



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía

**Efecto Transgeneracional de la acidificación del océano
en larvas de *Mytilus chilensis* y su respuesta fisiológica a
estresores ambientales: temperatura y cadmio disuelto.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en
Oceanografía

.....
ROSARIO MARÍA MERCEDES DÍAZ CAMPOS
CONCEPCIÓN-CHILE
2018

Profesor Guía: Cristian Vargas Gálvez
Profesor co-Guía: Fabián Tapia Jorquera

Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción



“A Ester”

AGRADECIMIENTOS

Primero, agradecer a mis familias, nuclear y extendida, quienes de todas las formas posibles han contribuido en la realización de este estudio.

A mi profesor guía Dr. Cristian Vargas y el equipo del laboratorio LAFE, quienes me recibieron como una amiga más durante mi periodo de permanencia en el postgrado y así mismo, me impulsaron a terminar el manuscrito. Al comité evaluador, Dr. Fabián Tapia, Dr. Marco Lardies y Dr. Eduardo Tarifeño, por su contribución crítica y apoyo.

A la Universidad de Concepción y Programa de Postgrado den Oceanografía, por aceptarme como estudiante y acogerme con la Beca de la Dirección de Postgrado Universidad de Concepción. A la Estación de Biología Marina y su personal, por entregarme las facilidades y ayuda durante el desarrollo experimental de mí trabajo.

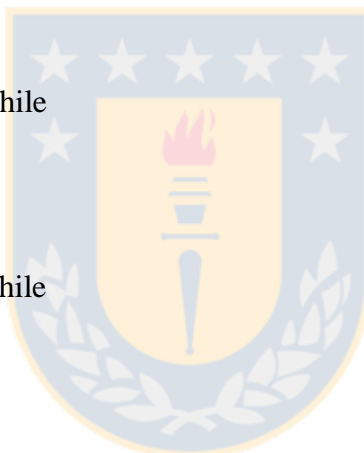
Este estudio fue financiado por el Núcleo Milenio MUSELS “Center for the Study of Multiple-drivers on Marine Socio-Ecological Systems, MINECON NC120086 (Beca de estudios), y el Instituto Milenio de Oceanografía IMO, MINECON IC120019.



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado

La Tesis de “*Magister en ciencias con mención en Oceanografía*” titulada “*Efecto Transgeneracional de la acidificación del océano en larvas de *Mytilus chilensis* y su respuesta fisiológica a estresores ambientales: temperatura y cadmio disuelto*” de la Srta. *Rosario María Mercedes Díaz Campos* y realizada en la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográfica, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dr. Cristian Vargas.
Profesor Guía
Universidad de Concepción, Chile



Dr. Fabián Tapia.
Profesor co-Guía
Universidad de Concepción, Chile

Dr. Eduardo Tarifeño.
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción, Chile

Dr. Marco A. Lardies
Evaluador Externo
Universidad Adolfo Ibáñez, Chile.

Dr. Fabián Tapia.
Director
Programa Magíster en Oceanografía
Universidad de Concepción, Chile

Currículum Vitae

Rosario María Mercedes Díaz Campos

Ingeniero en Acuicultura

Nacida el 5 de febrero de 1985, en Santiago, Chile.

2014-2018 Magíster en Ciencias mención Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile

2003-2011 Ingeniero en Acuicultura, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile.

2003-2007 Grado de Licenciado en Acuicultura, Ingeniero en Acuicultura, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile.

PUBLICACIONES

Álvarez, G., Uribe, E., **Díaz, R.**, Braun, M., Mariño, C. & Blanco, J. 2011. Bloom of the Yessotoxin producing dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae) in Northern Chile. *Journal of Sea Research*, 65(4), 427-434.

AREA DE INVESTIGACIÓN

Principal: Oceanografía Biológica

Secundaria: Fisiología animal

EXPERIENCIA DOCENTE

Ayudantía Asignatura de Sistemas Pelágicos. Carrera de Biología Marina, Universidad de Concepción, Chile, años 2015.

Ayudantía Asignatura de Sistemas Pelágicos. Carrera de Biología Marina, Universidad de Concepción, Chile, años 2015.

Ayudantía Asignatura de Fundamentos de la investigación científica. Carrera de Biología Marina, Universidad de Concepción, Chile, año 2014.

EXPERIENCIA PROFESIONAL

2014-2017. Técnico Instituto Milenio de Oceanografía (IMO).

CURSOS Y PASANTIAS

2014. Curso internacional “Latin American School of Ocean Acidification (LAOCA)”, Universidad de Concepción, Chile.

BECAS

2014. Beca de la Dirección de Postgrado Universidad de Concepción, Chile.

2015. Beca “Center for the study of multiple-drivers on marine socio-ecological systems” (MUSELS).

EXTENSIÓN Y DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

2014-2015. Monitora en talleres del Océano, Campamentos Científicos ChileVa!-Explora. Pinto y Tomé, Chile. CICAT e IMO.

2014-2017. Expositor programa “1000 Científicos, 1000 aulas”. Explora- Conicyt.



Tabla de Contenido

Índice de Figuras.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis.....	9
1.2. Objetivo específicos.....	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.1. Obtención de organismos.....	11
2.2. Sistema de manipulación de $p\text{CO}_2$ en agua de mar.....	12
2.3. Diseño experimental.....	13
2.4. Bioensayo: Tasa de Ingestión.....	20
2.5. Análisis de datos.....	21
3. RESULTADOS.....	23
4. DISCUSIÓN GENERAL.....	53
4.1. Efecto de la concentración de cadmio disuelto en la tasa de ingestión de alimento en larvas de <i>M. chilensis</i> en escenarios de AO.....	53
4.2. Efecto transgeneracional de $p\text{CO}_2$ y estresores múltiples.....	55
4.3. Efecto materno y las implicancias en AO.....	61
5. CONCLUSIONES.....	63
6. REFERENCIAS.....	65

Índice de Figuras

Figura 2: Esquema del diseño experimental utilizado para determinar la respuesta alimentaria de larvas de 21 días cultivadas en dos niveles de $p\text{CO}_2$ (claro: 550 μatm ; oscuro: 1200 μatm) mediante un bioensayo de 24h con concentraciones nominales de cadmio disuelto (Cd^{+2} : 0- 0,01-1 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). 16

Figura 3. Esquema del diseño experimental utilizado para investigar las consecuencias combinadas del efecto transgeneracional y estresores múltiples en larvas de *M. chilensis*: $p\text{CO}_2$ (gris: 550 μatm ; oscuro: 1200 μatm), temperatura (11-15 °C) y cadmio disuelto (Cd_0 : 0 $\mu\text{g L}^{-1}$ y Cd_{10} : 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). a) Acondicionamiento de los reproductores en dos niveles de $p\text{CO}_2$. b) Esquema del cultivo larval con estresores múltiples..... 18



RESUMEN

El efecto de la acidificación del océano (AO) impulsado por el CO₂ en la biota marina se ha estudiado mayormente en una sola etapa del ciclo de vida. Sin embargo, la respuesta acumulativa y a nivel poblacional ante este estresor de carácter global, puede estar sesgada debido a los efectos transgeneracionales y sus impactos sobre la plasticidad fisiológica. En este estudio, se expusieron individuos adultos del bivalvo mitílido *Mytilus chilensis* durante el periodo de gametogénesis en dos niveles de *p*CO₂ (550 y 1200 µatm) por 16 semanas, con el objetivo de comprender si la exposición prolongada de individuos reproductores a escenarios futuros de AO (bajo pH/alto *p*CO₂), podría afectar el desempeño de su progenie, los cuales a la vez fueron cultivados bajo estresores múltiples (*p*CO₂, temperatura y cadmio disuelto). Nuestros resultados indican una dependencia entre el nivel de *p*CO₂ de los reproductores (es decir, el efecto materno) y el desempeño de las etapas larvales en términos de crecimiento y tasas fisiológicas, siendo la temperatura el factor determinante. Mientras que los efectos principales de *p*CO₂ y cadmio se observaron en el crecimiento larval y las tasas de ingestión, respectivamente. La exposición combinada a estos estresores (*p*CO₂, temperatura y cadmio disuelto) tuvo efectos antagónicos. Junto con lo anterior, los resultados revelan una supresión de la actividad de alimentación en reproductores posteriores al desove en condiciones de *p*CO₂ elevadas. Sin embargo, esta observación no fue reflejada en el peso final de reproductores y del diámetro de los ovocitos. Debido a la importancia ecológica y socioeconómica de las especies de mitílidos en todo el mundo, las implicaciones potenciales de los efectos maternos para la fisiología,

la supervivencia y el reclutamiento de larvas bajo estresores combinados de cambio global requieren mayor investigación.

ABSTRACT

The effect of CO₂-driven ocean acidification (OA) on marine biota has been extensively studied mostly on a single stage of the life cycle. However, the cumulative and population-level response to this global stressor may be biased due to transgenerational effects and their impacts on physiological plasticity. In this study, we exposed adult mussels *Mytilus chilensis* undergoing gametogenesis to two *p*CO₂ levels (550 and 1200 µatm) for 16 weeks, aiming to understand if prolonged exposure of reproductive individuals to OA can affect the performance of their offspring, which, in turn, were reared under multiple stressors (*p*CO₂, temperature, and dissolved cadmium). Our results indicate dependence between the level of *p*CO₂ of the broodstock (i.e. maternal effect) and the performance of larval stages in terms of growth and physiological rates, as a single effect of temperature. While main effects of *p*CO₂ and cadmium were observed for larval growth and ingestion rates, respectively; the combined exposure to stressors had antagonistic effects. Moreover, we found a suppression of feeding activity in post-spawning broodstock upon high *p*CO₂ conditions. Nevertheless, this observation was not reflected in the final weight of the broodstock and oocyte diameter. Due to the ecological and socioeconomic importance of mussels species around the globe, the potential implications of maternal effects for the physiology, survival, and recruitment of larvae under combined global-change stressors warrant further investigation.

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que el crecimiento de la economía mundial ha sido responsable de casi el ~65% de la aceleración en el incremento del dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera con concentraciones sin precedentes en los últimos 850.000 años y una tasa de emisiones atmosféricas 30 veces mayor a las registradas en los últimos 55 millones de años (Kump *et al.*, 2009). El aumento en las emisiones de CO₂ se hace evidente ante la comparación del registro estimado para época pre-industrial (280 ppm; Feely *et al.*, 2009; Tans, 2009) y los actuales (406,75 pm para Diciembre de 2017; Mauna Loa Observatory: www.esrl.noaa.gov).

En los últimos años, el aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera ha significado un incremento en cerca del 50% en la absorción de éste por los océanos (Sabine *et al.*, 2004), provocando una disminución en el pH y del ion carbonato (CO₃²⁻). Este proceso es conocido como “Acidificación del Océano” (AO) (Caldeira & Wickett, 2003; Feely *et al.*, 2009) y se ha reportado como un potencial problema para los organismos calcificadores, debido a que limita la producción de carbonato de calcio biogénico necesario para la formación de las conchas, promoviendo además la disolución de éstas (*e.g.* Langdon *et al.*, 2000; Caldeira & Wickett, 2003; Langdon & Atkinson, 2005; Kleypas *et al.*, 2006; Hiebenthal *et al.*, 2013).

En la última década, la mayor parte de los esfuerzos de investigación en la AO se han centrado en sus efectos en la biota marina (e.g. Gattuso & Hansson, 2011; Parker *et al.*, 2013), señalando que los estadios tempranos (i.e. embriones y larvas) de moluscos serían más sensibles a la AO que los estados juveniles o adultos, debido a que alcanzarían menores tamaños y en un tiempo más prolongado, junto con una disminución en las tasas de crecimiento; aumentando también su mortalidad e incidencia de malformaciones en las conchas (e.g. Kurihara, 2008; Gazeau *et al.*, 2010; Waldbusser *et al.*, 2014).

La mayoría de los estudios enfocados en evaluar la respuesta de los organismos frente a escenarios potenciales de AO se ha centrado en una etapa del ciclo de vida de estos, siendo los primeros estadios de desarrollo los menos estudiados en moluscos (Parker *et al.*, 2013). Generalmente, en estos estudios se han considerado ensayos de tipo agudo, sin considerar la AO como un proceso crónico que afectará a los organismos a lo largo de todo su ciclo de vida (Welch & Munday, 2017) y puede modificar los rasgos fenotípicos de su descendencia (Mousseau & Fox, 1998).

Este mecanismo hereditario (no genético) se denomina plasticidad transgeneracional, y corresponde al proceso adaptativo de rápida respuesta que es transferido desde progenitores expuestos a condiciones particulares a la progenie (Bonduriansky *et al.*, 2012; Salinas *et*

al., 2013), el cual es especialmente desarrollado cuando los reproductores se encuentran en el proceso de gametogénesis (Hamdoun & Epel, 2007; Byrne, 2011; Munday, 2014).

Los reportes recientes indican una respuesta positiva del efecto transgeneracional en moluscos sometidos a escenarios de acidificación/alto $p\text{CO}_2$, como por ejemplo, un mayor crecimiento en larvas de la almeja *Ruditapes philippinarum* (Zhao *et al.*, 2017) y ostras *Saccostrea glomerata* (Parker *et al.*, 2012), la cual fue mantenida en cultivo por una generación más obteniendo los mismos resultados y una mayor capacidad para modular el pH extracelular en los escenarios de AO con respecto al control (Parker *et al.*, 2015). En el mitílido *Mytilus edulis* se registró un aumento en el rendimiento de calcificación en estadios larvales cultivadas en altos niveles de $p\text{CO}_2$ (Thomsen *et al.*, 2017), y como consecuencia adaptativa, Fitzer *et al.* (2014) identificaron un cambio en la ultraestructura de la concha con la precipitación de calcita debido a que es la forma más resistente de CO_3^{2-} .

La evidencia de la plasticidad transgeneracional en escenarios de AO bajo estresores múltiples en moluscos es aún más escasa. Los estudios que incluyen factores adicionales a la exposición parental a AO, como limitación alimentaria (Griffith & Gobler 2017, Parker *et al.*, 2017), algas nocivas (Griffith & Gobler 2017) y estrés por salinidad (Parker *et al.*, 2017), obtuvieron larvas más sensibles en almeja *Mercenaria mercenaria*, pectínido

Argopecten irradians (Griffith & Gobler 2017) y ostra *Saccostrea glomerata* (Parker *et al.*, 2017).

El océano es un ambiente dinámico donde interaccionan múltiples factores bióticos y abióticos (Harley *et al.*, 2006), donde la respuesta de organismos ante la combinación de factores podría variar entre aditiva, antagónica o sinérgica (Todgham & Stillman, 2013). En escenarios de AO, estos tipos de interacciones convencionales se han estudiado principalmente con temperatura (*e.g.* Vihtakari *et al.*, 2013, Gazeau *et al.*, 2014; Kroeker *et al.*, 2014), mientras que otras combinaciones han sido menos estudiadas (Przeslawski *et al.*, 2015, Gunderson *et al.*, 2016), como es el caso de los metales traza (Millero, 2009; Boyd, 2011; Ivanina *et al.*, 2014; Przeslawski *et al.*, 2015).

Se ha descrito que la solubilidad, absorción, toxicidad y estado redox de los metales están relacionadas con la disminución de la concentración de los iones OH^- y CO_3^{2-} , de esta manera, la AO afectaría a los metales que forman especies hidrolizadas (*e.g.* Fe (III)) y carbonatadas (*e.g.* Cu(II)), mientras que los metales que se encuentran en forma libre, de transición o en especies cloradas como el cadmio (Cd^{2+}) no presentarían cambios con las variaciones de pH (Millero, 2009)

El cadmio (Cd^{2+}) es un metal no esencial que se encuentra formando fuertes complejos con el ion cloruro (CdCl^+). Su distribución en la columna de agua es de tipo nutriente, siendo incorporado por los organismos en superficie, y luego devuelto en profundidad como resultado de la oxidación del material biogénico durante el proceso de sedimentación (Bruland, 1980). Las concentraciones de cadmio en océano abierto se encuentran entre 0,001 y 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Neff, 2002), pudiendo presentar concentraciones mayores en ambientes costeros y estuarinos (Clark, 1997) debido a que sus principales fuentes son el transporte por surgencia costera (Cotté-Krief *et al.*, 2000; Takesue *et al.*, 2004) y el material litogénico proveniente de aportes fluviales (i.e. descargas de ríos, y escorrentía superficial; Valdés *et al.*, 2006), además del aporte antropogénico como por ejemplo la industrialización de zinc, plásticos, pinturas y uso de fertilizantes agrícolas (ATSDR, 1999).

Estudios previos indican que moluscos sometidos a concentraciones sub-letales de cadmio disminuyen las tasas de crecimiento (Sunila & Lindström, 1985; Ringwood, 1991; Wang *et al.*, 2009), desarrollan malformaciones en la concha (Sunila & Lindström, 1985) y disminuyen su peso (Marigómez *et al.*, 1990; Ringwood., 1991), afectando también la composición lipídica de la glándula digestiva y de ácidos grasos (Fokina *et al.*, 2013). Esto se podría relacionar al cierre de las valvas en presencia del metal para evitar su ingreso al

organismo (Redpath & Davenport, 1988; Altamirano-Chovar *et al.*, 2006) y a la disminución de la tasa de filtración y tasa de respiración (Lin *et al.*, 1992).

Investigaciones en la interacción entre cadmio y la AO en organismos marinos indican una respuesta de toxicidad antagónica en copépodos (Pascal *et al.*, 2010) y en embriones de sepia, donde se determinó una disminución en la acumulación de cadmio con el aumento del $p\text{CO}_2$ (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009). Este resultado es similar a lo observado por Ivaninna *et al.* (2013), quienes registraron una menor acumulación en el tejido del manto en almejas y ostras, mientras que Götze *et al.* (2014) observaron una mayor acumulación en branquias. Sin embargo, la AO potenciaría los efectos negativos del cadmio en el sistema inmune de bivalvos, afectando la fagocitación y capacidad de adhesión de los hemocitos (Ivanina *et al.*, 2014), los cuales intervienen en la reparación de la concha de los moluscos (Cheng, 1996; Ahearn *et al.*, 2004). Estos resultados y la competencia entre el Cd^{2+} y Ca^{2+} sugieren que la exposición de estadios tempranos de desarrollo a altas concentraciones de cadmio puede afectar el proceso de mineralización de la concha (Machado & Lopes-Lima, 2011), debido a la inhibición de la precipitación de calcita (Kitano & Hood, 1962), lo cual significaría una reducción en el crecimiento larval y prolongación de la vida pelágica de las larvas (Machado & Lopes-Lima, 2011).

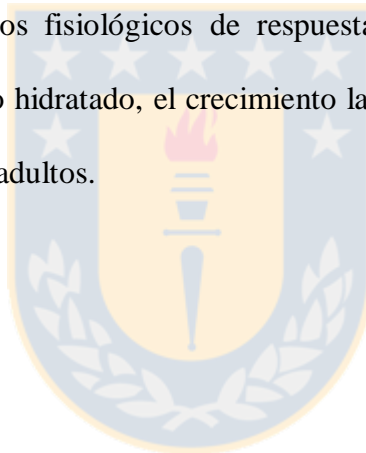
En el contexto del cambio global, la AO y la temperatura pueden modular la sensibilidad a la intoxicación por metales traza (Sokolova & Lannig, 2008; Nikinmaa, 2013; Ivanina & Sokolova, 2015). Se han informado efectos sinérgicos entre la temperatura, la acidificación y el cadmio en el ostión *Adamussium colbecki* (Benedetti *et al.*, 2016) y el mitílido *Mytilus galloprovincialis* (Nardi *et al.*, 2017).

A lo largo de la costa de Chile se han reportado concentraciones de cadmio relativamente altas ($> 1 \mu\text{g L}^{-1}$). Los antecedentes para aguas costeras registran concentraciones de cadmio sobre los $2 \mu\text{g L}^{-1}$ en Bahía Concepción (Carrera *et al.*, 1993) y en Bahía de Puerto Montt (Alarcón, 2003), este último atribuido a aportes naturales (Hervé-Fernández *et al.*, 2010), las cuales finalmente se pueden ver reflejadas en las concentraciones de metal en los tejidos de los organismos.

La industria acuícola del bivalvo mitílido *Mytilus chilensis* (“chorito”) en el país, es una de las principales productoras en el mundo (FAO, 2014; Ferreira *et al.*, 2014) representando el 12,1% del mercado mundial (FAO, 2011). Sin embargo, las concentraciones de cadmio en el producto representan un importante problema para las exportaciones, debido a que regularmente exceden el estándar europeo (Figueroa, 2008; SERNAPESCA, 2015) y provocan un eventual rechazo a las exportaciones (CODEX, 2009) ya que los principales destinos de exportación (mercado norteamericano y europeo) se encuentran estrictamente

regulados con una normativa que limita los niveles de concentración de metales en los organismos (Vidal, 2009; Hervé-Fernández *et al.*, 2010).

Considerando que las variaciones en el desarrollo larval tienen implicaciones ecológicas significativas, a través de sus efectos sobre el reclutamiento de moluscos (Calabrese *et al.*, 1977; Machado & López-Lima, 2011), el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto transgeneracional en escenarios de AO en *Mytilus chilensis* y la posterior respuesta de la progenie expuesta a estresores adicionales, como temperatura y una concentración sub-letal de cadmio disuelto. Los rasgos fisiológicos de respuesta considerados en este estudio fueron: el diámetro del ovocito hidratado, el crecimiento larval y la tasa de ingestión tanto en larvas como en ejemplares adultos.



1.1. Hipótesis

En el presente estudio se proponen las siguientes hipótesis de trabajo:

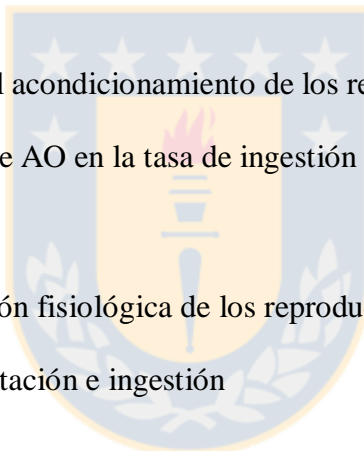
H1: El acondicionamiento de los reproductores de *Mytilus chilensis* en bajo pH/alto $p\text{CO}_2$ condiciona el desempeño de la progenie en términos fisiológicos de crecimiento y respuesta alimentaria.

H2: Las larvas provenientes de reproductores acondicionados en escenarios de AO, presentaran un mejor desempeño en presencia de estresores múltiples (temperatura, pH y Cadmio).



1.2. Objetivo específicos

- Determinar la concentración de cadmio disuelto que tiene efecto en la tasa de ingestión de larvas de *M. chilensis*.
- Evaluar el tamaño de los ovocitos obtenidos de los desoves de los reproductores acondicionados en diferentes niveles de $p\text{CO}_2$.
- Determinar el efecto del acondicionamiento de los reproductores en diferentes escenarios propuestos de AO en la talla de las larvas cultivada bajo estresores múltiples.
- Determinar el efecto del acondicionamiento de los reproductores en diferentes escenarios propuestos de AO en la tasa de ingestión de la progenie cultivada bajo estresores múltiples.
- Evaluar el la recuperación fisiológica de los reproductores post-desove mediante experimentos de alimentación e ingestión



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de organismos.

Se obtuvieron ejemplares adultos de *Mytilus chilensis* (67 ± 3 mm de longitud de concha) de un centro de cultivo suspendido (5 m de profundidad) ubicado en Vilupulli, Chiloé, sur de Chile ($42^{\circ}35'35''\text{S}$; $73^{\circ}47'18''\text{W}$) en el mes de noviembre de 2015 (Figura 1). Los reproductores fueron transportados en cajas térmicas y a baja temperatura ($2\text{ }^{\circ}\text{C}$) al laboratorio experimental en la Estación de Investigación de Biología Marina de la Universidad de Concepción en Dichato. Los organismos fueron aclimatados durante 3 semanas en estanques (30×40 cms) con agua de mar filtrada ($0,1\text{ }\mu\text{m} + \text{UV}$, $\text{pH} = 8,1 \pm 0,01$, temperatura = $13 \pm 0,01\text{ }^{\circ}\text{C}$ y salinidad = ~ 31 psu), la cual fue renovada cada 2 días, y con aireación constante. Durante este periodo de aclimatación, los organismos fueron alimentados diariamente con una suspensión concentrada de fitoplancton ($\sim 40 \times 10^6$ células mL^{-1} , Phytogold-S).

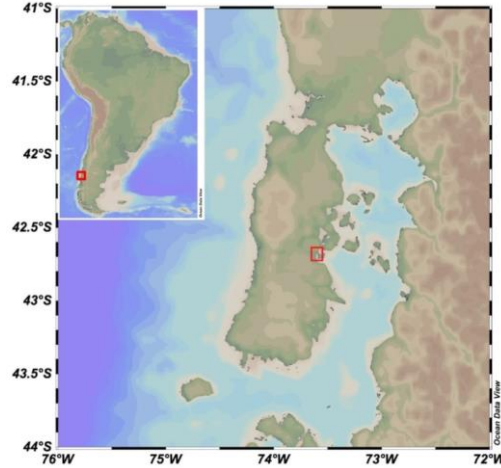


Figura 1: Ubicación geográfica del cultivo comercial de *Mytilus chilensis* donde se obtuvieron los organismos experimentales (43°08'S; 73°44' O), Vilupulli, Chiloé.

2.2. Sistema de manipulación de $p\text{CO}_2$ en agua de mar

Para obtener los dos niveles diferentes de $p\text{CO}_2$ de agua de mar, se mezcló aire seco con CO_2 puro en cada concentración objetivo utilizando controladores de flujo másico (MFC) tanto para el aire como para el CO_2 . Para cada tanque experimental, la temperatura, el pH y la salinidad se controlaron diariamente, mientras que la alcalinidad total se midió cada 10 días. El pH se midió potenciométricamente en una celda de 25 mL a 25,0 °C con un medidor de pH Metrohm 713 (resistencia de entrada > 1013Ohm, sensibilidad de 0,1 mV y resolución nominal de 0,001 unidades de pH) y un electrodo de Ag/AgCl de doble unión combinado de vidrio (modelo Metrohm 6.0219.100) calibrado con 8.089 tampón Tris 25

°C. Los valores de pH se informan en la escala total de iones de hidrógeno. La temperatura y la salinidad se midieron usando un medidor de salinidad portátil Oakton SALT 6 + con sonda. La alcalinidad total se midió usando el método de Haraldsson *et al.* (1997). El pH, la alcalinidad total, fosfato, silicato disuelto y los datos hidrográficos se usaron para calcular los parámetros restantes del sistema de carbonato y la etapa de saturación de Omega Aragonita usando el software CO2SYS con las constantes de solubilidad de Mehrbach reajustadas por Dickson & Millero (1987).

2.3. Diseño experimental

El trabajo experimental consideró la realización de dos experimentos, lo cuales están clasificados como experimento preliminar (experimento 1) y experimento transgeneracional de $p\text{CO}_2$ con estresores múltiples (experimento 2).

El experimento preliminar corresponde a un bioensayo de corta duración (24 hr) para evaluar la respuesta alimentaria (tasa de ingestión) en larvas de 21 días, cultivadas en 2 escenarios de AO (actual y futuro), ante la presencia de diferentes concentraciones de cadmio disuelto. Este resultado fue usado para determinar la concentración de este metal traza a utilizar en el posterior experimento 2, donde se evaluó el efecto transgeneracional del $p\text{CO}_2$ y respuesta a estresores múltiples en la progenie larval.

Los escenarios de AO propuestos en este estudio corresponden a: (i) condiciones actuales en el área de cultivo en Chiloé (Control: 550 μatm , $n = 3$) y (ii) escenario pronosticado para el año 2100 (1200 μatm , $n = 3$; RCP8.5; Meinshausen *et al.*, 2011). Las condiciones actuales se establecieron en base del análisis de series de tiempo de datos colectados por la boya oceanográfica ubicada en el mismo centro de cultivo perteneciente al núcleo milenio MUSELS (*Center for the Study of Multiple Drivers on Marine Socio-Ecological Systems*; datos disponibles en www.ceazamet.cl)

2.3.1. Ensayo preliminar de toxicidad aguda de cadmio disuelto y su interacción con AO en larvas de *M. chilensis* (experimento 1)

Los reproductores, previamente aclimatados en laboratorio (véase Diseño experimental), fueron inducidos a desove mediante de la técnica de choque térmico (Bayne, 1976). En este procedimiento, los reproductores fueron alternando entre bandejas de 15 L a 15 y 19 °C cada 30 min aprox. hasta que iniciara la expulsión de gametos, momento en el cual se trasladaron a contenedores individuales de 5 L por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, los gametos fueron tamizados para luego realizar la fertilización y obtención de larvas siguiendo las indicaciones de Ruiz *et al.* (2008) y Toro *et al.* (2012).

Los cultivos larvales fueron realizados en los dos escenarios de AO propuestos (550 y 1200 μatm) (Figura 2). El cultivo se inició con una densidad inicial de 10 larvas mL^{-1} en frascos

de borosilicato lavados con ácido de 1 L (Duran Schott®) y los recambios de agua de mar se realizaron cada dos días utilizando agua de mar (0,1 $\mu\text{m} + \text{UV}$) previamente equilibrada a los dos niveles de $p\text{CO}_2$ de estudio. La temperatura fue controlada mediante un baño termorregulado (15 °C) y las larvas fueron alimentadas diariamente con la microalga viva cultivada en laboratorio, *Isochrysis galbana*, en razón de $\sim 3,0 \text{ g de Chl-a L}^{-1}$ ($\sim 400,000 \text{ cel mL}^{-1}$).

Al cabo de 21 días de cultivo, se realizó un bioensayo de 24 horas para evaluar las tasas de alimentación de larvas expuestas a concentraciones nominales de cadmio disuelto: ~ 0 (sin cadmio adicional), 0,01, 1 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estas concentraciones se basaron en los rangos de concentraciones naturales observadas en ambientes costeros a lo largo de la costa chilena (e.g. Alarcón, 2003; Peña, 2006; Ahumada *et al.*, 2011) y a un escenario de contaminación realista (Neff, 2002). Las concentraciones de cadmio disuelto serán agregadas mediante diluciones sucesivas de sal cloruro de cadmio (Hwang *et al.*, 1995) al agua de mar previamente equilibrada a los niveles de $p\text{CO}_2$ propuestos.

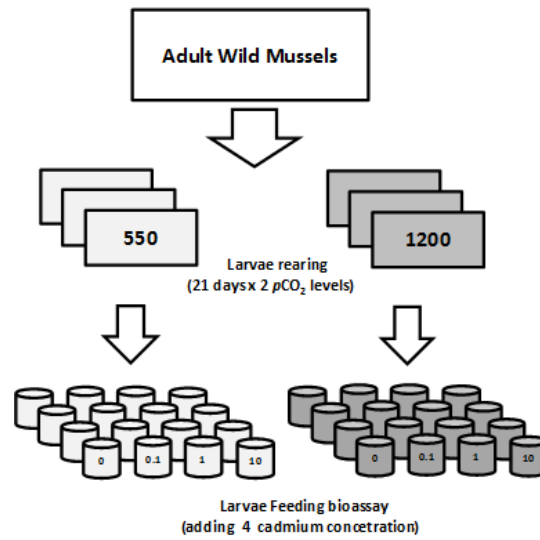


Figura 2: Esquema del diseño experimental utilizado para determinar la respuesta alimentaria de larvas de 21 días cultivadas en dos niveles de $p\text{CO}_2$ (claro: 550 μatm ; oscuro: 1200 μatm) mediante un bioensayo de 24h con concentraciones nominales de cadmio disuelto (Cd^{+2} : 0- 0,01-1 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Fuente: Elaboración Propia.

2.3.2. Efecto transgeneracional de $p\text{CO}_2$ y estresores múltiples (experimento 2)

Los reproductores, previamente desovados en el experimento 1, fueron mantenidos durante una semana en condiciones de aclimatación (véase Diseño experimental) para luego ser separados en dos grupos correspondientes a los dos niveles de $p\text{CO}_2$ propuestos (550 y 1200 μatm). Este periodo de acondicionamiento bajo distintos escenarios de AO fueron realizados en ocho tanques de 25 L con cinco reproductores cada uno (densidad media = 0,2 ind L^{-1}). La temperatura de incubación fue aumentada a 15 °C para promover el desarrollo gonadal (Lagos *et al.*, 2012a).

Al cabo de 16 semanas de acondicionamiento se realizó siguiendo las directrices expuestas en el experimento 1. Las larvas obtenidas se cultivaron siguiendo un diseño factorial cruzado completo (2 x 2 x 2; Figura 3), donde los factores considerados fueron las dos concentraciones de $p\text{CO}_2$ (550 y 1200 μatm) y adicionalmente se agregaron dos concentraciones nominales de Cadmio disuelto (~0- 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, experimento 1) y dos niveles de temperatura (11 - 15 °C), las cuales representan el rango ambiental de primavera-verano en el sitio de cultivo.

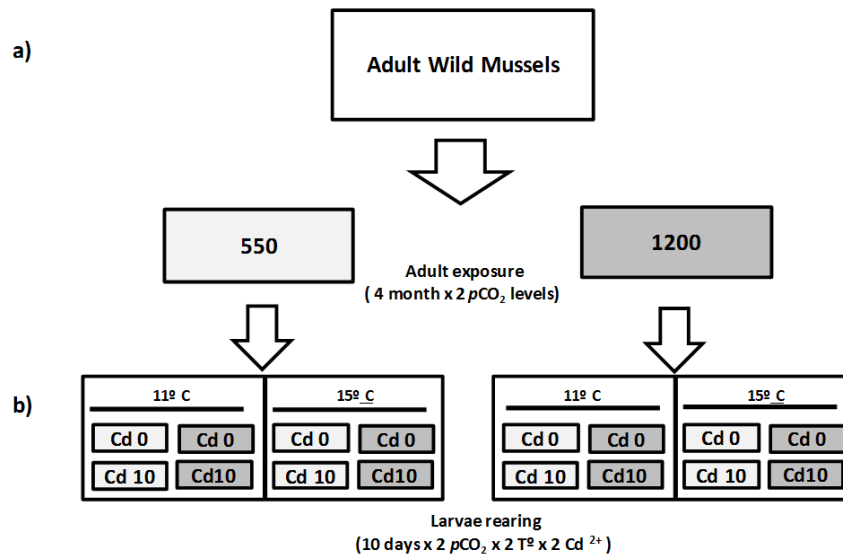


Figura 3. Esquema del diseño experimental utilizado para investigar las consecuencias combinadas del efecto transgeneracional y estresores múltiples en larvas de *M. chilensis*: $p\text{CO}_2$ (gris: 550 μatm ; oscuro: 1200 μatm), temperatura (11-15 °C) y cadmio disuelto (Cd0: 0 $\mu\text{g L}^{-1}$ y Cd10: 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). a) Acondicionamiento de los reproductores en dos niveles de $p\text{CO}_2$. b) Esquema del cultivo larval con estresores múltiples. Fuente: Elaboración Propia.

La fecundación y cultivo larval fueron realizados en botellas de borosilicato de 1 L (tres réplicas por grupo, densidad inicial = 10 ind mL⁻¹), con recambio total de agua cada dos días y alimentación diaria de ~ 3,0 µg Chl-a L⁻¹ (~ 400.000 cel mL⁻¹) con *I. galbana*.

Se colectaron submuestras de los ovocitos hidratados de cada tratamiento con *pCO*₂ y fueron conservadas en una solución de formalina tamponada con fosfato al 3% hasta ser medidas (µm diámetro) bajo microscopio.

El tamaño de las lavas fue obtenido midiendo la longitud de la concha (L) (Ramorino & Campos, 1979; Ruiz *et al.*, 2008) de las submuestras obtenidas los días 4, 7 y 10 de cultivo, las cuales fueron fijadas en alcohol al 70 % hasta el momento de análisis. Adicionalmente, los días 4 y 10 de cultivo se realizaron bioensayos de alimentación de larvas.

Finalmente, los reproductores desovados fueron regresados a sus estanques de cultivo y fueron mantenidos en las mismas condiciones de *pCO*₂ hasta el final de los experimentos con larvas (2 semanas), con la finalidad de comparar su recuperación post-desove en cuanto a peso total (g), el tejido metabólicamente activo (g) y la tasa de ingestión.

2.4. Bioensayo: Tasa de Ingestión

Las tasas de ingestión (IR) se midieron como la disminución de la concentración de Chl-a en un sistema estático según la metodología de Coughlan (1969). Los cálculos de la tasa de ingestión fueron realizados de acuerdo a la metodología propuesta por Frost (1975), modificada por Marin *et al.* (1986).

Se colectaron 25 larvas con micropipetas y se encubaron por 20-24 horas luego de adición de alimento ($\sim 3,0 \mu\text{g Chl-a L}^{-1}$ de *I. galbana*) en botellas de policarbonato de 200 mL con agua de mar previamente equilibrada a los tratamientos correspondientes de $p\text{CO}_2$, cadmio disuelto y temperatura. Se utilizaron tres botellas de control sin larvas y tres botellas con larvas para cada tratamiento. Durante la incubación, todas las botellas fueron periódicamente homogenizadas manualmente con movimientos lentos para evitar la sedimentación de partículas.

Debido a la diferencia de tamaño y requerimiento de alimento, los reproductores fueron incubados individualmente en baldes con 2000 ml de agua de mar previamente equilibrada en $p\text{CO}_2$, por un periodo de 4 horas transcurridas luego de adicionar $\sim 7,0 \mu\text{g}$ de Chl-a L^{-1} alimento seco (~ 3 ml).

La variación de la concentración de alimento inicial y final se midió en función de la clorofila a (Chl-a), para lo cual se filtraron las submuestras de 100 ml ($0,7 \mu\text{m}$) y se extrajeron en oscuridad con acetona al 95% para ser medidas en un fluorómetro TD 700 Turner (Strickland & Parsons, 1968).

La tasa de ingestión en larvas se estandarizó de acuerdo a la cantidad de larvas incubadas ($\text{ng Chl-a larva}^{-1} \text{h}^{-1}$) y para reproductores en función del tejido metabólicamente activo ($\mu\text{g Chl-a g}^{-1} \text{h}^{-1}$; Lardies *et al.*, 2017). El tejido metabólicamente activo (MW) corresponde a la diferencia entre el peso húmedo total (TW) y el peso boyante (BW) (Lardies *et al.*, 2017), los cuales fueron determinados con un pesa semi-analítica ($\pm 0,01 \text{ mg}$).

2.5. Análisis de datos

En el experimento preliminar (experimento 1), se realizó un análisis de varianza de dos vías para evaluar la tasa de ingestión de larvas cultivadas en 2 escenarios de AO y expuestas por 24 horas a concentraciones nominales de cadmio disuelto.

En el experimento transgeneracional con estresores múltiples se realizaron pruebas de ANOVA de una vía para comparar las TW y MT de los reproductores post desove y diámetro de ovocitos.

La interacción entre el efecto de los reproductores acondicionados en diferentes niveles de $p\text{CO}_2$ y la talla de las larvas obtenida bajo estresores múltiples ($p\text{CO}_2$, temperatura, Cd^{+2}) se analizaron mediante un ANCOVA anidado factorial, usando la edad de larva o tiempo de cultivo como covariable. En la comparación de las tasas de ingestión en larvas se utilizó una prueba de ANOVA anidado factorial, agregando la edad de las larvas como un factor adicional. En ambos análisis (ANCOVA y ANOVA anidado), los factores fueron anidados en función al nivel de exposición de $p\text{CO}_2$ en adultos.

Cuando el análisis mostró interacciones significativas, se realizaron comparaciones múltiples utilizando la prueba a posteriori HSD Tukey usando una corrección de Bonferroni. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad las pruebas de ANOVA y ANCOVA fueron evaluados utilizando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente (Zar, 2010). Se aplicó transformación de raíz cuadrada cuando fue necesario (Sokal & Rohlf, 1995). Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el software Statistica versión 7.0.

3. RESULTADOS

Artículo científico enviado a la revista *Frontiers in Physiology*, sección *Aquatic Physiology*.

Efecto transgeneracional de la acidificación del océano impulsada por el $p\text{CO}_2$ en mitílidos adultos, *Mytilus chilensis*, modulan la respuesta fisiológica a estresores múltiples de la progenie larval.

Rosario Díaz^{1, 2, 3, 4}, Marco A. Lardies^{3, 5}, Fabián J. Tapia⁶, Eduardo Tarifeño⁷, Cristian A. Vargas^{2, 3, 4*}

¹Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, Universidad de Concepcion, Chile.

²Aquatic Ecosystem Functioning Laboratory (LAFE), Environmental Sciences Center EULA-Chile & Department of Aquatic System, Faculty of Environmental Sciences, Universidad de Concepción, Chile.

³Center for the Study of Multiple-Drivers on Marine Socio-Ecological Systems (MUSELS), Universidad de Concepción, Chile.

⁴Millennium Institute of Oceanography (IMO), Universidad de Concepción, Chile.

⁵Facultad de Artes Liberales, Universidad Adolfo Ibáñez, Chile.

⁶Department of Oceanography & COPAS Sur-Austral, Chile.

⁷Department of Zoology, Universidad de Concepción, Chile.

Transgenerational effects of pCO₂-driven ocean acidification on adult mussels *Mytilus chilensis* modulate physiological response to multiple stressors in offspring larvae

Rosario Diaz^{1, 2, 3, 4}, Marco A. Lardies^{3, 5}, Fabian J. Tapia⁶, Eduardo Tarifeño⁷, Cristian A. Vargas^{2, 3, 4*}

¹Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, Universidad de Concepcion, Chile,

²Aquatic Ecosystem Functioning Laboratory (LAFE), Environmental Sciences Center EULA-Chile & Department of Aquatic System, Faculty of Environmental Sciences, Universidad de Concepción, Chile,

³Center for the Study of Multiple-Drivers on Marine Socio-Ecological Systems (MUSELS), Universidad de Concepción, Chile, ⁴Millennium Institute of Oceanography (IMO), Universidad de Concepción, Chile,

⁵Facultad de Artes Liberales, Universidad Adolfo Ibáñez, Chile, ⁶Department of Oceanography & COPAS Sur-Austral, Chile, ⁷Department of Zoology, Universidad de Concepción, Chile

Submitted to Journal:
Frontiers in Physiology

Specialty Section:
Aquatic Physiology

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
380257

Received on:
29 Mar 2018

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

Transgenerational effects of $p\text{CO}_2$ -driven ocean acidification on adult mussels *Mytilus chilensis* modulate physiological response to multiple stressors in offspring larvae

Rosario Diaz^{1,2,3,4}, Marco A. Lardies^{3,5}, Fabián J. Tapia⁶, Eduardo Tarifeño⁷, Cristian A. Vargas^{2,3,4*}

¹ Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, Universidad de Concepcion, Chile.

² Aquatic Ecosystem Functioning Laboratory (LAFE), Environmental Sciences Center EULA-Chile & Department of Aquatic System, Faculty of Environmental Sciences, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

³ Center for the Study of Multiple-Drivers on Marine Socio-Ecological Systems (MUSELS), Universidad de Concepción, Concepcion, Chile.

⁴ Millennium Institute of Oceanography (IMO), Universidad de Concepción, Chile.

⁵ Facultad de Artes Liberales, Universidad Adolfo Ibáñez, Santiago, Chile.

⁶ Department of Oceanography & COPAS Sur-Austral, Universidad de Concepción, Chile

⁷ Department of Zoology, Universidad de Concepción, Chile

* Correspondence:

Cristian A. Vargas
crvargas@udec.cl

Keywords: Ocean Acidification, Transgenerational Plasticity, Multiple Stressors, *Mytilus chilensis*, thermal effects

Abstract

The effect of CO₂-driven ocean acidification (OA) on marine biota has been extensively studied mostly on a single stage of the life cycle. However, the cumulative and population-level response to this global stressor may be biased due to transgenerational effects and their impacts on physiological plasticity. In this study, we exposed adult mussels *Mytilus chilensis* undergoing gametogenesis to two pCO₂ levels (550 and 1200 µatm) for 16 weeks, aiming to understand if prolonged exposure of reproductive individuals to OA can affect the performance of their offspring, which, in turn, were reared under multiple stressors (pCO₂, temperature, and dissolved cadmium). Our results indicate dependence between the level of pCO₂ of the broodstock (i.e. maternal effect) and the performance of larval stages in terms of growth and physiological rates, as a single effect of temperature. While main effects of pCO₂ and cadmium were observed for larval growth and ingestion rates, respectively, the combined exposure to stressors had antagonistic effects. Moreover, we found a suppression of feeding activity in post-spawning broodstock upon high pCO₂ conditions. Nevertheless, this observation was not reflected in the final weight of the broodstock and oocyte diameter. Due to the ecological and socioeconomic importance of mussels' species around the globe, the potential implications of maternal effects for the physiology, survival, and recruitment of larvae under combined global-change stressors warrant further investigation.

1 Introduction

The ocean is a natural sink for carbon dioxide (CO₂); however the increase of anthropogenic emissions is changing the ocean chemistry by lowering the seawater pH, and causing a reduction in the availability of carbonates (CO₃²⁻) and biogenic calcium carbonate (CaCO₃), a process widely known as Ocean Acidification (OA) (Caldeira and Wickett, 2003; Feely *et al.*, 2009; Gattuso and Hanson, 2011).

OA has been reported as a potential problem for calcifying organisms, limiting the production of biogenic calcium carbonate forms (Omega-Ω aragonite and calcite) and promoting their dissolution (e.g., Langdon *et al.*, 2000, Caldeira and Wickett, 2003, Langdon and Atkinson, 2005, Kleypas *et al.*, 2006, Hiebenthal *et al.*, 2013). In the last decades, most of the research efforts studying OA have focused on its effects on marine biota (e.g. Gattuso and Hansson, 2011, Parker *et al.*, 2013), reporting that early stages (embryos and larvae) of mollusks would be more sensitive to this global stressor (e.g. Kurihara, 2008; Gazeau *et al.*, 2010; Waldbusser *et al.*, 2014). However, most studies have focused on a single life stage, suggesting an acute exposure response at high pCO₂ levels, without considering the effect of OA as a chronic process that can impact the biology of species throughout its life history (Welch and Munday, 2017) and modify the phenotypic traits of the offspring. This inheritance process is known as transgenerational plasticity and is an adaptive mechanism transferred from parents to offspring exposed to particularly rigorous or stressful conditions, especially during gametogenesis process (Hamdoun and Epel, 2007; Byrne, 2011; Munday, 2014)

Different studies have been carried out on the effect of high pCO₂ on the offspring of mollusks, suggesting a positive carryover of pCO₂. For instance, a recent study where adults of the clam *Ruditapes philippinarum* were exposed to high pCO₂ levels demonstrated an improvement in the offspring's growth performance (Zhao *et al.*, 2017). Similarly, larvae of the oyster *Saccostrea glomerata* grew to larger sizes and at a faster rate than those from lines reared under environmental

Transgenerational effects on mussel physiology

conditions (Parker *et al.*, 2012). Nevertheless, adult oysters and their larvae have shown the same performance and higher capacity to modulate extracellular pH (pH_e) upon OA scenarios (Parker *et al.*, 2015). The mussel *Mytilus edulis* not only increased the calcification performance in larvae stages reared at high pCO_2 levels (Thomsen *et al.*, 2017), but also changed their shell ultrastructure as an adaptive response, by precipitating only calcite, the more resistant form of CO_3^{2-} (Fitzer *et al.*, 2014).

The evidence of transgenerational plasticity in physiological performance in mollusks exposed to multiple stressors under OA scenarios is even scarcer. Studies that exposed adults to additional factors in OA regimes indicate more sensitive larvae in the clam *Mercenaria mercenaria*, the scallop *Argopecten irradians* (Griffith and Gobler 2017), and *Saccostrea glomerata* (Parker *et al.*, 2017) exposed to food limitation (Griffith and Gobler 2017; Parker *et al.*, 2017), harmful algae (Griffith and Gobler 2017), and low-salinity stress (Parker *et al.*, 2017).

In a changing-ocean scenario, the interaction among multiple biotic and abiotic factors (Harley *et al.*, 2006), and the organisms' response to a combination of stress factors could be additive, antagonistic, or synergistic (Todgham and Stillman 2013). Studies of these types of interactions in an OA context have been mainly focused on temperature effects, whereas other combinations have been less reported (Gunderson *et al.*, 2016).

Farming of Chilean mussels (*Mytilus chilensis*) is one of the leading industries in mussel production worldwide (FAO, 2014). Nevertheless, a significant problem for the mussel farming industry is the cadmium concentrations that regularly exceed the European standard (Figueroa, 2008; SERNAPESCA, 2015), which can lead to a rejection of global exports (CODEX, 2009). In the global change context, OA and temperature can modulate the sensitivity to trace-metal toxicity (Ivanina and Sokolova, 2015; Nikinmaa, 2013; Sokolova and Lannig, 2008). A synergistic effect of enhanced cadmium toxicity has been reported from experiments combining temperature, acidification, and cadmium as stressors for the scallop *Adamussium colbecki* (Benedetti *et al.*, 2016) and the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Nardi *et al.*, 2017).

Considering that variations in larval development can substantially impact the recruitment of mollusks (Calabrese *et al.*, 1977; Machado *et al.*, 2011), hence the renewal and persistence of natural banks, the objective of this study was to assess the generational carryover effect of OA in *Mytilus chilensis*. Adult mussels conditioned for 4 months under current and projected future pCO_2 levels, were exposed to the interaction of temperature and sub-lethal concentrations of dissolved cadmium as additional stressors in a full cross-factorial design. The physiological traits considered as response variables in our study were egg diameter, larval size, and ingestion rates in both larvae and adult mussels.

2 Materials and Methods

2.1 Animal Collection

Adult specimens of the Chilean mussel, *Mytilus chilensis* (67 ± 3 mm in shell length), were obtained from culture ropes (5 m depth) at a mussel-farming center located in Vilupulli, Chiloé, southern Chile ($42^{\circ} 35' 35''\text{S}$; $73^{\circ} 47' 18''\text{W}$) during November 2015 (Figure 1). The mussels were transported under wet conditions to the experimental laboratory at the University of Concepcion's Marine Biology Research Station in Dichato (Chile) and acclimatized for 3 weeks in 30 x 40 cm tanks filled with filtered seawater ($0.1 \mu\text{m} + \text{UV}$, $\text{pH} = 8.1 \pm 0.01$, $\text{Temperature} = 13 \pm 0.01 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and $\text{salinity} = \sim 31$ psu) and constant aeration. Throughout this acclimation period, mussels were fed daily with a phytoplankton suspension ($\sim 40 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$, Phytogold-S), and seawater and feces were carefully renewed every two days.

2.2 Seawater $p\text{CO}_2$ manipulation and carbonate system monitoring

To obtain the two different levels of seawater $p\text{CO}_2$ (550-1200 μatm), dry air with pure CO_2 was blended into each target concentration using mass flow controllers (MFCs) for both air and CO_2 . For each experimental tank, temperature, pH and salinity were monitored every day while total alkalinity was measured every 10 days (Table 1). Samples for pH were collected in 50 mL syringes, avoiding formation of bubbles during collection and handling of the sample, and immediately transferred to a 25 mL thermostated closed cell at $25.0 \pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for standardization (DOE 1994, Torres *et al.* 2013), using a Metrohm® 713 pH-meter with a glass combined double junction Ag/AgCl electrode (Metrohm model 6.0258.600). Samples for Total Alkalinity (AT) were stored in 500 ml borosilicate bottles (Pyrex, Corning®) and poisoned with 50 μl of saturated HgCl_2 solution and with ground-glass stoppers lightly coated with Apiezon L® grease. AT was determined using the open-cell titration method (Dickson *et al.* 2007), by using an automatic Alkalinity Titrator Model AS-ALK2 Apollo SciTech. The AS-ALK2 system was equipped with a combination pH electrode (8102BNUWP, Thermo Scientific, USA) and temperature probe for temperature control (Star ATC probe, Thermo Scientific, USA) connected to a pH-meter (Orion Star A211 pH meter, Thermo Scientific, USA). All samples were analyzed at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) with temperature regulation using a water-bath (Lab Companion CW-05G). The accuracy was controlled against a certified reference material (CRM, supplied by Andrew Dickson, Scripps Institution of Oceanography, San Diego, USA) and the AT repeatability was $2 - 3 \mu\text{mol kg}^{-1}$ in average. Temperature and salinity were measured using an Oakton SALT 6 + handheld salinity meter with probe (Salt6+, Oakton®, accuracy: $\pm 1\%$ and $\pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively). Temperature and salinity data were used to calculate the rest of the carbonate system parameters (e.g. $p\text{CO}_2$, CO_3^{2-}) and the saturation stage of Omega Aragonite ($\Omega_{\text{aragonite}}$) and Calcite (Ω_{calcite}). Analyses were performed using CO2SYS software for MS Excel (Pierrot *et al.* 2006) set with Mehrbach solubility constants (Mehrbach *et al.* 1973) refitted by Dickson and Millero (1987). The KHSO_4 equilibrium constant determined by Dickson (1990) was used for all calculations.

2.3 Preliminary toxicity experiment (experiment 1#)

A preliminary experiment was carried out to determine the levels of cadmium selected for the transgenerational carryover and multiple-driver experiment. Adult mussels were induced to spawn through heat shock technique (Bayne, 1976). Larvae were obtained following Ruiz *et al.* (2008) and Toro *et al.* (2012). A larval culture was performed at initial density of 10 larvae mL⁻¹ in 1 L acid-washed borosilicate bottles (Duran Schott®) during 21 days, and at two pCO₂ levels: (i) present conditions in the mussel farming area (Control: 550 µatm, n=3) and (ii) the worst case scenarios (RCP8.5) predicted for 2100 (1200 µatm, n=3; Meinshausen *et al.*, 2011) (Figure 2). Present pCO₂ conditions were established based on a time-series analysis of data collected by an oceanographic buoy deployed by the Center for the Study of Multiple Drivers on Marine Socio-Ecological Systems (MUSELS) in the same mussel-farming site (see www.ceazamet.cl).

During this larval rearing experiment, seawater was renewed every two days (0.1 µm + UV) using pre-equilibrated pCO₂ water. Temperature was controlled by a thermoregulated bath (15°C) and larvae fed daily ~ 3.0 µg Chl-a L⁻¹ (~400.000 cel mL⁻¹) of *Isochrysis galbana*.

After the 21 days rearing, a 24-hour bioassay was performed to assess feeding rates of larvae exposed to nominal concentrations of dissolved cadmium Cd⁺²: 0, 0.01, 1, and 10 µg L⁻¹. We have considered these ranges based on natural concentrations observed in coastal environments along the Chilean coast and a realistic polluted scenario (Neff, 2002).

2.4 Transgenerational carry over and multiple driver experiment (experiment 2#)

Spawned adult mussels were stabilized for one week under acclimation conditions (see above), and then moved into one of two pCO₂ levels (550 and 1200 µatm). Mussels were kept in eight 25 L tanks with five specimens each (mean density = 0.2 ind L⁻¹). Temperature was increased to 15°C to promote gonadal development (Lagos *et al.*, 2012a). After 16 weeks of incubation at these nominal pCO₂ levels, each group of adult mussels was induced to spawn and larval stages from each group were reared at the pCO₂ treatments, thus completing a full cross-factorial design (2 × 2 × 2); *i.e.* two pCO₂ levels (550 - 1200 µatm), two nominal concentrations of dissolved Cd⁺² (0-10 µg L⁻¹), and two temperature levels representing the spring-summer environmental range at the mussel farming site (11° - 15°C) (Figure 3).

Fertilization and larval rearing were carried out in 1 L borosilicate bottles (three replicates per group, initial density = 10 ind mL⁻¹). Seawater was renewed every two days and larval stages were fed daily at ~ 3.0 µg Chl-a L⁻¹ (~400.000 cel mL⁻¹) of *I. galbana*.

Subsamples of hydrated oocytes were collected from each pCO₂ treatment and preserved in a 3% phosphate buffered formalin solution for egg-diameter measurements using an inverted microscope. At days 4, 8, and 11, subsamples of current larvae rearing were also collected and fixed in 70% ethanol for measurements of shell length and larval growth estimates. At days 4 and 11, individuals were also collected for larval feeding experiments.

Finally, spawned broodstock were returned to the culture tanks and maintained at the same conditions until the end of the experiments with the larval stages, in order to compare the total weight (g), the metabolically active tissue (g), and ingestion rate for both treatments.

2.5 Ingestion rate experiments

Ingestion rates (IR) were measured as Chl-a removal in a static system the experimental procedure outlined by Coughlan (1969). Clearance and ingestion-ratios calculations were conducted according to Frost (1975) and modified by Marin *et al.* (1986). For larval stages, 25 individuals were collected and transferred to 200 mL acid-washed polycarbonate bottles (0.13 ind mL^{-1}) filled with the corresponding treatment of $p\text{CO}_2$ levels, temperature, Cd^{+2} concentration, and subsequently fed with *I. galbana* ($\sim 3.0 \mu\text{g Chl-a L}^{-1}$). Three control bottles without larvae and three bottles with larvae for each corresponding treatment were incubated for approximately 20 h and periodically rotated by hand to avoid particle sedimentation. Similar procedures were followed for adult mussels, which were individually incubated for 4 h in 2 L baskets with around 3 mL of dry food ($\sim 7.0 \mu\text{g Chl-a L}^{-1}$).

Ingestion rate was estimated as the change in food concentration as indicated by chlorophyll a (Chl-a) concentration. Upon incubation, 100 mL subsamples were filtered ($0.7 \mu\text{m}$) and extracted in acetone 95% at dark before the measurement on a TD 700 Turner fluorometer (Strickland and Parsons, 1968). For adult feeding estimates, total wet weight (TW) and buoyant weight (BW) were determined with an analytical balance ($\pm 0.01 \text{ mg}$) to estimate the metabolically active tissue (TW–BW) (Lardies *et al.*, 2017). Ingestion rate in adult mussels was standardized per metabolically active tissue ($\mu\text{g Chl-a g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and for larvae ($\text{ng Chl-a larvae}^{-1} \text{ day}^{-1}$).

2.6 Statistical analyses

Two-way ANOVA was used to evaluate larvae IR tests (Preliminary toxicity experiment) and one-way ANOVA for Adult TW, MT and oocyte diameter (Transgenerational experiment). Interaction between transgenerational carry over (adult $p\text{CO}_2$ exposure) and multiple drivers ($p\text{CO}_2$, Temperature, Cd^{+2}) on larval growth (shell length) were tested by Factorial Nested ANCOVA with larval age (i.e. culture time) as covariate and a Factorial Nested ANOVA for ingestion rates adding larval age as a factor. Factors analyzed were nested in adult $p\text{CO}_2$ exposure. When the analysis showed significant interactions, multiple comparisons were carried out using Tukey's *a posteriori* HSD test on each factor that showed significant differences using a Bonferroni correction. Assumptions of normality and homoscedasticity for the ANOVA's test were evaluated using the Kolmogorov-Smirnov and Bartlett tests, respectively (Zar, 2010) and square-root transformation was applied when necessary. All analyses were carried out using Statistica version 7.0 software.

3 RESULTS

3.1 Preliminary toxicity experiment (experiment 1#)

Ingestion rates in 21-days old larvae were not significantly different among $p\text{CO}_2$ treatments, but the 24-hour exposure to $10 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd}^{+2}$ significantly reduced the ingestion rate in larval stages from both $p\text{CO}_2$ levels (Figure 4, Table 2).

3.2 Transgenerational carry over and multiple driver experiment (experiment 2#)

3.2.1.1 Physiological response of adult mussels conditioning upon high $p\text{CO}_2$

The statistical comparison of the biological response in adult mussels conditioned under high $p\text{CO}_2$ is shown in Table 3. Adult mussels conditioned during four months at two $p\text{CO}_2$ levels did not exhibit significant post-spawning differences in either total weight (Figure 5a) or metabolically active tissue (Figure 5b). However, mean ingestion rate in the control group ($550 \mu\text{atm}$) was significantly higher than under high $p\text{CO}_2$ conditions ($1200 \mu\text{atm}$) (Figure 5c), which in turn suggests a metabolic depression and lower capacity for post-spawning recovery in adult mussels. In both cases, oocyte

3.2.2 Physiological response of *M. chilensis* larvae upon transgenerational effect and multiple stressors

Statistical comparisons of the effect of multiple stressors on larval growth (shell length) and ingestion rates under experimental conditions are shown in Tables 4 and 5. Larval shell length (Figure 6a-b) was significantly different from broodstock conditioned to different $p\text{CO}_2$ levels. Moreover, the parental effect conditioned the response of mussel larvae upon contrasting $p\text{CO}_2$ and temperature conditions (Table 4). Post-hoc analysis indicated evidence of larger shell sizes in offspring from broodstock exposed to high $p\text{CO}_2$ levels, and larval rearing under high temperature and low $p\text{CO}_2$ treatment.

On the other hand, cadmium had a non-significant effect on larval size. A greater shell length in those larvae reared at low $p\text{CO}_2$ and non Cd^{+2} additions was evidenced from the factorial interactions. The interactions between $p\text{CO}_2$ with temperature and Cd^{+2} were non-significant in shell length of progeny.

Ingestion rates in larvae were also significantly related to $p\text{CO}_2$ exposure in broodstock, and their interaction with temperature and Cd^{+2} . No differences were found in relation to larval rearing at changing $p\text{CO}_2$ conditions as observed in the preliminary experiment on ingestion rates (Figure 7). Post-hoc tests showed lower ingestion rates in the offspring of high- $p\text{CO}_2$ adults when reared at 11°C (Figure 7a) and an increase of ingestion rates in larvae from adults conditioned under control $p\text{CO}_2$ levels and without Cd^{+2} exposure. Multi stressor interactions only indicated significant differences between temperature and larvae culture age, showing a higher ingestion rate in 11 days old larvae reared at 15°C (Figure 7b), the rest of the treatment combinations showed non-significant differences (Figure 7).

4 Discussion

Our results indicate that combinations of different stressors found in the coastal ocean may interact antagonistically as far as the physiology of mussels is concerned, with the paternal effect being an important factor in the physiological performance of mussel larvae, and temperature being a key variable that affects both the growth and feeding of offspring. The specific global change stressor (OA), which is maintained in the broodstock evidently, has important consequences for adult energy budgets and the physiological performance of their offspring.

Our results demonstrated that oocyte size in both $p\text{CO}_2$ levels were smaller ($\sim 2\mu\text{m}$) than reported by Lagos *et al.* (2012a) for *Mytilus chilensis* but within the range reported by Ockelmann (1965) for a number of bivalves. No effect in oocyte size from broodstock exposed to high $p\text{CO}_2$ levels was observed. Similar results have been observed in transgenerational studies in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* (Dupont *et al.*, 2013), the clam *Mercenaria mercenaria*, the scallop *Argopecten irradians* (Griffith and Gobler, 2017), and the oyster *Saccostrea glomerata* (Parker *et al.*, 2017). Our observations are also consistent with Dupont *et al.* (2013), since egg size apparently is not a predictor of the effect on offspring success for methodological setup in transgenerational experiments.

We report the effect of OA on the post-spawning recovery of organisms due to their high-energy demand. The weight of the broodstock was similar in both $p\text{CO}_2$ levels (wet weight and metabolically active tissue), but the feeding performance was substantially higher in specimens exposed to control $p\text{CO}_2$ levels. Therefore, it may suggest a suppression of feeding activity under high $p\text{CO}_2$ conditions, which could drastically affect the recovery of the organism. Kurihara *et al.* (2013) found a delayed reproductive phenology in sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* and reduced energy intake in futuristic $p\text{CO}_2$ levels. In the copepod *Acartia steueri*, egg production rates decreased significantly under high $p\text{CO}_2$ (Kurihara *et al.*, 2004), whereas in the marine shrimp *Palaemon pacificus*, egg production was suppressed but feeding was not affected by $p\text{CO}_2$ treatments (Kurihara *et al.*, 2008). The effect of OA in the post-spawning recuperation of adult organisms could determine the success of the subsequent spawning period, and consequently affect the life-history cycle as well as population renewal. Furthermore, mussels exposed to high $p\text{CO}_2$ for a long time show a plastic response because they are capable of physiologically compensating the drop in feeding rate, while maintaining growth and tissue stable under these stressful conditions.

Our experimental approach considered an initial spawning of adult mussels in order to homogenize the state of gonadal development prior to reproductive conditioning under two OA scenarios (550 - 1200 $p\text{CO}_2$) and otherwise optimal conditions of food supply and temperature. While previous experimental studies in *Mytilus chilensis* have reported conditioning periods of up to 81 days at 15°C (Lagos et al., 2012a), we extended this period to ca. 4 months to be consistent with other transgenerational OA experiments in mollusks (Fitzer et al., 2014; Griffith and Gobler 2017; Parker et al., 2012; Parker et al., 2017; Zhao et al., 2017).

Parental effects were significant in the physiological response of larvae upon exposure to multiple drivers. Both shell length and ingestion rate in mussel larvae depend directly on the broodstock $p\text{CO}_2$ exposure. In consequence, the potential effect of $p\text{CO}_2$ -driven ocean acidification could change through different generations of mussel populations (Duarte et al., 2014; Osorio et al., 2017). Osorio et al. (2017) reported that the phenotypic plasticity in the feeding rates was related to the environmental component, whereas the growth rate remains independent, which in turn suggests the importance of a genetic component. In our study, shell length was smaller than values reported by Ruiz et al. (2008), which suggests it could have been attributed to differences in reared system and food supply (Lagos et al., 2012b).

Larval size is related to the fitness of individual offspring in many invertebrates (Bernardo 1996; Fox and Czesak, 2000), including bivalves (Przeslawski and Webb, 2009; Ventura et al., 2016). In nature, a smaller initial size could result in higher juvenile mortality for at least two reasons. First, smaller young may have lower energy reserves and, consequently would be more sensitive to periodic food shortages in the sea (see Phillips, 2002). Second, and probably a more important effect of smaller initial size, is that the juveniles remain small for a longer time. Consequently, these smaller juveniles are exposed to a greater predation risk (Johnson and Smee, 2012; Rumrill, 1990). That is, OA can significantly affect larval survival, and at the same time affect the broodstock fitness.

Our study also showed that larger larvae were commonly observed when reared at low $p\text{CO}_2$ conditions. A similar effect has been found in other transgenerational studies in other mollusks (Parker et al. 2012; Griffith and Gobler, 2017). Greater larval performance under current $p\text{CO}_2$

conditions may stem from greater ease to calcify due to greater availability of biogenic carbonates, which would agree with previous experimental studies (e.g. Gazeau et al., 2010, Kurihara et al., 2007; Kurihara et al., 2008); however, results are not directly comparable as these studies did not consider parental acclimation in acidification.

Larval ingestion rates did not differ among $p\text{CO}_2$ levels in both experiments (see experiments #1 and #2), suggesting that larval feeding is independent of parental acclimation. Similar responses were described for *Mytilus edulis* larvae, which showed feeding rates that were notably robust to increasing seawater acidity, thus suggesting that the cost of energy maintenance could have been supplied from other physiological processes such as energy storage (Ventura et al., 2016).

Temperature affected the physiological performance of larval stages depending on parental exposure. From broodstock exposed to high $p\text{CO}_2$ conditions, we obtained larger larvae (shell length) with higher ingestion rates at 15 °C, which suggest that increasing temperature can promote an increase in energy intake. Previous studies in marine invertebrates have shown an antagonistic relationship between OA and temperature (Byrne and Przeslawski, 2013). Navarro *et al.* (2013) and Duarte *et al.* (2014) observed a positive effect of temperature on the physiology of juvenile *Mytilus chilensis* under future OA scenarios, although using a slightly higher temperature range (12-16 °C) than those applied in this study (11-15 °C). Duarte *et al.* (2014) proposed this range (12-16 °C) to simulate the potential increase in seawater temperature predicted by the IPCC (2007) for the late 21st century. Nevertheless, these ranges of sea surface temperature fall into the natural variability range measured currently in a typical mussel farming area in Chiloe Island, Southern Chile (Narvaez *et al.* submitted to Progress in Oceanography).

The combined effect of broodstock exposure to high $p\text{CO}_2$ levels and larval rearing under high cadmium concentrations resulted in decreasing larval ingestion rates. Poulsen *et al.* (1982) found non-significant effects of similarly high cadmium concentrations on the feeding rates and growth of *Mytilus edulis* juvenile. However, in our preliminary experiment, we found a significant drop in ingestion rates for 21-days old larvae when exposed to high cadmium concentration ($10 \mu\text{g L}^{-1}$). Nevertheless, this cadmium concentration is much higher than Cd concentrations found in mussel farming areas ($< 1 \mu\text{g Cd L}^{-1}$, unpublished data by MUSELS Research Center) and/or similar tidal inlets and fjords in southern Chile ($0.14 \mu\text{g Cd L}^{-1}$; Ahumada *et al.*, 2011).

Therefore, larval performance and food intake for larval growth is largely determined by the environmental conditions to which brood stock were exposed during its reproductive stage. Almost all of the parameters evaluated in this study changed as a function of broodstock environment. However, variation in multiple stressor scenarios has diverse effects on the physiological plasticity of the offspring, making it difficult to generalize as to how OA and other environmental stressors affect offspring phenotype in marine invertebrate larvae offspring. Finally, we hope that this kind of experimental approach will stimulate other researchers to examine not only phenotypic plasticity in life history, physiological traits and trade-offs, but also intergenerational effects, which are far more informative regarding the selective and evolutionary consequences of parental effects on offspring phenotypes beyond genetic inheritance.

4.1.1 Permission to reuse and Copyright

Permission must be obtained for use of copyrighted material from other sources (including the web). Please note that it is compulsory to follow figure instructions.

4.2 Resource Identification Initiative

To take part in the Resource Identification Initiative, please use the corresponding catalog number and RRID in your current manuscript. For more information about the project and for steps on how to search for an RRID, please click [here](#).

4.3 Life Science Identifiers

Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in the manuscript before the keywords with the following format:

urn:lsid:<Authority>:<Namespace>:<ObjectID>[:<Version>]

For more information on LSIDs please see [Inclusion of Zoological Nomenclature](#) section of the guidelines.

5 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

6 Author Contributions

RD, CAV and MAL designed the experiments. RD carried out the experimental studies and data acquisition. RD, CAV, MAL and FJT participated in data analysis/interpretation. RD, CAV and MAL performed to writing the manuscript. FJT and ET contributed in of intellectual content, revising critically and manuscript editing. All authors approve the final version of the manuscript.

7 Funding

This work was supported by Millennium Nucleus “*Center for the Study of Multiple-drivers on Marine Socio-Ecological Systems (MUSELS)*” funded by MINECON NC120086 and the *Millennium Institute of Oceanography (IMO)* funded by MINECON IC120019.

8 Acknowledgments

The authors thank to C. Stuardo, D. Toledo, J. Marileo and E. Flores for their valuable assistance in mussels rearing. We also acknowledge to University of Concepcion’s Marine Biology Research Station for allowing all the facilities to the experimental work, Finally, we also thank to Ricardo Barra for his valuable discussions about metal pollution.

9 Reference

Ahumada, R., Rudolph, A., González, E., Fones, G., Saldías, G., and Ahumada-Rudolph, R. (2011). 35
Dissolved trace metals in the water column of Reloncaví Fjord, Chile. *Lat Am J Aquat Res.* 39(3),
567-574. doi:10.4067/S0718-560X2011000300016.

Transgenerational effects on mussel physiology

- Bayne, B.L. (1976). *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge. 506pp.
- Benedetti, M., Lanzoni, I., Nardi, A., d'Errico, G., Di Carlo, M., Fattorini, D., *et al.* (2016). Oxidative responsiveness to multiple stressors in the key Antarctic species, *Adamussium colbecki*: interactions between temperature, acidification and cadmium exposure. *Mar. Environ. Res.* 121, 20-30. doi:10.1016/j.marenvres.2016.03.011.
- Bernardo, J. (1996). Maternal effects in animal ecology. *Am. Zool.* 36(2), 83-105. doi:10.1093/icb/36.2.83.
- Byrne, M., and Przeslawski, R. (2013). Multistressor Impacts of warming and acidification of the ocean on Marine Invertebrates' life Histories. *Integr. Comp. Biol.* 53, 582-596. doi:10.1093/icb/ict049.
- Byrne, M. (2011). Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev.* 49, 1-42.
- Calabrese, A., MacInnes, J. R., Nelson, D. A., and Miller, J. E. (1977). Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress. *Mar Biol.* 41(2): 179-184. doi:10.1007/BF00394024
- Caldeira, K., and Wickett, M. E. (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nat.* 425-365. doi:10.1038/425365a.
- Codex Alimentarius Commission (CAC). 2009. Informe de la tercera reunión del comité del CODEX sobre contaminantes de los alimentos. Róterdam. Países Bajos. 23-27 marzo 2009. 106 pp.
- Coughlan, J. (1969). The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar Biol.* 2(4), 356-358. doi:10.1007/BF00355716.
- Dickson, A. G., and Millero, F. J. (1987). A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 34(10): 1733-1743. doi:10.1016/0198-0149(87)90021-5.
- Dickson, A. G., Sabine, C. L., and Christian, J. R (Eds.). (2007). Guide to best practices for ocean CO₂ measurements. PICES Special Publication 3, 191 pp.
- DOE. 1992. Handbook of methods for the analysis of the various parameters of the carbon dioxide system in sea water. DOE Handbook 1994: 22. doi:ORNL/CDIAC-74.
- Duarte, C., Navarro, J. M., Acuña, K., Torres, R., Manríquez, P. H., Lardies, M. A., *et al.* (2014). Combined effects of temperature and ocean acidification on the juvenile individuals of the mussel *Mytilus chilensis*. *J. Sea Res.* 85: 308-314. doi:10.1016/j.seares.2013.06.002.
- Dupont, S., Dorey, N., Stumpp, M., Melzner, F., and Thorndyke, M. (2013). Long term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar Biol.* 160, 1835–1843. doi:10.1007/s00227-012-1921-x.

Transgenerational effects on mussel physiology

FAO. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Opportunities and challenges. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation, 223.

Feely, R. A., Doney, S. C., and Cooley, S. R. (2009). Ocean acidification: Present and future changes in a high-CO₂ world. *Oceanography*. 22: 36–47. doi:10.5670/oceanog.2009.95.

Figuerola, E. (2008). Are more restrictive food cadmium standards justifiable health safety measures or opportunistic barriers to trade? An answer from economics and public health. *Sci. Total Environ*. 389(1): 1-9. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.08.015.

Fitzer, S. C., Cusack, M., Phoenix, V. R., and Kamenos, N. A. (2014). Ocean acidification reduces the crystallographic control in juvenile mussel shells. *J Struct Biol*. 188: 39–45. doi: 10.1016/j.jsb.2014.08.007.

Fokina, N. N., Ruokolainen, T. R., Nemova, N. N., and Bakhmet, I. N. (2013). Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect. *Biol Trace Elem Res*. 154(2), 217-225. doi:10.1007/s12011-013-9727-3.

Fox, C. W., and Czesak, M. E. (2000). Evolutionary ecology of progeny size in arthropods. *Annu. Rev. Entomol*. 45(1), 341-369. doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.341.

Frost, B.W. (1975). A threshold feeding behavior in *Calanus pacificus*. *Limnol. Oceanogr*. 1: 263-266. doi: 10.4319/lo.1975.20.2.0263.

Gattuso, J. P., and Hansson, L. (Ed.). (2011). *Ocean acidification*. Oxford University Press. 344 pp.

Gazeau, F., Gattuso, J. P., Dawber, C., Pronker, A. E., Peene, F., Peene, J., *et al.* (2010). Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biogeosciences*. 7(7): 2051–2060. doi: 10.1080/15287394.2011.550460.

Griffith, A. W., and Gobler, C. J. (2017). Transgenerational exposure of North Atlantic bivalves to ocean acidification renders offspring more vulnerable to low pH and additional stressors. *Sci Rep*. 7:11394. doi: 10.1038/s41598-017-11442-3.

Gunderson, A. R., Armstrong, E. J., and Stillman, J. H. (2016). Multiple stressors in a changing world: the need for an improved perspective on physiological responses to the dynamic marine environment. *Ann Rev Mar Sci*. 8, 357-378. doi:10.1146/annurev-marine-122414-033953.

Haraldsson, C., Anderson, L., Hassellöv, M., Hulth, S., and Olsson, K. (1997). Rapid, high precision potentiometric titration of alkalinity in ocean and sediment pore waters. *Deep-Sea Research I*, 44: 2031-2044. doi:10.1016/S0967-0637(97)00088-5.

Harley, C. D. G., Hughes, A. R., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., *et al.* (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol Lett*. 9, 228-241. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00871.x.

Hamdoun, A., and Epel, D. (2007). Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Natl Acad Sci USA*. 104(6), 1745-1750. doi: 10.1073/pnas.0610108104.

Transgenerational effects on mussel physiology

Hiebenthal, C., Philipp, E. E. R., Eisenhauer, A., and Wahl, M. 2013. Effects of seawater $p\text{CO}_2$ and temperature on shell growth, shell stability, condition and cellular stress of Western Baltic Sea *Mytilus edulis* (L.) and *Arctica islandica* (L.). *Mar Biol.* 160: 2073-2087.

Ivanina, A. V., and Sokolova, I. M. 2015. Interactive effects of metal pollution and ocean acidification on physiology of marine organisms. *Curr Zool.* 61(4), 653-668. doi: 10.1093/czoolo/61.4.653.

Johnson, K. D., and Smee, D. L. (2012). Size matters for risk assessment and resource allocation in bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 462, 103-110. doi: 10.3354/meps09804.

Kurihara, H., Matsui, M., Furukawa, H., Hayashi, M., and Ishimatsu, A. (2008). Long-term effects of predicted future seawater CO_2 conditions on the survival and growth of the marine shrimp *Palaemon pacificus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 367:41–46. doi: 10.1016/j.jembe.2008.08.016.

Kleypas, J. A., Feely, R. A., Fabry, V. J., Langdon, C., Sabine, C. L., and Robbins, L. L. (2006). Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research. Report of a Workshop Held 18–20 April 2005, St. Petersburg, FL, Sponsored by NSF, NOAA, and the US Geological Survey.

Kurihara, H. (2008). Effects of CO_2 -driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373:275–284. doi: 10.3354/meps07802.

Kurihara, H., Shimode, S., and Shirayama, Y. (2004). Effects of raised CO_2 concentration on the egg production rate and early development of two marine copepods (*Acartia steueri* and *Acartia erythraea*). *Mar. Pollut. Bull.* 49, 721-727. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.05.005.

Kurihara, H., Yin, R., Nishihara, G. N., Soyano, K., and Ishimatsu, A. (2013). Effect of ocean acidification on growth, gonad development and physiology of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Aquat Biol.* 18, 281–292. doi: 10.3354/ab00510.

Lagos, L., Uriarte, I., and Yany, G. (2012a). Evaluación del potencial reproductivo del chorito (*Mytilus chilensis*) de dos poblaciones naturales sometidas a diferentes temperaturas de acondicionamiento. *Lat Am J Aquat Res.* 40(2): 389-397. doi: 10.3856/vol40-issue2-fulltext-13.

Lagos, L., Uriarte, I., Yany, G., and Astorga, M. (2012b). Efecto de la temperatura en el cultivo de larvas del bivalvo *Mytilus chilensis* originadas por reproductores de distintas latitudes en ambiente controlado. *Cienc Mar.* 38(3), 543-550. doi: 10.7773/cm.v38i3.2081.

Langdon, C., and Atkinson, M. J. (2005). Seawater carbonate chemistry, calcification and photosynthesis during experiments with corals. *PANGAEA*. doi:10.1594/PANGAEA.721194.

Langdon, C., Takahashi, T., Sweeney, C., Chipman, D., Goddard, J., Marubini, *et al.* (2000). Effect of calcium carbonate saturation state on the calcification rate of an experimental reef. *Global Biogeochem Cycles.* 14, 639–654. doi: 10.1029/1999GB001195.

Lardies, M. A., Benitez, S., Osores, S., Vargas, C. A., Duarte, C., Lohrmann, K. B., *et al.* (2017). Physiological and histopathological impacts of increased carbon dioxide and temperature on the

Transgenerational effects on mussel physiology

scallops *Argopecten purpuratus* cultured under upwelling influences in northern Chile. *Aquaculture*. 479:455-466. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.06.008.

Machado, J., and Lopes-Lima, M. (2011). Calcification mechanism in freshwater mussels: potential targets for cadmium. *Toxicol Environ Chem*. 93(9): 1778-1787. doi:10.1080/02772248.2010.503656.

Marin, V., Huntley, M. E., and Frost, B. (1986). Measuring feeding rates of pelagic herbivores: analysis of experimental design and methods. *Mar Biol*. 93: 49-58. doi:10.1007/BF00428654

Mehrbach, C. (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnol. Oceanogr*. 18: 897-907. doi:10.4319/lo.1973.18.6.0897.

Munday, P. L. (2014). Transgenerational acclimation of fishes to climate change and ocean acidification. *F1000Prime Rep*. 6:99. doi: 10.12703/P6-99.

Nardi, A., Mincarelli, L. F., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., and Regoli, F. (2017). Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*. 169, 493-502. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.093.

Navarro, J. M., Torres, R., Acuña, K., Duarte, C., Manríquez, P. H., Lardies, M. A., *et al.* (2013). Impact of medium-term exposure to elevated $p\text{CO}_2$ levels on the physiological energetics of the mussel *Mytilus chilensis*. *Chemosphere*. 90: 1242-1248. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.09.063.

Neff, J.M. (2002). *Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water*. Elsevier. London.

Nikinmaa, M. (2013). Climate change and ocean acidification—Interactions with aquatic toxicology. *Aquat. Toxicol*. 126, 365-372. doi:10.1016/j.aquatox.2012.09.006.

Ockelmann, K. (1965). Developmental types in marine bivalves and their distribution along the Atlantic coast of Europe. *Proceedings of the First European Malacological Congress*. (1962): 25-35.

Osores, S. J.A., Lagos, N. A., San Martín, V., Manríquez, P. H., Vargas, C. A., Torres, R., *et al.* (2017). Plasticity and inter-population variability in physiological and life-history traits of the mussel *Mytilus chilensis*: A reciprocal transplant experiment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 490:1-12. doi:10.1016/j.jembe.2017.02.005.

Parker, L. M., O'Connor, W. A., Raftos, D. A., Pörtner, H-O., and Ross, P. M. (2015). Persistence of positive carryover effects in oysters following transgenerational exposure to ocean. *PLoS ONE*. 10(7): e0132276. doi:10.1371/journal.pone.0132276.

Parker, L., Scanes, E., O'Connor, W. A., Coleman, R. A., Byrne, M., Pörtner, H. O., *et al.* (2017). Ocean acidification narrows the acute thermal and salinity tolerance of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. *Mar. Pollut. Bull*. 122(1-2):263-271. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.06.052.

39

Transgenerational effects on mussel physiology

- Parker, L. M., Ross, P. M., O'Connor, W. A., Borysko, L., Raftos, D. A., and Pörtner, H. O. (2012). Adult exposure influences offspring response to ocean acidification in oysters. *Glob Chang Biol.* 18(1), 82-92. doi:10.1111/j.1365-2486.2011.02520.x.
- Parker, L. M., O'Connor, W.A., Byrne, M., Coleman, R.A., Virtue, P., Dove, M., *et al.* (2017). Adult exposure to ocean acidification is maladaptive for larvae of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* in the presence of multiple stressors. *Biol Lett.* 13(2). doi: 10.1098/rsbl.2016.0798.
- Parker, L. M., Ross, P. M., O'Connor, W. A., Pörtner, H. O., Scanes, E., and Wright, J. M. (2013). Predicting the response of molluscs to the impact of ocean acidification. *Biology.* 2(2): 651-692. doi:10.3390/biology2020651.
- Phillips, N. E. (2002). Effects of nutrition-mediated larval condition on juvenile performance in a marine mussel. *Ecology.* 83: 2562-2574.
- Pierrot, D., Lewis E., and Wallace, D. W. R. (2006) MS Excel program developed for CO₂ system calculations. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, US Department of Energy, Oak Ridge, TN. ORNL/CDIAC-105a
- Poulsen, E., Riisgtrd, H. U., and Mohlenberg, F. (1982). Accumulation of cadmium and bioenergetics in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol.* 68, 25-29. doi:10.1007/BF00393137.
- Przeslawski, R., Byrne, M., and Mellin, C. (2015). A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Glob Chang Biol.* 21(6), 2122-2140. doi: 10.1111/gcb.12833.
- Rumrill, S. S. (1990). Natural mortality of marine invertebrate larvae. *Ophelia.* 32: 163-198. doi:10.1080/00785236.1990.10422030.
- Ruiz, M., Tarifeño, E., Llanos-Rivera, A., Padget, C., and Campos, B. (2008). Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Rev Biol Mar Oceanogr.* 43(1): 51-61. doi: 10.4067/S0718-19572008000100006.
- Sernapesca. (2015). Listado de áreas de extracción programa de sanidad de moluscos bivalvos (PSMB). Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Gobierno de Chile. 48pp.
- Sokolova, I. M., and Lannig, G. (2008). Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim Res.* 37, 181-201. doi: 10.3354/cr00764.
- Strickland, J. D. H., and Parsons, T. R. (1968). Determination of reactive phosphorus. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada Bulletin. 167: 49-56
- Thomsen, J., Stapp, L. S., Haynert, K., Schade, H., Danelli, M., Lannig, G., Wegner M., *et al.* (2017) Naturally acidified habitat selects for ocean acidification-tolerant mussels. *Sci Adv.* 3(4), e1602411. doi: 10.1126/sciadv.1602411.

Transgenerational effects on mussel physiology

- Todgham, A. E., and Stillman, J. H. (2013). Physiological Responses to Shifts in Multiple Environmental Stressors: Relevance in a Changing World. *Integr Comp Biol.* 53: 539-544. doi: 10.1093/icb/ict086.
- Toro, J. E., Oyarzún, P. A., Peñaloza, C., Alcapán, A., Videla, V., Tillería, J., *et al.* (2012). Production and performance of larvae and spat of pure and hybrid species of *Mytilus chilensis* and *M. galloprovincialis* from laboratory crosses. *Lat Am J Aquat Res.* 40(1): 243-247. doi:10.4067/S0718-560X2012000100024.
- Torres, R., Manríquez, P.H., Duarte, C., Navarro, J. M., Lagos, N. A., Vargas, C. A., *et al.* (2013). Evaluation of a semi-automatic system for long-term seawater carbonate chemistry manipulation. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 86: 443–451. doi:10.4067/S0716-078X2013000400006.
- Ventura, A., Schulz, S., and Dupont, S. (2016). Maintained larval growth in mussel larvae exposed to acidified undersaturated seawater. *Sci Rep.* 6, 23728. doi:10.1038/srep23728.
- Waldbusser, G. G., Hales, B., Langdon, C. J., Haley, B. A., Schrader, P., Brunner, E. L. *et al.* (2014). Saturation-state sensitivity of marine bivalve larvae to ocean acidification. *Nat Clim Chang.* 5(3), 273-280. doi:10.1038/nclimate2479.
- Welch, M. J., and Munday, P. L. (2017). Heritability of behavioural tolerance to high CO₂ in a coral reef fish is masked by nonadaptive phenotypic plasticity. *Evol Appl.* 10:682–693. doi:10.1111/eva.12483.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical analysis.* Prentice Hall. New Jersey.
- Zhao, L., Schöne, B. R., Mertz-Kraus, R., and Yang, F. (2017). Sodium provides unique insights into transgenerational effects of ocean acidification on bivalve shell formation. *Sci. Total Environ.* 577:360-366. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.200.

9.1 Figures

Figure 1. Study area: geographical location of mussels' farming where broodstock were collected (43°08' S; 73°44' O), Vilupulli, Chiloé.

Figure 2. Schematic of Experiment #1, used to determine the feeding response of 21 days old larvae rearing under two $p\text{CO}_2$ levels (gray: 550 μatm and dark: 1200 μatm), adding nominal concentrations of dissolved cadmium (Cd^{+2} : 0- 0.01-1 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) in a 24-hour bioassay.

Figure 3. Schematic of Experiment #2, used to investigate the combined consequences of transgenerational effect and multiple stressors on *M. chilensis* larvae: $p\text{CO}_2$ (gray: 550 μatm and dark: 1200 μatm), temperature (11-15 °C), and cadmium ($\text{Cd}0$: 0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and $\text{Cd}10$: 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). **(A)** Adult acclimatization in two $p\text{CO}_2$ levels. **(B)** Schematic of larvae rearing. (See Material and methods for further details).

Figure 4. Ingestion rate (mean \pm SD) of *M. chilensis* larvae reared for 21 days under two $p\text{CO}_2$ levels (550 and 1200 μatm) and exposed to four nominal concentrations of dissolved cadmium in a 24-hour bioassay.

Figure 5. Biological response of adult mussels under two $p\text{CO}_2$ conditions (550 and 1200 μatm): **(a)** Total wet weight, **(B)** Metabolically Active Tissue, **(C)** Ingestion rate, and **(D)** Oocyte diameter, after 4 months of experimental rearing in two $p\text{CO}_2$ levels (550 and 1200 μatm) (mean \pm SD).

Figure 6. Shell length (mean \pm SD) of larvae obtained from adults conditioned under two $p\text{CO}_2$ levels (550 and 1200 μatm) after 11 days of rearing at multiple combinations of $p\text{CO}_2$ (550 and 1200 μatm), temperature (11 and -15 °C), and cadmium concentration (0 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$): **(A)** larval rearing at 11°C and **(B)** larval rearing at 15°C .

Figure 7. Ingestion rate (mean \pm SD) of larvae obtained from adults conditioned under two $p\text{CO}_2$ levels (550 and 1200 μatm) after 11 days of rearing at multiple combinations of $p\text{CO}_2$ (550 and 1200 μatm), temperature (11 and 15 °C), and cadmium concentration (0 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$): **(A)** larval rearing at 11°C, and **(B)** larval rearing at 15°C.

10 Tables

Table 1. Average (\pm SD) conditions of carbonate system parameters during rearing of *M. chilensis* larvae during the experimental period. pH_T (total scale), total alkalinity (TA), CO_2 partial pressure (pCO_2), carbonate ion concentration (CO_3^{2-}), saturation states of the water with respect to calcite (Ω_{calcite}) and aragonite ($\Omega_{\text{aragonite}}$) minerals.

CO ₂ System parameters	Experimental treatments (nominal levels of pCO_2)					
	550	1200	550	1200	550	1200
	(Exp 1#)	(Exp 1#)	(Exp 2#)	(Exp 2#)	(Exp 2#)	(Exp 2#)
pH at 25°C (pH units)	7.80 \pm 0.03	7.50 \pm 0.03	7.80 \pm 0.05	7.50 \pm 0.04	7.75 \pm 0.05	7.44 \pm 0.03
pH <i>in situ</i> (pH units)	7.95 \pm 0.03	7.63 \pm 0.03	7.94 \pm 0.05	7.60 \pm 0.04	7.95 \pm 0.06	7.62 \pm 0.04
Temperature (°C)	15.00	15.00	15.00	15.00	11.00	11.00
Salinity (psu)	29.00	29.00	30.00	30.00	30.00	30.00
TA ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	2135.60	2156.51	2270.90	2252.50	2270.90	2252.50
pCO_2 <i>in situ</i> (μatm)	493.81 \pm 35.98	1114.84 \pm 85.25	528.57 \pm 69.53	1134.14 \pm 108.02	514.07 \pm 75.91	1151.55 \pm 108.00
[CO ₃ ²⁻] <i>in situ</i> ($\mu\text{atm Kg}^{-1}$)	109.09 \pm 6.37	56.44 \pm 3.83	118.13 \pm 10.9	61.57 \pm 5.15	104.76 \pm 11.25	51.71 \pm 4.47
Ω_{calcite}	2.70 \pm 0.16	1.71 \pm 0.10	2.91 \pm 0.27	1.51 \pm 0.13	2.57 \pm 0.28	1.27 \pm 0.11
$\Omega_{\text{aragonite}}$	1.40 \pm 0.09	0.88 \pm 0.06	1.83 \pm 0.17	0.96 \pm 0.08	1.62 \pm 0.17	0.80 \pm 0.07

Transgenerational effects on mussel physiology

Table 2. Results of two-way ANOVA for testing variation in ingestion rates in *M. chilensis* larvae reared for 21 days under two different $p\text{CO}_2$ levels (550 and 1200 μatm) and exposed to nominal concentrations of dissolved cadmium (Cd^{+2} : 0, 0.01, 1 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) in a 24-hour bioassay.

Variable	Factor	F	<i>df.</i>	p-value	Tukey post hoc comparisons
Ingestion	$p\text{CO}_2$	0.41	1,24	0.53	
	Cd^{+2}	6.43	3,24	< 0.01	10 \neq All
	$p\text{CO}_2 \times \text{Cd}^{+2}$	0.71	3,24	0.55	



Transgenerational effects on mussel physiology

Table 3. Statistical results of one-way ANOVA of adult mussels at the end of the experiment: Total wet weight (g), metabolically active tissue (g), Ingestion rate and Oocyte Diameter (μm) after 4 months exposure to two $p\text{CO}_2$ levels (550 and 1200 μatm).

Variable	Factor	F	<i>d.f.</i>	p-value	Tukey post hoc comparisons
Total Wet Weight	$p\text{CO}_2$	4.50	1,13	0.61	
Metabolically Active Tissue	$p\text{CO}_2$	2.86	1,7	0.13	
Ingestion Rate	$p\text{CO}_2$	15.18	1,6	<0.01	550 \neq 1200
Oocyte Diameter	$p\text{CO}_2$	1.43	1,126	0.23	

Transgenerational effects on mussel physiology

Table 4. Results of nested ANCOVA: effect of adult *M. chilensis* $p\text{CO}_2$ exposure (550 and 1200 μatm) on the shell length (μm) of larvae reared under multiple stressors: $p\text{CO}_2$ (550 and 1200 μatm), temperature (11° and 15°C), and cadmium (0 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Variable	Factor	F	<i>d.f.</i>	p-value	Tukey post hoc comparisons
Shell Length	Broodstock	29.45	1,1423	<0.01	550≠1200
	$p\text{CO}_2$ (Broodstock)	4.43	1,1423	0.04	550(1200) ≠ All
	T° (Broodstock)	4.88	1,1423	0.02	15°(1200) ≠ 11- 15° (550) 15°(550)≠ 11°(1200)
	Cd ⁺² (Broodstock)	2.66	1,1423	0.10	
	$p\text{CO}_2 \times \text{T}^\circ$	2.17	1,1423	0.14	
	$p\text{CO}_2 \times \text{Cd}^{+2}$	16.78	1,1423	<0.01	0 (550) ≠ All
	T° x Cd ⁺²	0.00	1,1423	0.94	

Transgenerational effects on mussel physiology

Table 5. Results of nested ANOVA: effect of adult *M. chilensis* $p\text{CO}_2$ exposure (550 and 1200 μatm) on feeding response of larvae reared under multiple stressors: $p\text{CO}_2$ (550 and 1200 μatm), temperature (11° and 15°C), and cadmium (0 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Variable	Factor	F	<i>df.</i>	p-value	Tukey post hoc comparisons
Ingestion Rate	Broodstock	6.42	1,60	0.01	550≠1200
	$p\text{CO}_2$ (Broodstock)	0.002	1,60	0.96	
	Age (Broodstock)	1.20	1,60	0.28	
	T° (Broodstock)	7.07	1,60	<0.01	11(1200)≠ All
	Cd^{+2} (Broodstock)	4.06	1,60	0.05	0(550)≠0(1200) 0(550)≠10(1200)
	$p\text{CO}_2 \times \text{Age}$	0.15	1,60	0.70	
	$p\text{CO}_2 \times T^\circ$	0.32	1,60	0.58	
	$p\text{CO}_2 \times \text{Cd}^{+2}$	3.42	1,60	0.07	
	Age $\times T^\circ$	10.03	1,60	<0.01	4(11°)≠ 10(11°) 10(15°)≠All
	Age $\times \text{Cd}^{+2}$	0.088	1,60	0.77	
	$T^\circ \times \text{Cd}^{+2}$	0.199	1,60	0.66	
	$p\text{CO}_2 \times \text{Age} \times T^\circ$	2.74	1,60	0.10	
	$p\text{CO}_2 \times \text{Age} \times \text{Cd}^{+2}$	0.069	1,60	0.794	
	$p\text{CO}_2 \times T^\circ \times \text{Cd}^{+2}$	3.97	1,60	0.051	

47

Transgenerational effects on mussel physiology

Age x T° x Cd ²⁺	0.46	1,60	0.499
pCO ₂ x Age x T° x Cd ²⁺	0.68	1,60	0.41



Figure 1.TIF

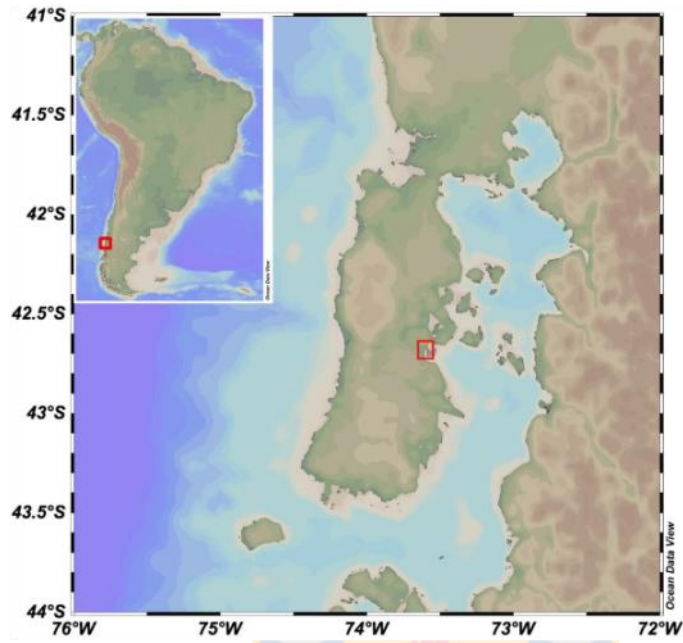


Figure 2.TIF

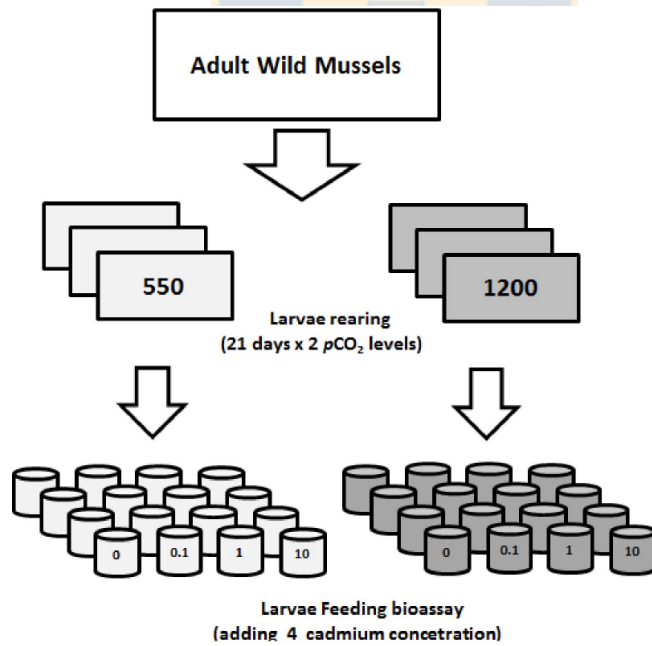


Figure 3.TIF

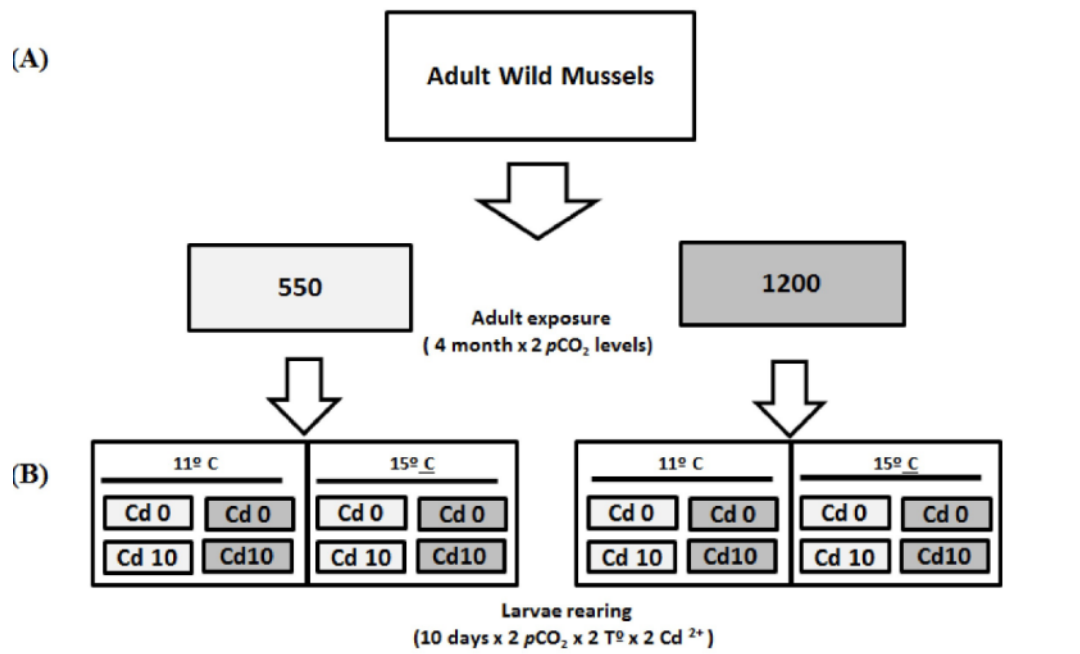


Figure 4.TIF

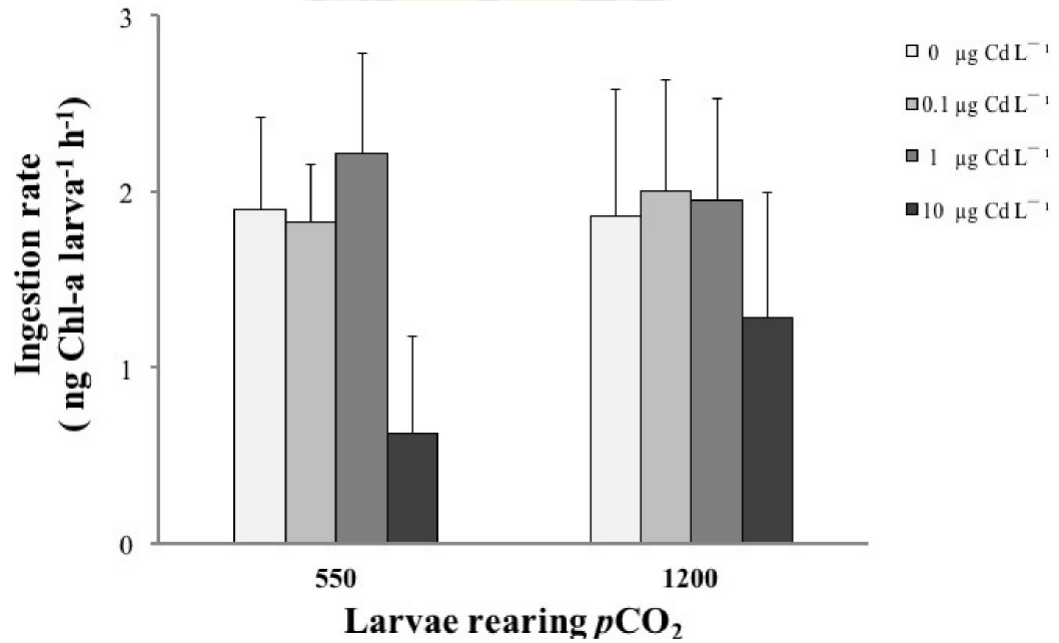


Figure 5.TIF

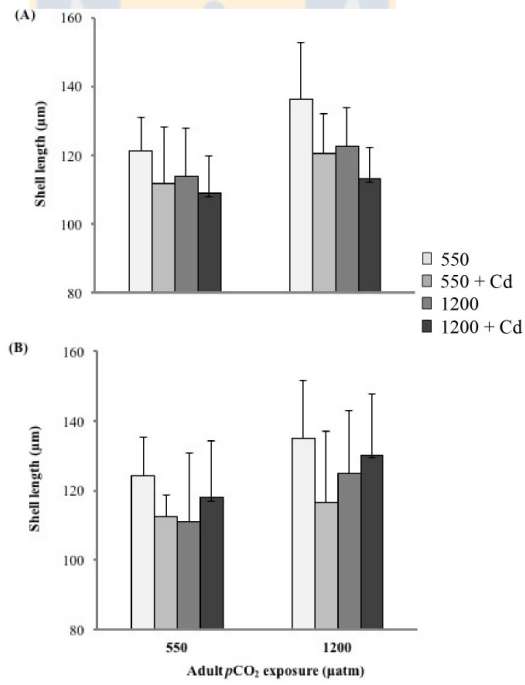
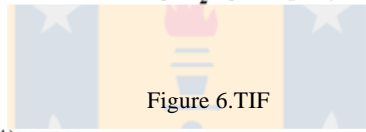
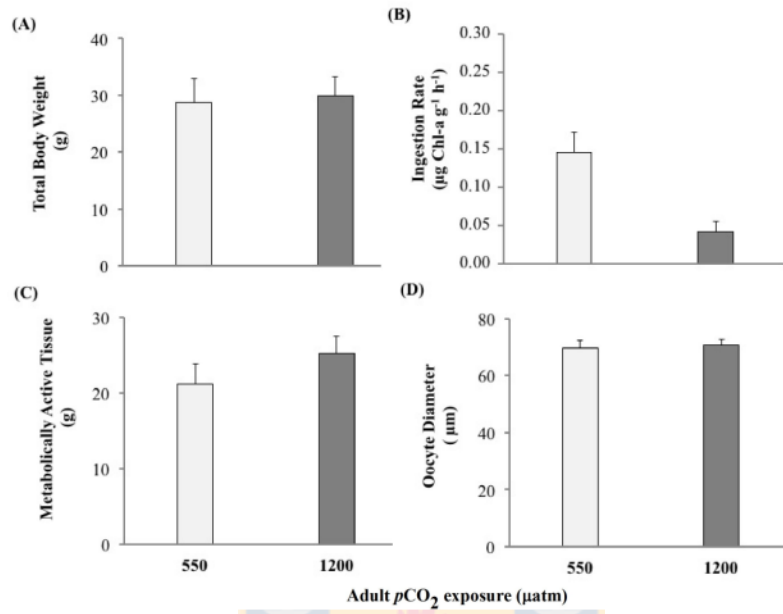
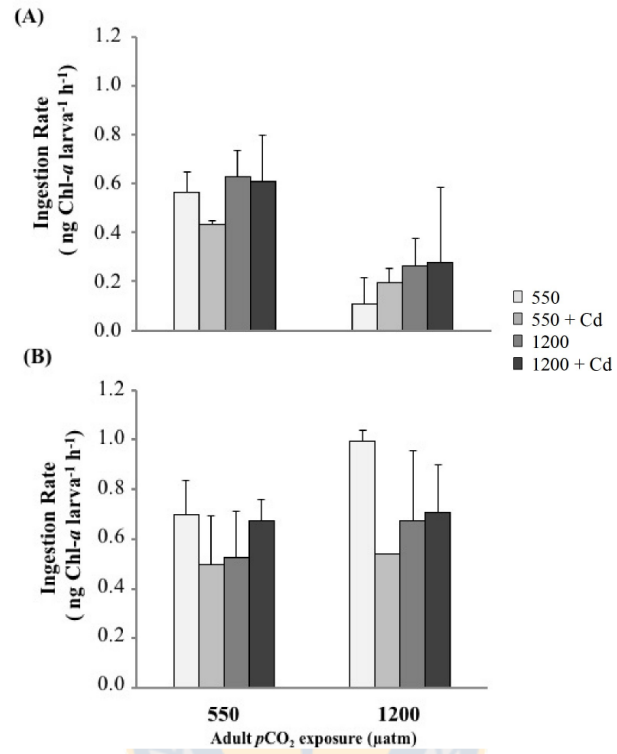


Fig 7.TIF



4. DISCUSIÓN GENERAL

4.1. Efecto de la concentración de cadmio disuelto en la tasa de ingestión de alimento en larvas de *M. chilensis* en escenarios de AO.

La exposición aguda de larvas (21 días) de *M. chilensis* a concentraciones nominales de cadmio disuelto (Cd^{+2} : control- 0,01 - 1 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$), demostraron una significativa disminución en las tasas de ingestión de alimento en 10 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ para ambos escenarios de AO ($p\text{CO}_2$: 550- 1200 μatm), mientras que el tratamiento de $p\text{CO}_2$ de cultivo y la interacción de factores ($\text{Cd}^{+2} \times p\text{CO}_2$) no tuvo efecto en la tasa de ingestión. La respuesta alimentaria de los organismos bajo determinados escenarios son un importante predictor del posible desempeño del organismo en el ambiente (Navarro, 2001). En este caso, la aproximación realizada de AO en larvas no tendría mayor implicancia en su desempeño alimenticio, concordando con los resultados obtenidos por Bechmann *et al.* (2011) en larvas de *Mytilus edulis* cultivadas en similares niveles de AO. Ventura *et al.* (2016) encontró que bajo de cierto nivel de acidificación las tasas de alimentación disminuían drásticamente, sin embargo, nuestra aproximación de AO se encontraría sobre este nivel, donde no se encontraría mayor efecto en la ingesta de alimento.

La disminución en la ingesta de alimento como respuesta a la exposición aguda a concentraciones de cadmio de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ fue evidente en ambos escenarios de $p\text{CO}_2$, sugiriendo una respuesta de tipo antagónica. Reportes previos en el contexto de la AO con

cadmio disuelto como estresor adicional, han observado este tipo de interacción antagónica en la toxicidad del metal en copépodos (Pascal *et al.*, 2010) y en embriones de sepia (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009). Nuestros resultados se podrían relacionar con los obtenidos por Kraak *et al.* (1991), quienes determinaron efectos negativos en la alimentación del mitílido *Dreissena polymorpha* en concentraciones desde los 9 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ sin tener repercusiones en la mortalidad de los organismos.

En cuanto a la concentraciones de cadmio testeadas en el bioensayo de toxicidad aguda, los niveles utilizados corresponden a rangos realistas de ambientes contaminados (Neff, 2002) y se alejan de las concentraciones naturales medidas en los ambientes costeros a lo largo de la costa chilena (*e.g.* Alarcón, 2003; Peña, 2003; Ahumada *et al.*, 2011) y en especial en el área de atingencia ($<1 \mu\text{g Cd L}^{-1}$, datos no publicados por *MUSELS Research Center*). Razón por la cual, la concentración con efecto en la tasa de ingestión de las larvas de 10 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ correspondería a un nivel magnificado para este ambiente. De igual forma, los estudios recientes en el contexto de la acidificación del océano y su interacción con cadmio disuelto en moluscos, han sido realizados con niveles de exposición superiores al máximo empleado en este estudio (*eg.* 20 $\mu\text{g L}^{-1}$: Nardi *et al.*, 2017; 40 $\mu\text{g L}^{-1}$: Benedetti *et al.*, 2016; 50 $\mu\text{g L}^{-1}$: Götze *et al.*, 2014; Ivanina *et al.*, 2014; Ivanina & Sokolova, 2015)

4.2. Efecto transgeneracional de $p\text{CO}_2$ y estresores múltiples

4.2.1. Efecto del $p\text{CO}_2$ en el acondicionamiento de reproductores.

La primera parte del experimento transgeneracional consistió en el acondicionamiento de los reproductores en dos niveles de $p\text{CO}_2$ (550 – 1200 μatm) para determinar si existía relación entre la exposición previa de los reproductores y el posterior desempeño de la progenie enfrentada a estresores múltiples ($p\text{CO}_2$, temperatura y cadmio disuelto).

El desove en los organismos representa un proceso fisiológico de alta demanda metabólica, el cual se ve reflejado en la disminución del peso corporal de los reproductores (Sokołowski *et al.*, 2010). La recuperación metabólica del organismo es subsidiada por las reservas energéticas disponibles y la alimentación (Bayne & Newell, 1983; Sokołowski *et al.*, 2010). Para este caso, los reproductores acondicionados por 4 meses en dos niveles de $p\text{CO}_2$ (550- 1200 μatm), evidenciaron un peso similar (peso húmedo y tejido metabólicamente activo) luego de 2 semanas de recuperación del desove. Sin embargo, las tasas de alimentación fueron sustancialmente mayores en los reproductores expuestos al nivel control de $p\text{CO}_2$, sugiriendo una supresión en la actividad de alimentación en condiciones de AO. Este grupo de reproductores podría encontrarse en una desventaja drástica en la recuperación del organismo con respecto a los reproductores control, debido a que las reservas de energía interna de los organismos se estarían ocupando de igual manera

en ambos escenarios y la principal fuente de energía externa (alimento) se estaría limitando en los reproductores del tratamiento en AO. Esta desventaja podría desencadenar en la muerte de los organismos en caso de no poder suplir el costo metabólico del desove y posterior recuperación del reproductor (Bayne & Newell 1983).

Los efectos de la AO en organismos en estadios reproductivos son diversos. Kurihara *et al.* (2013) describen un retraso en la fenología reproductiva en el erizo de mar *Hemicentrotus pulcherrimus* y una disminución en la ingesta de energía en los niveles futuristas de $p\text{CO}_2$. En el copépodo *Acartia steueri* se produjo una significativa reducción en la tasa de producción de huevos (Kurihara *et al.*, 2004), al igual que en el camarón marino *Palaemon pacificus*, donde la alimentación no se vio afectada por los tratamientos con $p\text{CO}_2$ (Kurihara, 2008). El efecto de AO en la recuperación de organismos desovados podría influir o determinar el éxito de los subsiguientes períodos de desove y, en consecuencia, afectar su ciclo de vida y limitar la descendencia. En este caso, los adultos expuestos a largo plazo a altas condiciones de $p\text{CO}_2$ muestran una respuesta plástica, ya que son capaces de compensar fisiológicamente la disminución en la tasa de alimentación mientras mantienen su masa en tejido somático y el crecimiento bajo condiciones de estrés (AO y desove).

Adicionalmente, se obtuvieron muestras de los ovocitos obtenidos de los dos grupos de reproductores (550- 1200 μatm), lo cuales resultaron ser más pequeños ($\sim 2 \mu\text{m}$) que los informado por Lagos *et al.* (2012a) para la misma especie, pero dentro de los rangos reportados por Ockelmann (1965) para mitílidos. No se observó ningún efecto en el tamaño de los ovocitos de reproductores expuestos a altos niveles de $p\text{CO}_2$. Se han observado resultados similares en estudios transgeneracionales con el erizo de mar *Strongylocentrotus droebachiensis* (Dupont *et al.*, 2013), la almeja *Mercenaria mercenaria*, el pectínido *Argopecten irradians* (Griffith & Gobler, 2017) y la ostra *Saccostrea glomerata* (Parker *et al.*, 2017). Nuestras observaciones también son consistentes con Dupont *et al.* (2013), dado que el tamaño del huevo aparentemente no es un predictor del efecto sobre el éxito de la progenie en este tipo de experimentos de configuración transgeneracional.

4.2.2. Efecto parental y respuestas fisiológicas de larvas de *M. chilensis* ante estresores múltiples

Los efectos parentales fueron significativos en la respuesta fisiológica de las larvas expuestas a estresores múltiples ($p\text{CO}_2$, temperatura y cadmio disuelto). Tanto la longitud de la concha como la tasa de ingestión dependieron directamente de la exposición de $p\text{CO}_2$ de los reproductores. En consecuencia, el efecto potencial de la acidificación de los océanos impulsada por el $p\text{CO}_2$ podría cambiar a través de diferentes generaciones de poblaciones de mitílidos (Duarte *et al.*, 2014; Osoreo *et al.*, 2017). Osoreo *et al.* (2017) reportaron que

las tasas de alimentación de *M. chilensis* presentaban una plasticidad fenotípica con respecto al componente ambiental, mientras que la tasa de crecimiento sería independiente, sugiriendo la importancia del componente genético.

Se evidenció un mayor tamaño en talla en las larvas cultivadas en el nivel control de $p\text{CO}_2$, incluyendo las líneas de cultivo que provenían de adultos acondicionados en AO. Este efecto se ha reportado en otros estudios transgeneracionales sobre moluscos en AO (Parker *et al.*, 2012; Griffith y Gobler, 2017). El mayor rendimiento larval en condiciones actuales de $p\text{CO}_2$ puede deberse a una mayor facilidad de calcificación debido a una mayor disponibilidad de carbonatos biogénicos, lo que estaría de acuerdo con estudios experimentales previos (*eg*: Gazeau *et al.*, 2010; Kurihara *et al.*, 2007; Kurihara *et al.* 2008); sin embargo, los resultados no son directamente comparables ya que no incluyeron la aclimatación de los reproductores en los escenarios de AO.

Dentro de la combinación de estresores múltiples, la temperatura tuvo un claro efecto en el rendimiento fisiológico de las larvas según la línea de cultivo (exposición de los padres). Los reproductores expuestos a AO, obtuvieron larvas más grandes en longitud de concha y mayores tasas de ingestión a 15 °C, lo que sugiere que el aumento de la temperatura puede promover un aumento metabólico que fue cubierto con una mayor ingesta de alimento, ya que en muchas ocasiones las larvas desarrollan un mejor rendimiento en temperaturas que

son inclusive superiores a las que experimentarían en su ambiente natural (Helm *et al.*, 2006).

Estudios previos en invertebrados marinos han mostrado una relación antagónica entre AO y temperatura (Byrne & Przeslawski, 2013). Navarro *et al.* (2013) y Duarte *et al.* (2014) observaron un efecto positivo de la temperatura sobre la fisiología del juvenil *Mytilus chilensis* en futuros escenarios de AO, aunque utilizando un rango de temperatura ligeramente más alto (12- 16 °C) que este estudio (11- 15 °C). Duarte *et al.* (2014) propusieron este rango (12- 16 °C) para simular el aumento potencial de la temperatura del agua marina pronosticado por el IPCC (2007) para fines del siglo XXI. Sin embargo, estos rangos de temperatura de la superficie del mar se encuentran dentro del rango de variabilidad natural medido actualmente en un área típica de cultivo de mejillón en la isla de Chiloé, sur de Chile (Narváez *et al.* *Enviado a Progress in Oceanography*).

En nuestro estudio, la longitud de concha en larvas fue menor que los informados por Ruiz *et al.* (2008) y Lagos *et al.* (2012b), lo que podría ser atribuido a las diferencias en el sistema de cultivo y alimentación (Lagos *et al.*, 2012b). En este caso, la dieta suministrada consistió en la microalga *Isochrysis galbana*, esto proporcionaría un sesgo con respecto a las publicaciones de comparación, pudiendo retrasar el desarrollo y crecimiento de larvas

como se ha reportado en especies del genero *Crassostrea* a partir de los 110 μm de longitud de concha (Helm *et al.*, 2006).

El manejo realizado durante los recambios de agua es otro aspecto que pudo influir en la dispersión de tallas durante el cultivo larval, ya que se utilizó un tamiz acorde al tamaño del primer estadio larval (80 μm) a modo de evitar el sesgo de talla durante el cultivo, siendo este manejo de descarte y eliminación de organismos de bajo crecimiento uno de los puntos críticos a los que se atribuye la mayor pérdida de larvas (Helm *et al.*, 2006).

Las tasas de ingestión de larvas no difirieron entre los niveles de $p\text{CO}_2$ en ambos experimentos (ver sección 4.1), sugiriendo que la alimentación es un proceso independiente de la aclimatación de los padres. Sin embargo, estos mismos niveles de $p\text{CO}_2$ provocaron una disminución en la respuesta alimentaria en los reproductores, similar a estudios previos en adultos y juveniles de la misma especie bajo condiciones similares de AO (Navarro *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2014). Comparando la respuesta alimentaria obtenida en larvas y adultos en condiciones de AO, se puede inferir que los estadios tempranos de desarrollo tendrían una mejor capacidad de adaptación, debido a que no han experimentado en su historia de vida un ambiente diferente al impuesto en laboratorio. Por otra parte, los adultos que fueron obtenidos del ambiente, tendrían un rango de tolerancia sesgado a las condiciones ambientales conocidas por el organismo. Esta mayor tolerancia y plasticidad

fenotípica en larvas con respecto a los organismos adultos fue descrita en erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, donde atribuyen esta condición al ambiente variable que experimentan en la columna de agua previo al asentamiento, la cual le permitirá tener mejor desempeño durante el reclutamiento (González, 2010).

Nuestros resultados indican que los diferentes factores estresantes encontrados en el océano costero pueden interactuar de manera antagónica en la fisiología de las larvas de *M. chilensis*, siendo el efecto parental un factor importante en el rendimiento fisiológico de estas, y la temperatura una variable clave que afecta el crecimiento y la alimentación de la descendencia.

4.3. Efecto materno y las implicancias en AO

El factor estresante de cambio global específico (AO), que se mantuvo desde la aclimatación de los reproductores, tuvo importantes consecuencias en la obtención de energía en los adultos y el rendimiento fisiológico de la descendencia. Estos resultados infieren que el desempeño fisiológico de estas larvas, estaría determinado tanto por el fenotipo y las condiciones ambientales de los progenitores (efectos indirectos ambientales), como por el propio genotipo y las condiciones ambientales que experimenta durante su desarrollo (Mousseau & Fox, 1998).

En este estudio los reproductores u organismos adultos mostraron un claro deterioro en la obtención de energía luego del desove debido a la exposición aguda a la AO. Mientras que las larvas sometidas a la AO de manera crónica, solo demostraron un efecto en la talla y no en las tasas de ingestión de alimento. Esta diferencia se debe en parte a que los estadios tempranos de desarrollo poseen una fisiología y morfología diferentes a sus etapas adultas, por lo que la respuesta a factores ambientales estresantes puede variar a lo largo de su historia de vida (Thor & Dupont, 2018). Sin embargo, aún queda por investigar el desempeño de estas larvas en sus etapas adultas y siguientes generaciones (*e.g.* Parker *et al.*, 2015), así como también, posibles medios de compensación de los efectos negativos de la AO, como por ejemplo la alimentación (Thomsen *et al.*, 2013; Ramajo *et al.*, 2016).

Estudios recientes establecen la necesidad de comprender las posibles respuestas de la población y del ecosistema mediante las aproximaciones de tipo multigeneracional y la aplicación de escenarios de multiestrés, para así poder fortalecer las predicciones ante el cambio climático global (Parker *et al.*, 2013; Donelson *et al.*, 2018), debido a la posibles variabilidad de los efectos biológicos entre las etapas del ciclo de vida, comunidades y en las posibles características de tipo adaptativas que puedan amortiguar las respuestas de las poblaciones ante los efectos del cambio climático (Chevin *et al.*, 2010; Kopp & Matuszewski, 2014; Thor & Dupont, 2018).

5. CONCLUSIONES

El presente estudio evaluó el efecto transgeneracional en escenarios de AO en *Mytilus chilensis* y la posterior respuesta de la progenie expuesta a estresores adicionales: temperatura y cadmio disuelto. En base al diseño experimental propuesto, podemos concluir lo siguiente:

- Los escenarios de AO propuestos no tienen efecto significativo en las tasas de ingestión de larvas de *M. chilensis*, sin embargo, la alimentación tiene una respuesta plástica bajo los estresores adicionales propuestos (temperatura y cadmio disuelto).
- El desempeño fisiológico de las larvas está directamente influenciado por el acondicionamiento parental y a la vez, por los factores ambientales en que se desarrollaron.
- Si bien en este estudio obtuvo un efecto negativo de la AO en reproductores que no se vio reflejado en diámetro de los ovocitos resultantes del desove ni en el peso post-desove, no podemos generalizar este resultado hacia las generaciones siguientes, debido a que la historia de vida previa de estos organismos en ambiente natural pudo sesgar el resultado y a la vez significar un factor de estrés adicional.

Estos resultados permiten dar sustento a la hipótesis 1 planteada, la cual postulaba que el acondicionamiento de los reproductores en bajo pH/alto $p\text{CO}_2$ condiciona el desempeño de la progenie en términos fisiológicos de talla y respuesta alimentaria. Por otra parte, podemos sustentar parcialmente la hipótesis 2, debido a que el desempeño fisiológico de las larvas dependió principalmente del efecto parental y temperatura de cultivo, mientras que la combinación de factores estresantes (temperatura x $p\text{CO}_2$ x cadmio disuelto) tuvieron un efecto antagónico entre sí.



6. REFERENCIAS

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1999. Toxicological Profile for Cadmium. US Department of Human and Health Services.

Ahearn, G. A., Mandal, P. K. & Mandal, A. 2004. Calcium regulation in crustaceans during the molt cycle: a review and update. *Comparative Biochemistry & Physiology.*, 137A, 247-257.

Ahumada, R., Rudolph, A., González, E., Fones, G., Saldías, G., & Ahumada-Rudolph, R. 2011. Dissolved trace metals in the water column of Reloncaví Fjord, Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39(3), 567-574.

Alarcón, S. 2003. Determinación de elementos traza (Cd, Cu, Ni, Hg, y As) en agua de mar y sedimento de la Bahía de Puerto Montt. Año 2002. Tesis, Escuela de Química y Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.

Altamirano-Chovar, C., Rudolph, A. & Sepúlveda, R. D. 2006. Differential sensitivity to human influence in juvenile *Semimytilus algosus* (Gould, 1850) (Mollusca: Mytilidae) from four coastal sites in south-central Chile. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 77(2), 171-178.

Bayne, B. L. 1976. *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Bayne, B. L., & Newell, R. C. 1983. Physiological energetics of marine molluscs. In *The Mollusca*. Volume 4: 407-515.

Bechmann, R. K., Taban, I. C., Westerlund, S., Godal, B. F., Arnberg, M., Vingen, S., Ingvarsdottir, A. & Baussant, T. 2011. Effects of ocean acidification on early life stages of shrimp (*Pandalus borealis*) and mussel (*Mytilus edulis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(7-9), 424-438.

Benedetti, M., Lanzoni, I., Nardi, A., d'Errico, G., Di Carlo, M., Fattorini, D., Nigro, M. & Regoli, F. 2016. Oxidative responsiveness to multiple stressors in the key Antarctic species, *Adamussium colbecki*: interactions between temperature, acidification and cadmium exposure. *Marine Environmental Research*, 121, 20-30.

Bonduriansky, R., Crean, A. J. & Day, T. 2012. Las implicaciones de la herencia no genética para la evolución en entornos cambiantes. *Evolutionary Applications*, 5: 192 – 201.

Boyd, P. W. 2011. Beyond ocean acidification. *Nature Geoscience*, 4(5): 273-274.

Bruland, K.W. 1980. Oceanographic Distributions of Cadmium, Zinc, Nickel, and Copper in the North Pacific. *Earth and Planetary Science Letters* 47(2): 176-198.

Byrne, M. 2011. Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. In: *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 49, 1-42.

Byrne, M. & Przeslawski, R. 2013. Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4): 582-596.

Calabrese, A., MacInnes, J. R., Nelson, D. A. & Miller, J. E. 1977. Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress. *Marine Biology*, 41(2): 179-184.

Caldeira, K. & Wickett, M. E. 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425-365.

Carrera, M., Valenta, P., Ahumada, R. & Rodriguez, V. 1993. Determinación voltamétrica de metales trazas en la columna de agua y sedimentos de Bahía de Concepción. *Revista de Biología Marina*. 28(1):151-163.

Cheng, T. C. 1996. Hemocytes: forms and functions, in: *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, 299-329.

Chevin, L-M., Lande, R. & Mace, G. M. 2010. Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: Towards a predictive theory. PLoS Biology, 8, e1000357.

Clark, R. 1997. Marine Pollution. Oxford. Clarendon Press.

Codex Alimentarius Commission (CAC). 2009. Informe de la tercera reunión del comité del CODEX sobre contaminantes de los alimentos. Róterdam. Países Bajos. 23-27 marzo 2009.

Cotté-Krief, M. H., Guieu, C., Thomas, A. J. & Martin, J. M. 2000. Sources of Cd, Cu, Ni and Zn in Portuguese coastal waters. Marine Chemistry, 71(3): 199-214.

Coughlan, J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. Marine Biology, 2(4), 356-358.

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. 34(10): 1733-1743.

Donelson, J. M., Salinas, S., Munday, P. L. & Shama, L. N. 2018. Transgenerational plasticity and climate change experiments: Where do we go from here?. Global change biology, 24(1), 13-34.

Duarte, C., Navarro, J. M., Acuña, K., Torres, R., Manríquez, P. H., Lardies, M. A. & Aguilera, V. 2014. Combined effects of temperature and ocean acidification on the juvenile individuals of the mussel *Mytilus chilensis*. Journal of Sea Research, 85: 308-314.

Dupont, S., Dorey, N., Stumpp, M., Melzner, F. & Thorndyke, M. 2013. Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Marine Biology, 160(8), 1835-1843.

FAO, 2010. Food Agriculture Organization. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome.

FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Opportunities and challenges. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation, 223.

Feely, R. A., Doney, S. C. & Cooley, S. R. 2009. Ocean acidification: Present and future changes in a high-CO₂ world. *Oceanography*, 22: 36–47.

Ferreira, M., Lago, J., Vieites, J. M. & Cabado, A.G. 2014. World production on bivalve mollusks and socioeconomic facts related to the impact of marine biotoxins. *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection*. 291-311.

Figuerola, E. 2008. Are more restrictive food cadmium standards justifiable health safety measures or opportunistic barriers to trade? An answer from economics and public health. *Science of the total environment*, 389(1): 1-9.

Fitzer, S. C., Cusack, M., Phoenix, V. R. & Kamenos, N. A. 2014. Ocean acidification reduces the crystallographic control in juvenile mussel shells. *Journal of Structural Biology*. 188: 39–45.

Fokina, N. N., Ruokolainen, T. R., Nemova, N. N. & Bakhmet, I. N. 2013. Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect. *Biological trace element research*, 154(2), 217-225.

Frost, B. W. 1975. A threshold of feeding behavior in *Calanus pacificus*. *Limnology and Oceanography*, 20: 263-266.

Gattuso, J. P. & Hansson, L. (Ed.). 2011. *Ocean acidification*. Oxford University Press.

Gazeau, F., Gattuso, J. P., Dawber, C., Pronker, A. E., Peene, F. J. Peene, Heip, C. H. R. & Middelburg, J. J. 2010. Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biogeosciences*, 7: 2051–2060.

Gazeau, F., Alliouane, S., Bock, C., Bramanti, L., López- Correa, M., Gentile, M., Hirse, T., Pörtner, H-O. & Ziveri, P. 2014. Impact of ocean acidification and warming on the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Frontiers in Marine Science*. 1:62.

Gonzalez, C. 2010. Estrés térmico durante el desarrollo ontogenético del erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*). Tesis para optar al grado Maestro en Ciencias en Ecología Molecular y Biotecnología. Universidad Autónoma de Baja California. México.

Götze, S., Matoo, O. B., Beniash, E., Saborowski, R. & Sokolova, I. M. 2014. Interactive effects of CO₂ and trace metals on the proteasome activity and cellular stress response of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Aquatic Toxicology*, 149, 65-82.

Griffith, A. W., & Gobler, C. J. 2017. Transgenerational exposure of North Atlantic bivalves to ocean acidification renders offspring more vulnerable to low pH and additional stressors. *Scientific Reports*, 7:11394.

Gunderson, A. R., Armstrong, E. J. & Stillman, J. H. 2016. Multiple stressors in a changing world: the need for an improved perspective on physiological responses to the dynamic marine environment. *Annual review of marine science*, 8, 357-378.

Haraldsson, C., Anderson, L., Hassellöv, M., Hulth S. & Olsson, K. (1997). Rapid, high precision potentiometric titration of alkalinity in ocean and sediment pore waters. *Deep-Sea Research I*, 44: 2031-2044.

Hamdoun, A. & Epel, D. 2007. Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 1745–1750.

Harley, C. D., Randall Hughes, A., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J., Harley, C. D. G., Hughes, A. R., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., Thornber, C. S., Rodriguez, L. F., Tomanek, L. & Williams, S. L. 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9, 228-241.

Helm, M., Bourne, N. & Lovatelli, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Documento Técnico de Pesca FAO, 471, Roma.

Hervé-Fernández, P., Houlbrèque, F., Boisson, F., Mulsow, S., Teyssié, J. L., Oberhänsli, F. & Jeffree, R. 2010. Cadmium bioaccumulation and retention kinetics in the Chilean blue mussel *Mytilus chilensis*: seawater and food exposure pathways. *Aquatic toxicology*, 99(4), 448-456.

Hiebenthal, C., Philipp, E. E. R., Eisenhauer, A. & Wahl, M. 2013. Effects of seawater $p\text{CO}_2$ and temperature on shell growth, shell stability, condition and cellular stress of Western Baltic Sea *Mytilus edulis* (L.) and *Arctica islandica* (L.). *Marine Biology*, 160: 2073-2087.

Hwang, P. P., Lin, S. W. & Lin, H. C. 1995. Different sensitivities to cadmium in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*; teleostei). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(1): 1-7.

Ivanina, A. V., Dickinson, G. H., Matoo, O. B., Bagwe, R., Dickinson, A., Beniash, E. & Sokolova, I. M. 2013. Interactive effects of elevated temperature and CO_2 levels on energy metabolism and biomineralization of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 166(1), 101-111.

Ivanina, A. V., Hawkins, C. & Sokolova, I. M. 2014. Immunomodulation by the interactive effects of cadmium and hypercapnia in marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Fish & shellfish immunology*, 37(2): 299-312.

Ivanina, A. V. & Sokolova, I. M. 2015. Interactive effects of metal pollution and ocean acidification on physiology of marine organisms. *Current Zoology*, 61(4), 653-668.

Kitano, Y. & Hood, D. W. 1962. Calcium carbonate crystal forms formed from sea water by inorganic processes. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 18(3), 141-145.

Kleypas, J. A., Feely, R. A., Fabry, V. J., Langdon, C., Sabine, C. L. & Robbins, L. L. 2006. Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research. Report of a Workshop Held 18–20 April 2005, St. Petersburg, FL, Sponsored by NSF, NOAA, and the US Geological Survey.

Kopp, M. & Matuszewski, S. 2014. Rapid evolution of quantitative traits: theoretical perspectives. *Evolutionary Applications*, 7(1), 169-191.

Kraak, M. H., Martin, C. T., Peeters, W. H. & De Kock, W. C. 1991. Biomonitoring of heavy metals in the Western European rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Environmental pollution*, 74(2), 101-114.

Kroeker, K. J., Gaylord, B., Hill, T. M., Hosfelt, J. D., Miller, S. H. & Sanford, E. 2014. The role of temperature in determining species' vulnerability to ocean acidification: a case study using *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE* 9(7): e100353.

Kump, L., Bralower, T. & Ridgwell, A. 2009. Ocean acidification in deep time. *Oceanography*, 22: 94–107.

Kurihara, H., Shimode, S. & Shirayama, Y. 2004. Effects of raised CO₂ concentration on the egg production rate and early development of two marine copepods (*Acartia steueri* and *Acartia erythraea*). *Marine Pollution Bulletin*, 49(9-10), 721-727.

Kurihara, H., Kato, S. & Ishimatsu, A. 2007. Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Biology*, 1(1), 91-98.

Kurihara, H. 2008. Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, 373:275–284.

Kurihara, H., Yin, R., Nishihara, G. N., Soyano, K. & Ishimatsu, A. 2013. Effect of ocean acidification on growth, gonad development and physiology of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Aquatic Biology*, 18(3), 281-292.

Lacoue-Labarthe, T., Martin, S., Oberhänsli, F., Teyssié, J. L., Markich, S., Jeffree, R. & Bustamante, P. 2009. Effects of increased pCO₂ and temperature on trace element (Ag, Cd and Zn) bioaccumulation in the eggs of the common cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Biogeosciences*, 6(11), 2561-2573.

Lagos, L., Uriarte, I. & Yany, G. 2012a. Evaluación del potencial reproductivo del chorito (*Mytilus chilensis*) de dos poblaciones naturales sometidas a diferentes temperaturas de acondicionamiento. Latin american journal of aquatic research, 40(2): 389-397.

Lagos, L., Uriarte, I., Yany, G. & Astorga, M. 2012b. Efecto de la temperatura en el cultivo de larvas del bivalvo *Mytilus chilensis* originadas por reproductores de distintas latitudes en ambiente controlado. Ciencias marinas, 38 (3), 543-550.

Langdon, C., Takahashi, T., Sweeney, C., Chipman, D., Goddard, J., Marubini, F., Aceves, H., Barnett, H. & Atkinson, M. J. 2000. Effect of calcium carbonate saturation state on the calcification rate of an experimental reef. Global Biogeochemical Cycles 14, 639–654.

Langdon, C. & Atkinson, M. J., 2005. Effect of elevated $p\text{CO}_2$ on photosynthesis and calcification of corals and interactions with seasonal change in temperature/ irradiance and nutrient enrichment. Journal of Geophysical Research, 110, C09S07.

Lardies, M. A., Benitez, S., Osoreo, S., Vargas, C. A., Duarte, C., Lohrmann, K. B. & Lagos, N. A. 2017. Physiological and histopathological impacts of increased carbon dioxide and temperature on the scallops *Argopecten purpuratus* cultured under upwelling influences in northern Chile. Aquaculture, 479, 455-466.

Lin, W., Rice, M. A. & Chien, P. K. 1992. The effects of copper, cadmium and zinc on particle filtration and uptake of glycine in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 103(1), 181-187.

Machado, J. & Lopes-Lima, M. 2011. Calcification mechanism in freshwater mussels: potential targets for cadmium. Toxicological & Environmental Chemistry, 93(9): 1778-1787.

Marigomez, I. A., Cajaraville, M. P. & Angulo, E. 1990. Littorea exposed to cadmium. Diseases of aquatic organisms, 9, 229-238.

Marin, V., Huntley, M. & Frost, B. W. 1986. Measuring feeding rates of pelagic herbivores: Analysis of experimental design and methods. *Marine Biology*, 93: 49-58.

Meinshausen, M., Smith, S. J., Calvin, K., Daniel, J. S., Kainuma, M. L. T., Lamarque, J-F., Matsumoto, K., Montzka, S. A., Raper, S. C. B., Riahi, K., Thomson, A., Velders, G. J. M. & van Vuuren, D. P. P. 2011. The RCP greenhouse gas concentrations and their extensions from 1765 to 2300. *Climatic Change*, 109: 213-241.

Millero, F. J. 2009. Effect of Ocean acidification on the Speciation of Metals in Seawater. *Oceanography*, 22(4): 72.

Mousseau, T. A. & Fox, C. W. 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in ecology & evolution*, 13(10), 403-407.

Munday, P. L. 2014. Transgenerational acclimation of fishes to climate change and ocean acidification. *F1000 Prime Reports*, 6: 99.

Nardi, A., Mincarelli, L. F., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G. & Regoli, F. 2017. Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 169, 493–502.

Navarro, J. M. 2001. Fisiología energética de pectínidos iberoamericanos. En: A. N. Maeda-Martínez (ed). *Los moluscos pectínidos de iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Editorial Limusa, México, pp. 61-67.

Navarro, J. M., Torres, R., Acuña, K., Duarte, C., Manríquez, P. H., Lardies, M., Lagos, N. A., Vargas, C. & Aguilera, V. 2013. Impact of medium-term exposure to elevated $p\text{CO}_2$ levels on the physiological energetics of the mussel *Mytilus chilensis*. *Chemosphere*, 90(3), 1242-1248.

Neff, J. M. 2002. *Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water*. Elsevier. London.

Nikinmaa, M. 2013. Climate change and ocean acidification—Interactions with aquatic toxicology. *Aquatic toxicology*, 126, 365-372.

Ockelmann, K. W. 1965. Developmental types in marine bivalves and their distribution along the Atlantic coast of Europe. In *Proceedings of the First European Malacological Congress*, 25-53.

Osores, S. J., Lagos, N. A., San Martin, V., Manriquez, P. H., Vargas, C. A., Torres, R., Navarro, J. M., Poupin, J., Saldias, G. S. & Lardies, M. A. 2017. Plasticity and inter-population variability in physiological and life-history traits of the mussel *Mytilus chilensis*: A reciprocal transplant experiment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 490, 1-12.

Parker, L. M., Ross, P. M., O'Connor, W. A., Borysko, L., Raftos, D. A. & Pörtner, H. O. 2012. Adult exposure influences offspring response to ocean acidification in oysters. *Global change biology*, 18(1), 82-92.

Parker, L. M., Ross, P. M., O'Connor, W. A., Pörtner, H. O., Scanes, E. & Wright, J. M. 2013. Predicting the response of molluscs to the impact of ocean acidification. *Biology*, 2(2), 651-692.

Parker, L. M., O'Connor, W. A., Raftos, D. A., Pörtner, H-O. & Ross, P. M. 2015. Persistence of positive carryover effects in oysters following transgenerational exposure to ocean. *PLoS ONE* 10(7): e0132276.

Parker, L. M., O'Connor, W. A., Byrne, M., Coleman, R. A., Virtue, P., Dove, M. Gibbs, M., Spohr, L., Scanes, E. & Ross, P. M. 2017. Adult exposure to ocean acidification is maladaptive for larvae of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* in the presence of multiple stressors. *Biology Letters*, 13(2).

Pascal, P. Y., Fleeger, J. W., Galvez, F. & Carman, K. R. 2010. The toxicological interaction between ocean acidity and metals in coastal meiobenthic copepods. *Marine Pollution Bulletin*, 60(12), 2201-2208.

Peña, N. 2006. Determinación de elementos traza (Ni, Cu, Pb, Cd, As y Hg) en el Seno de Reloncaví. Tesis, Escuela de Química y Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.

Przeslawski, R., Byrne, M. & Mellin, C. 2015. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Global change biology*, 21(6), 2122-2140.

Ramajo, L., Pérez-León, E., Hendriks, I. E., Marbà, N., Krause-Jensen, D., Sejr, M. K., Blicher, M. E., Lagos, N. A., Olsen, Y. S. & Duarte, C. M. 2016. Food supply confers calcifiers resistance to ocean acidification. *Scientific reports*, 6, 19374.

Ramorino, L. & Campos, B. 1979. Desarrollo larval y postlarval de *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819), Bivalvia: Mytilidae. *Anales del Museo de Historia Natural, Valparaíso* 12: 207-218.

Redpath, K. J. & Davenport, J. 1988. The effect of copper, zinc and cadmium on the pumping rate of *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 13(3), 217-225.

Ringwood, A. H. 1991. Short-term accumulation of cadmium by embryos, larvae, and adults of an Hawaiian bivalve, *Isognomon californicum*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 149(1), 55-66.

Ruiz, M., Tarifeño, E., Llanos-Rivera, A., Padget, C. & Campos, B. 2008. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(1): 51-61.

Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K. H., Bullister, J. L., Wanninkhof, R., Wong, C. S., Wallace, D. W. R., Tilbrook, B., Millero, F. J., Peng, T.-H., Kozyr, A., Ono, T. & Rios, A. F. 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science* 305:367-371.

Salinas, S., Brown, S. C., Mangel, M. & Munch, S. B. 2013. Non-genetic inheritance and changing environments. *NGI* 1: 38–50.

Sernapesca. 2015. Listado de áreas de extracción programa de sanidad de moluscos bivalvos (PSMB). Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Gobierno de Chile.

Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological sciences*. WH Free Company, New York, USA.

Sokolova, I. M. & Lannig, G. 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research*. 37, 181-201.

Sokołowski, A., Bawazir, A. S., Sokołowska, E. & Wołowicz, M. 2010. Seasonal variation in the reproductive activity, physiological condition and biochemical components of the brown mussel *Perna perna* from the coastal waters of Yemen (Gulf of Aden). *Aquatic Living Resources*, 23(2), 177-186.

Strickland, J. D. H. & Parsons, T. R. 1968. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. A practical handbook of seawater analysis, (167), 311.

Sunila, I. & Lindström, R. 1985. Survival, growth and shell deformities of copper-and cadmium-exposed mussels (*Mytilus edulis*) in brackish water. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 21(4), 555-565.

Takesue, R, A Van Geen, A., J Carriquiry, J., E Ortiz, E., L Godinez-Orta, L., I Granados, I., M Saldívar, M., L Ortlieb, L., R Escribano, R., N Guzmán, N., J Castilla, J., M Varas, M., M Salamanca, M. & C Figueroa, C. 2004. Influence of coastal upwelling and El Niño-Southern Oscillation on nearshore water along Baja California and Chile: shore-based monitoring during 1997-2000. *Journal of Geophysical Research* 109: 1-14.

Tans, P. 2009. An accounting of the observed increase in oceanic and atmospheric CO₂ and an outlook for the future. *Oceanography*, 22: 26-35.

Thomsen, J., Stapp, L. S., Haynert, K., Schade, H., Danelli, M., Lannig, G., Wegner, K. M. & Melzner, F. 2017. Naturally acidified habitat selects for ocean acidification-tolerant mussels. *Science Advances* 3(4), e1602411.

Thor, P. & Dupont, S. 2018. Ocean Acidification. In *Handbook on Marine Environment Protection*. Springer, Cham.

Todgham, A. E. & Stillman, J. H. 2013. Physiological responses to shifts in multiple environmental stressors: relevance in a changing world. *Integrative and comparative biology*, 53: 539-544.

Toro, J. E., Oyarzún, P. A., Peñaloza C., Alcapán A., Videla V., Tillería J., Astorga M. & Martínez V. 2012. Production and performance of larvae and spat of pure and hybrid species of *Mytilus chilensis* and *M. galloprovincialis* from laboratory crosses. *Latin american journal of aquatic research*, 40(1): 243-247.

Valdés, J, Román, D., Dávila, P., Ortlieb, L. & Guñez, M. 2006. Variabilidad estacional de cadmio en un sistema de surgencia costera del norte de Chile (Bahía Mejillones del Sur, 23° S). *Revista chilena de historia natural*, 79(4), 517-535.

Ventura, A., Schulz, S. & Dupont, S. 2016. Maintained larval growth in mussel larvae exposed to acidified under-saturated seawater. *Scientific reports*, 6, 23728.

Vidal, G. 2009. Identificación de las variables que intervienen en la acumulación de cadmio en los moluscos filtradores. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.

Vihtakari, M., Hendriks, I. E., Holding, J., Renaud, P. E., Duarte, C. M. & Havenhand, J. N. 2013. Effects of ocean acidification and warming on sperm activity and early life stages of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Water*, 5(4): 1890-1915.

Waldbusser, G. G., Hales, B., Langdon, C. J., Haley, B. A., Schrader, P., Brunner, E. L., Gray, M.W., Miller, C. A. & Gimenez, I. 2014. Saturation-state sensitivity of marine bivalve larvae to ocean acidification. *Nature Climate Change*, 5(3), 273-280.

Wang, Q., Liu, B., Yang, H., Wang, X. & Lin, Z. 2009. Toxicity of lead, cadmium and mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Meretrix meretrix* larvae. *Ecotoxicology*, 18(7), 829-837.

Welch, M. J. & Munday, P. L. 2017. Heritability of behavioural tolerance to high CO₂ in a coral reef fish is masked by non-adaptive phenotypic plasticity. *Evolutionary applications*.

Zar, J. H. 2010. *Biostatistical Analysis: Pearson New International Edition*. Pearson Higher.

Zhao, L., Schöne, B. R., Mertz-Kraus, R. & Yang, F. 2017. Sodium provides unique insights into transgenerational effects of ocean acidification on bivalve shell formation. *Science of the Total Environment*, 577:360-366.

