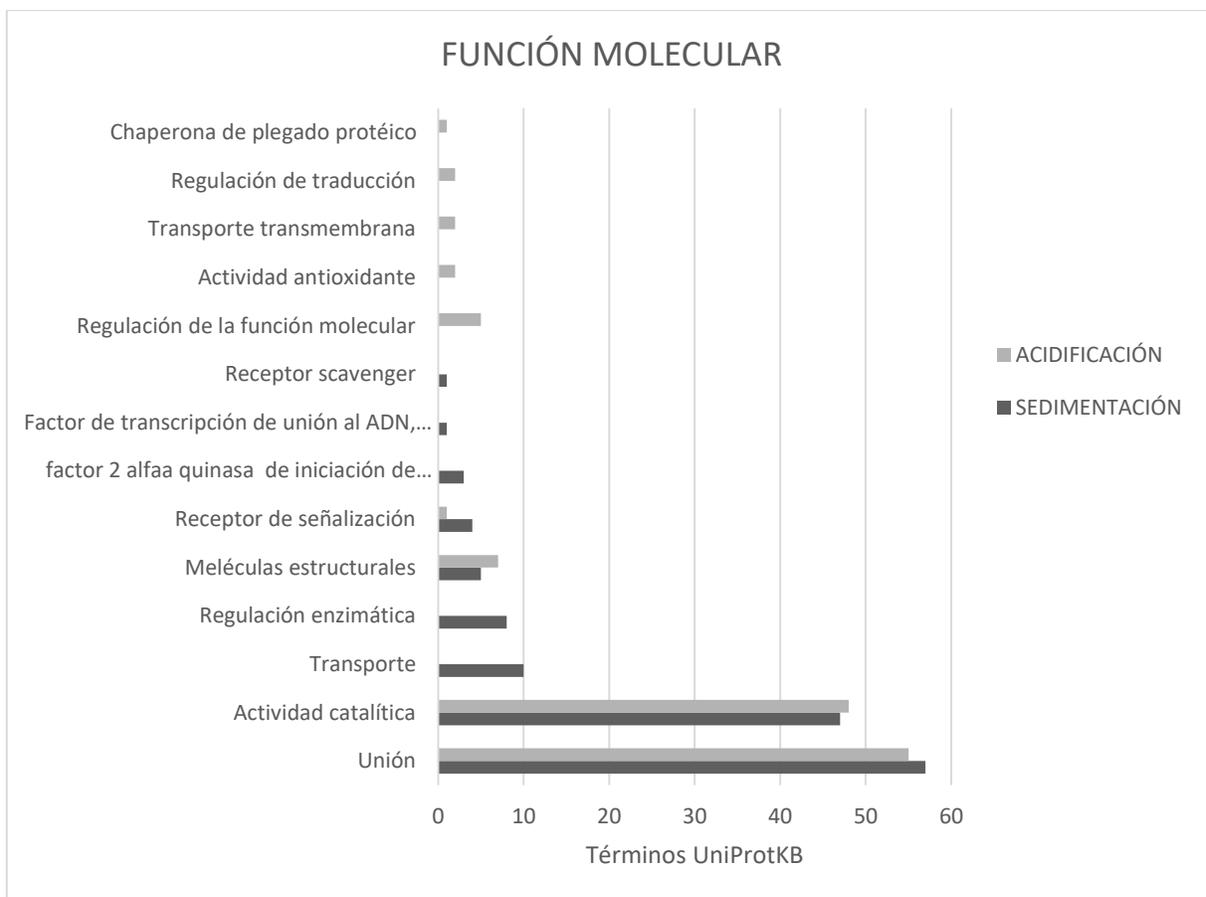


Figura 4.5. Porcentaje de términos GO pertenecientes a la categoría de función molecular, de los genes diferencialmente expresados en los experimentos de acidificación y sedimentación.

Una vez obtenidos los términos GO, se procedió al análisis de enriquecimiento, el objetivo del mismo es obtener los nombres de vías que están enriquecidas, estas vías respetan el esquema de organización de GO. El análisis se llevó a cabo con el script del paquete Trinity, usando GOseq, GO.db, y qvalue en R v3.6 para Microsoft Windows (R Development Core Team, 2020). Este procedimiento evalúa si la fracción de genes de interés en cierta vía es mayor en comparación con la fracción de genes fuera de la vía, basado en la anotación funcional de los genes expresados diferencialmente. El análisis trabaja comparando la frecuencia de anotaciones individuales en la lista de genes con una lista de referencia. En nuestro caso utilizamos como referencia la lista completa de genes anotados (genes expresados diferencialmente y genes no expresados diferencialmente). El valor p obtenido aquí, expresa la probabilidad de ver al menos x número de genes del total de n genes en la lista anotados a un término GO particular, dada la proporción de genes en todo el genoma que están anotados a un término GO. Cuanto más cercano es el valor p a cero, más significativo es el término GO particular asociado con el grupo de genes. Con la lista de términos GO enriquecidos ($p \leq 0,05$) se construyó un “TreeMap” utilizando

la herramienta *online* REVIGO (figura 4.6). El *TreeMap* muestra un gráfico de jerarquía de términos GO. Las nubes de etiquetas muestran palabras clave que están sobrerrepresentadas en las descripciones de términos GO, y palabras clave que están correlacionadas con los valores p de enriquecimiento obtenidos luego del análisis de enriquecimiento (ver sección 4.2.3.).



Figura 4.6. *TreeMap* de términos GO enriquecidos de genes expresados diferencialmente para el experimento de sedimentación (a y b) y el experimento de acidificación (c y d) (a y c términos relacionados con genes sobre expresados, b y d términos relacionados con genes infra expresados). El análisis de enriquecimiento se realizó con la secuencia de comandos del paquete Trinity, utilizando un valor $p \leq 0.05$, se tomaron como conjunto de referencia todos los genes secuenciados y ensamblados en este trabajo. Los términos GO significativamente sobrerrepresentados se muestran con la herramienta web REVIGO. Cada rectángulo es un solo término representativo del término GO correspondiente, estos grupos están conformados por términos estrechamente relacionados. Los tamaños de los rectángulos se ajustan en relación de los valores p de enriquecimiento.

Para el experimento de SEDIMENTACIÓN se vio que, por un lado, los términos GO enriquecidos sobre expresados están relacionados principalmente con la respuesta inmune, la digestión de proteínas y el catabolismo de nucleótidos. Por otro lado, los términos GO enriquecidos infra expresados están involucrados en la diferenciación de tejido, desarrollo / ciclo celular y procesos relacionados con la modificación de proteínas, la respuesta inmune, el almacenamiento de energía, la adhesión celular y el transporte. Para el experimento de ACIDIFICACIÓN se vio que, por un lado, los términos GO enriquecidos sobre expresados están relacionados principalmente con procesos metabólicos, procesos extracelulares y de la membrana, respuesta a estímulos, comportamiento, y metabolismo proteico. Por otro lado, los términos GO enriquecidos infra expresados están involucrados en respuesta a estrés, desarrollo de tejidos, y regulación de ARN.

Por otra parte, la base de datos KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) es un recurso para comprender funciones jerarquizadas del sistema biológico, a partir de información a nivel molecular, especialmente conjuntos de datos moleculares generados por secuenciación del genoma y transcriptoma. Puntualmente se utilizó la herramienta *KEGG mapper – Reconstruct Pathway* usando los términos KO correspondientes a los genes diferencialmente expresados, así se obtuvo una lista de genes ordenados jerárquicamente en las categorías / vías propuestas por KEGG. Las categorías obtenidas con el mapeador KEGG para el experimento de SEDIMENTACIÓN (ver tabla 4 del material suplementario) fueron; categoría de vías metabólicas, que incluye metabolismo de carbohidratos, lípidos, nucleótidos, aminoácidos, vitaminas y cofactores, terpenoides y policétidos, metabolitos secundarios y metabolismo de xenobióticos; esta categoría comprende principalmente genes que están regulados negativamente. Por otra parte, la categoría de procesamiento de información *genética* presentó la mayoría de genes regulados negativamente, con la excepción de los genes involucrados en la proteólisis mediada por ubiquitina. La categoría de procesamiento de la información ambiental mostró genes regulados positivamente y negativamente, pero la mayoría de ellos estaban sobre expresados, específicamente las vías de señalización de MAPK presentaban genes regulados negativamente. Dentro de la categoría de proceso celular, todos los genes implicados en el transporte y catabolismo, el sistema excretor y el desarrollo y la regeneración estaban regulados negativamente; mientras que los genes involucrados en el crecimiento y la muerte celular, el sistema nervioso y la adaptación ambiental estaban regulados algunos positivamente y otros negativamente. En cuanto al experimento de ACIDIFICACIÓN, las categorías obtenidas con el mapeador KEGG fueron (ver tabla 6 del material suplementario); la categoría de vías metabólicas, que incluye metabolismo de carbohidratos, lípidos, nucleótidos, aminoácidos,

vitaminas y cofactores, terpenoides y policétidos, metabolitos secundarios y metabolismo de xenobióticos; comprendió en su amplia mayoría, en respuesta a la acidificación, genes sobre expresados. Así también, la categoría de procesamiento de información genética presentó la mayoría de genes regulados positivamente. La categoría de procesamiento de la información ambiental mostró tanto genes regulados positivamente, como negativamente. Por su parte, la categoría de proceso celular, comprendió genes implicados en el transporte y catabolismo en su mayoría sobre expresados, genes tanto sobre como infra expresados involucrados en crecimiento y muerte celular, y por último genes de comunidad celular sobre expresados. Finalmente, la categoría de sistemas orgánicos que comprendió genes relacionados al sistema inmune y al sistema endócrino, regulados positiva y negativamente; y genes sobre expresados involucrados en el sistema digestivo y nervioso, como así también en envejecimiento, y desarrollo/regeneración.

4.3.4. Vías activadas / desactivadas como respuesta a la SEDIMENTACIÓN

En esta sección se discutirán y describirán las vías activadas y desactivadas en respuesta a la sedimentación de la ascidia *C. verrucosa* sp. A, basado en los resultados de RNA-Seq, la representación esquemática de la respuesta se muestra en la figura 4.7. Los genes diferencialmente expresados en el experimento se escribirán en negrita, acompañados de sus respectivos Fold Change (FC), en el caso de genes regulados positivamente el valor del FC será positivo, mientras que aquellos regulados negativamente, el FC será negativo.

4.3.4.1. Apoptosis

La apoptosis a través de la inducción de la cascada de caspasas es desencadenada por daño al ADN, shock de frío o calor, patógenos y virus, entre otros. Esta forma de muerte celular programada involucra la traducción y amplificación de señales intracelulares apoptóticas. La apoptosis regula el crecimiento, desarrollo, respuesta inmune, y el despeje de células (Fan et al., 2005; McIlwain et al., 2015). El balance entre las señales pro y anti-apoptosis influencia la función efectora del sistema inmune (McFarlane et al., 2002; Zehntner et al., 2007). La **caspara-2** (CASP2 FC = -9,37) participa en la vía apoptótica dependiente de la mitocondria, induciendo la liberación de citocromo c y otros factores apoptogénicos mitocondriales al citoplasma (Fan et al., 2005; Guo et al., 2002; McIlwain et al., 2015); esta enzima se encontró sobre expresada en camarones expuestos a estrés inducido por amonio (Li et al., 2018). Cuando las células reciben un estímulo pro-apoptótico, la mitocondria libera citocromo c, el cual se une a Apaf-1 y dATP. El complejo resultante recluta a **caspara-9** (CASP9 FC = 8,13) produciendo su

activación. La caspasa-9 activada escinde las caspasas 3, 6 y 7 que están más abajo en la cascada de caspasas (Kuida, 2000; Li & Yuan, 2008). La **proteína baculoviral IAP** (IAP/XIAP/BIR, FC \geq 7,31) es multifuncional, y está involucrada en 17 vías KEGG, relacionadas principalmente a la degradación y plegado de proteínas, traducción de señales, crecimiento y muerte celular, y sistema inmune. XIAP inhibe las caspasas 3, 7, y 9 (Li & Yuan, 2008). Por otro lado, el retículo endoplásmico (RE) también está implicado en la ejecución de la apoptosis, donde la alteración en la homeostasis de Ca^{+2} y la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, producen su estrés; esto induce subsecuentemente la activación de la caspasa 12 (Fan et al., 2005; Mcllwain et al., 2015; Nakagawa & Yuan, 2000). Consecutivamente, caspasa 12 escinde y activa la procaspasa 9 en el citosol (Morishima et al., 2002). Puntualmente, **IRE1/ERN1/PPK4** (genes redundantes: ERN1, FC = -9,73; IRE1, FC \geq 9, PPK4, FC = -11,25) censa el estrés en el lumen de RE y conduce a la producción de la forma madura de la proteína x-box binding 1 (**XBP1**) (FC=9,45 down), la cual induce la transcripción de los genes blanco de la llamada respuesta a proteínas no plegadas (unfolded protein response, UPR) (Fan, 2005; Mvllwain et al., 2015). Además, la proteína **XBP1** está relacionada con vías de reparación del ADN entre otras 19 categorías GO (Acosta-alvear et al., 2007); de hecho, se ha propuesto que el retículo endoplásmico desempeña un papel importante en la respuesta al estrés por calor de la ascidia *Ciona intestinalis* (Lopez et al., 2017). Asimismo, el factor de iniciación de traducción eucariota, 2-alfa kinasa 3 (**E2AK3** FC = -9,95) es un efector crítico de la UPR, y regula negativamente la síntesis proteica (Harding et al., 2000). Al igual que la caspasa 2, E2AK3 se encontró sobre expresado en camarones (*Penaeus monodon*) expuestos a estrés inducido por amonio por 96 h (Li et al., 2018). Finalmente, las vías relacionadas con la apoptosis están ampliamente involucradas en la respuesta al estrés evaluada mediante transcriptómica (Huth & Place, 2016; Srikanth et al., 2017). En particular, las transcripciones reguladas en este trabajo CASP9, IAP / XIAP, IRE1 se han descrito como participantes en la protección adaptativa a la hipoxia en cepas de *Caenorhabditis elegans* (Mao & Crowder, 2010), y parte de la respuesta al estrés por amoniaco en la almeja *Corbicula fluminea* (Zhang et al., 2019).

4.3.4.2. Transducción de señales

La vía de señalización MAPK regula el crecimiento celular, la diferenciación celular, y la muerte celular por apoptosis. Esta vía es activada tanto por estrés ambiental, como por citoquinas inflamatorias (Juntilla & Koretzky, 2008; Sun et al., 2015), puntualmente exportina 1 (**XPO1/CRM1** FC \geq -6,16) media la exportación de cientos de proteínas desde el núcleo, mayormente proteínas ligadas a ciclo celular o proteínas virales (Fung et al., 2015). La quinasa dependiente de calcium/calmodulin IV (**KCC4** FC = 4,99)

está involucrada en la vía de señalización de calcio, y regula la actividad de varios factores de transcripción como CREB1, MEF2D, JUN y RORA; que juegan un papel fundamental en la respuesta inmune, la inflamación y la consolidación de la memoria, en respuesta al estrés combinado de calor y acidificación en peces (Huth & Place, 2016). La proteína **RS6** de la subunidad pequeña ribosomal (FC = 4,29) juega un rol en varias vías de señalización: Apelin, HIF-1, PI3-Akt, mTOR, e insulina, estimula la limpieza de células apoptóticas a través de la fagocitosis para resolver el proceso de inflamación (Ohira et al., 2010; Xiao et al., 2015).

4.3.4.3. Respuesta inmune

La vía de señalización TNF induce un amplio rango de señales intracelulares que influyen tanto en apoptosis/supervivencia celular, como en los procesos de inflamación e inmunidad, activando la vía de señalización NF-KB, entre otras. Los genes **IAP/XIAP**, y el factor asociado al receptor de TNF (**TRAF3** FC = -8,87) están involucrados en las vías mencionadas arriba (Lin et al., 2013; Oeckinghaus et al., 2011; Sun, 2011). La vía de señalización NOD-like como parte del sistema inmune, involucra la activación del inflamasoma, un complejo multiprotéico que controla la inflamación y la muerte celular (Wen et al., 2013); **IAP** anteriormente descrito, **CASPD** (FC = 10,06) ortólogo de caspasa 4, y **TRAF3** participan en esta vía. Caspasa 4 es un componente importante del sistema inmune, dado que activa caspasa 1, la cual, en última instancia, conforma el llamado inflamasoma (McIntire et al., 2009; Sollberger et al., 2012). **TRAF3**, por su parte, está involucrado en la supervivencia de las células B (Oganesyan et al., 2006), en el proceso de infección (He et al., 2007), de maduración de IgM a IgG (Vallabhapurapu et al., 2008), y la respuesta inmune dependiente de células T (Zarnegar et al., 2008). Se trata de un receptor que reconoce patrones que puede detectar patógenos microbianos y virales, y generar respuesta inmune (Bishop et al., 2018; Nakhaei et al., 2009). Las cascadas de complemento y coagulación, que trabajan como mecanismo de defensa no específica contra patógenos, involucra el factor de coagulación V (**FA5** FC = -7,51), un regulador central de homeostasis (Maas et al., 2010); el complemento componente 4 (**CO4B** FC = -6) que participa en procesos de inflamación local; y la lectina serina proteasa 2 de unión a manano (**MASP2** FC = -8,24) que escinde CO4B. Por último, la claudina 19 (**CLD19** FC = -9,39), participa en la adhesión celular de unión estrecha. Se encontraron otros tipos de claudina en la respuesta transcripcional al estrés por calor en peces (Liu et al., 2013). La respuesta inmune al estrés ambiental, como el calor y la acidificación, está bien documentada en los corales a través de la transcriptómica de muestras de campo y experimentales (Anderson et al., 2016; Maor-Landaw et al., 2017), pero también en otros organismos

marinos como peces (*Pagothenia borchgrevinki*), camarones (*Penaeus monodon*), y bivalvos (*Corbicula fluminea*) (Huth & Place, 2016; Li et al., 2018; Zhang et al., 2019).

4.3.4.4. Traducción y replicación / reparación de ADN

La proteína **RS6/R6** (FC = 4.29) es parte de la vía de señalización Pi3 k-Akt, esta proteína forma parte de la subunidad menor ribosomal, participa en el control del crecimiento celular y la proliferación, a través de la traducción selectiva (Ohira et al., 2010). La proteína **RAN/TC4** (FC = 8) es necesaria para la importación de proteínas hacia el núcleo (Weis, 2003), en krill se registró que tal proteína fue sobre expresada en respuesta a infección viral (Han et al., 2007), en *Drosophilla Melanogaster* se sobre expresó en células kc en respuesta a estrés por la aplicación de insecticida (Liu et al., 2016). El factor esencial de exportación nuclear, exportina 1 (**XPO1/CRM1** FC = -10,39), en asociación con RAN medía la exportación de ARN empalmados incompletos o sin empalmar fuera del núcleo frente al estrés y la infección (Meng & Gao, 2021), por ejemplo, en crustáceos expuestos a la infección por virus (Yang et al., 2020), y también medía la exportación nuclear de cientos de proteínas relacionadas con el ciclo celular y exposición a virus (Fung et al., 2015). Por último, en este trabajo se vio sobre expresada la enzima uracil-ADN glicosilasa (**UNG** FC \geq -7,74), que está involucrada en la función de reparación por escisión de base, hidrolizando ADN de única hebra o ADN de doble hebra incompatible; esta enzima también se encontró regulada positivamente ante estrés oxidativo (Akbari et al., 2007), entre otros procesos (Pearl, 2000).

4.3.4.5. Movilización de energía

Como se mencionó anteriormente, las vías de metabolismo mostraron casi todos genes regulados negativamente, con la excepción de la enzima beta-ureidopropionasa (**BUP1** FC = 8,44) que hidroliza piramiditas. Al mismo tiempo, los genes relacionados a transporte y catabolismo se regularon negativamente con la excepción de IRE1 mencionado anteriormente. Por otra parte, la enzima tripsina (**TRY2/TRY1/TRYP** FC \geq 5,27), involucrada en la digestión y absorción de proteínas, se encontró sobre expresada en la categoría de sistema digestivo, mientras que el co-transportador de sodio/glucosa 1 (**SC5A1** FC = 5,57) involucrado en la digestión y absorción de carbohidratos se vio infra expresado.

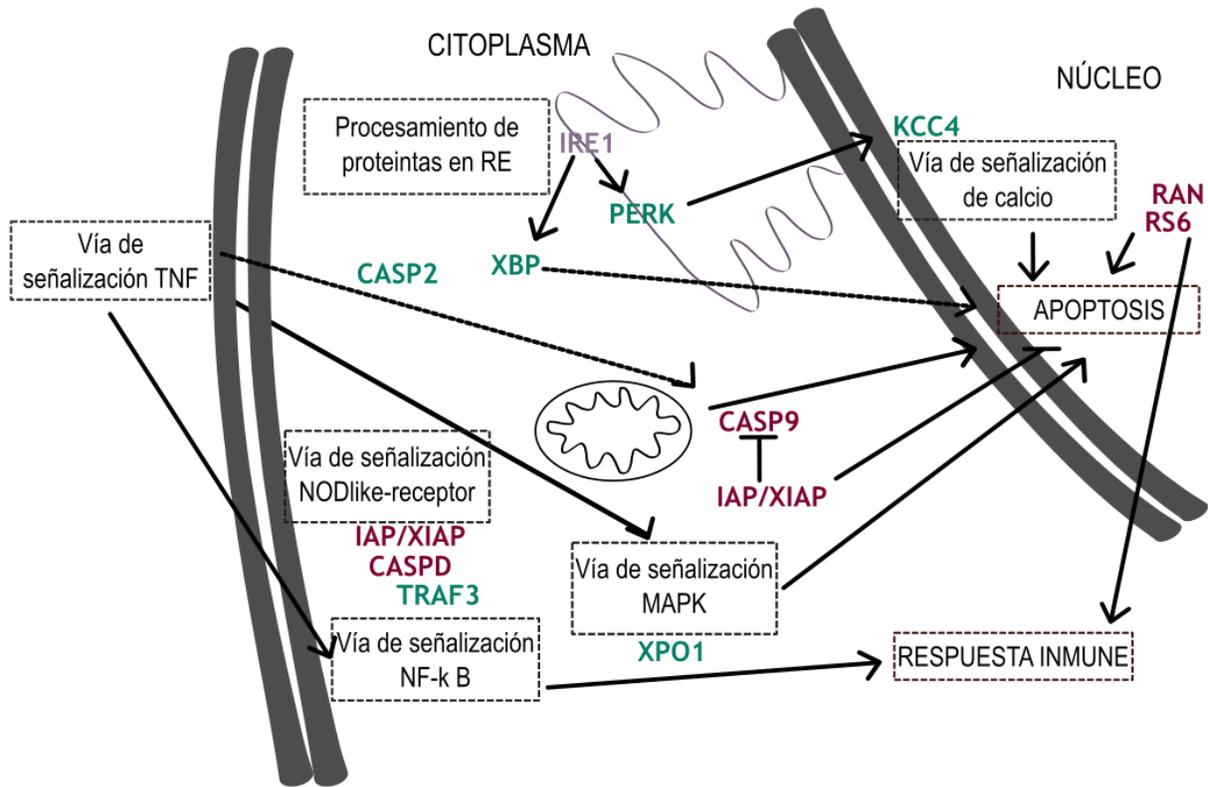


Figura 4.7. Representación esquemática de los genes y vías involucrados en la respuesta a SEDIMENTACIÓN de la ascidia *C. verrucosa* sp. A, basado en los resultados de RNA-Seq. Los genes regulados positivamente están representados en bordó, lo expresados *negativamente* en cian. IRE1 se representó en gris dado que está regulado *positiva y negativamente* dependiendo el transcripto que se tenga en cuenta (ver sección 4.3.4.1.). Los nombres de las vías están representados dentro de cajas. Las flechas continúan representan relación positiva, las punteadas representan relaciones no del todo esclarecidas en la literatura, las líneas continuas representan relaciones negativas.

4.3.5. Mediciones de caspasa y superóxido dismutasa en respuesta a la SEDIMENTACIÓN

En base a los resultados obtenidos a partir de RNAseq, específicamente del listado genes diferencialmente expresados y de las categorías funcionales que se definieron *a posteriori* (ver tablas 3 y 4, en material suplementario), se puede observar que los genes relacionados con apoptosis, y particularmente las caspasas se encuentran afectados. Puntualmente se sabe que las caspasas son una familia de enzimas que están involucradas en el proceso de apoptosis, estas enzimas se clasifican en tres tipos (funcional y filogenéticamente hablando): las caspasas activadoras de proceso apoptótico (2, 8, 9, y 10), las ejecutoras de apoptosis (3, 6, y 7), y las mediadoras de respuesta inflamatoria (1, 4, 5, 11, 12, 13, y 14). Las caspasas iniciadoras procesan las formas inactivas de las caspasas efectoras activándolas (Fan et al., 2005; Li & Yuan, 2008). A partir de aquí, y utilizando un método de medición enzimático ya puesto a punto en el laboratorio, se llevó a cabo la medición de la actividad de las caspasas

3/7. Por otro lado, la generación de especies reactivas de oxígeno bajo estrés ambiental, está bien documentada en invertebrados marinos (Abele et al., 2001; Abele & Puntarulo, 2004a; Carregosa et al., 2014; Jimenez et al., 2015; Li et al., 2020; Weihe et al., 2010). El llamado estrés oxidativo es un desbalance de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), el término ROS se refiere a radicales libres de oxígeno, parcialmente intermedios reducidos. Si estos derivados no están controlados por los sistemas de defensa antioxidante, se produce estrés oxidativo (Sies & Cadenas, 1985). El estrés oxidativo implica una mayor producción de ROS intracelular y extracelular, peroxidación de lípidos, proteínas y ADN, y a menudo causa una alteración general del equilibrio redox celular. Para controlar la producción de ROS, las células aeróbicas están dotadas de una serie de enzimas antioxidantes que convierten aniones superóxido en H_2O_2 (superóxido dismutasa, SOD), convierten H_2O_2 en agua y oxígeno (catalasa, CAT) o usan H_2O_2 para oxidar sustratos (peroxidasas, por ejemplo, glutatión peroxidasa). Es así que la medición de SOD, como buen estimador de la actividad del sistema antioxidante (Freitas et al., 2012), fue realizada.

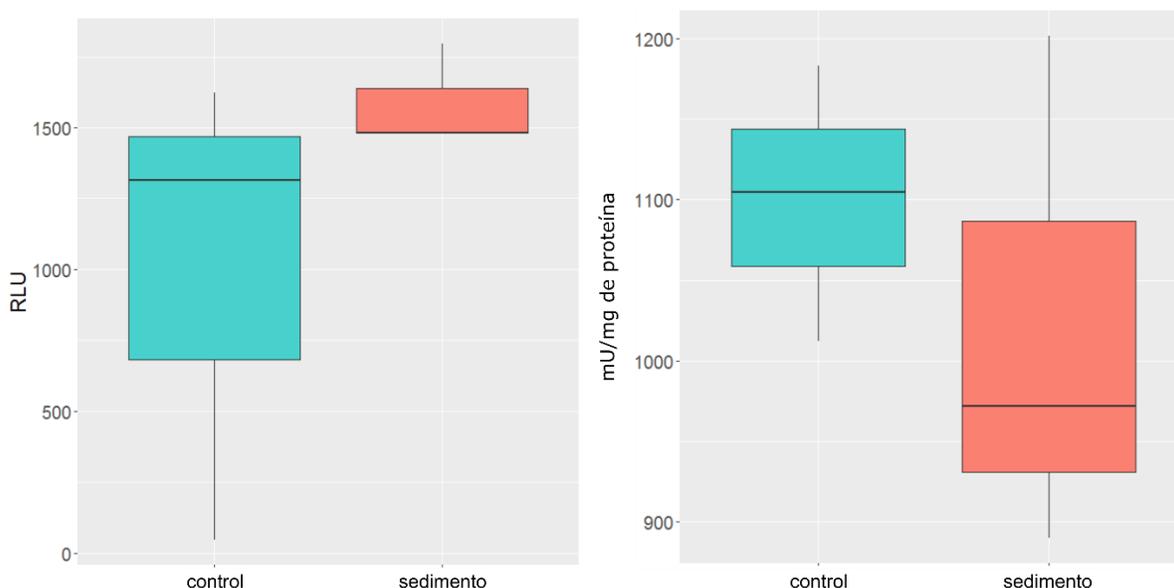


Figura 4.8. Mediciones de actividad enzimática observadas en respuesta a la exposición a sedimento (200mg/l) durante 36h. A la izquierda, actividad caspasa expresada en valores de luminiscencia (RLU). A la derecha, actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) expresada en actividad en el extracto (mU) / cantidad de proteína (mg). Los gráficos de caja representan la mediana (línea media), el segundo y tercer cuartil (límite superior e inferior de la caja, respectivamente), los bigotes expresan el valor máximo definido como el rango inter-cuartílico multiplicado por el factor 1,58.

Para las mediciones de la enzima caspasa, no se observó diferencia significativa entre control y tratamiento (test de Welch, $p=0,3447$), sin embargo se observó una tendencia de aumento de caspasa en los animales bajo sedimentación. De la misma manera, para las mediciones de SOD no se observó

diferencia significativa entre control y tratamiento (ANOVA, $p=0,4979$), pero si una tendencia de disminución de la cantidad de SOD (figura 4.8).

4.3.6. Respuesta molecular a la SEDIMENTACIÓN

Se ha documentado que *C. verrucosa sensu lato* expuesta a sedimentación muestra un incremento de la actividad metabólica hasta una concentración de sedimento crítica (200 mg L^{-1}) cuando la actividad desciende. Además, se registró que los animales expulsaban chorros de agua para expulsar los sedimentos, a la vez que cerraban los sifones (Torre et al., 2012, 2014). En este estudio, utilizamos la cantidad crítica de sedimento mencionada anteriormente, pero cabe aclarar que la entrada de sedimentos en la caleta donde se realizaron los muestreos, durante las tormentas, puede estar muy por encima de 200 mg L^{-1} (Barlett et al., 2021; Monien et al., 2016; Schloss et al., 2012). En el presente estudio, los animales bajo estrés por sedimentación mostraron una regulación negativa de la apoptosis y el metabolismo general, y bajos niveles de respuesta antioxidante (actividad SOD). Por tanto, suponemos que *C. verrucosa* sp. A utiliza una estrategia de “ahorro de energía/ apagado” bajo exposición aguda a grandes cantidades de sedimentos (36 horas en este estudio, 1 día en Torre et al., 2014). Abele et al. (2007) propusieron que el mecanismo de oxiconformidad podría ser un rasgo importante para la supervivencia de invertebrados marinos tolerantes a hipoxia, porque la actividad aeróbica reducida evitaría la aparición temprana de hipoxia tisular y provocaría una reducción de la formación de radicales libres mitocondriales. Además, los transcriptos relacionados con apoptosis que fueron regulados positivamente en este trabajo. Estos se han descrito como participantes en la protección adaptativa a la hipoxia en cepas de *Caenorhabditis elegans* (Mao & Crowder, 2010), la respuesta al estrés en peces, y camarones (Huth & Place, 2016; Li et al., 2018), y en respuesta al estrés por amoníaco en la almeja de agua dulce *Corbicula fluminea* (Zhang et al., 2019). Además de esto, el proceso de “depresión metabólica” se ha descrito en varios estudios transcriptómicos donde los metazoos marinos estuvieron expuestos a estrés agudo, principalmente a la acidificación y al calor (Peng et al., 2017; Rocker et al., 2015). Así, un mecanismo de “protección adaptativa” que implica depresión metabólica, puede atribuirse a *C. verrucosa* sp. A expuesta a concentraciones críticas de sedimento; este mecanismo implicaría una reducción de la defensa antioxidante y la desactivación de las vías apoptóticas, reducción de la actividad metabólica, acompañadas de comportamientos tales como la expulsión de agua a través de los sifones, y el cierre de los mismos.

La disminución de la actividad de la SOD ya se describió en algunos invertebrados en respuesta a la exposición de estrés térmico a corto plazo, patrón observado en el bivalvo antártico *Yoldia eightsi*, la

lapa antártica *Nacella concinna* y la almeja templada *Mya arenaria*, que se atribuyó a la desnaturalización de la SOD a altas temperaturas (Abele et al., 2001; Abele & Puntarulo, 2004). Sin embargo, estos estudios no pueden definir si la disminución se debe solo a la desnaturalización de proteínas inducido térmicamente o si refleja una alteración metabólica general. En nuestro estudio, la baja actividad de SOD se puede atribuir a una alteración o ajuste metabólico general, dado que la temperatura no se modificó con respecto a las condiciones naturales. La disminución de la amplitud de respuesta del sistema de defensa antioxidante y la expresión génica relacionada también se encontró en la ascidia *Ciona robusta*, respuesta propuesta como una "memoria de estrés frío" que ayuda a mantener la homeostasis adaptativa (Avramova, 2015; Li et al., 2020). De esta manera, se sugirió que la exposición prolongada y subletal al estrés (temperatura alta, pH bajo, salinidad alta, metales pesados) puede estimular el aumento evolutivo de la resiliencia al estrés (Maor-Landaw et al., 2017; Nguyen et al., 2016; Smith et al., 2013; Weihe et al., 2010). Este también podría ser el caso de *C. verrucosa* sp. A, de esta manera, la especie podría "aprender" cuándo ahorrar energía y así tolerar mejor el estrés recurrente que producen los pulsos de sedimentación durante el verano.

En nuestros resultados se encontró discordancia entre las mediciones transcriptómicas y enzimáticas. La vía de apoptosis estaba regulada negativamente en las ascidias bajo estrés de sedimentación de acuerdo con la transcriptómica, pero se encontró una tendencia a tener una mayor actividad enzimática de la caspasa 3/7 en los animales expuestos a la sedimentación. También se han encontrado resultados contradictorios entre las respuestas moleculares y bioquímicas en la respuesta del mejillón *Mytilus galloprovincialis* expuesto a mezclas químicas (Giuliani et al., 2013), y la respuesta de la ascidia *Ciona robusta* expuesta a estrés por frío (Li et al., 2020). Regoli & Giuliani, (2014) propusieron que los efectos que ocurren en varios niveles intracelulares pueden ser enmascarados por procesos no genómicos que afectan la estabilidad del ARN mensajero y el recambio de proteínas, por diferentes tiempos para los mecanismos de transcripción y traducción, por la capacidad metabólica de los tejidos, y por modificaciones postranscripcionales de proteínas (DiBello et al., 2007; Giuliani et al., 2013).

Se puede concluir que la respuesta a la exposición de estrés por sedimentación de *C. verrucosa* sp. A, abarcó más genes regulados negativamente que positivamente; y la defensa inmunológica, la apoptosis y el sistema antioxidante se vieron afectados. Todos estos procesos ya fueron descritos mediante transcriptómica y proteómica por estar involucrados en respuesta a diferentes estresores ambientales: en camarones expuestos a estrés por amoníaco (Li et al., 2018), en almejas expuestas a estrés por amoníaco (Zhang et al., 2019), en peces expuestos a calor y acidificación (Huth & Place, 2016;

Liu et al., 2013; Smith et al., 2013), y estrés por salinidad (Nguyen et al., 2016), en corales expuestos a acidificación y estrés por calor (Kaniewska et al., 2015), y en ascidias expuestas a estrés por calor (Lopez et al., 2017). La apoptosis asociada a las mitocondrias se activó en los animales tratados en este trabajo, ya que el activador caspasa 9 se reguló positivamente y las mediciones enzimáticas mostraron una mayor cantidad de caspasa 3/7 (caspasas ejecutoras). Sin embargo, la caspasa 2 (inductora de apoptosis) se reguló negativamente y XIAP / IAP (inhibidor de las caspasas 3, 7 y 9) se reguló positivamente, por lo que la inhibición de la apoptosis también se desencadenó en los animales expuestos a la sedimentación en este trabajo. Esto también se acompaña de la regulación negativa de la apoptosis relacionada con el estrés del retículo endoplásmico (genes IRE1 y E2AK3). La respuesta inmune inespecífica fue regulada negativamente en general, pero al mismo tiempo, la respuesta inmune fue regulada positivamente a través de CASPD y XIAP, lo que finalmente implica la activación del inflammasoma. Esto se complementó con la regulación positiva de KCC4, que regula los factores de transcripción relacionados con la respuesta inmune, y RS6, que estimula la eliminación de las células apoptóticas para resolver el inflammasoma. En general, las vías metabólicas estaban reguladas negativamente, sin embargo, la tripsina estaba sobre expresada, lo que implica que la energía proteica se movilizó en respuesta a la sedimentación. Finalmente, el metabolismo general y la actividad de la SOD se redujeron en los animales tratados. Estos resultados apuntan a una protección adaptativa de la ascidia que implica depresión metabólica, la evidencia aportada en este trabajo apoya la hipótesis de que la exposición prolongada y subletal al estrés puede estimular el aumento evolutivo de la resiliencia al estrés (Anderson et al., 2016; Maor-Landaw et al., 2017), y que las respuestas plásticas al estrés proporcionan excelentes estrategias para la adaptación de las poblaciones al estrés ambiental creciente (Brown et al., 2018; DeBiasse & Kelly, 2016; Huth & Place, 2016; Nguyen, Viet et al., 2016; Smith et al., 2013). Patrón que podría explicar, en parte, la gran cantidad de *C. verrucosa sensu lato* que colonizaron áreas recientemente expuestas después del retroceso de los glaciares y, por lo tanto, están muy influenciadas por la sedimentación y la erosión del hielo (Kim et al., 2021; Lagger et al., 2017; Torre et al., 2021).

4.3.7. Vías activadas / desactivadas como respuesta a la ACIDIFICACIÓN

En esta sección se discutirán y describirán las vías activadas y desactivadas en respuesta a la acidificación de la ascidia *C. verrucosa* sp. A (tablas 5 y 6 del material suplementario), basado en los resultados de RNA-Seq, la representación esquemática de la respuesta se muestra en la figura 4.9. Los genes diferencialmente expresados en el experimento se escribirán en negrita, acompañados de sus

respectivos Fold Change (FC), en el caso de genes regulados positivamente el valor del FC será positivo, mientras que aquellos regulados negativamente, el FC será negativo.

4.3.7.1. Apoptosis

La regulación positiva de la vía apoptótica se vio en respuesta a muchos estresores, como se comentó en la sección 4.3.4.1. Y puntualmente, frente a la acidificación, en el caso de la ostra *Crassostrea gigas*, donde se observó tal respuesta en combinación con elevados niveles de cadmio (Cao et al., 2018). En este trabajo vimos que la proteína serina/treonina kinasa/endoribonucleasa IRE1 (**ENR1** FC = -5,33), es la encargada de percibir el estrés en el lumen del retículo endoplásmico. Su estimulación induce la transcripción de los genes blanco de la llamada respuesta a proteínas no plegadas (UPR, por sus siglas en inglés) (Fan et al., 2005; McIlwain et al., 2015). La proteína de muerte celular 3 (**CED3** FC = -4,80), homóloga a caspasa-2 controla el proceso de apoptosis dependiente de la mitocondria, activando o desactivando proteolíticamente un amplio rango de sustratos (Kumar, 2007), se encontró regulada negativamente también en el experimento de sedimentación de este trabajo, y sobre expresada en camarones expuestos a estrés inducido por amonio (Li et al., 2018). Además, la enzima caspasa-7 (**CASP7** FC = -3,35) es una caspasa ejecutora de apoptosis, es decir que además de estar involucrada en la activación de la casacada de caspasas, en última instancia, ejecuta el clivaje de las proteínas celulares. Además, su sobre expresión promueve la muerte programada (Fan et al., 2005; McIlwain et al., 2015). En el caso del experimento de acidificación, la expresión de CASP7 al igual que IRE1 y CED3 se encontraron reguladas negativamente, es decir, el proceso de muerte celular programada se estaría inhibiendo, al igual que en la respuesta a la sedimentación de *C. verrucosa* sp. A. Similar a lo que se observó recientemente en un trabajo en la ostra del pacífico *Crassostrea gigas* por Wang et al. (2021) quienes sugieren que una posible estrategia de adaptación de las ostras a la acidificación de los océanos y los cambios ambientales; ya que dichos autores observaron que tanto la caspasa 3 y 7, como así también la apoptosis de los hemocitos, aumentaron después de la exposición a corto plazo (7 días) y volvieron a los niveles normales después de la exposición a largo plazo (42 a 56 días). De la misma manera, el proceso de apoptosis se vio regulado negativamente en larvas de copépodos árticos expuestos a bajo pH (Bailey et al., 2017a). Sin embargo, el factor de iniciación de traducción eucariota, 2-alfa quinasa 3 (**E2AK3** FC = 2,88) (efector crítico de la UPR, y regulador de la síntesis proteica, Harding et al., 2000); se encontró sobre expresado en los resultados de este capítulo. De manera similar a lo que se observó en camarones expuestos a estrés inducido por amonio (Li et al., 2018), y en contraposición a lo que se encontró en el experimento de sedimentación de este trabajo, donde se reguló negativamente.

Además, en la ostra *Crassostrea gigas* se observó la típica respuesta de estrés frente a estrés por calor, en donde sobre expresó el factor eIF2 α , sustrato de E2AK3 (Yang et al., 2017). Por último, la lactaderina (**MFGM** FC = 4,88), que se vio sobre expresada, es una molécula que contribuye a la fagocitosis de células apoptóticas, promoviendo su eficiente eliminación controlando la inflamación (Aziz et al., 2011; Nagata & Tanaka, 2017).

4.3.7.2. Respuesta inmune

Como se ha visto en otros animales marinos expuestos a estrés por acidificación (Bailey et al., 2017a), *C. verrucosa* sp. A presentó reguladas negativamente vías relacionadas a la respuesta inmune. El factor 3 asociado al receptor de TNF (**TRAF3** FC = -7,79), mencionado también en este capítulo en respuesta a la sedimentación, está involucrado en vías de señalización TNF y NF-KB, e inmunidad (He et al., 2007; Oganessian et al., 2006; Vallabhapurapu et al., 2008; Zarnegar et al., 2008), se trata de un receptor que reconoce patrones de patógenos microbianos y virales, y genera respuesta inmune (Bishop et al., 2018; Nakhaei et al., 2009). Por otra parte, las claudinas 19 y 24 (**CLD24** FC = 5,67, **CLD19** FC = 6,61) que participan en la función de adhesión celular, barrera en los epitelios, y señalización (Sugimoto & Chiba, 2021), se han encontrado reguladas positivamente frente al presente estresor, en contraposición a lo que se observó en respuesta a sedimentación en el capítulo anterior. Esto último es similar a lo que encontraron Liu et al., (2013) en hígado de peces en la respuesta al estrés por calor, aunque, dichos genes los encontraron sobre expresadas en las branquias, pero se regularon negativamente en hígado. Por su parte, el plasminógeno (**PLMN** FC = -3,43) o profibrinolisisina es una glucoproteína, precursora inactiva de una enzima proteasa llamada plasmina. La plasmina tiene actividad proteolítica, estimulando la producción de citocinas, ROS y otros mediadores, contribuyendo así a la inflamación (Syrovets et al., 2012). En el erizo de mar púrpura, es probable que el plasminógeno esté involucrado en la coagulación celular o la coagulación del líquido celómico como parte de la respuesta inmune (Hibino et al., 2006). Esta proteína fue también estudiada en respuesta a la acidificación, registrándose un aumento de la misma frente a valores altos y extremos de CO₂ (pH 7, 5 y 6, 5) en el pteropodo *Limacina helicina* (Koh et al., 2015). Se sabe que la inflamación se acompaña de una mayor producción de especies oxidantes y nitrantes. El dióxido de nitrógeno, reacciona con los ácidos grasos insaturados para producir derivados de nitroalqueno, y estos reaccionan con *kelch-like 1* (**KEAP1** FC = 8,28) para instigar la señalización de Nrf2, activar la expresión génica de respuesta al choque térmico e inhibir la señalización mediada por NF-KB induciendo respuestas antiinflamatorias y protectoras de tejidos. Dicha respuesta se ha visto en la ascidia *Ciona robusta* frente a estrés por frío (Li et al., 2020).

Por otra parte, se sabe que la respuesta inmune se activa en respuesta al estrés ambiental (Goncalves et al., 2016; Huth & Place, 2016; Li et al., 2018; Maor-Landaw et al., 2017; Zhang et al., 2019). En el caso de los resultados para el experimento de acidificación, se encontró que el receptor de glicoproteína dipeptidil peptidasa 4 (**DPP4** FC = 6,80), involucrado en la proliferación de células T y la activación de NF-KB, fue sobre expresado. Asimismo, la proteína de choque térmico *Heat shock 70 kDa protein cognate 1* (**HSP7A** FC = 2,47), involucrada en el sistema de presentación de antígenos (Javid et al., 2007), y como proteínas de estrés extracelular; funciona como mediadora de la señalización y el transporte intercelulares, y son liberadas luego de un trauma físico y/o estrés (Calderwood et al., 2010). La prostaglandina D sintasa hematopoyética (**HPGDS** FC = 2,10), participa en la respuesta a vías de señalización proinflamatorias (incluida la NF-KB), y actúa como una señal para provocar la resolución/suspensión de reacciones de hipersensibilidad (Trivedi et al., 2006). De manera opuesta a los resultados arrojados por el experimento de sedimentación, *C. verrucosa* sp. A, reguló positivamente las *cascadas de complemento y coagulación*, a través de la cadena alfa de la proteína de unión a C4b (**C4BPA** FC = 6,38), que controla la vía clásica de activación del complemento.

4.3.7.3. Traducción y replicación / Reparación del ADN

Se probó que la familia de genes HSP70, son buenos estimadores de la respuesta a estrés por acidificación en especies antárticas (Cummings et al., 2011; de Aranzamendi et al., 2021; Peck et al., 2009). Para el caso de *C. verrucosa* sp. A frente a acidificación, se encontraron sobre expresadas la proteína de choque térmico *Heat shock 70 kDa protein cognate 1* (**HSP7A** FC = 2,47), y la proteína 2 de choque térmico de 70 kDa (**HSP72** FC = 6,50), y la proteína DnaJ homóloga subfamilia B miembro 4 (**DNJB4** FC = 3,03) o HSP40. Todas son chaperonas moleculares implicadas en una amplia variedad de procesos celulares, incluida la protección del proteoma al estrés, el plegado y transporte de polipéptidos recién sintetizados, la activación de la proteólisis de proteínas mal plegadas, y la formación y disociación de complejos proteicos (Somero, 2020). Específicamente, en experimentos de acidificación de corales, se encontró una regulación variable de tales chaperonas, dependiendo de la duración del estudio (Carreiro-Silva et al., 2014; Cummings et al., 2011; Kanehisa et al., 2014). Algunos experimentos de laboratorio sugirieron que la exposición a pCO₂ elevado provoca una sobre expresión de HSP a corto plazo, con un descenso en la expresión luego de un mes de exposición en un arrecife de coral australiano (Kaniewska et al., 2015; Moya et al., 2012, 2015). Asimismo, De Aranzamendi et al. (2021) observó en un estudio realizado en Caleta Potter, una menor expresión de HSP70A y B en la lapa *Nacella concinna* (en el morfotipo sublitoral) a 15 días de exposición a bajo pH (~ 923 ppm); diferencias que se dejaron de

registrar a 54 días de exposición. Por otra parte, se observó en un coral antártico *Malacobelemnion daytoni* (de Caleta Potter) una regulación positiva significativa de la HSP70 a largo plazo (54 días) (Servetto et al., 2021), similar al resultado encontrado por Carreiro-Silva et al. (2014) en un coral de agua fría después de una exposición prolongada (8 meses) a la acidificación.

Por otra parte, las proteínas *kelch-like 1* (**KEAP1** FC = 8,28), 7 (**KLHL7** FC = 4,62), y 17 (**KLH17** FC = 8,14), median la ubiquitinación de una serie de proteínas, siendo importantes en la regulación de muchos procesos biológicos, particularmente KEAP1 participa en la respuesta celular al estrés oxidativo (Li et al., 2020; Shi et al., 2019). KLHL7 cumple una función importante en mantener la integridad nucleolar (Kim et al., 2017), mientras que KLH17 juega un rol en la función neuronal (Hu et al., 2020). La proteína corporal multivesicular cargada 4c (**CHM4C** FC = 9,24) se encarga del transporte vesicular de proteínas, y es un componente clave del punto de control de citocinesis (Kato et al., 2004).

Como ya se mencionó el experimento de sedimentación, la enzima uracil-ADN glicosilasa (**UNG** FC = 7,98; **UNG** FC = -10,03, **SMUG1** FC = -9,88) está involucrada en la función de reparación por escisión de base, hidrolizando el ADN de única hebra o de doble hebra incompatible. Este proceso se encontró regulado positivamente en células humanas ante estrés oxidativo (Akbari et al., 2007), como así también negativamente ante el efecto de la acidificación en el copépodo *Calanus glacialis* (Bailey et al., 2017a). En cuanto a la regulación de los procesos relacionados con el ARN, se encontraron regulados; la proteína de anclaje A-quinasa 17A (**AK17A** FC = -8,66; 6,17), factor de empalme que regula la selección del sitio de empalme alternativo para ciertos precursores de ARN mensajero. El factor de complementación POBEC1 (**A1CF** FC = 7,27), un componente esencial de la aploproteína B, complejo enzimático responsable de la edición post-transcripcional. Y finalmente, el factor de elongación 2 (**EF2** FC = 6,49), cataliza el paso de translocación ribosómica dependiente de GTP durante el alargamiento de la traducción, interviene en el movimiento coordinado de las moléculas de ARN transportador, el ARN mensajero y los cambios conformacionales en el ribosoma (Knight et al., 2015), y se lo ha descrito como protector celular frente a estrés por hipoxia (Moore et al., 2015).

4.3.7.4. Metabolismo de lípidos

En cuanto al metabolismo de lípidos, se encontró que la proteína aldehído deshidrogenasa X (**AL1B1** FC = 6,17) (enzimas que se encargan de la desintoxican los aldehídos al facilitar su oxidación a ácidos carboxílicos), participa en la peroxidación de lípidos. Se ha demostrado que juegan un papel en la respuesta invertebrados marinos como crustáceos a estrés ambiental (Stephens-Camacho & Rosas-Rodríguez, 2015). Por su parte, la proteína transportadora 3-oxoacil- reductasa FabG (**FABG** FC = 5,15),

la enzima sintasa de ácidos grasos (**FAS** FC = -2,24), el citocromo P450 2U1 (**CP2U1** FC = 3,34), y la enzima glucosa-6-fosfofor deshidrogenasa-1 (**G6PD** FC = 3,78), participan en el metabolismo de ácidos grasos. La sobre expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, es un proceso ya descrito en diferentes especies expuestas a acidificación, tales como corales (Kenkel et al., 2018; Vidal-Dupiol et al., 2013), pterópodos antárticos (Johnson & Hofmann, 2017), como así también la regulación negativa en el caso de larvas de copépodos árticos (Bailey et al., 2017b). Puntualmente, la peroxidación de lípidos es una clara señal de daño celular, y se ha descrito en bivalvos expuestos a acidificación por 45 días (Liao et al., 2019), y en respuesta a la acidificación combinada con elevados niveles de cadmio por 31 días, en la ostra *Crassostrea gigas* (Cao et al., 2018).

4.3.7.5. Sistema antioxidante

Finalmente, *C. verrucosa* sp. A respondió al estrés por acidificación, activando su sistema antioxidante para mitigar el daño celular, no sólo con KEAP1 anteriormente mencionado (secciones 4.3.7.2. y 4.3.7.3.); sino también puntualmente con la enzima glutatión S transferasa omega 1 (**GSTO1** FC = 6,56), que cataliza la conjugación de la forma reducida de glutatión (GSH) a sustratos xenobióticos con el fin de desintoxicar. La activación de genes asociados al sistema antioxidante ha sido descrita ya en muchas especies de bivalvos expuestas a pH bajo (Cao et al., 2018; Goncalves et al., 2016; Li et al., 2016; Wang et al., 2016), y particularmente también de la enzima glutatión transferasa en el mejillón *Mytilus coruscus* (Huang et al., 2018), y en el copépodo *Tigriopus japonicas* (Lee et al., 2019). Mientras que para ascidias se ha descrito la activación del sistema antioxidante en respuesta a la exposición a metales pesados de *Ciona intestinalis* (Franchi et al., 2012), y a bajas temperaturas de *Ciona robusta* (Li et al., 2020). En este último trabajo citado, Li y colaboradores estudiaron una serie de indicadores antioxidantes (malondialdehído, capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión), ellos proponen que, al exponer a los animales a un evento de estrés inicial, se remodela la línea de base de la respuesta antioxidante que luego promueve el desarrollo de la memoria de estrés, y por lo tanto una segunda exposición al estresor incita una respuesta fisiológica disminuida.

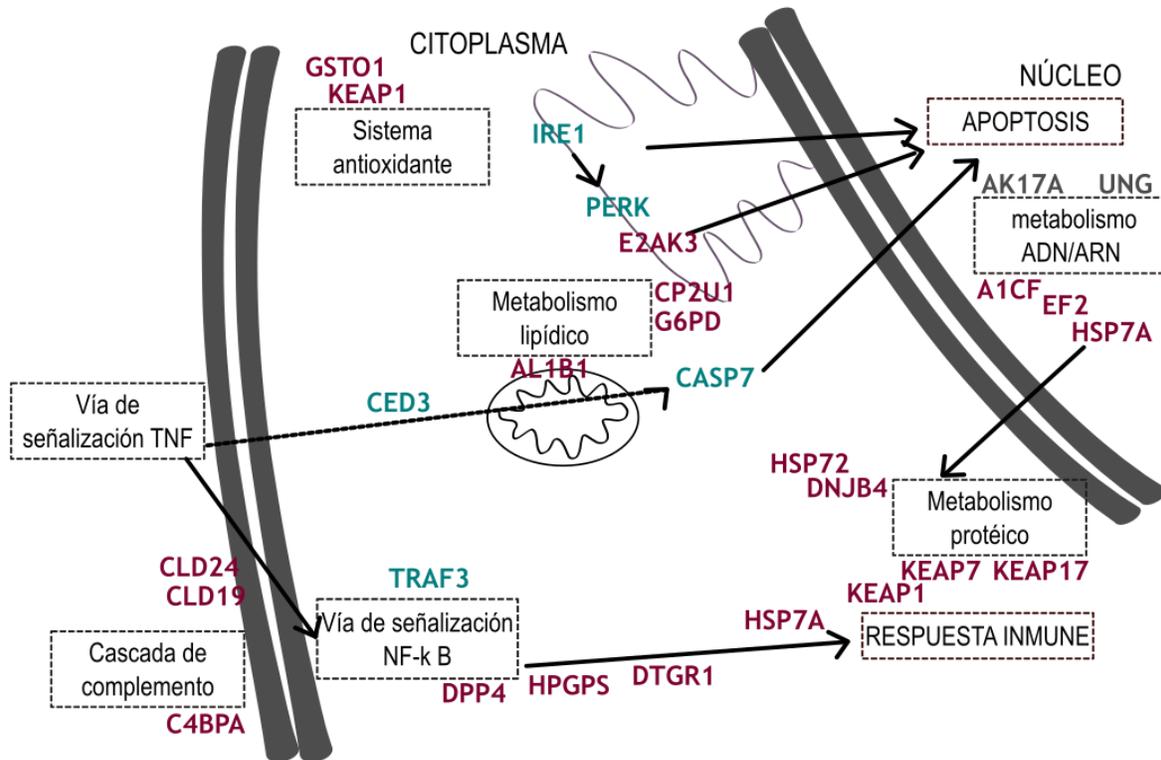


Figura 4.9. Representación esquemática de los genes y vías involucrados en la respuesta a ACIDIFICACIÓN de la ascidia *C. verrucosa* sp. A, basado en los resultados de RNA-Seq. Los genes regulados positivamente están representados en bordeau, lo expresados *negativamente* en cian. Los nombres de las vías están representados dentro de cajas. Las flechas continuas representan relación positiva, las punteadas representan relaciones no del todo esclarecidas en la literatura.

4.3.8. Mediciones de caspasa y superóxido dismutasa en respuesta a la ACIDIFICACIÓN

Al igual que para el experimento de sedimentación (ver sección 4.3.5.), para esta parte de la tesis, se realizaron las mediciones correspondientes de la actividad de las caspasas 3/7, y de superóxido dismutasa, SOD. Cabe aclarar que las mediciones enzimáticas, en el caso del experimento de acidificación, se llevaron a cabo para todo el conjunto de muestras correspondientes a *C. verrucosa* sp. A, esto es, a diferencia del análisis llevado a cabo con RNAseq, para esta parte del trabajo, se pudo llevar a cabo también la evaluación de los tiempos intermedios T_i (3 días) y T₁₀ (10 días), para más detalles ver la metodología en la sección 4.2.4.

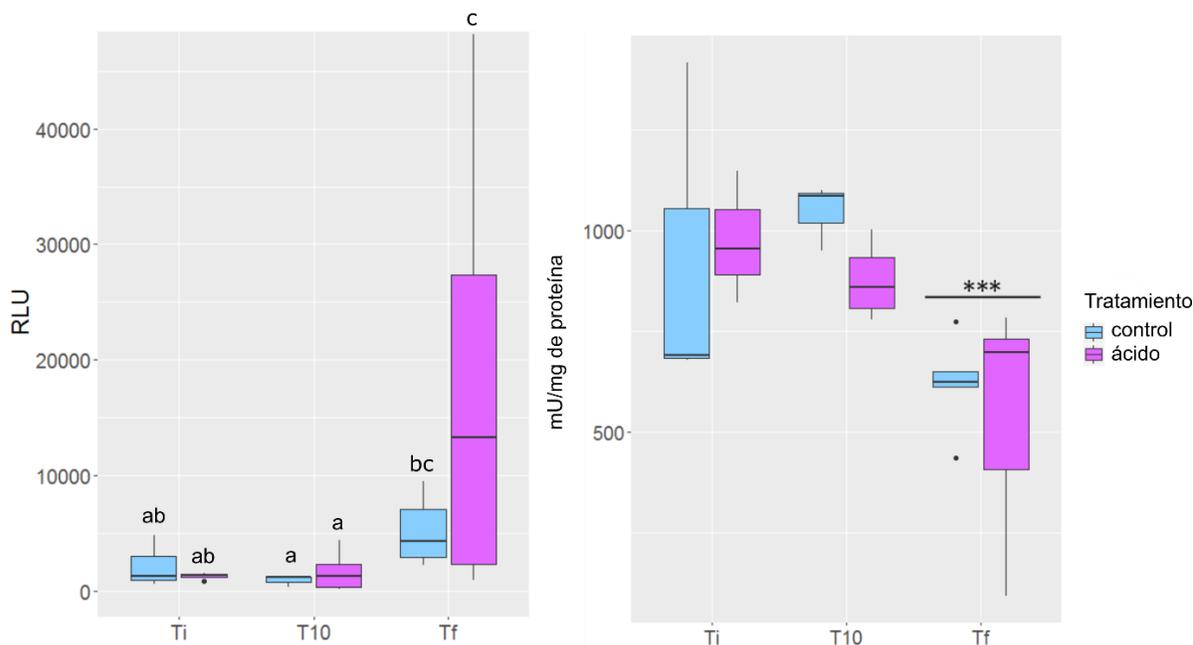


Figura 4.10. Mediciones de actividad enzimática observadas en respuesta a la exposición a acidificación ($p\text{CO}_2=1000\mu\text{atm}$) durante 3 días (Ti), 10 días (T10), y 54 días (Tf). A la izquierda, actividad caspasa expresada en valores de luminiscencia (RLU). A la derecha, actividad SOD expresada en actividad en el extracto (mU) / cantidad de proteína (mg). Los gráficos de caja representan la mediana (línea media), el segundo y tercer cuartil (límite superior e inferior de la caja, respectivamente), los bigotes expresan el valor máximo definido como el rango inter-cuartílico multiplicado por el factor 1,58. El código *** representa diferencias significativas ($p<0,001$).

No se observó, en los acuarios, un efecto significativo sobre la respuesta enzimática de la actividad de la enzima superóxido dismutasa y la actividad de la caspasa3 / 7 (ANOVA anidado, $p = 0,124$ y $p = 0,606$, respectivamente). Por otra parte, si se encontraron diferencias significativas en la actividad enzimática entre tratamientos en ambas enzimas (ANOVA, $F = 7,63$, $p = 0,0006$ para SOD y $F = 4,99$, $p = 0,03$ para caspasa3 / 7, ver figura 4.10).

4.3.9. Respuesta molecular a la ACIDIFICACIÓN

Como se mencionó en la introducción, no existen estudios previos que evalúen la respuesta de *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato* al proceso de acidificación del agua, es así que esta es la primera aproximación para entender el efecto de la disminución de pH en los océanos en una especie de ascidia dominante en el bentos antártico. La respuesta a la acidificación de ascidias, se ha estudiado escasamente. Gallo et al. (2019) encontraron que espermatozoides de la ascidia *Ciona robusta* muestran resiliencia en respuesta a la acidificación del océano. Y, por su parte, Peck et al. (2015) encontraron cambios significativamente grandes en la estructura de las comunidades bentónicas antárticas luego de

exponerlas durante 100 días a acidificación (pH 7,7), siendo las ascidias (*Molgula pedunculata*) y las esponjas (*Leucosolenia* sp.) aquellas especies que aumentaron significativamente la abundancia relativa.

En general, se sabe que los organismos varían en su respuesta al estrés por acidificación, pero hay patrones comunes tales como la regulación de ácido-base, metabolismo general, y mecanismos de respuesta de estrés que se activan (Strader et al., 2020). Puntualmente en moluscos, se vio una respuesta que involucra también la peroxidación de lípidos, y una alteración en la actividad enzimática general (Ducker & Falkenberg, 2020). En cuanto al estudio de la acidificación en especies antárticas, se vio que *Laternulla elíptica* (bivalvo) mostró aumento del metabolismo basal (consumo de O₂), y la sobre expresión de HSP70 en respuesta tanto a la elevación como a la disminución de pH durante 21 días, pero no así a los 120 días donde la respuesta fue casi nula (Cummings et al., 2011). Por otra parte, Huth & Place, (2016) evaluaron el efecto de la temperatura y la acidificación en un pez antártico (*Nototenia*), y vieron afectados el sistema inmune, la respuesta a estrés, la muerte celular y proliferación, y el metabolismo de carbohidratos y lípidos, entre los 7 y los 14 días de exposición. Luego, cerca del día 28, Huth & Place observan un pico de apoptosis, patrón que para el día 56 se revierte en gran medida. El aumento de la respuesta a estrés, tiene un costo energético en el animal que conduce a una asignación disminuida a otras funciones, como el crecimiento o la reproducción (Sørensen et al., 2003), es por eso que se entiende que en la bibliografía expuesta anteriormente los organismos no mantengan una respuesta de estrés alta, por periodos largos de tiempo (más de un mes). Por el contrario, *C. verrucosa* sp. A expuesta a acidificación, luego de 54 días de exposición, muestra un alto número de genes diferencialmente expresados, y gran parte sobre expresados, involucrado la actividad de genes tales como las chaperonas de choque térmico, el sistema antioxidante, y el metabolismo de lípidos. Esto se asemeja a los resultados encontrados en un coral antártico *Malacobelemnion daytoni*, donde se registró una regulación positiva de la HSP70 a largo plazo (54 días) (Servetto et al., 2021), similar al resultado encontrado por Carreiro-Silva et al., (2014) en un coral de agua fría después de una exposición prolongada (8 meses) a la acidificación. Sin embargo, cabe aclarar que este patrón de atenuación de la respuesta a largo plazo puede interpretarse en *C. verrucosa* sp. A, solamente para el proceso de apoptosis, dado que CASP7, IRE1, y CED3 se encontraron reguladas negativamente en el experimento de acidificación durante 54 días. Evidencia similar a la que observaron Wang et al., (2021) en un trabajo en la ostra del pacífico *Crassostrea gigas* quienes sugieren que se trata una estrategia de adaptación de las ostras a la acidificación de los océanos, dado que la muerte celular programada aumentó a corto plazo (7 días), pero disminuyó luego de 42 / 56 días.

La disminución de la actividad de la enzima SOD ya se describió en algunos invertebrados antárticos (Abele et al., 2001; Abele & Puntarulo, 2004). Y como se expuso en la sección 4.3.6., la disminución de la amplitud de respuesta del sistema de defensa antioxidante en la ascidia *Ciona robusta*, se propuso como "memoria de estrés frío" que promueve la homeostasis adaptativa (Avramova, 2015; Li et al., 2020); y que la exposición prolongada y subletal al estrés ambiental puede estimular el aumento evolutivo de la resiliencia al estrés (Maor-Landaw et al., 2017; Nguyen et al., 2016; Smith et al., 2013; Weihe et al., 2010). De hecho, Bailey et al. (2017a), proponen que el crecimiento de larvas de copépodos, no se ve afectada por la acidificación, gracias a cambios en la respuesta universal al estrés que incluye la regulación redox. Además, los estudios en ascidias muestran resiliencia en respuesta a la acidificación del océano (Gallo et al., 2019; Peck et al., 2015). Esto es discutible en el caso de *C. verrucosa* sp. A frente a acidificación, ya que a pesar de mostrar disminuida la actividad SOD, presenta dos genes; KEAP1 y GSTO que participan en la respuesta redox y que están sobre expresados. Cuando se analizaron los resultados de sedimentación se encontró discordancia entre las mediciones transcriptómicas y enzimáticas; para el caso del experimento de acidificación, esta discordancia se encontró con respecto a las mediciones de SOD, donde el grupo Tf (54 días) presentó menos actividad SOD que el resto de los grupos (ver figura 4.10); mientras que en el transcriptoma los genes KEAP1 y GSTO se regularon positivamente. Este tipo de respuestas a estrés contradictorias se han encontrado en mejillones (Giuliani et al., 2013), y ascidias (Li et al., 2020) y dan cuenta de diferentes procesos que suceden a varios niveles entre el ARN mensajero y la producción de proteínas (DiBello et al., 2007; Giuliani et al., 2013; Regoli & Giuliani, 2014).

Resumiendo, podemos decir que *Cnemidocarpa verrucosa* sp. A expuesta a acidificación mostró más genes regulados positivamente que negativamente. Las principales vías afectadas fueron la defensa inmunológica, la apoptosis, el metabolismo de lípidos, la regulación del ADN y ARN, la activación de chaperonas HSP, y el sistema antioxidante. Todos estos procesos ya fueron descritos mediante transcriptómica y proteómica por estar involucrados en respuesta a diferentes estresores ambientales, como por ejemplo Anderson et al. (2015), en peces y numerosos trabajos realizados en corales expuestos a estrés por acidificación y calor (Huth & Place, 2016; Kaniewska et al., 2015; Liu et al., 2013; Smith et al., 2013). En *C. verrucosa* sp. A, el proceso de muerte celular programada se vio regulado negativamente en respuesta a la acidificación por 54 días, siendo que IRE1, CED3, y CASP7 presentaron valores negativos de Fold Change. Por otra parte, las categorías de respuesta inmune, traducción, replicación y reparación del ADN; estuvieron representadas por un gran número de genes regulados tanto

negativamente como positivamente, apuntando a que ambos procesos están altamente activos durante la respuesta de la ascidia al pH bajo del agua. Puntualmente, la vía NF-KB ha sido una de las vías más implicadas en la respuesta de *C. verrucosa* sp. A, ya que muchos de los genes diferencialmente expresados en este trabajo (TRAF3, DPP4, PTGR1, HPGPS, y KEAP1) participan en esta vía, y que de hecho ya se ha registrado en la respuesta a estrés por frío de otras ascidias (*Ciona robusta*) (Li et al., 2020). La vía de señalización NF-KB es una de las vías de resistencia al estrés oxidativo más relevantes y ampliamente estudiadas (Sies et al., 2017), y modula la expresión de las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, y glutatión S-transferasa.

Finalmente, tanto el metabolismo de lípidos, como la activación de chaperonas HSP, y el sistema antioxidante, fueron procesos que se vieron regulados positivamente frente a la acidificación durante 54 días en *C. verrucosa* sp. A. Mecanismos que, como se mencionó anteriormente, se han descrito en respuestas moleculares de animales marinos expuestos a acidificación, pero que por lo general se activan durante un período corto y luego declinan (Bailey, De Wit, et al., 2017; de Aranzamendi et al., 2021; Li et al., 2020; Moya et al., 2012, 2015; Wang et al., 2021). Puntualmente, la peroxidación de lípidos es una clara señal de daño celular por la activación sostenida de la respuesta a estrés, y se ha descrito en bivalvos expuestos a acidificación por 45 días (Liao et al., 2019), y en respuesta a la acidificación combinada con elevados niveles de cadmio por 31 días, en la ostra *Crassostrea gigas* (Cao et al., 2018). Podemos decir entonces que, *C. verrucosa* sp. A se ve altamente afectada por el proceso de acidificación del océano, ya que luego de 54 días de exposición a niveles bajos de pH ($\approx 7,72$), presenta una marcada respuesta de estrés.

4.4. CONCLUSIONES: *diferencias y similitudes entre las respuestas a la sedimentación y acidificación*

Las conclusiones correspondientes al capítulo 4 de la tesis (una aproximación a la respuesta al cambio climático regional antártico: acidificación y sedimentación) están sintetizadas en los modelos expuestos de las figuras 4.7. y 4.9. Este estudio es el primero en proporcionar un análisis a nivel de transcriptoma de genes clave y vías metabólicas involucradas en la respuesta al estrés por sedimentación y acidificación de la conspicua *C. verrucosa* sp. A. Por lo tanto, contribuye con importantes aportes sobre los mecanismos subyacentes a los efectos de sedimentación y acidificación en las ascidias, respuestas que implican principalmente vías apoptóticas, metabólicas generales, e inmunitarias. Todos estos son mecanismos que forman parte de la respuesta celular al estrés general en metazoos (Kültz, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos en este capítulo arrojaron diferencias sustanciales entre la respuesta

a estrés por sedimentación y acidificación. En primer lugar, el metabolismo general fue regulado positivamente en acidificación, pero negativamente en sedimentación; de hecho, la respuesta a pH bajo mostró más genes regulados positivamente, mientras que la respuesta a alta carga de sedimentos presentó una mayoría de genes regulados negativamente. Además, los procesos de metabolismo y peroxidación de lípidos, la activación del sistema antioxidante, la activación de chaperonas de choque térmico, y de proteínas Kelch sólo fueron reguladas positivamente frente a estrés por acidificación, y no se evidenciaron como genes diferencialmente expresados frente a estrés por sedimentación.

La capacidad de un organismo para mantener procesos como el crecimiento y la reproducción mientras está expuesto a un entorno estresante, requiere un ajuste de procesos fisiológicos subyacentes (amortiguación fenotípica), tales como la disminución de la respuesta a estrés a largo plazo (Cummings et al., 2011; Huth & Place, 2016; Reusch, 2014; Wang et al., 2021). Sin embargo, este no es el caso de *C. verrucosa* sp. A expuesta a acidificación, dado que luego de 54 días de tratamiento, la ascidia activó procesos de respuesta de estrés. Por otra parte, el proceso de “depresión metabólica” se ha descrito en varios estudios transcriptómicos donde los metazoos marinos estuvieron expuestos a estrés agudo, principalmente a la acidificación y al calor (Peng et al., 2017; Rocker et al., 2015). De esta manera, se sugirió que la exposición prolongada y subletal al estrés puede estimular el aumento evolutivo de la resiliencia al mismo (Maor-Landaw et al., 2017; Nguyen et al., 2016; Smith et al., 2013; Weihe et al., 2010). Así, un mecanismo de “protección adaptativa” que implica depresión metabólica (Avramova, 2015; Li et al., 2020), podría atribuirse a la respuesta a corto plazo (36h) de *C. verrucosa* sp. A a estrés por sedimentación.

El incremento del CO₂ atmosférico y su consecuente acidificación de los océanos, es un evento que la Tierra no ha experimentado en, al menos, los últimos 55 millones de años (Doney et al., 2020; Gingerich, 2019; Gruber et al., 2019; Lüthi et al., 2008), mientras que la sedimentación es un proceso que ha sido acelerado en los últimos 30 años (Monien et al., 2016; Neder et al., 2020; Schloss et al., 2012), pero que el planeta ha experimentado sucesivamente tras los ciclos de glaciación y desglaciación (Pudsey, 2000), como así también cada verano para el caso de las comunidades bentónicas antárticas (Lagger et al., 2017; Sahade et al., 2015). Es por esto que se puede hipotetizar que *C. verrucosa* sp. A presenta protección adaptativa a los procesos de cambios en la sedimentación que se producen cíclicamente durante el verano, y que sucedieron históricamente frente a las glaciaciones.

El cambio climático que está experimentando la Península Antártica, será un factor de estrés ambiental cada vez más importante en los ecosistemas costeros donde las ascidias y particularmente *C. verrucosa sensu lato* son taxa dominantes de los ensamblajes bentónicos. Con el aporte de este trabajo podemos decir que *Cnemidocarpa verrucosa* sp. A responde de manera diferente al estrés por sedimentación y acidificación. Activando, en el primer caso, una respuesta de depresión metabólica que podría estar dando cuenta de un nivel de adaptación a las concentraciones altas de sedimentos en la caleta. No así frente a niveles de pH ácido, donde la ascidia respondió activando la típica respuesta de estrés.

CAPÍTULO 5: Perspectivas de un patrón genético del pasado nos ayudan a entender respuestas del cambio climático del futuro.

Cuando una población experimenta un cambio en las condiciones ambientales que superan el rango de respuesta normal dada la variabilidad fenotípica de la especie, la población puede responder de tres maneras diferentes: migrar, adaptarse, o extinguirse. Entendiendo el pasado podemos entender el presente, es decir, cómo los procesos micro evolutivos que delinean la historia evolutiva de las especies generan los patrones que hoy caracterizan la estructura genética de las poblaciones (Avice, 2000; Beheregaray & Caccone, 2007). Asimismo, al comprender la respuesta transcriptómica de un organismo a una variable ambiental proporciona información sobre el grado en que la variable induce una respuesta al estrés y qué funciones fisiológicas son inducidas por esa respuesta al estrés, indicando si son componentes de la respuesta al estrés universal o específicas de ese factor o especie. La expresión genética alterada puede indicar estrés, pero también la capacidad de lidiar con los factores estresantes (Anderson et al., 2016; Bailey et al., 2017a), e inclusive estimar como responderán en el futuro.

5.1. EL ESCENARIO EN EL PASADO

En la escala de tiempo geológico, el ambiente marino costero antártico se ha enfriado desde el Cretácico tardío hasta las condiciones polares actuales. Aunque la trayectoria general del clima ha sido de enfriamiento, esto ha sido interrumpido por máximas térmicas hace 55 Ma, y oscilaciones climáticas en el Oligoceno temprano, Mioceno tardío, y Plioceno temprano (Clarke et al., 2007; Zachos et al., 2001, 2003). Los análisis realizados en este trabajo, muestran que *C. verrucosa* sp. A y sp. B se habrían separado genéticamente entre 3,58 y 2,20 Ma. Así, la especiación tuvo lugar después del Mioceno, cuando la Antártida ya se había enfriado, pero que durante el Plioceno experimentó un período más cálido, caracterizado por colapsos de las capas de hielo de la costa Oeste de Antártida (Cook et al., 2013; Dolan et al., 2018; Pollard & DeConto, 2009). Se han descrito ya numerosos procesos de radiación y especiación entre los 8 y 5 Ma; así como ciclos de constricción de poblaciones, aislamiento en refugios hace 1 Ma (Rogers, 2007). *Cnemidocarpa verrucosa* pudo haber experimentado entonces, especiación alopátrica seguida de contacto secundario (Mayr, 1963), o especiación en respuesta a alguna oportunidad ecológica (Givnish et al., 2014; Simpson, 1953). Siendo bajo esta última hipótesis, el disco basal un carácter adaptativo en respuesta a la oportunidad ecológica: colonizar diferentes sustratos. De hecho, Smale & Barnes (2008) sugieren que, la fauna bentónica antártica pudo sobrevivir los períodos donde las capas de hielo se desarrollaron hasta cientos de metros en profundidad, dado que algunas especies

poseen capacidad euribática y larvas planctónicas colonizadoras (Brey et al., 1996; Thatje et al., 2005), o sobrevivido al último período glacial en aguas poco profundas de islas subantárticas o de la Patagonia (Thatje et al., 2008). Siendo ambas hipótesis posibles para la ascidia en estudio, ya que se ha descrito que *C. verrucosa sensu lato* puede habitar diferentes tipos de sustrato (Tatián et al., 2005) y tanto en aguas poco profundas (entre 20 y 30 m) como en profundidades de hasta 460 m para *C. verrucosa* sp. A y de 375 m para *C. verrucosa* sp. B (ver tablas 3.1 y 3.2). Como así también se ha descrito que *C. verrucosa sensu lato* tiene una distribución Sub-antártica, registrándose también en Sudamérica (Turón et al., 2016).

El último máximo glacial (UMG) transcurrió entre 26.500 y 19.000 años atrás (Clark et al., 2009). Luego, el inicio de la deglaciación de Antártida occidental ocurrió hace unos 14.000 y 15.000 años (Heroy & Anderson, 2005). Un enfriamiento posterior entre 13.000 y 6.500 años, disminuyó la temperatura del aire (Anderson et al., 2002; Pollard & DeConto, 2009; Strugnell et al., 2018). Parte de la costa de la isla King George, estuvo libre de hielo desde alrededor de 9.500 años atrás (Bentley et al., 2005; Rückamp et al., 2011); este es un período que se caracterizó por una reducida cobertura de hielo, una mayor producción primaria, y un incremento de sedimentación proveniente de los deshielos, detectados en los sedimentos marinos (Bentley et al., 2009). Así, se puede afirmar que el proceso de aumento de sedimentación había sucedido junto con los ciclos de deglaciación, y que de hecho están bien descritos para el margen del Océano Pacífico de la Península Antártica (Kelly, 2002; Lucchi et al., 2002; McInerney & Wing, 2011). Por otra parte, en los últimos 56 Ma no se ha evidenciado un aumento tal de carbono en la atmósfera que supongan un cambio sustancial en el pH de agua (Gingerich, 2019). Con la evidencia aportada en este trabajo, podemos estimar que *C. verrucosa* sp. A experimentó una expansión geográfica luego del UMG, hace aproximadamente 11.490 años (LI = 4600 LS = 21580), mientras que *C. verrucosa* sp. B. mantuvo una estabilidad demográfica/geográfica. Es decir que las diferentes especies han respondido a estímulos de cambio climático en el pasado, de manera desigual; como sucede con muchos taxones marinos (Díaz et al., 2011; Haye & Muñoz-Herrera, 2013; Krebs et al., 2011; Marko et al., 2010; Raupach et al., 2010).

5.2. EL ESCENARIO EN EL PRESENTE

La Península Antártica ha experimentado una de las más altas tasas de calentamiento regional del planeta en los últimos 50 años, produciendo una pérdida masiva de hielos marinos, glaciares continentales y el colapso de barreras (Bentley et al., 2009; Cook et al., 2016; Costi et al., 2018; Pachauri

et al., 2014; Pritchard & Vaughan, 2007; Stammerjohn et al., 2012). Los cambios físico-químicos en el agua de mar, no sólo incluye un cambio en la temperatura, sino también en la salinidad, y la concentración de sedimentos inorgánicos en el agua (Jerosch et al., 2019; Morley et al., 2020; Neder et al., 2020; Smale & Barnes, 2008). Además, las tasas de emisión de carbono modernas están aumentando constantemente los niveles atmosféricos actuales de CO₂ (410 ppm al presente), lo que produce una acidificación del océano (Gingerich, 2019), impactando la estructura de los ecosistemas marinos (Doney et al., 2020). La estructura espacial del bentos antártico está dada por una historia de ciclos glaciares con cambios en la temperatura del aire y expansión/retracción de los hielos muy abruptos; y por lo tanto, de especies que se fueron ajustando a los cambios ambientales que se sucedieron en consecuencia (Clarke et al., 2004; Mayewski et al., 2009; Rogers, 2007). Al presente, los ensamblajes bentónicos poco profundos en la Antártida están estructurados por la dinámica del hielo y las tasas de sedimentación, sufriendo cambios estructurales significativos bajo el rápido cambio climático regional reciente, donde la sedimentación se ha convertido en un factor de estrés importante (Barnes et al., 2018; Deregibus et al., 2017; Moon et al., 2015; Pasotti et al., 2015; Sahade et al., 2015; Torre et al., 2021).

Cnemidocarpa verrucosa sensu lato se encuentra entre las especies más abundantes en áreas influenciadas por la sedimentación y la erosión del hielo (Kim et al., 2021; Lager et al., 2017; Sahade et al., 2008). La comunidad bentónica de Caleta Potter, ha sufrido una transición desde una comunidad dominada por ascidias filtradoras en la década de los 90', a un ensamblaje mixto conformado por filtradores y aquellos que se alimentan de depósitos, al presente (Lager et al., 2017; Sahade et al., 2015). Sabemos que *C. verrucosa* expuesta a valores altos de sedimentación, que hoy experimenta Caleta Potter, sobre todo en verano, ve afectado su equilibrio energético (Alurralde et al., 2019; Torre et al., 2021), la frecuencia de *squirting*, el cierre de sifones, y el consumo de oxígeno (Torre et al., 2012, 2014). Por otra parte, no se han hecho estudios en cuando al efecto que tiene el proceso de acidificación del agua en *Cnemidocarpa verrucosa sensu lato*.

5.2. EL ESCENARIO EN EL FUTURO

Sabemos que la Tierra se viene calentando, pero puntualmente el Océano Austral (al sur de 30 ° S), entre los años 2005 y 2017, representó el 45–62% de la ganancia de calor oceánica global en los 2000 m superiores, a pesar de ocupar ~ 25% del área oceánica global (IPCC-SROCC 2019). Las estimaciones para el calentamiento de la Península Antártica son de 3,4 °K (siglo)⁻¹ (Vaughan et al., 2003). Esto producirá a futuro mayor derretimientos de hielos en Caleta Potter (Falk et al., 2018), de hecho, se ha demostrado que la temperatura del océano es el factor principal que determina el

adelgazamiento de las grandes barreras de hielo (Pritchard et al., 2012), y esto significaría también más sedimentación en la Caleta, al derretirse los glaciares y lavarse los sedimentos (Pritchard & Vaughan, 2007). Expuestas a eventos frecuentes de descarga masiva de agua de deshielo al presente (Meredith et al., 2018), y a lo largo de su historia evolutiva, las ascidias como componentes clave de las comunidades megabentónicas han desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir a la sedimentación (Clark et al., 2017; Kim et al., 2021; Moon et al., 2015; Pasotti et al., 2015; Torre et al., 2021). Estas estrategias incluyen evadir la deposición de sedimentos eligiendo asentarse en paredes verticales (Lagger et al., 2017), expulsando partículas que no son alimento mediante contracciones del manto (Torre et al., 2014), y habiendo desarrollado la capacidad de ahorrar energía disminuyendo su metabolismo para soportar episodios de sedimentación (Torre et al., 2012). En este trabajo vimos que *C. verrucosa* sp. A expuesta a concentraciones críticas de sedimento adopta un mecanismo de “protección adaptativa” que implica depresión metabólica. Así, la evidencia aportada en este trabajo apoya la hipótesis de que la exposición subletal al estrés podría estimular la resistencia a la sedimentación, y que las respuestas plásticas podrían ayudar a la adaptación de las poblaciones al estrés ambiental creciente (Brown et al., 2018; DeBiasse & Kelly, 2016; Huth & Place, 2016; Nguyen et al., 2016; Smith et al., 2013).

Por otra parte, los niveles atmosféricos de CO₂ vienen aumentando rápidamente, tasas que no se han registrado en los últimos 56 Ma (Gingerich, 2019). Produciendo acidificación de los océanos (Doney et al., 2020), se prevé que para el 2030 el océano antártico se vuelva insaturado en aragonita, de acuerdo con el escenario RCP8.5 (IPCC-SROCC 2019). En este trabajo, *C. verrucosa* sp. A expuesta a acidificación mostró la típica respuesta de estrés, siendo afectadas la defensa inmunológica, la apoptosis, el metabolismo de lípidos, la regulación del ADN y ARN, la activación de chaperonas HSP, y el sistema antioxidante.

La evolución depende del grado en que la variación genética está alineada con la dirección de selección (Blows & Hoffman, 2005). Los organismos pueden evolucionar mucho más rápido de lo que creíamos posible recientemente (Sanford & Kelly, 2011), especialmente a través de la epigenética (Moore et al., 2019; Perez & Lehner, 2019), y más aún en el caso de las ascidias donde la tasa de mutación es alta (Delsuc et al., 2018). Como se vio en esta tesis, *C. verrucosa* sp. A pudo haber presentado alguna ventaja adaptativa por sobre *C. verrucosa* sp. B, dada su capacidad de responder con depresión metabólica al estrés por sedimentación, y evitando el taponamiento de las branquias durante los grandes eventos de descarga de sedimentos en la caleta. Característica que le habría permitido en su historia evolutiva aumentar su rango de distribución, y ser hoy la más abundante en comparación con su especie

hermana. Es así, que sería de interés probar en *C. verrucosa* sp. B la respuesta a la acidificación y sedimentación, porque si los niveles de acidificación de agua, continúan incrementándose como lo indican las estimaciones a futuro, es de esperar que *C. verrucosa* sp. A mueva su rango de distribución o incluso se extinga localmente, y queda saber si su especie hermana, pueda llegar a avanzar sobre el espacio libre. Se trataría así de un proceso adaptativo y/o diferenciación de nicho de las especies *C. verrucosa* sp. A y sp. B. De hecho, otro factor a tener en cuenta es la presencia o ausencia de disco basal en las especies, carácter que también le podría dar alguna ventaja a *C. verrucosa* sp. B para poder asentarse en ciertos tipos de sustrato, es así que un análisis espacial de la presencia de los individuos con disco basal sería de gran interés para un trabajo a futuro.

Cnemidocarpa verrucosa sensu lato ha respondido a lo largo de su historia evolutiva a los cambios en las condiciones físicas del agua. Hace 3,58 y 2,20 Ma se especió para dar lugar a *C. verrucosa* sp. A y sp. B, probablemente en respuesta a los ciclos glaciares en el Plioceno. Luego, hace aproximadamente 11.500 años *C. verrucosa* sp. A experimentó una expansión geográfica, posiblemente dada la disminución de la cobertura de hielo en la Península Antártica, en esa época; mientras que *C. verrucosa* sp. B no experimentó cambios. Finalmente, *C. verrucosa* sp. A presenta protección adaptativa a la sedimentación y no así a la acidificación, probablemente dado que el incremento del CO₂ atmosférico y su consecuente acidificación de los océanos, es un estresor nuevo para la especie; mientras que la sedimentación es un proceso que ha sido acelerado en los últimos 30 años, pero que la especie ha podido experimentar sucesivamente tras los ciclos de glaciación y desglaciación, como así también cada verano.

Literatura citada

- Abele, D., & Puntarulo, S. (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 138(4), 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.05.013>
- Abele, D., Philipp, E., Gonzalez, P., & Puntarulo, S. (2007). *Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress*. 2, 933–946.
- Abele, D., & Puntarulo, S. (2004a). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 138(4), 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.05.013>
- Abele, D., & Puntarulo, S. (2004b). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 138(4), 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.05.013>
- Abele, D., Tesch, C., Wencke, P., & Pörtner, H. O. (2001). How does oxidative stress relate to thermal tolerance in the Antarctic bivalve *Yoldia eightsi*? *Antarctic Science*, 13(2), 111–118.
- Acosta-alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y., & Dynlacht, B. D. (2007). *Article XBP1 Controls Diverse Transcriptional Regulatory Networks*. 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.011>
- Akbari, M., Otterlei, M., & Krokan, H. E. (2007). *Different organization of base excision repair of uracil in dna in nuclei and mitochondria and selective upregulation of mitochondrial uracil-dna glycosylase after oxidative stress*. 145(4), 1201–1212. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.010>
- Allcock, A. L., & Strugnell, J. M. (2012). Southern Ocean diversity: new paradigms from molecular ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(9), 520–528.
- Allio, R., Donega, S., Galtier, N., & Nabholz, B. (2017). Large variation in the ratio of mitochondrial to nuclear mutation rate across animals: Implications for genetic diversity and the use of mitochondrial DNA as a molecular marker. *Molecular Biology and Evolution*, 34(11), 2762–2772.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msx197>

- Alurralde, G., Fuentes, V. L., Maggioni, T., Movilla, J., Olariaga, A., Orejas, C., Schloss, I. R., & Tatián, M. (2019). Role of suspension feeders in antarctic pelagic-benthic coupling : Trophic ecology and potential carbon sinks under climate change ☆. *Marine Environmental Research*, June, 104790. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104790>
- Anderson, D. A., Walz, M. E., Weil, E., & Smith, M. C. (2016). RNA-Seq of the Caribbean reef-building coral *Orbicella faveolata* (Scleractinia- Merulinidae) under bleaching and disease stress expands models of coral innate immunity. <https://doi.org/10.7717/peerj.1616>
- Anderson, J. B., Shipp, S. S., Lowe, A. L., Wellner, J. S., & Mosola, A. B. (2002). *The Antarctic Ice Sheet during the Last Glacial Maximum and its subsequent retreat history : a review*. 21, 49–70.
- Ardelan, M. V., Hewes, C. D., Reiss, C. S., Silva, N. S., Dulaiova, H., Steinnes, E., & Sakshaug, E. (2010). *Natural iron enrichment around the Antarctic Peninsula in the Southern Ocean*. 1995, 11–25.
- Arendt, K. E., Dutz, J., Jónasdóttir, S. H., Jung-madsen, S., Mortensen, J., Friis Moller, E., & Nielsen, T. G. (2011). *Effects of suspended sediments on copepods feeding in a glacial influenced sub-Arctic fjord*. 33. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbr054>
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- Avramova, Z. (2015). *Transcriptional ‘ memory ’ of a stress : transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes*. 149–159. <https://doi.org/10.1111/tpj.12832>
- Aziz, M., Jacob, A., Matsuda, A., & Wang, P. (2011). Review: Milk fat globule-EGF factor 8 expression, function and plausible signal transduction in resolving inflammation. *Apoptosis*, 16(11), 1077–1086. <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0630-0>
- Bailey, A., De Wit, P., Thor, P., Browman, H. I., Bjelland, R., Shema, S., Fields, D. M., Runge, J. A., Thompson, C., & Hop, H. (2017). Regulation of gene expression is associated with tolerance of the Arctic copepod *Calanus glacialis* to CO₂-acidified sea water. *Ecology and Evolution*, 7(18), 7145–7160. <https://doi.org/10.1002/ece3.3063>
- Bailey, A., Thor, P., Browman, H. I., Fields, D. M., Runge, J., Vermont, A., Bjelland, R., Thompson, C., Shema, S., & Durif, C. M. F. (2017). Early life stages of the Arctic copepod *Calanus glacialis* are unaffected by increased seawater pCO₂. *ICES Journal of Marine Science*, 74(4), 996–1004.

- Baird, H. P., Miller, K. J., & Stark, J. S. (2011). Evidence of hidden biodiversity, ongoing speciation and diverse patterns of genetic structure in giant Antarctic amphipods. *Molecular Ecology*, 20(16), 3439–3454.
- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4), 729–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x>
- Barlett, E. M. R., Sierra, M. E., Costa, A. J., & Tosonotto, G. V. (2021). Interannual variability of hydrographic properties in Potter Cove during summers between 2010 and 2017. *Antarctic Science*, 1–20.
- Barnes, D. K. A., & Conlan, K. E. (2007). *Disturbance , colonization and development of Antarctic benthic communities*. 11–38. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1951>
- Barnes, D. K. A., Fleming, A., Chester, J., & Quartino, M. L. (2018). *Icebergs , sea ice , blue carbon and Antarctic climate feedbacks Subject Areas : Author for correspondence :*
- Beheregaray, L. B., & Caccone, A. (2007). Cryptic biodiversity in a changing world. *Journal of Biology*, 6(4), 9. <https://doi.org/10.1186/jbiol60>
- Bentley, M. J., Hodgson, D. A., Smith, J. A., Cofaigh, C. Ó., Larter, R. D., Roberts, S. J., Brachfeld, S., Leventer, A., Hjort, C., Hillenbrand, C., & Evans, J. (2009). *Mechanisms of Holocene palaeoenvironmental change in the Antarctic Peninsula region. 1*, 51–69.
- Bentley, M. J., Hodgson, D. A., Sugden, D. E., Roberts, S. J., Smith, J. A., Leng, M. J., & Bryant, C. (2005). Early Holocene retreat of the George VI ice shelf, Antarctic Peninsula. *Geology*, 33(3), 173–176.
- Berna, L., & Alvarez-Valin, F. (2014). Evolutionary genomics of fast evolving tunicates. *Genome Biology and Evolution*, 6(7), 1724–1738. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu122>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., & Das, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Bishop, G. A., Hostager, B., Stunz, L., & States, U. (2018). *TRAF3 as a multifaceted regulator of B lymphocyte survival and activation*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02161>
- Blows, M. W., & Hoffman, A. A. (2005). A REASSESSMENT OF GENETIC LIMITS TO EVOLUTIONARY CHANGE. *Ecology*, 1371–1384.

- Bock, D. G., Macisaac, H. J., & Cristescu, M. E. (2012). Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1737), 2377–2385. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2610>
- Bohonak, A. J. (2002). IBD (isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93(2), 153–154.
- Bouchemousse, S., Bishop, J. D. D., & Viard, F. (2016). Contrasting global genetic patterns in two biologically similar, widespread and invasive *Ciona* species (Tunicata, Ascidiacea). *Scientific Reports*, 6(April). <https://doi.org/10.1038/srep24875>
- Bouchemousse, S., Liautard-Haag, C., Bierne, N., & Viard, F. (2016). Distinguishing contemporary hybridization from past introgression with postgenomic ancestry-informative SNPs in strongly differentiated *Ciona* species. *Molecular Ecology*, 25(21), 5527–5542. <https://doi.org/10.1111/mec.13854>
- Bowden, D. A., Clarke, A., & Peck, L. S. (2009). Seasonal variation in the diversity and abundance of pelagic larvae of Antarctic marine invertebrates. *Marine Biology*, 156(10), 2033–2047. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1235-9>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248–254.
- Brey, T., Dahm, C., Gorny, M., Klages, M., Stiller, M., & Arntz, W. E. (1996). Do Antarctic benthic invertebrates show an extended level of eurybathy? *Antarctic Science*, 8(1), 3–6.
- Brown, N. E. M., Milazzo, M., Rastrick, S. P. S., Hall-Spencer, J. M., Therriault, T. W., & Harley, C. D. G. (2018). Natural acidification changes the timing and rate of succession, alters community structure, and increases homogeneity in marine biofouling communities. *Global Change Biology*, 24(1), e112–e127. <https://doi.org/10.1111/gcb.13856>
- Brunetti, R., Gissi, C., Pennati, R., Caicci, F., Gasparini, F., & Manni, L. (2015). Morphological evidence that the molecularly determined *Ciona intestinalis* type A and type B are different species: *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 53(3), 186–193. <https://doi.org/10.1111/jzs.12101>
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., Lee, T. J., Leigh,

- N. D., Kuo, T.-H., & Davis, F. G. (2017). A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell Reports*, 18(3), 762–776.
- Buchfink, B., Reuter, K., & Drost, H.-G. (2021). Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods*, 18(4), 366–368.
- Bushnell, B. (2015). BMap short-read aligner, and other bioinformatics tools. URL: [Http://Sourceforge.Net/Projects/Bbmap/](http://Sourceforge.Net/Projects/Bbmap/)(Last Accessed 15 Aug. 2016).
- Bylenga, Christine H, Cummings, V. J., & Ryan, K. G. (2017). High resolution microscopy reveals significant impacts of ocean acidification and warming on larval shell development in *Laternula elliptica*. *PLoS One*, 12(4), e0175706.
- Bylenga, Christine Heather. (2016). *The impacts of ocean acidification and warming on the Antarctic bivalve, Laternula elliptica*. URI: <http://hdl.handle.net/10063/5211>
- Calderwood, S. K., Wang, Y., Xie, X., Khaleque, M. A., Chou, S. D., Murshid, A., Prince, T., & Zhang, Y. (2010). Signal Transduction Pathways Leading to Heat Shock Transcription. *Signal Transduction Insights*, 2, STI.S3994. <https://doi.org/10.4137/sti.s3994>
- Cao, R., Liu, Y., Wang, Q., Dong, Z., Yang, D., Liu, H., Ran, W., Qu, Y., & Zhao, J. (2018). Seawater acidification aggravated cadmium toxicity in the oyster *Crassostrea gigas*: Metal bioaccumulation, subcellular distribution and multiple physiological responses. *Science of the Total Environment*, 642, 809–823. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.126>
- Caputi, L., Andreakis, N., Mastrototaro, F., Cirino, P., Vassillo, M., & Sordino, P. (2007). Cryptic speciation in a model invertebrate chordate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22), 9364–9369. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610158104>
- Carregosa, V., Velez, C., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., & Freitas, R. (2014). Comparative Biochemistry and Physiology , Part B Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 177–178, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.001>
- Carreiro-Silva, M., Cerqueira, T., Godinho, A., Caetano, M., Santos, R. S., & Bettencourt, R. (2014). Molecular mechanisms underlying the physiological responses of the cold-water coral *Desmophyllum dianthus* to ocean acidification. *Coral Reefs*, 33(2), 465–476.

- Clark, G. F., Raymond, B. E. N., Riddle, M. J., Stark, J. S., & Johnston, E. L. (2015). *Vulnerability of Antarctic shallow invertebrate- dominated ecosystems*. 482–491. <https://doi.org/10.1111/aec.12237>
- Clark, G. F., Stark, J. S., Palmer, A. S., Riddle, M. J., & Johnston, L. (2017). *The Roles of Sea-Ice , Light and Sedimentation in Structuring Shallow Antarctic Benthic Communities*. 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168391>
- Clark, P. U., Dyke, A. S., Shakun, J. D., Carlson, A. E., Clark, J., Wohlfarth, B., Mitrovica, J. X., Hostetler, S. W., & McCabe, A. M. (2009). *The Last Glacial Maximum*. *August*, 710–715.
- Clarke, A., Aronson, R. B., Crame, J. A., Gili, J.-M., & Blake, D. B. (2004). Evolution and diversity of the benthic fauna of the Southern Ocean continental shelf. *Antarctic Science*, *16*(4), 559–568. <https://doi.org/10.1017/S0954102004002329>
- Clarke, A., Murphy, E. J., Meredith, M. P., King, J. C., Peck, L. S., Barnes, D. K. A., & Smith, R. C. (2007). Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *362*(1477), 149–166. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1958>
- Convey, P., Chown, S. L., Clarke, A., Barnes, D. K. A., Bokhorst, S., Cummings, V., Ducklow, H. W., Frati, F., Green, T. G. A., Gordon, S., Griffiths, H. J., Howard-Williams, C., Huiskes, A. H. L., Laybourn-Parry, J., Lyons, W. B., McMinn, A., Morley, S. A., Peck, L. S., Quesada, A., ... Wall, D. H. (2014). The spatial structure of antarctic biodiversity. *Ecological Monographs*, *84*(2), 203–244. <https://doi.org/10.1890/12-2216.1>
- Cook, A. J., Fox, A. J., Vaughan, D. G., & Ferrigno, J. G. (2005). Retreating glacier fronts on the Antarctic Peninsula over the past half-century. *Science*, *308*(5721), 541–544. <https://doi.org/10.1126/science.1104235>
- Cook, Alison J, Holland, P. R., Meredith, M. P., Murray, T., Luckman, A., & Vaughan, D. G. (2016). Ocean forcing of glacier retreat in the western Antarctic Peninsula. *Science*, *353*(6296), 283–286.
- Cook, C. P., Van De Flierdt, T., Williams, T., Hemming, S. R., Iwai, M., Kobayashi, M., Jimenez-Espejo, F. J., Escutia, C., González, J. J., Khim, B. K., McKay, R. M., Passchier, S., Bohaty, S. M., Riesselman, C. R., Tauxe, L., Sugisaki, S., Galindo, A. L., Patterson, M. O., Sangiorgi, F., ... Yamane, M. (2013). Dynamic behaviour of the East Antarctic ice sheet during Pliocene warmth. *Nature Geoscience*, *6*(9), 765–769. <https://doi.org/10.1038/ngeo1889>

- Cornils, A., & Held, C. (2014). Evidence of cryptic and pseudocryptic speciation in the *Paracalanus parvus* species complex (Crustacea, Copepoda, Calanoida). *Frontiers in Zoology*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-19>
- Costi, J., Arigony-neto, J., Braun, M., Mavlyudov, B., Nicholas, E., Barbosa, A., Silva, D. A., Marques, W. C., & Cardia, J. (2018). *Estimating surface melt and runoff on the Antarctic Peninsula using ERA-Interim reanalysis data*. 30(6), 379–393. <https://doi.org/10.1017/S0954102018000391>
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258), 561–563.
- Cristini, L., Grosfeld, K., Butzin, M., & Lohmann, G. (2012). Influence of the opening of the Drake Passage on the Cenozoic Antarctic Ice Sheet: A modeling approach. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 339–341, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2012.04.023>
- Croucher, N. J., Fookes, M. C., Perkins, T. T., Turner, D. J., Marguerat, S. B., Keane, T., Quail, M. A., He, M., Assefa, S., Bähler, J., Kingsley, R. A., Parkhill, J., Bentley, S. D., Dougan, G., & Thomson, N. R. (2009). A simple method for directional transcriptome sequencing using illumina technology. *Nucleic Acids Research*, 37(22). <https://doi.org/10.1093/nar/gkp811>
- Cummings, V., Hewitt, J., van Rooyen, A., Currie, K., Beard, S., Thrush, S., Norkko, J., Barr, N., Heath, P., Jane Halliday, N., Sedcole, R., Gomez, A., McGraw, C., & Metcalf, V. (2011). Ocean acidification at high latitudes: Potential effects on functioning of the antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016069>
- Darmanis, S., Gallant, C. J., Marinescu, V. D., Niklasson, M., Segerman, A., Flamourakis, G., Fredriksson, S., Assarsson, E., Lundberg, M., & Nelander, S. (2016). Simultaneous multiplexed measurement of RNA and proteins in single cells. *Cell Reports*, 14(2), 380–389.
- de Aranzamendi, M. C., Servetto, N., Movilla, J., Bettencourt, R., & Sahade, R. (2021). Ocean acidification effects on the stress response in a calcifying antarctic coastal organism: The case of *Nacella concinna* ecotypes. *Marine Pollution Bulletin*, 166(February), 112218. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112218>
- DeBiasse, M. B., & Kelly, M. W. (2016). Plastic and evolved responses to global change: What can we learn from comparative transcriptomics? *Journal of Heredity*, 107(1), 71–81. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv073>
- DeBiasse, M. B., Nelson, B. J., & Hellberg, M. E. (2014). Evaluating summary statistics used to test for

- incomplete lineage sorting: Mito-nuclear discordance in the reef sponge *Callyspongia vaginalis*. *Molecular Ecology*, 23(1), 225–238. <https://doi.org/10.1111/mec.12584>
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., & Philippe, H. (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, 439(7079), 965–968. <https://doi.org/10.1038/nature04336>
- Delsuc, F., Philippe, H., Tsagkogeorga, G., Simion, P., Tilak, M. K., Turon, X., López-Legentil, S., Piette, J., Lemaire, P., & Douzery, E. J. P. (2018). A phylogenomic framework and timescale for comparative studies of tunicates. *BMC Biology*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0499-2>
- Denoeud, F., Henriot, S., Mungpakdee, S., Aury, J. M., Da Silva, C., Brinkmann, H., Mikhaleva, J., Olsen, L. C., Jubin, C., Cañestro, C., Bouquet, J. M., Danks, G., Poulain, J., Campsteijn, C., Adamski, M., Cross, I., Yadetie, F., Muffato, M., Louis, A., ... Chourrout, D. (2010). Plasticity of animal genome architecture unmasked by rapid evolution of a pelagic tunicate. *Science*, 330(6009), 1381–1385. <https://doi.org/10.1126/science.1194167>
- Deregibus, D, Martín, S., Aires, B., Cdjr, A. A. G., Aires, B., Bremerhaven, D.-, Survey, B. A., Cross, H., Road, M., & Cb, C. (2017). *Understanding the link between sea ice , ice scour and Antarctic benthic biodiversity – the need for cross-station and international collaboration.* 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0032247416000875>
- Deregibus, Dolores, Quartino, M. L., Campana, G. L., Momo, F. R., Wiecke, C., & Zacher, K. (2016). Photosynthetic light requirements and vertical distribution of macroalgae in newly ice-free areas in Potter Cove , South Shetland Islands , Antarctica. *Polar Biology*, 153–166. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1679-y>
- Dias, G. M., Abreu, A. G., Silva, F. de O. M., & Solferini, V. N. (2008). Microgeographical differentiation between morphotypes of *Trididemnum orbiculatum* (Tunicata: Ascidiacea) in Southeastern Brazil. *Aquatic Biology*, 4(3), 243–252. <https://doi.org/10.3354/ab00115>
- Díaz, A., Féral, J. P., David, B., Saucède, T., & Poulin, E. (2011). Evolutionary pathways among shallow and deep-sea echinoids of the genus *Sterechinus* in the Southern Ocean. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58(1–2), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2010.10.012>
- DiBello, D., Vaccaro, E., Longo, V., Regoli, F., Nigro, M., Benedetti, M., Giovanni, P., & Pretti, C. (2007). *Presence and inducibility by 6-methyl-7-methoxyflavone of CYP1A1 , CYP1B1 and phase II enzymes in*

- Trematomus bernacchii*, an Antarctic fish. 84, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.05.010>
- Dickson, A. G., & Millero, F. J. (1987). A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 34(10), 1733–1743.
- Dickson, A., Sabine, C., & Christian, J. (2007). 3 Guide to Best Practices for Ocean CO₂ Measurements 2007. In *PICES Special Publ* (Vol. 3, Issue 8).
- Dierssen, H. M., Smith, R. C., & Vernet, M. (2002). Glacial meltwater dynamics in coastal waters west of the Antarctic peninsula. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 1790–1795. [https://doi.org/DOI 10.1073/pnas.032206999](https://doi.org/DOI%2010.1073/pnas.032206999)
- Dietz, L., Arango, C. P., Dömel, J. S., Halanych, K. M., Harder, A. M., Held, C., Mahon, A. R., Mayer, C., Melzer, R. R., & Rouse, G. W. (2015). Regional differentiation and extensive hybridization between mitochondrial clades of the Southern Ocean giant sea spider *Colossendeis megalonyx*. *Royal Society Open Science*, 2(7), 140424.
- Dolan, A. M., De Boer, B., Bernales, J., Hill, D. J., & Haywood, A. M. (2018). High climate model dependency of Pliocene Antarctic ice-sheet predictions. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05179-4>
- Dömel, J. S., Harder, A. M., Melzer, R. R., Arango, C. P., Held, C., Mayer, C., Mahon, A. R., Halanych, K. M., Weis, A., Leese, F., Dietz, L., Rouse, G. W., & Wilson, N. G. (2015). Regional differentiation and extensive hybridization between mitochondrial clades of the Southern Ocean giant sea spider *Colossendeis megalonyx*. *Royal Society Open Science*, 2(7), 140424. <https://doi.org/10.1098/rsos.140424>
- Doney, S. C., Busch, D. S., Cooley, S. R., & Kroeker, K. J. (2020). The impacts of ocean acidification on marine ecosystems and reliant human communities. *Annual Review of Environment and Resources*, 45, 83–112. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-012320-083019>
- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A., & Kleypas, J. A. (2009). Ocean acidification: the other CO₂ problem. *Annual Review of Marine Science*, 1, 169–192.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B., & Pybus, O. G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1185–1192. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi103>

- Drummond, Alexei J, & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 214.
- Drummond, Alexei J, Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969–1973.
- Ducker, J., & Falkenberg, L. J. (2020). How the Pacific Oyster Responds to Ocean Acidification: Development and Application of a Meta-Analysis Based Adverse Outcome Pathway. *Frontiers in Marine Science*, 7(November), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.597441>
- Dupont, S., & Thorndyke, M. C. (2009). Impact of CO₂-driven ocean acidification on invertebrates early life-history – What we know, what we need to know and what we can do. *Biogeosciences Discussions*, 6(2), 3109–3131. <https://doi.org/10.5194/bgd-6-3109-2009>
- Eraso, A., & Domínguez, M. del C. (2007). *Physicochemical characteristics of the subglacier discharge Introduction . Justification for the investigation As part of the GLACKMA Project that we.*
- Espinel-Velasco, N., Hoffmann, L., Agüera, A., Byrne, M., Dupont, S., Uthicke, S., Webster, N. S., & Lamare, M. (2018). Effects of ocean acidification on the settlement and metamorphosis of marine invertebrate and fish larvae: A review. *Marine Ecology Progress Series*, 606, 237–257. <https://doi.org/10.3354/meps12754>
- Esposito, M. C., Boni, R., Cuccaro, A., Tosti, E., & Gallo, A. (2020). Sperm motility impairment in free spawning invertebrates under near-future level of ocean acidification: uncovering the mechanism. *Frontiers in Marine Science*, 6, 794.
- Excoffier, L., Foll, M., & Petit, R. J. (2009). Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 481–501.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 117693430500100000.
- Fabry, V. J., McClintock, J. B., Mathis, J. T., & Grebmeier, J. M. (2009). Ocean acidification at high latitudes: The Bellwether. *Oceanography*, 22(SPL.ISS. 4), 160–171. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.105>
- Falk, U., Falk, U., Silva-busso, A., & Pölcher, P. (2018). *Subject Areas : Author for correspondence : A simplified method to estimate the run-off in Periglacial Creeks : a case study of King George Islands*

, *Antarctic Peninsula*.

- Fan, T., Han, L., Cong, R., & Liang, J. (2005). *Caspase Family Proteases and Apoptosis Molecular Properties of Caspases*. 37(11), 719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., & Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>
- Felsenstein, J. (1992). Estimating effective population size from samples of sequences: inefficiency of pairwise and segregating sites as compared to phylogenetic estimates. *Genetics Research*, 59(2), 139–147.
- Fišer, C., Robinson, C. T., & Malard, F. (2018). Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Molecular Ecology*, 27(3), 613–635. <https://doi.org/10.1111/mec.14486>
- Franchi, N., Ferro, D., Ballarin, L., & Santovito, G. (2012). Transcription of genes involved in glutathione biosynthesis in the solitary tunicate *Ciona intestinalis* exposed to metals. *Aquatic Toxicology*, 114–115, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.007>
- Freitas, R., Lima, A., Oliveira, C., Costa, E., Maria, A., Quintino, V., & Figueira, E. (2012). *Looking for suitable biomarkers in benthic macroinvertebrates inhabiting coastal areas with low metal contamination : Comparison between the bivalve Cerastoderma edule and the Polychaete Diopatra neapolitana*. 75, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.019>
- Fu, X., Fu, N., Guo, S., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Chen, W., Li, Y., Zeng, R., & Khaitovich, P. (2009). Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. *BMC Genomics*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-161>
- Fuentes, V., Alurralde, G., Meyer, B., Aguirre, G. E., Canepa, A., Wölfl, A., Hass, H. C., & Williams, G. N. (2016). Glacial melting : an overlooked threat to Antarctic krill. *Nature Publishing Group, June*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep27234>
- Fung, H. Y. J., Fu, S. C., Brautigam, C. A., & Chook, Y. M. (2015). Structural determinants of nuclear export signal orientation in binding to exportin CRM1. *ELife*, 4(September 2015), 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.10034>
- Gaffney, P. M. (2000). Molecular tools for understanding population structure in Antarctic species.

Antarctic Science, 12(3), 288–296. <https://doi.org/10.1017/S0954102000000353>

- Galaska, M. P., Sands, C. J., Santos, S. R., Mahon, A. R., & Halanych, K. M. (2017). Geographic structure in the Southern Ocean circumpolar brittle star *Ophionotus victoriae* (Ophiuridae) revealed from mt DNA and single-nucleotide polymorphism data. *Ecology and Evolution*, 7(2), 475–485.
- Gallo, A., Boni, R., Buia, M. C., Monfrecola, V., Esposito, M. C., & Tosti, E. (2019). Ocean acidification impact on ascidian *Ciona robusta* spermatozoa: New evidence for stress resilience. *Science of the Total Environment*, 697(August), 134100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134100>
- Gambi, M. C., Buia, M. C., Mazzella, L., Lorenti, M., & Scipione, M. B. (2000). Spatio-temporal variability in the structure of benthic populations in a physically controlled system off Terra Nova Bay: the shallow hard bottoms. In *Ross Sea Ecology* (pp. 527–538). Springer.
- Gatusso, J.-P., Brewer, P. G., Hoegh-Guldberg, O., Kleypas, J. A., Pörtner, H.-O., & Schmidt, D. N. (2014). Cross-chapter box on ocean acidification. *Climate {Change} 2014: {Impacts}, {Adaptation}, and {Vulnerability}. {Part} {A}: {Global} and {Sectoral} {Aspects}. {Contribution} of {Working} {Group} {II} to the {Fifth} {Assessment} {Report} of the {Intergovernmental} {Panel} of {Climate} {Change}*, 129–131.
- Gaylord, B., Kroeker, K. J., Sunday, J. M., Anderson, K. M., Barry, J. P., Brown, N. E., Connell, S. D., Dupont, S., Fabricius, K. E., Hall-Spencer, J. M., Klinger, T., Milazzo, M., Munday, P. L., Russell, B. D., Sanford, E., Schreiber, S. J., Thiyagarajan, V., Vaughan, M. L. H., Widdicombe, S., & Harley, C. D. G. (2015). Ocean acidification through the lens of ecological theory. *Ecology*, 96(1), 3–15. <https://doi.org/10.1890/14-0802.1>
- Gili, J. M., Arntz, W. E., Palanques, A., Orejas, C., Clarke, A., Dayton, P. K., Isla, E., Teixidó, N., Rossi, S., & López-González, P. J. (2006). A unique assemblage of epibenthic sessile suspension feeders with archaic features in the high-Antarctic. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 53(8–10), 1029–1052. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2005.10.021>
- Gili, J. M., Coma, R., Orejas, C., López-González, P. J., & Zabala, M. (2001). Are antarctic suspension-feeding communities different from those elsewhere in the world? *Polar Biology*, 24(7), 473–485. <https://doi.org/10.1007/s003000100257>
- Gingerich, P. D. (2019). Temporal Scaling of Carbon Emission and Accumulation Rates: Modern Anthropogenic Emissions Compared to Estimates of PETM Onset Accumulation. *Paleoceanography*

and *Paleoclimatology*, 34(3), 329–335. <https://doi.org/10.1029/2018PA003379>

- Gissi, C., Pesole, G., Mastrototaro, F., Iannelli, F., Guida, V., & Griggio, F. (2010). Hypervariability of ascidian mitochondrial gene order: Exposing the Myth of deuterostome organelle genome stability. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 211–215. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp234>
- Giuliani, E. M., Benedetti, M., Arukwe, A., & Regoli, F. (2013). Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. *Aquatic Toxicology*, 134–135, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.012>
- Givnish, T. J., Barfuss, M. H. J., Van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P. A., Jabaily, R. S., Crayn, D. M., & Smith, J. A. C. (2014). Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71, 55–78.
- Goncalves, P., Anderson, K., Thompson, E. L., Melwani, A., Parker, L. M., Ross, P. M., & Raftos, D. A. (2016). Rapid transcriptional acclimation following transgenerational exposure of oysters to ocean acidification. *Molecular Ecology*, 25(19), 4836–4849. <https://doi.org/10.1111/mec.13808>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., & Zeng, Q. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644.
- Griggio, F., Voskoboynik, A., Iannelli, F., Justy, F., Tilak, M. K., Xavier, T., Pesole, G., Douzery, E. J. P., Mastrototaro, F., & Gissi, C. (2014). Ascidian mitogenomics: Comparison of evolutionary rates in closely related taxa provides evidence of ongoing speciation events. *Genome Biology and Evolution*, 6(3), 591–605. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu041>
- Gruber, N., Clement, D., Carter, B. R., Feely, R. A., van Heuven, S., Hoppema, M., Ishii, M., Key, R. M., Kozyr, A., Lauvset, S. K., Monaco, C. Lo, Mathis, J. T., Murata, A., Olsen, A., Perez, F. F., Sabine, C. L., Tanhua, T., & Wanninkhof, R. (2019). The oceanic sink for anthropogenic CO₂ from 1994 to 2007. *Science*, 363(6432), 1193–1199. <https://doi.org/10.1126/science.aau5153>
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321.
- Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. S. (2002). Caspase-2 induces

- apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13430–13437.
- Gutt, J. (2000). Some “ driving forces ” structuring communities of the sublittoral Antarctic macrobenthos. *Antarctic Science*, 12(3), 297–313. <https://doi.org/10.1017/S0954102000000365>
- Gutt, J., Cape, M., Dimmler, W., Fillinger, L., Isla, E., Lieb, V., Lundälv, T., & Pulcher, C. (2013). Shifts in Antarctic megabenthic structure after ice-shelf disintegration in the Larsen area east of the Antarctic Peninsula. *Polar Biology*, 36(6), 895–906. <https://doi.org/10.1007/s00300-013-1315-7>
- Halanych, K. M., & Mahon, A. R. (2018). Challenging dogma concerning biogeographic patterns of Antarctica and the Southern Ocean. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, 355–378.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9.
- Han, F., Xu, Æ. J., & Zhang, Æ. X. (2007). Characterization of an early gene (wsv477) from shrimp white spot syndrome virus (WSSV). 193–198. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0053-0>
- Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., & Ron, D. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cell*, 5(5), 897–904.
- Harmon, L. J., Schulte II, J. A., Larson, A., & Losos, J. B. (2003). Tempo and Mode of Evolutionary Radiation in Iguanian Lizards. [10.1126/science.1084786](https://doi.org/10.1126/science.1084786). *Science*, 301(5635), 961–964. <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/301/5635/961>
- Havermans, C., Nagy, Z. T., Sonet, G., De Broyer, C., & Martin, P. (2011). DNA barcoding reveals new insights into the diversity of Antarctic species of Orchomene sensu lato (Crustacea: Amphipoda: Lysianassoidea). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58(1–2), 230–241.
- Havird, J. C., & Sloan, D. B. (2016). The roles of mutation, selection, and expression in determining relative rates of evolution in mitochondrial versus nuclear genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 33(12), 3042–3053. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw185>
- Haye, P. A., & Muñoz-Herrera, N. C. (2013). Isolation with differentiation followed by expansion with admixture in the tunicate *Pyura chilensis*. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 252. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-252>

- He, J. Q., Oganessian, G., Saha, S. K., Zarnegar, B., & Cheng, G. (2007). TRAF3 and its biological function. *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)*, 48–59.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), 96–99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hedgecock, D. (2019). Population genetics of marine organisms. In *Encyclopedia of Ocean Sciences* (Issue June). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.04302-5>
- Heethoff, M. (2018). Cryptic species—conceptual or terminological chaos? A response to Struck et al. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(5), 310.
- Held, Christoph, & Leese, F. (2007). The utility of fast evolving molecular markers for studying speciation in the Antarctic benthos. *Polar Biology*, 30(4), 513–521. <https://doi.org/10.1007/s00300-006-0210-x>
- Held, Christoph, & Wägele, J.-W. (2005). Cryptic speciation in the giant Antarctic isopod *Glyptonotus antarcticus* (Isopoda: Valvifera: Chaetiliidae). *Scientia Marina*, 69(2), 175–181. <https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69s2175>
- Held, Christoph. (2003). Molecular evidence for cryptic speciation within the widespread Antarctic crustacean *Ceratoserolis trilobitoides* (Crustacea, Isopoda). *Antarctic Biology in a Global Context, Proceedings*, 3(Kattner 1998), 135–139 338.
- Hemery, L. G., Eléaume, M., Roussel, V., Améziane, N., Gallut, C., Steinke, D., Cruaud, C., Couloux, A., & Wilson, N. G. (2012). Comprehensive sampling reveals circumpolarity and sympatry in seven mitochondrial lineages of the Southern Ocean crinoid species *Promachocrinus kerguelensis* (Echinodermata). *Molecular Ecology*, 21(10), 2502–2518.
- Herdman, W. A. (1881). WA 1880—1881. Preliminary report on the Tunicata of the Challenger expedition. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh. Vols*, 10(11).
- Heroy, D. C., & Anderson, J. B. (2005). Ice-sheet extent of the Antarctic Peninsula region during the Last Glacial Maximum (LGM)—Insights from glacial geomorphology. *Geological Society of America*

Bulletin, 117(11–12), 1497–1512.

- Hewitt, G M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 359(1442), 183–195; discussion 195. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1388>
- Hewitt, Godfrey M. (2001a). Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10, 537–549. <https://doi.org/doi:10.1046/j.1365-294x.2001.01202.x>
- Hewitt, Godfrey M. (2001b). Speciation, hybrid zones and phylogeography — or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10, 537–549. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01202.x>
- Hewitt, Godfrey M. (2004). Biodiversity: a climate for colonization. *Heredity*, 92, 1–2. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800365>
- Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A. J., Cohen, A. H., Terwilliger, D. P., Buckley, K. M., Brockton, V., Nair, S. V., Berney, K., Fugmann, S. D., Anderson, M. K., Pancer, Z., Cameron, R. A., Smith, L. C., & Rast, J. P. (2006). The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Developmental Biology*, 300(1), 349–365. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.065>
- Hill, G. E. (2015). Mitonuclear ecology. *Molecular Biology and Evolution*, 32(8), 1917–1927. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv104>
- Hjort, C., Ingólfsson, Ó., Bentley, M. J., & Björck, S. (2003). The Late Pleistocene and Holocene Glacial and Climate History of the Antarctic Peninsula Region as Documented by the Land and Lake Sediment Records—A Review. *Antarctic Peninsula Climate Variability: Historical and Paleoenvironmental Perspectives*, 79, 95–102.
- Ho, S. Y. W., Lanfear, R., Bromham, L., Phillips, M. J., Soubrier, J., Rodrigo, A. G., & Cooper, A. (2011). Time-dependent rates of molecular evolution. *Molecular Ecology*, 20(15), 3087–3101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05178.x>
- Hoy, M. S., & Rodriguez, R. J. (2013). Intragenomic sequence variation at the ITS1–ITS2 region and at the 18S and 28S nuclear ribosomal DNA genes of the New Zealand mud snail, *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae: Mollusca). *Journal of Molluscan Studies*, 79(3), 205–217.
- Hu, H. T., Huang, T. N., & Hsueh, Y. P. (2020). KLHL17/Actinfilin, a brain-specific gene associated with

- infantile spasms and autism, regulates dendritic spine enlargement. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00696-1>
- Huang, X., Liu, Z., Xie, Z., Dupont, S., Huang, W., Wu, F., Kong, H., Liu, L., Sui, Y., & Lin, D. (2018). Oxidative stress induced by titanium dioxide nanoparticles increases under seawater acidification in the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Marine Environmental Research*, 137, 49–59.
- Huntsman, A. G. (1913). The classification of the Styelidae. *Zoologischer Anzeiger*, 41, 482–501.
- Huth, T. J., & Place, S. P. (2016). Marine Genomics RNA-seq reveals a diminished acclimation response to the combined effects of ocean acidification and elevated seawater temperature in *Pagothenia borchgrevinki*. *Marine Genomics*. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.02.004>
- Isla, E., Palanques, A., Alvá, V., & P. Piug, J. G. (2001). Fluxes and composition of settling particles during summer in an Antarctic shallow bay of Livingston Island, South Shetlands. 670–676. <https://doi.org/10.1007/s003000100267>
- Janosik, A. M., & Halanych, K. M. (2010). Unrecognized Antarctic biodiversity: a case study of the genus *Odontaster* (Odontasteridae; Asteroidea). *Integrative and Comparative Biology*, 50(6), 981–992.
- Javid, B., MacAry, P. A., & Lehner, P. J. (2007). Structure and Function: Heat Shock Proteins and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology*, 179(4), 2035–2040. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2035>
- Jerosch, K., Scharf, F. K., Deregibus, D., Campana, G. L., Zacher, K., Pehlke, H., Falk, U., Christian Hass, H., Quartino, M. L., & Abele, D. (2019). Ensemble modeling of Antarctic macroalgal habitats exposed to glacial melt in a polar fjord. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7(JUN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00207>
- Jimenez, A. G., Jayawardene, S., Alves, S., Dallmer, J., Dowd, W. W., & Dowd, W. W. (2015). *Micro-scale environmental variation amplifies physiological variation among individual mussels*.
- Johnson, K. M., & Hofmann, G. E. (2017). Transcriptomic response of the Antarctic pteropod *Limacina helicina antarctica* to ocean acidification. *BMC Genomics*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4161-0>
- Juntilla, M. M., & Koretzky, G. A. (2008). Critical roles of the PI3K/Akt signaling pathway in T cell development. *Immunology Letters*, 116(2), 104–110.

- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D199–D205.
- Kaniewska, P., Chan, C. K. K., Kline, D., Ling, E. Y. S., Rosic, N., Edwards, D., Hoegh-Guldberg, O., & Dove, S. (2015). Transcriptomic changes in coral holobionts provide insights into physiological challenges of future climate and ocean change. *PLoS ONE*, 10(10), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139223>
- Kapsenberg, L., Alliouane, S., Gazeau, F., Mousseau, L., & Gattuso, J.-P. (2017). Coastal ocean acidification and increasing total alkalinity in the northwestern Mediterranean Sea. *Ocean Science*, 13(3), 411–426.
- Katoh, K., Shibata, H., Hatta, K., & Maki, M. (2004). CHMP4b is a major binding partner of the ALG-2-interacting protein Alix among the three CHMP4 isoforms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 421(1), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.09.038>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., & Duran, C. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.
- Kelly, D. C. (2002). Response of Antarctic (ODP Site 690) planktonic foraminifera to the Paleocene-Eocene thermal maximum: Faunal evidence for ocean/climate change. *Paleoceanography*, 17(4), 23-1-23–13. <https://doi.org/10.1029/2002pa000761>
- Kenkel, C. D., Moya, A., Strahl, J., Humphrey, C., & Bay, L. K. (2018). Functional genomic analysis of corals from natural CO₂-seeps reveals core molecular responses involved in acclimatization to ocean acidification. *Global Change Biology*, 24(1), 158–171. <https://doi.org/10.1111/gcb.13833>
- Khim, B. K., Shim, J., Yoon, H. I., Kang, Y. C., & Jang, Y. H. (2007). *Lithogenic and biogenic particle deposition in an Antarctic coastal environment (Marian Cove , King George Island) : Seasonal patterns from a sediment trap study*. 73, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.12.015>
- Kim, D., Seong, J., & Ahn, I. (2021). Patterns , drivers and implications of ascidian distributions in a rapidly deglaciating fjord , King George Island , West Antarctic Peninsula. *Ecological Indicators*, 125(January), 107467. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107467>
- Kim, J., Tsuruta, F., Okajima, T., Yano, S., Sato, B., & Chiba, T. (2017). KLHL7 promotes TUT1

- ubiquitination associated with nucleolar integrity: Implications for retinitis pigmentosa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(1–2), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.049>
- Knight, J. R. P., Bastide, A., Roobol, A., Roobol, J., Jackson, T. J., Utami, W., Barrett, D. A., Smales, C. M., & Willis, A. E. (2015). Eukaryotic elongation factor 2 kinase regulates the cold stress response by slowing translation elongation. *Biochemical Journal*, 465, 227–238. <https://doi.org/10.1042/BJ20141014>
- Koh, H. Y., Lee, J. H., Han, S. J., Park, H., Shin, S. C., & Lee, S. G. (2015). A transcriptomic analysis of the response of the arctic pteropod *Limacina helicina* to carbon dioxide-driven seawater acidification. *Polar Biology*, 38(10), 1727–1740. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1738-4>
- Kopylova, E., Noé, L., & Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28(24), 3211–3217.
- Korshunova, T., Martynov, A., Bakken, T., & Picton, B. (2017). External diversity is restrained by internal conservatism: new nudibranch mollusc contributes to the cryptic species problem. *Zoologica Scripta*, 46(6), 683–692.
- Kosman, E. T., & Levitan, D. R. (2014). Sperm competition and the evolution of gametic compatibility in externally fertilizing taxa. *Molecular Human Reproduction*, 20(12), 1190–1197.
- Kosti, I., Jain, N., Aran, D., Butte, A. J., & Sirota, M. (2016). Cross-tissue Analysis of Gene and Protein Expression in Normal and Cancer Tissues. *Scientific Reports*, 6(March), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep24799>
- Kott, P. (1971). Antarctic Ascidiacea II. *Biology of the Antarctic Seas IV*, 17, 11–82.
- Kott, P. (1985). The Australian ascidiacea part IP, Phlebobranchia and Stolidobranchia. *Mem. Qd Mus.*, 23.
- Kott, P., & Mather, P. (1969). *Antarctic Ascidiacea: Monographic Account of the Known Species Based on Specimens Collected Under US Government Auspices, 1947-1965* (Vol. 13). American Geophysical Union.
- Krebs, L., Blank, M., & Bastrop, R. (2011). Phylogeography, historical demography and postglacial colonization routes of two amphi-atlantic distributed amphipods. *Systematics and Biodiversity*, 9(3),

259–273. <https://doi.org/10.1080/14772000.2011.604359>

- Kuida, K. (2000). Caspase-9. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(2), 121–124.
- Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 225–257.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death & Differentiation*, 14(1), 32–43.
- Lacoursière-Roussel, A., Bock, D. G., Cristescu, M. E., Guichard, F., Girard, P., Legendre, P., & McKindsey, C. W. (2012). Disentangling invasion processes in a dynamic shipping-boating network. *Molecular Ecology*, 21(17), 4227–4241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05702.x>
- Lagger, C., Servetto, N., Torre, L., & Sahade, R. (2017). *Benthic colonization in newly ice-free soft-bottom areas in an Antarctic fjord*. 1–15. <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.879315>. Funding
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357.
- Lee, Y. H., Kang, H. M., Kim, M. S., Wang, M., Kim, J. H., Jeong, C. B., & Lee, J. S. (2019). Effects of ocean acidification on life parameters and antioxidant system in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 212(March), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.05.007>
- Lejeune, C., Bock, D. G., Therriault, T. W., MacIsaac, H. J., & Cristescu, M. E. (2011). Comparative phylogeography of two colonial ascidians reveals contrasting invasion histories in North America. *Biological Invasions*, 13(3), 635–650. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9854-0>
- Levitán, D. R., McGhee, K. E., Swanson, C. A., Fukami, H., Jara, J., Kline, D., Knowlton, N., & McGovern, T. M. (2004). Mechanisms of reproductive isolation among sympatric broadcast-spawning corals of the *Montastraea annularis* species complex. *Evolution*, 58(2), 308–323. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01647.x>
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 1–16.
- Li, H., Huang, X., & Zhan, A. (2020). Stress Memory of Recurrent Environmental Challenges in Marine Invasive Species: *Ciona robusta* as a Case Study. *Frontiers in Physiology*, 11(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00094>
- Li, J., & Yuan, J. (2008). *Caspases in apoptosis and beyond*. 6194–6206.

<https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>

- Li, S., Huang, J., Liu, C., Liu, Y., Zheng, G., Xie, L., & Zhang, R. (2016). Interactive Effects of Seawater Acidification and Elevated Temperature on the Transcriptome and Biomineralization in the Pearl Oyster *Pinctada fucata*. *Environmental Science and Technology*, *50*(3), 1157–1165. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05107>
- Li, Y., Zhou, F., Huang, J., Yang, L., Jiang, S., Yang, Q., He, J., & Jiang, S. (2018). Transcriptome reveals involvement of immune defense, oxidative imbalance, and apoptosis in ammonia-stress response of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish and Shellfish Immunology*, *83*(July), 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.026>
- Liao, H., Yang, Z., Dou, Z., Sun, F., Kou, S., Zhang, Z., Huang, X., & Bao, Z. (2019). Impact of ocean acidification on the energy metabolism and antioxidant responses of the Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Frontiers in Physiology*, *10*(JAN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01967>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, *25*(11), 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Liem, K. F. (1973). Evolutionary strategies and morphological innovations: cichlid pharyngeal jaws. *Systematic Zoology*, *22*(4), 425–441.
- Lin, Y., Huang, D., Chu, C., Lin, Y., & Lin, W. (2013). *The Tyrosine Kinase Syk Differentially Regulates Toll-like Receptor Signaling Downstream of the Adaptor Molecules TRAF6 and TRAF3*. *6*(289), 1–13.
- Linse, K., Cope, T., Lörz, A.-N., & Sands, C. (2007). Is the Scotia Sea a centre of Antarctic marine diversification? Some evidence of cryptic speciation in the circum-Antarctic bivalve *Lissarca notorcadensis* (Arcoidea: Philobryidae). *Polar Biology*, *30*(8), 1059–1068.
- Liu, S., Wang, X., Sun, F., Zhang, J., Feng, J., Liu, H., Rajendran, K. V., Sun, L., Zhang, Y., Jiang, Y., Peatman, E., Kaltenboeck, L., Kucuktas, H., & Liu, Z. (2013). RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish. *Physiological Genomics*, *45*(12), 462–476. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00026.2013>
- Liu, W., Xu, Q., Chi, Q., Hu, J., Li, F., & Cheng, L. (2016). Up-regulated expression of Ran reveals its potential role to deltamethrin stress in Kc cells. *Gene*, *583*(1), 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.037>

- Lopez, C. E., Sheehan, H. C., Vierra, D. A., Azzinaro, P. A., Meedel, T. H., Howlett, N. G., & Irvine, S. Q. (2017). Proteomic responses to elevated ocean temperature in ovaries of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Biology Open*, 6(7), 943–955. <https://doi.org/10.1242/bio.024786>
- Losos, J. B. (2008). Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters*, 11(10), 995–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01229.x>
- Lucchi, R. G., Rebesco, M., Camerlenghi, A., Busetti, M., Tomadin, L., Villa, G., Persico, D., Morigi, C., Bonci, M. C., & Giorgetti, G. (2002). Mid-late pleistocene glacial marine sedimentary processes of a high-latitude, deep-sea sediment drift (Antarctic Peninsula Pacific margin). *Marine Geology*, 189(3–4), 343–370. [https://doi.org/10.1016/S0025-3227\(02\)00470-X](https://doi.org/10.1016/S0025-3227(02)00470-X)
- Lüthi, D., Le Floch, M., Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J. M., Siegenthaler, U., Raynaud, D., Jouzel, J., Fischer, H., Kawamura, K., & Stocker, T. F. (2008). High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature*, 453(7193), 379–382. <https://doi.org/10.1038/nature06949>
- Maas, C., Meijers, J. C. M., Marquart, J. A., Bakhtiari, K., Weeterings, C., de Groot, P. G., & Urbanus, R. T. (2010). Activated factor V is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin in plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9083–9087.
- Mao, X. R., & Crowder, C. M. (2010). Protein Misfolding Induces Hypoxic Preconditioning via a Subset of the Unfolded Protein Response Machinery. *PLoS ONE*, 5(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016111>
- Maor-Landaw, K., Waldman Ben-Asher, H., Karako-Lampert, S., Salmon-Divon, M., Prada, F., Caroselli, E., Goffredo, S., Falini, G., Dubinsky, Z., & Levy, O. (2017). Mediterranean versus Red sea corals facing climate change, a transcriptome analysis. *Scientific Reports*, 7, 42405. <https://doi.org/10.1038/srep42405>
- Marko, P. B., Hoffman, J. M., Emme, S. A., McGovern, T. M., Keever, C. C., & Nicole Cox, L. (2010). The “expansion-Contraction” model of Pleistocene biogeography: Rocky shores suffer a sea change? *Molecular Ecology*, 19(1), 146–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04417.x>
- Martinson, D. G. (2012). Antarctic circumpolar current’s role in the Antarctic ice system: An overview.

Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 335, 71–74.

- Mayewski, P. A., Meredith, M. P., Summerhayes, C. P., Turner, J., Worby, A., Barrett, P. J., Casassa, G., Bertler, N. A. N., Bracegirdle, T., Naveira Garabato, A. C., Bromwich, D., Campbell, H., Hamilton, G. S., Lyons, W. B., Maasch, K. A., Aoki, S., Xiao, C., & Van Ommen, T. (2009). State of the antarctic and southern ocean climate system. *Reviews of Geophysics*, 47(1), 1–38. <https://doi.org/10.1029/2007RG000231>
- Mayr, E. (1963). Animal species and evolution. *Animal Species and Evolution*.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055.
- McFarlane, S. M., Pashmi, G., Connell, M. C., Littlejohn, A. F., Tucker, S. J., Vandenabeele, P., & MacEwan, D. J. (2002). Differential activation of nuclear factor- κ B by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Letters*, 515(1–3), 119–126. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02450-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02450-X)
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2015). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026716>
- McInerney, F. A., & Wing, S. L. (2011). The Paleocene-Eocene Thermal Maximum: A perturbation of carbon cycle, climate, and biosphere with implications for the future. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 39, 489–516.
- McIntire, C. R., Yeretssian, G., & Saleh, M. (2009). Inflammasomes in infection and inflammation. *Apoptosis*, 14(4), 522.
- McNeil, B. I., & Matear, R. J. (2008). Southern Ocean acidification: A tipping point at 450-ppm atmospheric CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18860–18864. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806318105>
- Mehrbach, C., Culbertson, C. H., Hawley, J. E., & Pytkowicz, R. M. (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure 1. *Limnology and Oceanography*, 18(6), 897–907.
- Meng, W., & Gao, S. (2021). Targeting XPO1 enhances innate immune response and inhibits KSHV lytic replication during primary infection by nuclear stabilization of the p62 autophagy adaptor protein. *Cell*

Death and Disease, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03303-1>

- Meredith, M. P., Falk, U., Valeria, A., Mackensen, A., Schloss, I. R., Barlett, E. R., Jerosch, K., Silva, A., & Abele, D. (2018). *Anatomy of a glacial meltwater discharge event in an Antarctic cove Author for correspondence : January*. <https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0163>
- Migliaccio, O., Pinsino, A., Maffioli, E., Smith, A. M., Agnisola, C., Matranga, V., Nonnis, S., Tedeschi, G., Byrne, M., Gambi, M. C., & Palumbo, A. (2019). Living in future ocean acidification, physiological adaptive responses of the immune system of sea urchins resident at a CO₂ vent system. *Science of the Total Environment*, 672, 938–950. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.005>
- Millar, R. H. (1960). The identity of the ascidians *Styela mammiculata* Carlisle and *S. clava* Herdman. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 39(3), 509–511.
- Moffat, C., & Meredith, M. (2018). Shelf-ocean exchange and hydrography west of the Antarctic Peninsula: A review. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 376(2122). <https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0164>
- Monien, D., Monien, P., Brünjes, R., Widmer, T., Kappenberg, A., Busso, A. A. S., Schnetger, B., & Brumsack, H. (2016). *Meltwater as a source of potentially bioavailable iron to Antarctica waters*. 15. <https://doi.org/10.1017/S095410201600064X>
- Monien, P., Schnetger, B., Brumsack, H. J., Hass, H. C., & Kuhn, G. (2011). A geochemical record of late Holocene palaeoenvironmental changes at King George Island (maritime Antarctica). *Antarctic Science*, 23(3), 255–267. <https://doi.org/10.1017/S095410201100006X>
- Monniot, C., & Monniot, F. (1983). *Ascidies antarctiques et subantarctiques: morphologie et biogéographie*. Éditions du Muséum.
- Monniot, C., Monniot, F., & Laboute, P. (1991). *Coral reef ascidians of New Caledonia* (Issue 30). IRD Editions.
- Monniot, F., Dettai, A., Eleaume, M., Cruaud, C., & Ameziane, N. (2011). Antarctic Ascidians (Tunicata) of the French-Australian survey CEAMARC in Terre Adélie. *Zootaxa*, 2817(1), 1–54.
- Montano, S., Maggioni, D., Galli, P., & Hoeksema, B. W. (2017). A cryptic species in the *Pteroclava krempfi* species complex (Hydrozoa, Cladocorynidae) revealed in the Caribbean. *Marine Biodiversity*, 47(1), 83–89.

- Moon, H., Mohd, W., Wan, R., Kim, H., & Ahn, I. (2015). The impacts of climate change on Antarctic nearshore mega-epifaunal benthic assemblages in a glacial fjord on King George Island : Responses and implications. *Ecological Indicators*, 57, 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.04.031>
- Moore, C. E. J., Mikolajek, H., Regufe da Mota, S., Wang, X., Kenney, J. W., Werner, J. M., & Proud, C. G. (2015). Elongation Factor 2 Kinase Is Regulated by Proline Hydroxylation and Protects Cells during Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 35(10), 1788–1804. <https://doi.org/10.1128/mcb.01457-14>
- Moore, R. S., Kaletsky, R., & Murphy, C. T. (2019). Piwi/PRG-1 Argonaute and TGF- β Mediate Transgenerational Learned Pathogenic Avoidance. *Cell*, 177(7), 1827-1841.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.024>
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., & Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis: cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34287–34294.
- Morley, S. A., Abele, D., Barnes, D. K. A., Cárdenas, C. A., Cotté, C., Gutt, J., Henley, S. F., Höfer, J., Hughes, K. A., Martin, S. M., Moffat, C., Raphael, M., Stammerjohn, S. E., & Morley, S. A. (2020). *Global Drivers on Southern Ocean Ecosystems: Changing Physical Environments and Anthropogenic Pressures in an Earth System*. 7(December), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.547188>
- Movilla, J., Calvo, E., Pelejero, C., Coma, R., Serrano, E., Fernández-Vallejo, P., & Ribes, M. (2012). Calcification reduction and recovery in native and non-native Mediterranean corals in response to ocean acidification. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 438, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.09.014>
- Moya, A., Huisman, L., Ball, E. E., Hayward, D. C., Grasso, L. C., Chua, C. M., Woo, H. N., Gattuso, J., Foret, S., & Miller, D. J. (2012). Whole transcriptome analysis of the coral *Acropora millepora* reveals complex responses to CO₂-driven acidification during the initiation of calcification. *Molecular Ecology*, 21(10), 2440–2454.
- Moya, A., Huisman, L., Foret, S., Gattuso, J., Hayward, D. C., Ball, E. E., & Miller, D. J. (2015). Rapid acclimation of juvenile corals to CO₂-mediated acidification by upregulation of heat shock protein and Bcl-2 genes. *Molecular Ecology*, 24(2), 438–452.

- Nagata, S., & Tanaka, M. (2017). Programmed cell death and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(5), 333–340.
- Nagelkerken, I., & Munday, P. L. (2016). Animal behaviour shapes the ecological effects of ocean acidification and warming: Moving from individual to community-level responses. *Global Change Biology*, 22(3), 974–989. <https://doi.org/10.1111/gcb.13167>
- Nakagawa, T., & Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 150(4), 887–894.
- Nakhaei, P., Genin, P., Civas, A., & Hiscott, J. (2009). RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection. *Seminars in Immunology*, 21(4), 215–222.
- Neder, C., Sahade, R., Abele, D., Pesch, R., & Jerosch, K. (2020). Suspended Particulate Matter in Potter Cove , West Antarctic Peninsula. *Fluids*, 5, 235.
- Nguyen, Viet, T., Jung, H., Nguyen, M. T., Hurwood, D., & Mather, P. (2016). Marine Genomics Evaluation of potential candidate genes involved in salinity tolerance in striped cat fi sh (*Pangasianodon hypophthalmus*) using an RNA-Seq approach. *Marine Genomics*, 25, 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.11.010>
- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtapong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlén, M., & Nielsen, J. (2012). A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: A case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10084–10097. <https://doi.org/10.1093/nar/gks804>
- Nosil, P. (2008). Speciation with gene flow could be common. *Molecular Ecology*, 17(9), 2103–2106.
- Nydam, M. L., & Harrison, R. G. (2007). Genealogical relationships within and among shallow-water *Ciona* species (Ascidiacea). *Marine Biology*, 151(5), 1839–1847. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0617-0>
- Nydam, M. L., & Harrison, R. G. (2011). Introgression despite substantial divergence in a broadcast spawning marine invertebrate. *Evolution*, 65(2), 429–442. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01153.x>
- Nydam, M. L., Yanckello, L. M., Bialik, S. B., Giesbrecht, K. B., Nation, G. K., Peak, J. L., & Marcos, S. (2017). *Introgression in two species of broadcast spawning marine invertebrate*. 879–890.

- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). *Crosstalk in NF- κ B signaling pathways*. 12(8). <https://doi.org/10.1038/ni.2065>
- Oganesyan, G., Saha, S. K., Guo, B., He, J. Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., & Cheng, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and-independent antiviral response. *Nature*, 439(7073), 208–211.
- Ohira, T., Arita, M., Omori, K., Recchiuti, A., Van Dykeand, T. E., & Serhan, C. N. (2010). Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3451–3461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.044131>
- Pachauri, R. K., Allen, M. R., Barros, V. R., Broome, J., Cramer, W., Christ, R., Church, J. A., Clarke, L., Dahe, Q., & Dasgupta, P. (2014). *Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Ipc.
- Palumbi, S. R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25(1994), 547–572. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.25.110194.002555>
- Pasotti, F., Saravia, L. A., De Troch, M., Tarantelli, M. S., Sahade, R., & Vanreusel, A. (2015). Benthic trophic interactions in an Antarctic shallow water ecosystem affected by recent glacier retreat. *PLoS ONE*, 10(11), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141742>
- Pearl, L. H. (2000). Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mutation Research/DNA Repair*, 460(3-4), 165-181.
- Peck, L. S., Clark, M. S., Morley, S. A., Massey, A., & Rossetti, H. (2009). Animal temperature limits and ecological relevance: Effects of size, activity and rates of change. *Functional Ecology*, 23(2), 248–256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01537.x>
- Peck, L. S., Clark, M. S., Power, D., Reis, J., Batista, F. M., & Harper, E. M. (2015). Acidification effects on biofouling communities: Winners and losers. *Global Change Biology*, 21(5), 1907–1913. <https://doi.org/10.1111/gcb.12841>
- Peng, C., Zhao, X., Liu, S., Shi, W., Han, Y., Guo, C., Peng, X., Chai, X., & Liu, G. (2017). Ocean acidification alters the burrowing behaviour, Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase activity, metabolism, and gene expression of a bivalve species, *Sinonovacula constricta*. *Marine Ecology Progress Series*, 575,

107–117. <https://doi.org/10.3354/meps12224>

- Pérez-Portela, R., Arranz, V., Rius, M., & Turon, M. (2013). Cryptic speciation or global spread? The case of a cosmopolitan marine invertebrate with limited dispersal capabilities. *Scientific Reports*, 3, 3197. <https://doi.org/10.1038/srep03197>
- Pérez-Portela, R., Bishop, J. D. D., Davis, A. R., & Turon, X. (2009). Phylogeny of the families Pyuridae and Styelidae (Stolidobranchiata, Ascidiacea) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(3), 560–570. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.11.014>
- Pérez-Portela, Rocío, & Turon, X. (2008). Cryptic divergence and strong population structure in the colonial invertebrate *Pycnoclavella communis* (Ascidiacea) inferred from molecular data. *Zoology*, 111(2), 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2007.06.006>
- Perez, M. F., & Lehner, B. (2019). Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals. *Nature Cell Biology*, 21(2), 143–151. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0242-9>
- Petit, R. J., Raynaud, D., Basile, I., Chappellaz, J., Ritz, C., Delmotte, M., Legrand, M., Lorius, C., & Pe, L. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399, 429–413. <https://doi.org/10.1038/20859>
- Philipp, E. V. A. E. R., Husmann, G., & Abele, D. (2011). *The impact of sediment deposition and iceberg scour on the Antarctic soft shell clam Laternula elliptica at King George Island , Antarctica*. 3(2). <https://doi.org/10.1017/S0954102010000970>
- Pollard, D., & DeConto, R. M. (2009). Modelling West Antarctic ice sheet growth and collapse through the past five million years. *Nature*, 458(7236), 329–332. <https://doi.org/10.1038/nature07809>
- Pritchard, H. D., & Vaughan, D. G. (2007). Widespread acceleration of tidewater glaciers on the Antarctic Peninsula. *Journal of Geophysical Research: Earth Surface*, 112(F3).
- Pritchard, Hd., Ligtenberg, S. R. M., Fricker, H. A., Vaughan, D. G., van den Broeke, M. R., & Padman, L. (2012). Antarctic ice-sheet loss driven by basal melting of ice shelves. *Nature*, 484(7395), 502–505.
- Pudsey, C. J. (2000). Sedimentation on the continental rise west of the Antarctic Peninsula over the last three glacial cycles. *Marine Geology*, 167(3–4), 313–338. [https://doi.org/10.1016/S0025-3227\(00\)00039-6](https://doi.org/10.1016/S0025-3227(00)00039-6)

- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Quartino, M. L., Deregibus, D., Campana, G. L., Latorre, G. E. J., & Momo, F. R. (2013). Evidence of Macroalgal Colonization on Newly Ice-Free Areas following Glacial Retreat in Potter Cove (South Shetland Islands), Antarctica. *PLoS ONE*, 8(3), 8–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058223>
- Ramos-esplá, A. a, Cárcel, J. a, & Varela, M. (2005). Zoogeographical relationships of the littoral ascidiofauna around the Antarctic Peninsula , in the Scotia Arc and in the Magellan region. *Scientia Marina*, 69, 215–223. <https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69s2215>
- Raupach, M. J., Thatje, S., Dambach, J., Rehm, P., Misof, B., & Leese, F. (2010). Genetic homogeneity and circum-Antarctic distribution of two benthic shrimp species of the Southern Ocean, *Chorismus antarcticus* and *Nematocarcinus lanceopes*. *Marine Biology*, 157(8), 1783–1797.
- Reem, E., Douek, J., Katzir, G., & Rinkevich, B. (2013). Long-term population genetic structure of an invasive urochordate: The ascidian *Botryllus schlosseri*. *Biological Invasions*, 15(1), 225–241. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0281-2>
- Reem, E., Douek, J., Paz, G., Katzir, G., & Rinkevich, B. (2017). Phylogenetics, biogeography and population genetics of the ascidian *Botryllus schlosseri* in the Mediterranean Sea and beyond. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.10.005>
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>
- Reusch, T. B. H. (2014). Climate change in the oceans: Evolutionary versus phenotypically plastic responses of marine animals and plants. *Evolutionary Applications*, 7(1), 104–122. <https://doi.org/10.1111/eva.12109>
- Riesgo, A., Taboada, S., & Avila, C. (2015). Evolutionary patterns in Antarctic marine invertebrates: An update on molecular studies. *Marine Genomics*, 23, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.07.005>
- Rintoul, S., Hughes, C., & Olbers, D. (2001). The Antarctic circumpolar current system. In *In: Ocean Circulation and Climate/G. Siedler, J. Church and J. Gould, eds. New York: Academic Press.* p. (pp.

271–302).

- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, *26*(1), 139–140.
- Rocha, R. M. da, Zanata, T. B., & Moreno, T. R. (2012). Keys for the identification of families and genera of Atlantic shallow water ascidians. *Biota Neotropica*, *12*(1), 269–303.
- Rocker, M. M., Noonan, S., Humphrey, C., Moya, A., Willis, B. L., & Bay, L. K. (2015). Expression of calcification and metabolism-related genes in response to elevated pCO₂ and temperature in the reef-building coral *Acropora millepora*. *Marine Genomics*, *24*, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.08.001>
- Rogers, A. D. (2007). Evolution and Biodiversity of Antarctic Organisms: A Molecular Perspective. *Antarctic Ecosystems: An Extreme Environment in a Changing World*, May, 417–467. <https://doi.org/10.1002/9781444347241.ch14>
- Rogers, A. R., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, *9*(3), 552–569.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539–542.
- Rooney, A. P. (2004). Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in apicomplexans. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(9), 1704–1711. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh178>
- Rückamp, M., Braun, M., Suckro, S., & Blindow, N. (2011). Observed glacial changes on the King George Island ice cap, Antarctica, in the last decade. *Global and Planetary Change*, *79*(1–2), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2011.06.009>
- Ruiz, M. B., Taverna, A., Servetto, N., Sahade, R., & Held, C. (2020). Hidden diversity in Antarctica: Molecular and morphological evidence of two different species within one of the most conspicuous ascidian species. *Ecology and Evolution*, *10*(15), 8127–8143. <https://doi.org/10.1002/ece3.6504>
- Sahade, R., Tatián, M., Kowalke, J., Kühne, S., & Esnal, G. B. (1998). Benthic faunal associations on soft substrates at Potter Cove, King George Island, Antarctica. *Polar Biology*, *19*(2), 85–91.

- Sahade, R., Lagger, C., Momo, F. R., Torre, L., Abele, D., Barnes, D. K. A., & Tarantelli, S. (2015). Climate change, glacier retreat and shifts in an Antarctic benthic ecosystem. *Science Advances*, 1(10), e1500050. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500050>
- Sahade, R., Tarantelli, S., Tatián, M., & Mercuri, G. (2008). Benthic community shifts: a possible linkage to climate change. *Berichte Zur Polar-Und Meeresforsch*, 571, 331–339.
- Sahade, R., Tatián, M., & Esnal, G. (2004). Reproductive ecology of the ascidian *Cnemidocarpa verrucosa* at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series*, 272(Clarke 1988), 131–140. <https://doi.org/10.3354/meps272131>
- Sanford, E., & Kelly, M. W. (2011). Local adaptation in marine invertebrates. *Annual Review of Marine Science*, 3, 509–535. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142756>
- Sato, A., Shimeld, S. M., & Bishop, J. D. D. (2014). Symmetrical reproductive compatibility of two species in the *Ciona intestinalis* (Ascidiacea) species complex, a model for marine genomics and developmental biology. *Zoological Science*, 31(6), 369–374.
- Scheet, P., & Stephens, M. (2006). A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *The American Journal of Human Genetics*, 78(4), 629–644.
- Schloss, I. R., Abele, D., Moreau, S., Demers, S., Bers, A. V., González, O., & Ferreyra, G. A. (2012). Response of phytoplankton dynamics to 19-year (1991-2009) climate trends in Potter Cove (Antarctica). *Journal of Marine Systems*, 92(1), 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2011.10.006>
- Schluter, D. (2000). Ecological Character Displacement in Adaptive Radiation. *The American Naturalist*, 156(4), S4–S16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/303412>
- Schüller, M. (2011). Evidence for a role of bathymetry and emergence in speciation in the genus *Glycera* (Glyceridae, Polychaeta) from the deep Eastern Weddell Sea. *Polar Biology*, 34(4), 549–564. <https://doi.org/10.1007/s00300-010-0913-x>
- Seehausen, O., Koetsier, E., Schneider, M. V., Chapman, L. J., Chapman, C. A., Knight, M. E., Turner, G. F., Van Alphen, J. J. M., & Bills, R. (2003). Nuclear markers reveal unexpected genetic variation and a Congolese-Nilotic origin of the Lake Victoria cichlid species flock. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1511), 129–137. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2153>

- Sepey, M., Manni, M., & Zdobnov, E. M. (2019). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. In *Gene prediction* (pp. 227–245). Springer.
- Servetto, N., de Aranzamendi, M. C., Bettencourt, R., Held, C., Abele, D., Movilla, J., González, G., Bustos, D. M., & Sahade, R. (2021). Molecular mechanisms underlying responses of the Antarctic coral *Malacobelemnion daytoni* to ocean acidification. *Marine Environmental Research*, 170(November 2020), 105430. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105430>
- Shapoval, N. A., & Lukhtanov, V. A. (2015). Intragenomic variations of multicopy ITS2 marker in *Agrodiaetus* blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae). *Comparative Cytogenetics*, 9(4), 483–497. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v9i4.5429>
- Shi, X., Xiang, S., Cao, J., Zhu, H., Yang, B., He, Q., & Ying, M. (2019). Kelch-like proteins: Physiological functions and relationships with diseases. *Pharmacological Research*, 148(August), 104404. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104404>
- Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 311(1152), 617–631.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Simpson, G. G. (1953). *The major features of evolution*.
- Slatkin, M. (1994). Flujo Génico y Estructura de las Poblaciones. *Gene*, 34, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0015-1882\(97\)91503-2](https://doi.org/10.1016/S0015-1882(97)91503-2)
- Slatkin, M., & Hudson, R. R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129(2), 555–562.
- Sluiter, C. P. (1905). Note préliminaire sur les ascidiens holosomates de l'Expédition Antarctique Française commandée par le Dr. Charcot. *Bull Mus Natl Hist Nat Paris*, 11(6), 470–475.
- Smale, D. A., & Barnes, D. K. A. (2008). Likely responses of the Antarctic benthos to climate-related changes in physical disturbance during the 21st century, based primarily on evidence from the West Antarctic Peninsula region. *Ecography*, 31(3), 289–305. <https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2008.05456.x>
- Smith, D. A., Hofmann, E. E., Klinck, J. M., & Lascara, C. M. (1999). Hydrography and circulation of the

- West Antarctic Peninsula Continental Shelf. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 46(6), 925–949. [https://doi.org/10.1016/S0967-0637\(98\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0967-0637(98)00103-4)
- Smith, S., Bernatchez, L., & Beheregaray, L. B. (2013). RNA-seq analysis reveals extensive transcriptional plasticity to temperature stress in a freshwater fish species. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-375>
- Soler-Membrives, A., Linse, K., Miller, K. J., & Arango, C. P. (2017). Genetic signature of last glacial maximum regional refugia in a circum-antarctic sea spider. *Royal Society Open Science*, 4(10). <https://doi.org/10.1098/rsos.170615>
- Sollberger, G., Strittmatter, G. E., Kistowska, M., French, L. E., & Beer, H.-D. (2012). Caspase-4 Is Required for Activation of Inflammasomes. *The Journal of Immunology*, 188(4), 1992 LP – 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101620>
- Somero, G. N. (2020). The cellular stress response and temperature: Function, regulation, and evolution. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 333(6), 379–397.
- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., & Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6(11), 1025–1037.
- Srikanth, K., Kwon, A., Lee, E., & Chung, H. (2017). Characterization of genes and pathways that respond to heat stress in Holstein calves through transcriptome analysis. *Cell Stress and Chaperones*, 29–42. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0739-8>
- Stach, T., & Turbeville, J. M. (2002). Phylogeny of Tunicata inferred from molecular and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25(3), 408–428. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00305-6](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00305-6)
- Stammerjohn, S., Massom, R., Rind, D., & Martinson, D. (2012). Regions of rapid sea ice change: An inter-hemispheric seasonal comparison. *Geophysical Research Letters*, 39(6), 1–8. <https://doi.org/10.1029/2012GL050874>
- Stark, J. S., Roden, N. P., Johnstone, G. J., Milnes, M., Black, J. G., Whiteside, S., Kirkwood, W., Newbery, K., Stark, S., Van Ooijen, E., Tilbrook, B., Peltzer, E. T., Berry, K., & Roberts, D. (2018). Carbonate chemistry of an in-situ free-ocean CO₂ enrichment experiment (antFOCE) in comparison to short term variation in Antarctic coastal waters. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21029-1>

- Stefaniak, L., Lambert, G., Gittenberger, A., Zhang, H., Lin, S., & Whitlatch, R. B. (2009). Genetic conspecificity of the worldwide populations of *Didemnum vexillum* Kott, 2002. *Aquatic Invasions*, 4(1), 87–94. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.1.3>
- Stephens-camacho, N. A., & Rosas-rodríguez, J. A. (2015). *Surviving environmental stress : the role of betaine aldehyde dehydrogenase in marine crustaceans Abstract Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) belongs to the aldehyde dehydrogenases (ALDH) family , an ancestral group of enzymes responsible for aldehy. 66–74.*
- Strader, M. E., Wong, J. M., & Hofmann, G. E. (2020). Ocean acidification promotes broad transcriptomic responses in marine metazoans: A literature survey. *Frontiers in Zoology*, 17(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12983-020-0350-9>
- Strathmann, R. R., Kendall, L. R., & Marsh, A. G. (2006). Embryonic and larval development of a cold adapted Antarctic ascidian. *Polar Biology*, 29(6), 495–501. <https://doi.org/10.1007/s00300-005-0080-7>
- Struck, T. H., Feder, J. L., Bendiksbj, M., Birkeland, S., Cerca, J., Gusarov, V. I., Kistenich, S., Larsson, K. H., Liow, L. H., Nowak, M. D., Stedje, B., Bachmann, L., & Dimitrov, D. (2018). Finding Evolutionary Processes Hidden in Cryptic Species. *Trends in Ecology and Evolution*, 33(3), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.11.007>
- Strugnell, J. M., Pedro, J. B., & Wilson, N. G. (2018). Dating Antarctic ice sheet collapse: Proposing a molecular genetic approach. *Quaternary Science Reviews*, 179, 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2017.11.014>
- Sugimoto, K., & Chiba, H. (2021). The claudin–transcription factor signaling pathway. *Tissue Barriers*, 1908109.
- Sun, S.-C. (2011). Non-canonical NF-κB signaling pathway. *Cell Research*, 21(1), 71–85.
- Sun, Y., Liu, W. Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N., & Zhou, H. F. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35(6), 600–604. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412>
- Supek, F. (2011). BoÅ; njak M, Skunca N, Smuc T. *PLoS One*, 6(7), e21800.
- Syrovets, T., Lunov, O., & Simmet, T. (2012). Plasmin as a proinflammatory cell activator. *Journal of*

- Leukocyte Biology*, 92(3), 509–519. <https://doi.org/10.1189/jlb.0212056>
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.
- Tatian, M., Sahade, R. J., Doucet, M. E., & Esnal, G. B. (1998). Ascidiaceae (Tunicata, Ascidiacea) of Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Antarctic Science*, 10(2), 147–152. <https://doi.org/10.1017/s0954102098000194>
- Tatián, M., & Lager, C. (2010). Ascidiaceae-Ascidiaceae. *Marine Benthic Fauna of Chilean Patagonia. Nature in Focus, Puerto Montt*.
- Tatián, M., Sahade, R. J., Doucet, M. E., & Esnal, G. B. (1998). Ascidiaceae (Tunicata, Ascidiacea) of Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Antarctic Science*, 10(02), 147–152. <https://doi.org/10.1017/S0954102098000194>
- Tatián, M., Antacli, J. C., & Sahade, R. (2005). Ascidiaceae (Tunicata, Ascidiacea): species distribution along the Scotia Arc. *Scientia Marina*, 69(S2), 205–214. <https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69s2205>
- Thatje, S., Hillenbrand, C.-D., Mackensen, A., & Larter, R. (2008). Life hung by a thread: endurance of Antarctic fauna in glacial periods. *Ecology*, 89(3), 682–692.
- Thatje, S., Hillenbrand, C. D., & Larter, R. (2005). On the origin of Antarctic marine benthic community structure. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(10), 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.010>
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882.
- Thornhill, D. J., Mahon, A. R., Norenburg, J. L., & Halanych, K. M. (2008). Open-ocean barriers to dispersal: A test case with the Antarctic Polar Front and the ribbon worm *Parborlasia corrugatus* (Nemertea: Lineidae). *Molecular Ecology*, 17(23), 5104–5117.
- Torre, L., Alurralde, G., Lager, C., Abele, D., Schloss, I. R., & Sahade, R. (2021). Antarctic ascidians under increasing sedimentation: Physiological thresholds and ecosystem hysteresis. *Marine Environmental Research*, 167(December 2020), 105284. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105284>

- Torre, L., Abele, D., Lager, C., Momo, F., & Sahade, R. (2014). When shape matters: Strategies of different Antarctic ascidians morphotypes to deal with sedimentation. *Marine Environmental Research*, 99, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.05.014>
- Torre, L., Servetto, N., Eöry, M. L., Momo, F., Tatián, M., Abele, D., & Sahade, R. (2012). Respiratory responses of three Antarctic ascidians and a sea pen to increased sediment concentrations. *Polar Biology*, 35(11), 1743–1748. <https://doi.org/10.1007/s00300-012-1208-1>
- Trivedi, S. G., Newson, J., Rajakariar, R., Jacques, T. S., Hannon, R., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Colville-Nash, P., & Gilroy, D. W. (2006). Essential role for hematopoietic prostaglandin D2 synthase in the control of delayed type hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 5179–5184. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507175103>
- Tsagkogeorga, G., Turon, X., Hopcroft, R. R., Tilak, M.-K., Feldstein, T., Shenkar, N., Loya, Y., Huchon, D., Douzery, E. J., & Delsuc, F. (2009). An updated 18S rRNA phylogeny of tunicates based on mixture and secondary structure models. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-187>
- Turon, X., Cañete, J. I., Sellanes, J., Rocha, R. M., & López-legentil, S. (2016). Too cold for invasions? Contrasting patterns of native and introduced ascidians in subantarctic and temperate Chile. *Management of Biological Invasions*, 7(1), 77–86. <https://doi.org/10.3391/mbi.2016.7.1.10>
- Turon, X., Cañete, J. I., Sellanes, J., Rocha, R. M., & López-Legentil, S. (2016). Ascidian fauna (Tunicata, Ascidiacea) of subantarctic and temperate regions of Chile Millennium Nucleus for Ecology and Sustainable Management of Oceanic Islands (ESMOI), Chile. *Zootaxa*, 4093(2), 151–180. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4093.2.1>
- Vacquier, V. D., & Swanson, W. J. (2011). Selection in the rapid evolution of gamete recognition proteins in marine invertebrates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), a002931.
- Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P.-H., Keats, J. J., Wang, H., Vignali, D. A. A., Bergsagel, P. L., & Karin, M. (2008). Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- κ B signaling. *Nature Immunology*, 9(12), 1364–1370.
- VanName, W. G. (1945). North and South American ascidians. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 84, 1–462.

- Vaughan, D. G., Marshall, G. J., Connolley, W. M., Parkinson, C., Mulvaney, R., Hodgson, D. A., King, J. C., Pudsey, C. J., & Turner, J. (2003). Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula. *Climatic Change*, 60(3), 243–274.
- Viard, F., Roby, C., Turon, X., Bouchemousse, S., & Bishop, J. (2019). Cryptic diversity and database errors challenge non-indigenous species surveys: an illustration with *Botrylloides* spp. in the English Channel and Mediterranean Sea. *Frontiers in Marine Science*, 6, 615.
- Vidal-Dupiol, J., Zoccola, D., Tambutté, E., Grunau, C., Cosseau, C., Smith, K. M., Freitag, M., Dheilly, N. M., Allemand, D., & Tambutté, S. (2013). Genes Related to Ion-Transport and Energy Production Are Upregulated in Response to CO₂-Driven pH Decrease in Corals: New Insights from Transcriptome Analysis. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058652>
- Wang, Q., Cao, R., Ning, X., You, L., Mu, C., Wang, C., Wei, L., Cong, M., Wu, H., & Zhao, J. (2016). Effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 49, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.025>
- Wang, X., Li, C., Jia, Z., Xu, T., Wang, Y., Sun, M., Han, S., Wang, X., & Qiu, L. (2021). Regulation of apoptosis by Pacific oyster *Crassostrea gigas* reveals acclimation strategy to CO₂ driven acidification. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 217, 112235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112235>
- Weihe, E., Kriews, M., & Abele, D. (2010). Differences in heavy metal concentrations and in the response of the antioxidant system to hypoxia and air exposure in the Antarctic limpet *Nacella concinna*. *Marine Environmental Research*, 69(3), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.09.003>
- Weis, K. (2003). *Regulating Access to the Genome : Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle Macromolecular transport between the cytoplasm and.* 112, 441–451.
- Wen, H., Miao, E. A., & Ting, J. P. (2013). Review Mechanisms of NOD-like Receptor-Associated Inflammasome Activation. *Immunity*, 39(3), 432–441. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.037>
- Wiernes, M. P., Sahade, R., Tatián, M., & Chiappero, M. B. (2013). Genetic variability and differentiation among polymorphic populations of the genus *Synoicum* (Tunicata, Ascidiacea) from the South Shetland Islands. *Polar Biology*, 36(6), 871–883.
- Wilson, N. G., Hunter, R. L., Lockhart, S. J., & Halanych, K. M. (2007). Multiple lineages and absence of panmixia in the “circumpolar” crinoid *Promachocrinus kerguelensis* from the Atlantic sector of

- Antarctica. *Marine Biology*, 152(4), 895–904. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0742-9>
- Xiao, H., Wang, H., Silva, E. A., Thompson, J., Guillou, A., Yates Jr, J. R., Buchon, N., & Franc, N. C. (2015). The Pallbearer E3 ligase promotes actin remodeling via RAC in efferocytosis by degrading the ribosomal protein S6. *Developmental Cell*, 32(1), 19–30.
- Xue, L., Cai, W. J., Takahashi, T., Gao, L., Wanninkhof, R., Wei, M., Li, K., Feng, L., & Yu, W. (2018). Climatic modulation of surface acidification rates through summertime wind forcing in the Southern Ocean. *Nature Communications*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05443-7>
- Yang, C., Gao, Q., Liu, C., Wang, L., Zhou, Z., Gong, C., Zhang, A., Zhang, H., Qiu, L., & Song, L. (2017). The transcriptional response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* against acute heat stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 68, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.016>
- Yang, H., Wei, X., Wang, R., Zeng, L., Yang, Y., Huang, G., Shafique, L., Ma, H., Ruan, Z., Naz, H., Lin, Y., Huang, L., & Chen, T. (2020). Fish and Shellfish Immunology Transcriptomics of *Cherax quadricarinatus* hepatopancreas during infection with Decapod iridescent virus 1 (DIV1). *Fish and Shellfish Immunology*, 98(November 2019), 832–842. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.041>
- Yokobori, S., Kurabayashi, A., Neilan, B. A., Maruyama, T., & Hirose, E. (2006). *Multiple origins of the ascidian-Prochloron symbiosis : Molecular phylogeny of photosymbiotic and non-symbiotic colonial ascidians inferred from 18S rDNA sequences.* 40, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.ympv.2005.11.025>
- Yokobori, S., Ueda, T., Feldmaier-Fuchs, G., Pääbo, S., Ueshima, R., Kondow, A., Nishikawa, K., & Watanabe, K. (1999). Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the ascidian *Halocynthia roretzi* (Chordata, Urochordata). *Genetics*, 153(4), 1851–1862.
- Yokobori, S., Watanabe, Y., & Oshima, T. (2003). Mitochondrial genome of *Ciona savignyi* (Urochordata, Ascidiacea, Enterogona): comparison of gene arrangement and tRNA genes with *Halocynthia roretzi* mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*, 57(5), 574–587.
- Yoo, K., Lee, M. I. N. K., Yoon, H. O. I. L., Lee, Y. I. L., & Kang, C. Y. (2015). *Hydrography of Marian Cove , King George Island , West Antarctica : implications for ice-proximal sedimentation during summer.* 27(2), 185–196. <https://doi.org/10.1017/S095410201400056X>
- Yund, P. O., Collins, C., & Johnson, S. L. (2015). Evidence of a native northwest atlantic COI haplotype clade in the cryptogenic colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Biological Bulletin*, 228(3), 201–216.

<https://doi.org/10.1086/BBLv228n3p201>

- Zachos, J. C., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., & Billups, K. (2001). Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present: Discovery Service para UNAM. *Science*, *292*(5517), 686–693. <https://doi.org/10.1126/science.1059412>
- Zachos, J. C., Wara, M. W., Bohaty, S., Delaney, M. L., Petrizzo, M. R., Brill, A., Bralower, T. J., & Premoli-Silva, I. (2003). A transient rise in tropical sea surface temperature during the Paleocene-Eocene thermal maximum. *Science*, *302*(5650), 1551–1554.
- Zarnegar, B. J., Wang, Y., Mahoney, D. J., Dempsey, P. W., Cheung, H. H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W., & Mak, T. W. (2008). Noncanonical NF- κ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nature Immunology*, *9*(12), 1371–1378.
- Zehntner, S. P., Bourbonnière, L., Moore, C. S., Morris, S. J., Methot, D., St. Jean, M., Lacasse, E., Hebb, A. L. O., Robertson, G. S., Durkin, J., Gillard, J. W., & Owens, T. (2007). X-linked Inhibitor of Apoptosis Regulates T Cell Effector Function. *The Journal of Immunology*, *179*(11), 7553–7560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7553>
- Zhang, T., Yan, Z., Zheng, X., Fan, J., Wang, S., Wei, Y., Yang, L., Wang, P., & Guo, S. (2019). Transcriptome analysis of response mechanism to ammonia stress in Asian clam (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology*, *214*(June), 105235. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105235>
- Zhou, Y., Duvaux, L., Ren, G., Zhang, L., Savolainen, O., & Liu, J. (2017). Importance of incomplete lineage sorting and introgression in the origin of shared genetic variation between two closely related pines with overlapping distributions. *Heredity*, *118*(3), 211–220. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.72>
- Zigler, K. S., McCartney, M. A., Levitan, D. R., & Lessios, H. A. (2005). Sea urchin binding divergence predicts gamete compatibility. *Evolution*, *59*(11), 2399–2404.

