



Universidad de Málaga
Facultad de Ciencias
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Área de Botánica

Tesis Doctoral

Evolución experimental de microorganismos fotosintéticos de agua dulce: selección en escenarios de Cambio Global

Ignacio José Melero Jiménez

2021

Directores

Dr. Antonio Flores Moya

Dra. Elena Bañares España

Programa de Doctorado

Diversidad Biológica y Medio Ambiente



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Ignacio José Melero Jiménez

 <http://orcid.org/0000-0003-1570-3828>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





Universidad de Málaga
Facultad de Ciencias
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Área de Botánica

TESIS DOCTORAL

**Evolución experimental de microorganismos
fotosintéticos de agua dulce: selección en escenarios de
Cambio Global**

Ignacio José Melero Jiménez

2021

Directores: Dr. Antonio Flores Moya y Dra. Elena Bañares España

Programa de doctorado: Diversidad Biológica y Medio Ambiente







UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Departamento de Botánica y
Fisiología Vegetal

Antonio Flores Moya, Catedrático de Botánica de la Universidad de Málaga y Elena Bañares España, Profesora Contratada Doctora de Botánica, y ambos del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal de la Universidad de Málaga.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada "Evolución experimental de microorganismos fotosintéticos de agua dulce: selección en escenarios de Cambio Global " presentada por el graduado en Ciencias Ambientales Ignacio José Melero Jiménez, ha sido realizada bajo nuestra dirección. El trabajo presentado y las publicaciones que lo avalan no han sido utilizados en tesis anteriores. Considerando que representa el trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su exposición y defensa para optar al Grado de Doctor en el Programa de Doctorado de Diversidad Biológica y Medio Ambiente.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente en Málaga a 12 de enero de 2021.

Fdo. Dr. Antonio Flores Moya

Fdo. Dra. Elena Bañares España



Facultad de Ciencias, Boulevard Louis Pasteur.
Tel.: 952133342







UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D. IGNACIO JOSÉ MELERO JIMÉNEZ

Estudiante del programa de doctorado DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y MEDIO AMBIENTE de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada:

Realizada bajo la tutorización de ANTONIO FLORES MOYA y dirección de ANTONIO FLORES MOYA Y ELENA BAÑARES ESPAÑA.

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 12 de enero de 2021

Fdo.: Ignacio José Melero Jiménez



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.

29071

Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10

E-mail: doctorado@uma.es





El trabajo ha sido desarrollado dentro del grupo de investigación RNM 115 de la Junta de Andalucía y financiado con los proyectos:

- CGL2014-53862-P. Ecología Evolutiva de cianobacterias de aguas sulfurosas: ¿Como aparece la tolerancia al sulfuro? Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España.
- CGL2017-87314-P. Evolución rápida de cianobacterias y microalgas en escenarios de deterioro ambiental: Rescate evolutivo y papeles de la adaptación, el azar y la historia. Financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España.

Parte de los resultados incluidos en esta memoria han sido presentados en el *Congress of European Microbiologists* (Valencia, 2017), *Symposium 2018 Microbial Eco Evolutionary Dynamic* (Lisboa, 2018) y en el *Congress of European Microbiologists* (Glasgow, 2019). Además, conforman los siguientes artículos:

- **Melero-Jiménez, I. J.**, Martín-Clemente, E., García-Sánchez, M. J., Flores-Moya, A., & Bañares-España, E. (2019). Adaptation of the toxic freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to salinity is achieved by the selection of spontaneous mutants. *Phycological Research*, 67(3), 192-201. DOI: 10.1111/pre.12370 -Este manuscrito se corresponde con parte del capítulo 2 de este documento.
- **Melero-Jiménez, I. J.**, Martín-Clemente, E., García-Sánchez, M. J., Bañares-España, E., & Flores-Moya, A. (2020). The limit of resistance to salinity in the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* is modulated by the rate of salinity increase. *Ecology and Evolution*, 10(11), 5045-5055. DOI:110.1002/ece3.6257 -Este manuscrito se corresponde con parte del capítulo 3 de este documento.
- **Melero-Jiménez, I. J.**, Martín-Clemente, E., Reul, A., García-Sánchez, M. J., Flores-Moya, A., & Bañares-España, E. (under review). Dispersal of populations and environmental deterioration rate influence evolutionary rescue under selection by salinity in the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *European*

Journal of Phycology. Este manuscrito se corresponde con el capítulo 4 de este documento.

- **Melero-Jiménez, I. J.,** Flores-Moya, A., Collins, S. (**accepted-21-Dec-2020**). The role of changes in environmental quality in multitrait plastic responses to environmental and social change in the model microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecology and Evolution*. DOI: 10.1002/ece3.7179 -Este manuscrito se corresponde con el capítulo 6 de este documento.

«Para quedarte donde estás tienes que correr lo más rápido que puedas. Si quieres ir a otro sitio, deberás correr, por lo menos, dos veces más rápido».

La Reina Roja en A través del espejo y lo que Alicia encontró allí (Lewis Carroll, 1871).



Agradecimientos

Desde mi punto de vista, la realización de una tesis doctoral sería similar a embarcarte en un viaje del cual intuyes el destino, pero no tienes ni idea de cómo comenzar. Además, en todo viaje, van surgiendo numerosos acontecimientos (tanto positivos como negativos) que no son posibles disfrutar y superar solos. Por ese motivo, sería absurdo y erróneo no mencionar que este trabajo ha sido posible gracias a muchas personas.

En primer lugar, este viaje no habría sido posible sin Antonio Flores, pues fue él quien me brindó la oportunidad de empezar a investigar y quien principalmente me ha guiado por este proceso. Está claro, que si algo sé de ciencia/cianobacterias/botánica/estadística/etc. es gracias a él. Podría escribir numerosos calificativos cariñosos, pero prefiero resumirlo en una frase que dijo Henry Adams: “El maestro deja una huella para la eternidad; nunca puede decir cuando se detiene su influencia”.

Asimismo, me gustaría agradecer a Elena Bañares que siempre tuviera la puerta de despacho abierta para atenderme, a pesar de las choporrocintas tareas que tenía. Siempre, me mostraste tu apoyo, ánimo y colaboración con una sonrisa. A María Jesús García, por todas sus aportaciones y correcciones en los artículos, sin duda las publicaciones no hubieran sido posibles sin ti. También agradecer a Andy su buen hacer y que nunca me pusiera ninguna objeción para pasar numerosas muestras por el FlowCam.

A Elena Martín, por meterte en el fango conmigo. Muchas son las horas que hemos pasado juntos en el laboratorio comiéndonos la cabeza por cómo hacer las cosas. Sé que tenemos formas de pensar distintas, no obstante, sabes que te tengo un profundo respeto y cariño.

A Luis Toscano, más allá de todos los autoclaves, siempre me recibiste con una sonrisa. A Antonio Picornell que siempre me ayudó con cuestiones botánicas/burocráticas cuando me hizo falta. También me gustaría mencionar a Pepe, Raquel y Andrea, pues vuestra presencia en el laboratorio hacía que todo fuese mucho más divertido.

Al resto de compañeros del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, siempre me tendisteis una mano cuando lo necesité, gracias por vuestra ayuda y buena disposición.

I also want to acknowledge to Sinead Collins for opening the door of its lab for me. It has been a pleasure to collaborate with you. I would also like to thank Jana Hinners and Toby Samuels for their lab help during my stay and for showing me Edinburgh! and Eric C. Henry for kindly revising the English style and usage.

Agradecer todo el apoyo durante estos años a mi familia y amigos.

Finalmente, dar las gracias a todos aquellos que en algún momento me han prestado su ayuda, pues todos ellos han aportado algo a esta tesis.



Índice

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	9
SUMMARY	13
1. Introduction.....	15
2. Material and methods.....	18
2.1. Experimental organisms and culture conditions	18
2.2. Fluctuation analysis of salinity-sensitive to salinity-resistance transformation	19
2.3. Ratchet protocol: The limit of resistance	20
2.4. Evolutionary rescue experiment.....	21
3. Results and discussion	22
CAPÍTULO 1. Introducción general	29
1.1. El Antropoceno	31
1.2. Respuestas de los microorganismos ante los cambios producidos en el Antropoceno.....	33
1.3. El estudio de la evolución mediante microorganismos	35
1.4. Evolución experimental y sus aplicaciones ecológicas	37
1.5. La evolución experimental y el Antropoceno: casos de estudio en ecosistemas de agua dulce	38
1.5.1. Importancia socio-ecológica de los ecosistemas de agua dulce.....	38
1.5.2. Salinización de ecosistemas de agua dulce: efecto de la salinidad sobre las comunidades microbianas	40
1.5.3. Aumento de las concentraciones de herbicidas en los ecosistemas de agua dulce: efecto del diurón y del glifosato sobre organismos fitoplanctónicos	41
1.5.4. Relación entre la variabilidad fenotípica y la calidad ambiental	43
1.6. Objetivos.....	44
1.7. Objectives	45
CAPÍTULO 2. La resistencia de la cianobacteria tóxica de agua dulce <i>Microcystis</i> <i>aeruginosa</i> a salinidad se logra mediante la selección de mutaciones espontáneas	47
2.1. Introducción	49
2.2. Material y métodos	51

2.2.1. Organismo experimental y condiciones de cultivo	51
2.2.2. Efecto de la salinidad sobre la tasa de crecimiento	52
2.2.3. Análisis de fluctuación de la sensibilidad a la resistencia a salinidad	52
2.2.4. Equilibrio mutación-selección.....	55
2.2.5. Detección del límite de resistencia a salinidad.....	55
2.2.6. El coste fisiológico de la resistencia en la tasa de crecimiento	57
2.2.7. El coste de la resistencia en la tasa neta de fotosíntesis y en la tasa de transporte de electrones	58
2.3. Resultados.....	60
2.3.1. Efecto de la salinidad sobre la tasa de crecimiento	60
2.3.2. Análisis de fluctuación de la transformación de la sensibilidad a la resistencia a salinidad.....	61
2.3.3. Detección del límite de resistencia a salinidad.....	62
2.3.4. El coste fisiológico de la resistencia a salinidad en la tasa de crecimiento... 63	
2.3.5. El coste de la resistencia a salinidad en la tasa neta de fotosíntesis y en la tasa de transporte de electrones	64
2.4. Discusión	66

CAPÍTULO 3. El límite de la resistencia a salinidad en la cianobacteria de agua dulce *Microcystis aeruginosa* está modulado por la tasa de aumento de salinidad 71

3.1. Introducción	73
3.2. Materiales y métodos	75
3.2.1. Organismo experimental y condiciones de cultivo	75
3.2.2. Diseño experimental: protocolo de trinquete a diferentes tasas de deterioro 75	
3.2.3. Aclimatación vs. adaptación.....	77
3.2.4. Rendimiento cuántico efectivo, amortiguamiento fotoquímico y amortiguamiento no fotoquímico de las cepas sensibles y resistentes.....	78
3.3. Resultados.....	80
3.3.1. Efecto de la salinidad sobre la tasa de crecimiento	80
3.3.2. El límite de la resistencia a salinidad en función de la tasa de incremento salino	81
3.3.3. Aclimatación vs. adaptación.....	84
3.3.4. Diferencias en rendimiento cuántico efectivo, amortiguamiento fotoquímico y amortiguamiento no fotoquímico de las cepas sensibles y resistentes.....	84

3.4. Discusión	89
CAPÍTULO 4. Roles de la dispersión y la tasa de incremento en el rescate evolutivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> bajo selección por salinidad.....	93
4.1. Introducción	95
4.2. Material y métodos	100
4.2.1. Organismo experimental y condiciones de cultivo	100
4.2.2. Experimento de rescate evolutivo	100
4.3. Resultados	104
4.4. Discusión	107
CAPÍTULO 5. El límite de la resistencia a herbicidas en organismos fitoplanctónicos de agua dulce.....	111
5.1. Introducción	113
5.2. Material y métodos	115
5.2.1. Organismos experimentales y condiciones de cultivo	115
5.2.2. Efecto tóxico de los herbicidas sobre la tasa de crecimiento	115
5.2.3. El límite de la resistencia a herbicidas	116
5.2.4. El coste fisiológico de la resistencia a herbicidas	118
5.3. Resultados	119
5.3.1. Efecto de los herbicidas sobre la tasa de crecimiento	119
5.3.2. Detección del límite de la resistencia a herbicidas.....	119
5.3.3. El coste fisiológico de la resistencia a herbicidas en la tasa de crecimiento	121
5.3.4. El coste de la resistencia a herbicidas en la tasa neta de fotosíntesis y en la tasa de transporte de electrones	122
5.4. Discusión	124
CAPÍTULO 6. The role of changes in environmental quality in multitrait plastic responses to environmental and social change in the model microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.....	129
6.1. Introduction.....	131
6.2. Material and methods.....	133
6.2.1. Experimental organism and culture conditions	133
6.2.2. Experimental Design	133
6.2.3. Population growth rate	135
6.2.4. Estimation of cell size and relative chlorophyll autofluorescence.....	136

6.2.5. Photosynthesis and respiration measurements	136
6.2.6. Reactive oxygen species assay	137
6.2.7. Growth response to conspecifics	137
6.2.8. Statistical analysis	139
6.3. Results.....	140
6.4. Discussion.....	149
6.4.1. Environmental quality affects phenotypic variation	149
6.4.2. Phenotypic diversity and responses to conspecifics.....	150
CAPÍTULO 7. Discusión General.....	153
CONCLUSIONES	167
REFERENCIAS	171
Índice de Figuras	209
Índice de Tablas.....	217
Índice de Ecuaciones	219
ANEXOS	221
Anexo 1. Información complementaria de los organismos experimentales	223
Anexo 2. Supplementary information of chapter 6.....	225
Anexo 3. Artículos publicados en revistas de impacto	231

ABREVIATURAS

<i>a</i>	Absortancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BG11	Medio de cultivo: <i>Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution</i>
CC _m	Concentración celular de <i>Microcystis aeruginosa</i>
CC _c	Concentración celular de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CC _d	Concentración celular de <i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>
CE	Comunidad Europea
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i> (Chlorophyll <i>a</i>)
CV	Coefficiente de variación
DE	Tipo de deterioro
DI	Tipo de dispersión
DMA	Directiva Marco del agua
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR	Tasa de respiración en oscuridad (<i>dark rate</i>)
ec	Ecuación
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
EPSPS	5- enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa
<i>ETR</i>	Tasa de transporte de electrones (<i>electron transport rate</i>)
<i>ETR-I</i>	Tasa de transporte de electrones vs. irradiancia
<i>ETR</i> _{max}	Tasa de transporte de electrones saturada por la irradiancia
<i>F</i> ' ₀	Fluorescencia mínima de muestras preincubadas en luz
<i>F</i> ' _m	Fluorescencia máxima de muestras preincubadas en luz
<i>F</i> ₀	Fluorescencia mínima de muestras preincubadas en oscuridad
<i>F</i> _m	Fluorescencia máxima de muestras preincubadas en oscuridad
<i>F</i> _t	Fluorescencia transitoria de muestras preincubadas en luz
<i>F</i> _v	Fluorescencia variable de muestras preincubadas en oscuridad y calculada como $F_m - F_0$
<i>g</i>	Número de generaciones
<i>I</i>	Irradiancia
<i>I</i> _{0,5}	Constante de semisaturación para la irradiancia.
<i>I</i> _c	Punto de compensación para la luz

m	Tasa de crecimiento
m_1	Tasa de crecimiento de células resistentes en medio no selectivo
m_2	Tasa de crecimiento de células resistentes en medio selectivo
MaAVc ^{rt}	Células de la cepa MaAVc resistentes a salinidad derivadas del experimento de trinquete
MaAVc ^s	Células de la cepa MaAVc silvestres
m^f	Tasa de crecimiento de células resistentes
m^s	Tasa de crecimiento de células sensibles
N_0	Número de células a tiempo=0
nc	Crecimiento celular no detectado
NPQ	Parámetro de Amortiguamiento no fotoquímico calculado como $Y(NPQ)/Y(NO)$
NPR	Tasa de fotosíntesis neta (<i>net photosynthesis rate</i>)
NPR-I	Tasa de fotosíntesis neta vs. irradiancia
NPR _{max}	Tasa de fotosíntesis neta máxima (<i>maximal net photosynthesis rate</i>)
N_t	Número de células a tiempo t
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
PAM	Pulso de amplitud modulada
PAR	Radiación fotosintéticamente activa (<i>Photosynthetically Active Radiation</i>)
PSI	Fotosistema I (P700) (<i>photosystem I</i>)
PSII	Fotosistema II (P680) (<i>photosystem II</i>)
q	Frecuencia de alelos resistentes en poblaciones salvajes
q_N	Amortiguamiento no fotoquímico (<i>non-photochemical quenching</i>)
q_p	Amortiguamiento fotoquímico (<i>photochemical quenching</i>)
RE	Rescate evolutivo
s	Tasa de eliminación selectiva (coeficiente de selección)
UE	Unión Europea
$Y(II)$	Rendimiento cuántico efectivo del PSII calculado como $(F'_m - F_t)/F'_m$
$Y(NO)$	Amortiguamiento no fotoquímico y no regulado calculado como F_t/F_m
$Y(NPQ)$	Amortiguamiento no fotoquímico y regulado calculado como $(F_t/F'_m) - (F_t/F_m)$.
α^{ETR}	Eficiencia fotosintética estimada por la relación <i>ETR-I</i>
α^{NPR}	Eficiencia fotosintética estimada por la relación <i>NPR-I</i>
β	Parámetro de fotoinhibición

μ	Tasa de mutación
σ	Desviación típica

***Abbreviations list for chapter 6**

C	Control
<i>Chl</i>	Relative chlorophyll autofluorescence per cell
<i>CUE</i>	Carbon use efficiency
<i>GPR</i>	Gross photosynthesis rate
H ₂ DCFDA	2,7-dichlorofluorescein diacetate
HCO ₂	High CO ₂
HL	High light
HT	High temperature
LL	Low light
<i>m</i>	Growth rate
<i>m_c</i>	Growth rate of a population when is growing in the presence of non-self competitor
<i>m_{mc}</i>	Growth rate of mono-culture ‘control’ conditions (self competitor; the same population is growing inside and outside of ThinCert™)
PCA	Principal components analysis
<i>R</i>	Respiration rate
RM	Reduced media
ROS	Relative intracellular reactive oxygen species



RESUMEN





1. Resumen

Durante las últimas décadas, numerosas evidencias indican que se está produciendo un Cambio Global, causado fundamentalmente por las actividades humanas. Como consecuencia, algunos autores han sugerido que estamos siendo testigos de un nuevo período geológico denominado Antropoceno. Los nuevos escenarios generados por el Cambio Global afectan negativamente a los ecosistemas. Todo ello está provocando una crisis de biodiversidad (“la sexta extinción”), la cual ha sido ampliamente explorada para vertebrados terrestres y algunos otros grupos. Sin embargo, hay una gran falta de conocimiento sobre cómo los microbios responderán a los nuevos escenarios ambientales generados por el Cambio Global. En el caso de los medios dulceacuícolas las alteraciones incluyen, entre otras, el incremento de las concentraciones de NaCl y de herbicidas. En particular, dado que los organismos fitoplanctónicos son los principales productores primarios de los ecosistemas acuáticos, entender cómo estos organismos responderán a las nuevas situaciones ambientales es muy relevante desde el punto de vista ecológico.

El trabajo desarrollado en esta tesis explora la dinámica del rescate evolutivo, el límite de resistencia y el coste fisiológico asociado a la resistencia en diversas especies de fitoplancton, bajo selección por salinidad y herbicidas. Para ello, se utilizaron como organismos modelo cianobacterias y microalgas verdes de agua dulce, ya que pueden cultivarse fácilmente en el laboratorio, presentan reproducción asexual, sus tasas de crecimiento son relativamente altas y es posible obtener desde decenas a cientos de generaciones en tiempos relativamente cortos. Además, se exploró en el laboratorio de la Dr. Collins (Universidad de Edimburgo) el papel de la calidad ambiental en la variabilidad fenotípica de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard.

La cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing es capaz de sobrevivir, a condiciones previamente letales de salinidad, gracias a la selección de variantes genéticas resistentes originadas por mutaciones espontáneas. Conjuntamente, se exploró el límite de la resistencia de diferentes cepas de *M. aeruginosa* a salinidad, y se observó que dicho límite varía en función de la cepa y de la tasa de incremento de salinidad. Además, se demostró que los eventos de rescate evolutivo pueden evitar la extinción de metapoblaciones de *M. aeruginosa* expuestas a condiciones letales de salinidad.

Mediante el protocolo de trinquete se observó que la cianobacteria *M. aeruginosa* y las clorofíceas *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) Komárek & Perman y *C. reinhardtii* son capaces de sobrevivir a condiciones letales de los herbicidas diurón y glifosato, debido a la selección de nuevas variantes genéticas. Los límites de la resistencia a herbicidas difirieron entre los organismos. Se detectó una disminución de la tasa de crecimiento y de la capacidad fotosintética en todas las cepas resistentes derivadas de los experimentos de trinquete (salinidad y herbicidas).

Se observó una relación entre la calidad ambiental y la variabilidad fenotípica de *C. reinhardtii*. Específicamente, se detectó mayor variabilidad fenotípica a mayor calidad ambiental. Por lo tanto, entender si las poblaciones experimentan el cambio ambiental como un aumento o una disminución de la calidad ambiental podría contribuir a mejorar las estimaciones sobre las respuestas plásticas de los microorganismos fotosintéticos en los nuevos escenarios del Cambio Global.

SUMMARY



1. Introduction

During the last decades, abundant evidence indicates that humans are producing a Global Change, in fact, it has been suggested that we are witnesses of a new geological period denominated Anthropocene (Waters *et al.*, 2016). The Anthropocene is characterized, above all, by declining biological diversity worldwide, in both numbers of species and genetic variability within species (Ceballos *et al.*, 2010, 2015, 2017; Ceballos & Ehrlich, 2018). Human impacts on the ecosystems may include biota homogenization, proliferation of opportunistic species including pests and weeds, and emerging diseases (Myers & Knoll, 2001). Indeed, extinction rates are 100 to 1000 times higher than the extinction rate expected if there were no anthropic actions (Ehlers & Krafft, 2006) and they are increasing due to human activities (Dirzo *et al.*, 2014; Ceballos *et al.*, 2015, 2017). Consequently, it has been estimated that 300-30,000 species disappear annually from a total of >10 million (Woodruff, 2001). Although the biodiversity crisis has been extensively explored for terrestrial vertebrates and some other groups (Albert *et al.*, 2020), there is a lack of knowledge about how microbes will respond to new environmental scenarios generated by global change. Studies on bacteria and protists are clearly necessary because most life on Earth, as well as biogeochemical cycles, depend on them (Woodruff, 2001). Since microalgae and cyanobacteria are the main primary producers of aquatic ecosystems (Falkowski & Raven, 1997), understanding how these organisms can evolve in scenarios of intense environmental deterioration is very relevant from the ecological point of view.

Numerous studies have assumed that ecological responses (phenotypic variability) of an organism would be the only way it could avert adverse rapid effects generated by environmental deterioration. However, there is ample evidence that, at least in microorganisms, the challenges of environmental deterioration can also be overcome through rapid evolutionary processes (Costas *et al.*, 2001; López-Rodas *et al.*, 2001; Huertas *et al.*, 2011; Flores-Moya *et al.*, 2012). When natural ecosystems are exposed to strong anthropic influences, the survival of populations could be possible by gene expression (acclimation) if the appropriate genetic variation is present (Bañares-España *et al.*, 2006, 2007), or if the mutation rate (adaptation) is so high that it compensates for the deterioration rate (Bell & Collins, 2008). The classic example is antibiotic resistance in pathogenic bacteria (Levin *et al.*, 1997; Perron *et al.*, 2008; Vogwill *et al.*, 2016);

however, it has been observed that large microbial populations could be extinguished under severe pollution (Kwiatkowski & Roff, 1976). For this reason, there is recent concern related to the possibility that the rate of environmental deterioration exceeds the adaptive capacity of microbial populations. Therefore, it is necessary to ask, if the selection pressure increases, how far is it possible for that organism to resist? If selective pressure increases over time, mutation-selection events may be suspected at each step but, when the pressure is extremely high, survival should no longer be possible. To detect the potential limit of resistance, Reboud *et al.* (2007) proposed an experimental design that maximized the appearance of mutants in the green alga *Chlamydomonas*. In a ratchet protocol, very large population sizes (to ensure the occurrence of resistant cells) were used and were selected with successive steps at normally lethal doses of an herbicide. Huertas *et al.* (2010, 2011) and Rouco *et al.* (2014) modified this experimental design to explore the maximum resistance to contaminants and temperature in cyanobacteria and microalgae, and they demonstrated that maximum resistance varied among different taxonomic and ecological groups. Here, a ratchet protocol was applied to explore the maximum resistance to salinity of *M. aeruginosa* and the maximum resistance to herbicides of *M. aeruginosa*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dictyosphaerium chlorelloides*. Furthermore, I explored whether the maximum resistance was determined by environmental deterioration rate.

Recent studies of experimental evolution have explored whether rapid evolutionary events can occur and prevent population extinction. The persistence and recovery of populations under intense selection pressure is known as evolutionary rescue (ER). There is a lack of knowledge about the functioning of evolutionary rescue in nature, and even less is known about how to predict when it might occur. The theoretical principles of ER have been proposed (Gomulkiewicz & Holt, 1995; Orr & Unckless, 2008) and an increasing number of experimental designs are proposed to test this theory (Bell & Gonzalez, 2009, 2011; Agashe *et al.*, 2011; Fussmann & Gonzalez, 2013; Low-Décarie *et al.*, 2015; Martín-Clemente *et al.*, 2019; Fugère *et al.*, 2020). These previous studies demonstrated that population size (demographic), genetic, and environmental factors influence the probability of ER. Understanding the factors that modulate ER is essential to protect threatened species, and it can be useful for design of strategies to combat antibiotic resistance, however there is much work still to be done based on basic conceptual approaches.

Furthermore, there have been few laboratory experiments that explore which factors determine ER for phytoplankton (Martín-Clemente *et al.*, 2019; Fugère *et al.*, 2020). Consequently, exploring whether ER can avert the extinction of phytoplankton could be an interesting topic from an ecology and evolutionary perspective. I was therefore motivated to explore whether ER could avert the extinction of the toxic cyanobacterium *M. aeruginosa* under lethal salinity conditions. From an ecological point of view, this can provide information about the factors that influence the survival of *M. aeruginosa* subjected to increasing salinity in fresh and brackish waters. From an evolutionary point of view, understanding how deterioration rate and dispersal among populations determine ER is fundamental to developing accurate mathematical models to predict ER outcomes.

Another important evolutionary question is the physiological cost of resistance (Lenski, 1998; Andersson & Levin, 1999). Physiological cost usually produces a decrease of the growth rate of the resistant population compared to ancestral organisms that have not achieved resistance. However, physiological cost of resistance (usually due to mutation) could also be reflected in other phenotypic characters, although this has been scarcely explored (Coustau *et al.*, 2000; Bañares-España *et al.*, 2016). In the case of cyanobacteria and microalgae, it has been observed that the resistance to various selective agents imposes a decrease of the growth rate of resistant cells compared with their ancestors, evoking a mutation-selection balance (López-Rodas *et al.*, 2001; Flores-Moya *et al.*, 2005; Costas *et al.*, 2007, 2008). In addition, drastic changes in cellular morphology and photosynthetic response have been detected (López-Rodas *et al.*, 2008b; Fernández-Arjona *et al.*, 2013; Bañares-España *et al.*, 2016). The physiological cost could have important ecological consequences because the contribution to primary production of resistant populations could be significantly less than non-resistant populations occurring in unaltered ecosystems.

The general aim of this thesis was to explore the dynamics of evolutionary rescue, the limits of resistance, and the physiological cost of resistance. For this purpose, freshwater cyanobacteria and green microalgae were used as model organisms, because they can be kept in culture by asexual reproduction, their growth rates are relatively high and they are easy to grow, generating tens to hundreds of generations in relatively short times. The selection pressure for environmental deterioration in freshwater bodies was simulated by increments in salinity and herbicides. Additionally, I explored with Dr. Collins (university of Edinburgh) the role of changes in environmental quality in

multitrait plastic responses to environmental and social change in the model microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. In this sense, the role of environmental quality in modulating plastic responses is relatively understudied; most eco-evolutionary experiments are built on a long tradition of experiments in toxic, starvation, or otherwise stressful environments. For these reasons, we test how environmental changes that encompass both amelioration and degradation affect intraspecific trait variation. Second, we explore whether differences in trait variability across abiotic environments affects responses to biotic environments by examining the relationship between maximum population growth rate in monoculture and in indirect co-culture with conspecifics across a range of environmental qualities. Finally, we discuss the potential implications of our results in terms of the potential for rapid evolution by genotype sorting following abrupt environmental shifts.

2. Material and methods

2.1. Experimental organisms and culture conditions

Three phytoplankton species, supplied by the Algal Culture Collection of the Universidad Complutense (Madrid, Spain), were used in the experiments performed at the University of Malaga; three strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Ma1Vc, Ma5Vc and MaAVc), and two strains of chlorophytes (*Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) Komárek & Perman and *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard) were used in the experiments (Dc1M and ChlaA, respectively). *Microcystis aeruginosa* strains were isolated from Valmayor reservoir (Community of Madrid, Spain), *D. chlorelloides* was isolated from a pristine mountain lake in the Sierra Nevada (Andalusia, Spain), and *C. reinhardtii* was isolated from a freshwater pond in Doñana National Park (Andalusia, Spain). The cultures were grown axenically in 250 mL ventilated cell culture flasks covered with filter screw-caps (Greiner; Bio-One, Longwood, NJ, USA), containing 60 mL of BG11 medium (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), diluted 50% (BG11-50%). I did not find significant differences in the growth rate whether I used BG11 medium or BG11-50%. Cultures were incubated at 20 °C under a continuous photon flux density of 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband

400–700 nm, provided by cool-white fluorescent lamps (Sylvania GroLux 36W, Germany). Cultures were maintained in mid-log exponential growth by serial transfers of an inoculum to fresh medium every week.

The strains CC-125, CC-1691, and CC-2931 of *Chlamydomonas reinhardtii* were used in the experiments performed at the university of Edinburgh. Strain populations were previously exposed to either ambient CO₂ or high CO₂ (2000 ppm) during 90 growth cycles (~ 180 d; Lindberg & Collins, 2020). For each strain, I used 3 independently-evolved high CO₂ populations, and 3 independently-evolved ambient CO₂ populations, for a total of 18 independently-evolved populations for this study. All populations were grown in sterile microwell plates in 2 mL of modified Tris-Acetate-Phosphate (TAP) medium at a standard temperature of 25 °C (Lindberg & Collins, 2020). Growing populations were maintained in mid-log exponential growth by serial transfers of an inoculum (1% of each culture, ~10⁴ cells) to fresh medium three times per week.

2.2. Fluctuation analysis of salinity-sensitive to salinity-resistance transformation

Fluctuation analysis makes it possible to distinguish between cells that show resistance due to acclimation process (i.e. gene expression) and resistant cells caused by spontaneous mutations that occur randomly during propagation prior to exposure to selective agent (Luria & Delbrück, 1943). The experiment consists of two culture sets. Set “1” consist of around 100 tubes considered as independent populations (derived from clone ancestral population, with almost zero genetic variability) in which around 10² cells are inoculated in each tube (low number of cells to minimize the presence of resistant cells), in a culture medium without selective agent. The tubes are incubated to a concentration of 10⁵ cells per tube. Once this cell count has been reached, the selective agent is added at the lethal concentration that has been previously determined (at the same time as Set “2” is founded). Set “2” consists of approximately half of tubes present in Set “1”, in which 10⁵ cells are directly inoculated from the same ancestral population used in Set “1”. In this case, the culture medium in which the cells are inoculated has the same lethal concentration to which the Set “1” has been exposed.

Three different results can be found when a fluctuation analysis is performed; each of them can be interpreted as independent consequence of three distinct phenomena. i) If a large variation (on a cells per culture basis) is observed on experimental Set “1”,

resistant cells appear only by mutations that occurred randomly before the addition of the selective agent (adaptation). This is because the mutation happens randomly, so it can occur earlier in some cultures (and therefore I will find many resistant cells), or late in others, or may not happen at all in many cultures. ii). If there is no variation within experimental Set “1”, then resistant cells appear by gene expression (acclimation) because all cells have the same chance of acquired resistance. iii) If resistant cells are not detected, the resistance to these concentrations of selective agent is not possible.

Fluctuation analysis was performed to disentangle whether the resistance of *M. aeruginosa* (strain MaAVc) to lethal salinity concentration was based on acclimation or adaptation. In addition, mutation rates and equilibrium mutation-selection were calculated using the results derived from fluctuation analysis.

2.3. Ratchet protocol: The limit of resistance

This experiment consists of exposing large populations to increasing concentrations of selective agent, in such a way that the large population size ensures the appearance of mutations that allow survival. As soon as populations reach a pre-determined cell concentration, they are exposed to a higher concentration of the selective agent. This experiment has been used previously to detect the limit of resistance of phytoplankton to anthropogenic and natural selective agents (Reboud *et al.*, 2007; Huertas *et al.*, 2010; Rouco *et al.*, 2014; Martín-Clemente *et al.*, 2019)

The experimental design consists of exposing different populations to successive increments of a selective agent. Specifically, four replicates of control cultures containing growth medium and four replicates of cultures exposed to selective agent are prepared. Each replicate is inoculated with a high cell concentration ($300,000 \text{ mL}^{-1}$ cells depending on the species) and is maintained under selective conditions during a specific time (depending on species). After that time, the cell concentration in each replicate is determined and compared to the growth in the control populations. The experimental population is moved to the ratchet's next cycle (the next selective concentration) when it reaches a cell concentration at least the same as that of the control population. If the cell density achieved by treatment cultures is not adequate, they are kept at the same selective agent concentration during another ratchet cycle, pending the next determination. It is important to mention that each culture is considered as in independent population.

Therefore the transfer of each of them to the next selection level will be independent of the other replicates. The selection protocol ends after 100 d, not based on growth of experimental populations. The maximum level of resistance that allows the growth for each strain is considered the maximum resistance to a particular selective agent. Depending on the selective agent and the ability of each species to evolve resistance, the number of ratchet cycles will be different.

The ratchet protocol was performed to explore the limit of resistance of three strains of *M. aeruginosa* to salinity, and to investigate the limit of resistance of two chlorophyceans (*Dictyosphaerium chlorelloides* and *Chlamydomonas reinhardtii*) and a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) to two widely used herbicides, glyphosate [*N*-(phosphonomethyl) glycine] and diuron [3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea].

A modification of the ratchet protocol was performed to explore whether the rate of environmental deterioration can determine the limit of resistance. This experiment was performed with three strains of *M. aeruginosa* exposed to increasing salinity levels.

It is necessary to highlight that the ratchet protocol is not designed to disentangle whether the observed limit of resistance of a microorganism to a selective agent results from a process of acclimation or adaptation. For this reason, in order to disentangle between both mechanisms, the approach followed by Rouco et al. (2014) was applied. This complementary experiment is based on that, at least for bacteria, acclimation effects processes, including epigenetic events, can span two-three generations (Bennet & Lenski, 1997).

2.4. Evolutionary rescue experiment

The experimental design is based on metapopulations that are subjected to different combinations of environmental deterioration and dispersal mode. To generate metapopulations, I cultured individual populations in standard 96-well plates where each well corresponded to an individual population. To minimize the probability of including previous mutations that may have accumulated during culture maintenance (mutation-selection balance), the ancestral population used to generate metapopulations was obtained from a single cell through serial dilutions (Andersen & Kawachi, 2005). Thus, genetic variability was minimal at the beginning of experiments, and thereafter resistance was generated by mutations and changes in gene expression. Then a NaCl concentration

gradient was established on the plate from left to right to simulate a range of habitats within the metapopulations.

Specifically, I imposed six different combinations of two deterioration rates (control = no deterioration, and progressive deterioration) and three dispersal modes (control, no dispersal; local dispersal; global dispersal), and cultures under each treatment were subjected to four NaCl concentration gradient (from non-lethal to lethal concentration).

To simulate the two deterioration rates, cultures were transferred to the next salinity gradient at different rates. Populations were transferred to the next gradient every four weeks in the progressive deterioration treatment. In the no-deterioration treatment, cultures remained at first level for twelve weeks before the transfer to lethal level. In all treatments, cultures were kept at lethal level for four weeks, after which the number of ER events was calculated.

To simulate the three dispersal modes, all cultures were transferred weekly to new medium in three different ways: No-dispersal was achieved by transferring a population aliquot to new medium. Local dispersal was achieved by mixing the six experimental populations subjected to the same salinity concentration; for this purpose, 50 μL of each cell culture was placed in an Eppendorf tube and mixed. From this mixture, six 3 μL aliquots were transferred to six new wells with new medium. For global dispersal simulation, all 30 populations from the same salinity gradient were mixed (all populations of the same plate regardless of salinity level) as indicated before, and thirty aliquots of 3 μL were transferred to the corresponding new media.

After eight transfers the no deterioration treatment and deterioration treatment were transferred to the lethal NaCl concentration gradient for 4 transfers. An evolutionary rescue event was scored if the growth rate at the end of the 4 transfers was positive. If the final growth rate is positive, it is possible to affirm that ER has occurred, and that the population averted extinction.

3. Results and discussion

Phytoplanktonic organisms have experienced many episodes of biodiversity loss and mass extinctions throughout the Earth's history, and there is abundant evidence that

present global change is negatively affecting phytoplanktonic organisms (Boyce *et al.*, 2010). For this reason, during recent years there is increasing attention toward the adaptation potential of phytoplankton organism (e.g. Padfield *et al.*, 2016; Schaum *et al.*, 2017; O'Donnell *et al.*, 2018; Beckmann *et al.*, 2019). In this vein, I explored the adaptative responses of some phytoplanktonic organism to different scenarios generated by global change.

The mechanisms involved on the resistance (acclimation *vs.* adaptation) of the strain MaAVc of *M. aeruginosa* to salinity were tested by a fluctuation analysis design, and its limit of resistance to salinity was studied by a ratchet protocol experiment. Whereas a dose of 10 g L⁻¹ NaCl completely inhibited the growth of *M. aeruginosa*, salinity-resistant variants (capable of tolerating up to 14 g L⁻¹ NaCl) were isolated in the fluctuation analysis experiment. Such tolerance to salinity has been previously observed in other strains of *M. aeruginosa* (Preece *et al.*, 2017). I determined that the salinity-resistant cells arose by spontaneous mutations at a rate of 7.3×10^{-7} mutants per cell division. This mutation rate was of the same order of magnitude as that found in this species for resistance to glyphosate and sulphureous waters (López-Rodas *et al.*, 2007; Fernández-Arjona *et al.*, 2013), one order of magnitude lower than that found for resistance to copper and temperature (García-Villada *et al.*, 2004; Costas *et al.*, 2014) and two orders of magnitude lower than that found for resistance to petroleum standard and diesel oil standard (Romero-López *et al.*, 2012). Additionally, a mutation-selection equilibrium was derived from the results of fluctuation analysis, and I showed that the presence of salinity-resistant cells in natural populations of *M. aeruginosa* is maintained by the recurrent appearance of mutants and their elimination by selection, yielding an equilibrium frequency of approximately 1 salinity-resistant cell per 10⁶ cells. Moreover, ratchet protocol results showed that three independent culture populations of the strain MaAVc of *M. aeruginosa* were able to adapt to up to 15.1 g L⁻¹ NaCl, suggesting that successive mutation-selection processes can enhance the highest salinity level that *M. aeruginosa* cells can tolerate. In this sense, I proposed that increasing salinity in water reservoirs could lead to the selection of salinity-resistant mutants of *M. aeruginosa*. Additionally, the net photosynthesis rate and electron transport rate were lower in salinity resistant cells than in sensitive ones, suggesting that genetic changes that provide salinity resistance have a physiological cost for photosynthesis (at least on the reactions that occur in the light phase). This result is consistent with recent studies where it has been observed

that salinity has a negative effect on the photosynthetic activity of *M. aeruginosa* (Ross *et al.*, 2019; Des Aulnois *et al.*, 2020).

Secondly, an eco-evolutionary approach, based on a ratchet protocol, was used to investigate the effect of deterioration rate on the limit of resistance to salinity of three strains of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. The cost of the resistance to salinity on photosynthesis and growth rate were also evaluated. I observed that the limit of resistance to salinity that *M. aeruginosa* strains were able to reach depended on the strain and the rate of environmental change. Specifically, more populations (independent of strain) were able to grow at their initial lethal salinity levels when the rate of salinity increment was slow. Using a complementary approach based on growth rate differences between resistant and ancestral cells (Rouco *et al.*, 2014), I determined that the selection of new genetic variants supported the resistance of the three strains to the highest salinity. The cost of resistance was detected as a reduction of growth rate, specifically the growth rates of ancestral cells were 2.2-2.6 times higher than those observed in salinity-resistant cells, in the three strains analyzed. In relation to the photosynthetic cost, non-photochemical energy dissipation was different between sensitive and resistant cells. The differences in the fraction of energy dissipated through regulated photoprotective mechanisms suggested that salinity resistance could impose a decrease in the photoprotection capacity of salinity-resistant cells. The results obtained in ratchet experiments at different rates of environmental change and with different strains could provide insights for understanding, at least in part, the high variability in salinity tolerance of natural populations of *M. aeruginosa* (Sellner *et al.*, 1988; Otsuka *et al.*, 1999; Verspagen *et al.*, 2006; Tonk *et al.*, 2007; Preece *et al.*, 2017). I reasoned that the previous salinity exposure of each strain could produce a different selection of genes, and therefore a great variability in salinity tolerance.

I explored the effect of deterioration rate and dispersal among populations under lethal salinity conditions on the number of evolutionary rescue events in metapopulations of *Microcystis aeruginosa* strain Ma5Vc. I observed that both dispersal among populations and previous exposure to salinity were very strong predictors of the ER outcome in metapopulations. Both dispersal among populations and prior stress exposure favoured the occurrence of ER events, in agreement with ER theory and previous ER experiments (Carlson *et al.*, 2014). Differing from previous experimental studies (Perron *et al.*, 2008; Bell & Gonzalez, 2011), significant interaction between deterioration rate

and dispersion mode was not observed. This suggests that the interaction between these two factors will depend on both the selective agent and organism.

The results of ER experiments can be extrapolated to natural environments. In the case of *M. aeruginosa*, dispersal among populations could be an interesting factor because it has been suggested that horizontal gene transfer could be a mechanism for *M. aeruginosa* to obtain genes involved in salinity resistance (Tanabe *et al.*, 2018, 2019).

The toxic character of *M. aeruginosa* renders this study relevant from an ecotoxicological point of view. In this sense, Tonk *et al.* (2007) suggested that fluctuations in salinity in freshwater ecosystems could affect many organisms because salinities higher than 10 g L⁻¹ NaCl do not limit the survival of *M. aeruginosa* populations, while there is an increase in the concentration of extracellular microcystin. Moreover, it could be possible that the limit of resistance and the probabilities of ER were higher in natural environments, where *M. aeruginosa* cells can be found forming colonies, because cells in the interior of a colony may be more protected from the external environment than individual cells (Liu *et al.*, 2018).

Aquatic ecosystems are suffering anthropogenic impacts apart from the increasing salinity; one of the most important anthropogenic impacts on freshwater aquatic ecosystems near intensive agriculture areas is the continuous increase of herbicide concentrations. The threat is especially serious for phytoplankton organisms, because they may have the same physiological targets as the plants for which herbicides have been designed. For these reasons, I explored the limit of resistance and physiological cost to different phytoplankton organisms when they are exposed to common herbicides diuron and glyphosate. The results showed that a dose of 1 µM diuron or 40 ppm glyphosate completely inhibited the growth of *M. aeruginosa* and *D. chlorelloides*, whereas *C. reinhardtii* growth was completely abolished at 2 µM diuron or 90 ppm glyphosate. However, an increase in tolerance to both herbicides was achieved in certain populations during the ratchet experiment. *Microcystis aeruginosa* and *D. chlorelloides* were able to resist up to 8 µM diuron and 80 ppm glyphosate, whereas *C. reinhardtii* resisted up to twice these herbicide concentrations. In order to disentangle acclimation *vs.* adaptation as components of the resistance to each herbicide, the growth rates of the cells that achieved resistance to the highest herbicide level were compared. The growth rate values of the ancestral wild-type cells were 2-3 times higher than that found in the herbicide-resistant cells, in all three species. In addition, no significant differences between the growth rate values of the herbicide-resistant cells, cultured in the absence or the presence of herbicide

were detected, indicating that the resistance to each herbicide was due to adaptation. Moreover, resistance to both herbicides induces a photosynthetic cost that varies depending on the herbicide and the organism. In the case of diuron, resistance leads to a reduction of NPR_{max} and ETR_{max} values in all organisms, whereas the resistance to glyphosate imposes a reduction of NPR_{max} and ETR_{max} values in chlorophyceans. However, the photosynthetic capacities of the cyanobacterium *M. aeruginosa* did not decrease. This could be related with the differences in PSII structure between chlorophyceans and cyanobacteria (Smedbol *et al.*, 2017). In accordance with these results, I suggest that increasing concentrations of these herbicides in freshwater bodies could induce the selection of herbicide-resistant mutants in phytoplankton communities, but with lower primary production than original populations.

Phenotypic traits play a key role in species' responses to global change; however, little is known about the role of how environmental quality, in determining the population growth rate an environment allows, affects intraspecific variation. For this reason, we (Dr. Collins and me) measured the range of multitrait phenotypes that can be generated over a range of environmental qualities in three strains of the model alga *Chlamydomonas reinhardtii* under laboratory conditions. Secondly, we explore how environmental quality and trait variation affect the predictability of lineage frequencies when lineage pairs are grown in indirect co-culture. Our results show that environmental quality has the potential to affect intraspecific variability both in terms of the variation in expressed trait values, and in terms of the genotype composition of rapidly growing populations. we found that *Chlamydomonas reinhardtii* has a different range of multitrait phenotypes (growth rate, photosynthetic rate, chlorophyll autofluorescence, size cell, and reactive oxygen species production) in environments that differ in terms of quality. Specifically, we found low phenotypic variability in degraded or same-quality environments and high phenotypic variability in ameliorated conditions. Consequently, we suggest that novel high quality environments may at least initially increase diversity more than expected based on increases to system carrying capacity (extra energy input) alone (Stevenson *et al.*, 2008; Gudmundsdottir *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2017; Burson *et al.*, 2018; Richardson *et al.*, 2019). This variation can affect population composition, as monoculture growth rate is a less reliable predictor of lineage frequencies in ameliorated environments. Our study highlights that understanding whether populations experience environmental change as an increase or a decrease in quality relative to their recent history affects the changes in trait variation during plastic responses, including growth responses to the presence of

conspecifics. This results are especially relevant for understanding how environmental quality affects the potential for genotype sorting during rapid, density-independent population growth, such as during the early stages of phytoplankton blooms, or during laboratory experiments that propagate populations by batch culture, and then use competitive assays to quantify fitness gain. This points towards a fundamental role for changes in overall environmental quality in driving phenotypic variation within closely-related populations, with implications for microevolution.

I emphasize that the experiments performed in this thesis must be considered as approximations to reality, since it is impossible to replicate exactly all processes and conditions that occur under natural conditions.

In summary, I explored using diverse eco-evolutionary approaches the mechanisms that allow the survival of some phytoplanktonic organisms under certain environmental scenarios caused by global change. The principal conclusions derived from this thesis are:

M. aeruginosa can survive under previous lethal salinity concentration due to random spontaneous mutations, which occur before exposure to elevated salinity. *M. aeruginosa* strains showed different limits of resistance, determined by the rate of salinity increase. Specifically, the highest salinity resistance was achieved when the rate salinity increment was slow.

Evolutionary rescue can avert the extinction of *M. aeruginosa* metapopulations exposed to lethal salinity conditions, determined by the previous exposure to salinity and dispersion among populations.

Phytoplanktonic organisms could survive under lethal herbicide conditions due to the selection of new genetic variants, and we observed that resistance capacity varies among organisms.

The adaptation of phytoplanktonic organisms to selective agents (salinity and herbicides in this study) impose a physiological cost. This cost was detected as a reduction of growth rate and photosynthetic capacity of resistant cells. Consequently, the increase in salinity and herbicide concentrations in freshwater ecosystems could lead to a decrease in primary production, which could affect higher levels of the trophic chain.

Environmental quality, measured as the maximum population growth rate that an environment allows, affects the range of phenotypes expressed by *C. reinhardtii*. Specifically, multitrait plastic responses increased when environmental quality increased. Additionally, we find that environmental quality (during exponential growth) can

determinate the predictability of lineage frequencies during co-culture, but that this depends on the evolutionary history of the populations

CAPÍTULO 1

Introducción general

“...It is always advisable to perceive clearly our ignorance”

Charles Darwin 1809-1882

The Expression of the Emotions in Man and Animals, 1872



1.1. El Antropoceno

La repercusión de las actividades humanas sobre el medio ambiente comenzó a tener interés a finales del siglo XIX. Se considera que la primera obra relevante que trató sobre la influencia del ser humano en la naturaleza fue *Man and Nature* de George Perkins Marsh publicada en 1864 (Zalasiewicz *et al.*, 2011). Esta obra empezó a cuestionar la creencia de que los recursos eran inagotables y, en consecuencia, que el impacto humano en el medio ambiente era insignificante. Unos años más tarde, el geólogo y paleontólogo italiano Stoppani (1873) propuso el término “antropozoico” para indicar que la Tierra estaba en una nueva era debido a que se podía observar una huella geológica como consecuencia de las actividades de los seres humanos. Sin embargo, la preocupación por el efecto del desarrollo humano sobre el medio ambiente se consolidó con la publicación de *Man’s Role in Changing the Face of the Earth* (Thomas, 1956). En esta línea de pensamiento es necesario mencionar la publicación de *Silent Spring* (Carson, 1962), la cual ha sido considerada como la obra que marcó un antes y un después en la conciencia ecológica. *Silent Spring* puso de manifiesto los efectos negativos del DDT sobre la vida silvestre. Su repercusión fue tan notable que provocó la prohibición del uso DDT en Estados Unidos y favoreció la creación de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. A pesar de estas publicaciones, donde claramente se demostraban los efectos del ser humano sobre el planeta, la propuesta de Stoppani del término “antropozoico” no se impuso hasta el año 2002, cuando Paul Crutzen, ganador del Premio Nobel de Química (1995), afirmó que habíamos dejado atrás el Holoceno y habíamos entrado en un nuevo periodo geológico: el Antropoceno (Crutzen, 2002).

El término Antropoceno se usa actualmente, de manera informal (no ha sido aprobado por Comisión Internacional de Estratigrafía), para abarcar los cambios geológicos, ecológicos, sociológicos y antropológicos en la historia reciente de la Tierra (Waters *et al.*, 2016). La repercusión de este término en el ámbito científico va en aumento; por ejemplo, la editorial Elsevier creó, en 2013, una nueva revista titulada *Anthropocene*. Además, se han llevado a cabo multitud de estudios para exponer evidencias de cambios producidos o acelerados por la acción del ser humano (Steffen *et al.*, 2011, 2018; Webster *et al.*, 2018; Zalasiewicz *et al.*, 2018).

Desde el punto de vista geológico, una gran parte de la comunidad científica argumenta que el Antropoceno puede considerarse como una nueva era distinta al

Holoceno, pues se han registrado nuevas firmas estratigráficas; por ejemplo, el uso de pesticidas ha provocado un aumento en los niveles nitrógeno y fósforo, la carrera armamentística ha provocado un exceso de radionucleidos como el ^{14}C y el ^{239}Pu o se han detectado firmas estratigráficas de aluminio, hormigón, plásticos, hidrocarburos poliaromáticos o bifenilos policlorados (Waters *et al.*, 2016). Otros acontecimientos que también podrían señalar el inicio de esta nueva era geológica son: i) cambios en la composición atmosférica ligados a un aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (Steffen *et al.*, 2011); ii) cambios en los registros climáticos (Haywood *et al.*, 2011); iii) aumento de la temperatura, acidificación y eutrofización de los océanos (Tyrrell, 2011); iv) cambios en el flujo de los sedimentos (Syvitski & Kettner, 2011); y v) procesos de desertización como consecuencia de malas prácticas agrícolas (Wilkinson, 2005). Todos estos cambios han tenido grandes efectos sobre la biodiversidad: las tasas de extinción son de 100 a 1000 veces mayores que la tasa esperable si no hubiese acciones antrópicas (Ehlers & Krafft, 2006). Woodruff (2001) señaló que entre 300-30.000 especies desaparecen anualmente de un total de más de 10 millones y se estima que aproximadamente el 75% de las especies se extinguirán en los próximos siglos (Barnosky *et al.*, 2011). Por lo tanto, es posible que estemos ante el sexto evento de extinción masiva de la historia de la vida en la Tierra, si se mantienen las tasas de sobreexplotación de los recursos y pérdida de hábitats actuales (Ceballos *et al.*, 2010, 2015, 2017; Ceballos & Ehrlich, 2018). Independientemente del número de extinciones, las características distintivas de la biosfera futura podrían incluir la homogeneización de la biota, la proliferación de especies oportunistas, el aumento de plagas y malezas, y enfermedades emergentes impredecibles (Myers & Knoll, 2001). Todos estos cambios supondrán una expresión paleontológica que diferirá notablemente del registro fósil del Holoceno y generarán zonas bioestratigráficas reconocibles y novedosas (Kidwell, 2015). Sin embargo, otros investigadores consideran que todos estos cambios ambientales aún no pueden observarse en el registro geológico y que el término Antropoceno es una cuestión más política que científica (Finney & Edwards, 2016).

A pesar del debate sobre la validez del concepto Antropoceno, es innegable que se está generando un nuevo escenario ambiental (Cambio Global) que obligará a los seres vivos a adaptarse para poder sobrevivir. La pérdida de organismos pluricelulares, comunidades y hábitats está ampliamente documentada; sin embargo, el efecto del Cambio Global sobre los microorganismos es aún un campo por explorar (Figura 1). Conocer las posibilidades de supervivencia de los microorganismos es imprescindible

porque intervienen en procesos claves de la biosfera (Woodruff, 2001). En particular, dado que las microalgas y las cianobacterias son los principales productores primarios de los ecosistemas acuáticos (Raven & Falkowski, 1999), comprender cómo estos organismos responderán ante escenarios de intenso deterioro ambiental es clave desde un punto de vista ecológico.

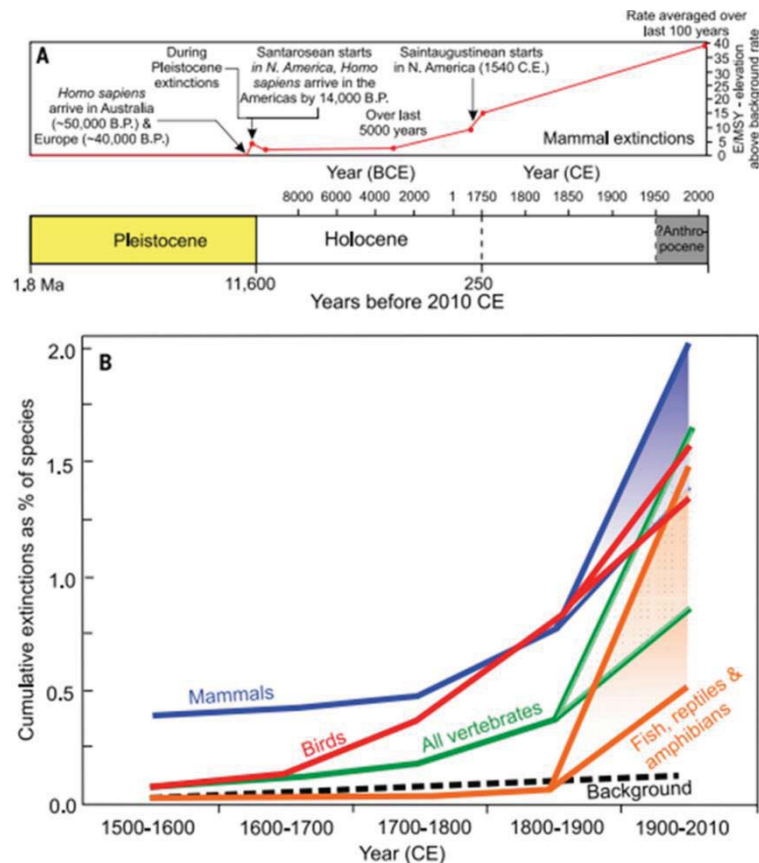


Figura 1. (A) Aumento aproximado en las tasas de extinción de mamíferos desde 2010 CE (CE, Common Era; Ma, millones de años). (B) Acumulación de extinciones de vertebrados referido al porcentaje del total de especies. El sombreado indica la diferencia entre tasas menos conservadoras (incluidas extinciones, extinciones en el medio silvestre, y posibles extinciones) y tasas conservadoras (solo extinciones verificadas). Fuente: Waters *et al.* (2016).

1.2. Respuestas de los microorganismos ante los cambios producidos en el Antropoceno

Las presiones ambientales que soportan los ecosistemas están aumentando a medida que avanzamos en el Antropoceno (Steffen *et al.*, 2011; Webster *et al.*, 2018). De manera general, cuando un organismo se expone a una condición de estrés sus respuestas pueden

ser: i) la evasión, si el organismo dispone de mecanismos de movilidad que permitan escapar de las nuevas condiciones; ii) la adaptación, la cual se detallara más adelante; o, si los niveles de estrés son tan elevados que no permiten ninguna de las respuestas anteriores, lo que ocurrirá será iii) la muerte del organismo. Cuando un organismo se expone a condiciones estresantes, y no tiene movilidad propia, puede sobrevivir gracias a los mecanismos que confieran resistencia. Es posible diferenciar entre aclimatación y adaptación. La aclimatación se basa en la regulación de la expresión génica (Bradshaw, 1991; Belfiore & Anderson, 2001) y dependerá de la plasticidad fenotípica de las poblaciones (Charmantier *et al.*, 2008), de tal manera que aquellas especies con baja plasticidad fenotípica tienen mayor riesgo de extinguirse ante las nuevas condiciones selectivas (Nicotra *et al.*, 2010). La aclimatación puede permitir la supervivencia de una especie hasta un nivel de estrés subletal. Cuando se superan los límites de tolerancia de un organismo, la supervivencia dependerá, exclusivamente, de la adaptación mediante la selección de nuevos genotipos que confieran resistencia través de mutaciones, transferencia horizontal de genes o recombinación genética (Sniegowski & Lenski, 1995; Belfiore & Anderson, 2001; Sniegowski, 2005).

Cuando los organismos no presentan reproducción sexual, la aparición de nuevas variantes genéticas se debe principalmente a mutaciones espontáneas, fundamentalmente producidas por errores en el proceso de replicación del ADN. En los primeros experimentos que expusieron cultivos bacterianos a agentes bacteriófagos se observó que, tras un periodo de tiempo, surgían nuevas variantes que podían sobrevivir en presencia del bacteriófago (Gratia, 1921; d'Herelle & Smith, 1926). Este hecho generó controversia acerca del momento de la aparición de la resistencia; es decir, se debatió sobre si la resistencia aparecía antes o después de estar en contacto con el bacteriófago (Gratia, 1921; d'Herelle & Smith, 1926). Luria & Delbrück (1943) diseñaron un experimento denominado "Análisis de fluctuación" que permitió discernir entre las dos siguientes hipótesis: modelo pre-selectivo, es decir, la aparición de la mutación que confiere la resistencia es consecuencia del azar y previa a que el organismo entre en contacto con el agente selectivo; la hipótesis alternativa (modelo post-selectivo) plantea lo contrario, en este caso la mutación podría aparecer cuando el organismo entra en contacto con el agente selectivo, lo que se denomina *acquired hereditary immunity*. Los resultados obtenidos por Luria & Delbrück (1943) demostraron de forma inequívoca que las mutaciones que ocurren en las bacterias no dependen de la presencia del agente selectivo (Luria & Delbrück, 1943; Lederberg & Lederberg, 1952). No obstante, las conclusiones extraídas

del experimento de Luria & Delbrück (1943) se pusieron en duda debido a la publicación de una serie experimentos en los que se observó la posibilidad de que las condiciones ambientales indujeran la aparición de ciertas mutaciones (conocidas como *adaptive mutations*; Cairns *et al.*, 1988; Hall, 1988). Estos experimentos volvieron a abrir la polémica entre las corrientes neo-Darwinista y neo-Lamarckista (Sniegowski & Lenski, 1995; Roth *et al.*, 2006; Roth, 2010; Maisnier-Patin & Roth, 2015).

Cuando ocurre una mutación que confiere resistencia, si la presión selectiva es constante, los organismos resistentes transmitirán la mutación a la descendencia y la población sobrevivirá. Sin embargo, los cambios ambientales no son constantes y, con el paso del tiempo, los organismos podrían enfrentarse a condiciones cada vez más selectivas (Bell, 2017). Definir los umbrales de tolerancia y los límites de resistencia a nuevos agentes selectivos resulta fundamental pues aportan información vital para entender qué ocurrirá con las comunidades microbianas en las nuevas condiciones ambientales impuestas por el Antropoceno.

En esta tesis se explorarán cómo determinados cambios ambientales están afectando a cianobacterias y microalgas. Previamente, se han realizado numerosos estudios que permiten discernir entre la aclimatación y adaptación de cianobacterias y microalgas a niveles letales de diferentes agentes selectivos de origen natural y antropogénico (Costas *et al.*, 2001, 2007; López-Rodas *et al.*, 2001, 2007, 2008a, b, c; García-Villada *et al.*, 2004; Flores-Moya *et al.*, 2005; Marvá *et al.*, 2010; Fernández-Arjona *et al.*, 2013; Baselga-Cervera *et al.*, 2016a,b; Martín-Clemente *et al.*, 2019). Sin embargo, los límites de la resistencia de estos organismos han sido escasamente explorados (Reboud *et al.*, 2007; Huertas *et al.*, 2010, 2011; Romero-López *et al.*, 2012; Rouco *et al.*, 2014; Martín-Clemente *et al.*, 2019) y esta información resulta de gran interés para poder comprender el devenir de cianobacterias y microalgas en los nuevos escenarios del Antropoceno.

1.3. El estudio de la evolución mediante microorganismos

Los microorganismos, para la mayoría de las personas, son menos familiares que otros organismos que pueden observarse a nuestro alrededor. No obstante, hay que resaltar que son esenciales en la habitabilidad del planeta, pues participan en multitud procesos

biogeoquímicos y climáticos indispensables para el mantenimiento y el desarrollo de la vida (Kasting & Siefert, 2002; Gilbert & Neufeld, 2014). Por ejemplo, existen evidencias de que durante el paso de la era Arcaica a la Proterozoica (hace entre 3.600 y 530 millones de años) se produjo un incremento de la actividad fotosintética de cianobacterias y microalgas que dio lugar a la concentración actual de oxígeno en la atmósfera (Crowe *et al.*, 2013). A pesar de la importancia ecológica de los microorganismos, estos no se incluyeron en la Síntesis Evolutiva moderna (Dobzhansky, 1937; Huxley, 1942; Mayr, 1942; Simpson, 1944). Su exclusión se debió a la hipótesis de que “*no poseían genes en el sentido de unidades discretas del material hereditario*”; por tanto, no estaban sujetos a las mismas normas de “*herencia y evolución que los organismos multicelulares*” (Huxley, 1942). En este sentido, Koonin & Wolf (2012) argumentaron que la ausencia de los microorganismos en la Síntesis Evolutiva moderna se debe a que en aquella época no se tenía suficiente información de la importancia de los microorganismos para entender los procesos evolutivos.

El empleo de microorganismos como modelo de estudio ha sido fundamental para demostrar diversas hipótesis de la Biología Evolutiva. El uso de microorganismos tiene la ventaja de poder trabajar con tiempos de generación cortos y grandes poblaciones en entornos muy controlados (Carlson *et al.*, 2014). Otra ventaja es la posibilidad de “viajar en el tiempo”, pues es posible congelar o preservar microorganismos (deteniendo los procesos evolutivos) y “revivirlos” en el futuro con el objetivo de compararlos con sus descendientes (Dykhuizen & Hartl, 1983; Lenski, 1991). Una cuestión fundamental es que los microorganismos ofrecen la posibilidad de trabajar con poblaciones clónicas. La mayoría de los experimentos con microorganismos comienzan a partir de una sola célula y la variabilidad genética se produce como consecuencia de nuevas mutaciones. Por lo tanto, el uso de microorganismos permite explorar cuestiones como la adaptación basada en el balance mutación-selección (Flores-Moya *et al.*, 2005; López-Rodas *et al.*, 2009) o el límite de la resistencia a determinados agentes selectivos (Reboud *et al.*, 2007; Huertas *et al.*, 2010, 2011; Romero-López *et al.*, 2012; Rouco *et al.*, 2014; Melero-Jiménez *et al.*, 2019). Otra serie de estudios aprovechan la posibilidad de reproducción sexual de algunos microorganismos para estudiar procesos como la evolución del aislamiento reproductivo (Leu & Murray, 2006; Dettman *et al.*, 2008) o la selección sexual (Rogers & Greig, 2008). También se están utilizando los microorganismos para explorar otro tipo de cuestiones, como el origen de la multicelularidad (Grosberg & Strathmann, 2007; Ratcliff *et al.*, 2012, 2013).

1.4. Evolución experimental y sus aplicaciones ecológicas

La evolución experimental consiste en el estudio de los cambios evolutivos que ocurren en poblaciones experimentales como consecuencia de determinadas condiciones (ambientales, demográficas o genéticas) impuestas por el experimentador (Kawecki *et al.*, 2012). La evolución experimental también es conocida como “Selección Natural de laboratorio” (Kawecki *et al.*, 2012). Sin embargo, este término no es del todo correcto ya que se han realizado algunos experimentos de evolución experimental en la naturaleza y, además, no todos ellos son experimentos de selección (Reznick *et al.*, 1990; Ebert *et al.*, 2002; Zbinden *et al.*, 2008). Según Garland & Rose (2009) los experimentos de evolución experimental se pueden dividir en tres grupos. En primer lugar, están aquellos experimentos que abordan el estudio de la respuesta de un organismo a eventos naturales, como podría ser la adaptación tras una sequía o inundación. Por otra parte, están los experimentos que abordan la adaptación de un organismo a un agente selectivo mediante su exposición a un nivel de estrés letal o subletal. Por último, se encuadrarían los experimentos de selección dirigida, en los cuales se intentan modificar determinados rasgos fenotípicos según los intereses del investigador. De manera general, en los tres tipos de experimento se pretende observar diferencias fenotípicas, o ciertas variables cuantitativas, que indiquen el efecto de la evolución, siendo la capacidad de reproducirse y dejar descendencia (*fitness* o eficacia biológica) la variable más utilizada. Los experimentos de evolución experimental se han utilizado para abordar importantes cuestiones de la Biología Evolutiva; desde resolver la controversia entre las teorías evolutivas neo-darwiniana y neo-lamarckiana (Cook, 1999) hasta estudios más recientes donde se pretende dar respuestas al origen de la multicelularidad (Ratcliff *et al.*, 2012; Quintero-Galvis *et al.*, 2018).

Como se ha comentado en epígrafes anteriores, somos testigos de una nueva era, donde los cambios ambientales obligan a que los organismos deban adaptarse para poder sobrevivir en estas nuevas condiciones. En este sentido, la evolución experimental es un marco de trabajo que ofrece la oportunidad de estudiar procesos evolutivos de manera experimental en tiempo real. Los estudios de evolución experimental son fundamentales para poder comprender las respuestas biológicas en el Antropoceno (Kawecki *et al.*, 2012) y pueden contribuir a comprender posibles de procesos de extinción local y rescate evolutivo (Bell, 2017). Es necesario considerar que los procesos que ocurren en la

naturaleza son infinitamente más complejos de lo que se puede reproducir en el laboratorio. Los resultados de los experimentos de evolución experimental tienen difícil extrapolación a la naturaleza; no obstante, pueden aportarnos información básica de lo que podría ocurrir.

1.5. La evolución experimental y el Antropoceno: casos de estudio en ecosistemas de agua dulce

1.5.1. Importancia socio-ecológica de los ecosistemas de agua dulce

Los ecosistemas de agua dulce proporcionan servicios ecosistémicos esenciales y son un recurso primordial para la vida humana (Baron *et al.*, 2002, 2004; Covich *et al.*, 2004). De hecho, se estima que el valor de sus servicios es de más de 4×10^{12} dólares anuales (Costanza *et al.*, 2014; Youn *et al.*, 2014; Béné *et al.*, 2016; Lynch *et al.*, 2016). Estos ecosistemas (ríos, lagos y humedales) conforman menos del 1% de la superficie de la Tierra y siendo únicamente el 0.01 % del agua del planeta (McAllister *et al.*, 1997; Mittermeier *et al.*, 2010). A pesar de ello, albergan cerca del 6% de todas las especies conocidas (Gibert & Deharveng, 2002; Dudgeon *et al.*, 2006; Balian *et al.*, 2008; Mittermeier *et al.*, 2010; Dijkstra *et al.*, 2014). Consecuentemente, los ecosistemas de agua dulce contribuyen de manera relevante a la riqueza biológica global (Baron *et al.*, 2002), mientras que socialmente aportan un recurso fundamental: el agua dulce, con una contribución directa en la productividad económica a través de sectores como pueden ser el pesquero y el recreativo (Pearce, 1998; Heal, 2000; Baron *et al.*, 2002; Covich *et al.*, 2004; Aylward *et al.*, 2005; Brauman *et al.*, 2007; Dodds *et al.*, 2013). Por lo tanto, los ecosistemas de agua dulce y su biodiversidad son un recurso natural valioso, en términos económicos, culturales, científicos y educativos (Dudgeon *et al.*, 2006).

A pesar de la gran importancia socio-ecológica de los ecosistemas de agua dulce, estos sistemas están sufriendo multitud de presiones (Dudgeon *et al.*, 2006; Dodds *et al.*, 2013; Dudgeon, 2019; Reid *et al.*, 2019), generando una gran pérdida de biodiversidad que podría provocar grandes problemas socio-ecológicos (Dudgeon *et al.*, 2006; Darwall *et al.*, 2018; Harrison *et al.*, 2018). Específicamente, Dudgeon *et al.* (2006) identificaron la sobreexplotación de acuíferos, la contaminación del agua, la modificación del flujo, la

fragmentación o degradación del hábitat y la invasión de especies exóticas como las cinco causas principales de la disminución de la población y la reducción del área de distribución de los organismos de agua dulce en todo el mundo. Todas estas amenazas se están intensificando a medida que avanzamos en el Antropoceno (Dudgeon, 2019). Por ejemplo, en 2015 ninguna de las masas de agua dulce de los estados miembro de la Unión Europea consiguió un buen estado químico (según los indicadores de la directiva Marco del Agua: Directiva 2000/60/CE del 23 de octubre de 2000) y sólo el 53% de los ríos y lagos obtuvieron un buen estado ecológico. Además, el Fondo Mundial para la Naturaleza (World Wildlife Fund:WWF) ha indicado que se ha producido una disminución del 81% en las poblaciones de vertebrados de agua dulce entre 1970 y 2012 (WWF, 2016). Asimismo, el Panel Internacional sobre Cambio Climático (IPCC) ha alertado que el Cambio Global creará una problemática en la disponibilidad y calidad del agua dulce que derivará en una gran presión sobre las sociedades y el medio ambiente (Bates *et al.*, 2008; Kundzewicz, 2008).

Debido a la gran presión que están sufriendo estos ecosistemas, conocer las respuestas adaptativas de los microorganismos fotosintéticos de agua dulce (base de la red trófica, e implicados en los ciclos biogeoquímicos con un papel muy relevante) resulta fundamental para poder hacer predicciones futuras precisas y una correcta gestión de estos ecosistemas. En este sentido, la evolución experimental ofrece un marco conceptual ideal para estudiar las respuestas adaptativas de estos microorganismos en los diferentes escenarios futuros esperados. Explorar las respuestas adaptativas de los microorganismos en el laboratorio (*in vitro*) también permite la obtención de nuevas cepas resistentes que podrían utilizarse en un futuro para recuperar poblaciones salvajes. Además, este marco de trabajo también permite la obtención de cepas que pueden utilizarse como bioindicadores del estado del ecosistema (Altamirano *et al.*, 2004; Hernández-Allica *et al.*, 2011) o con fines de biorremediación (González *et al.*, 2012; Baselga-Cervera *et al.*, 2018). Por lo tanto, los experimentos en el marco de la evolución experimental deben ser considerados como una herramienta más en las políticas de gestión y planificación de los ecosistemas de agua dulce.

1.5.2. Salinización de ecosistemas de agua dulce: efecto de la salinidad sobre las comunidades microbianas

Las causas de la salinización de las masas de agua dulce epicontinentales son diversas y varían según el entorno climatológico y geomorfológico, además del tipo e intensidad de la actividad humana (Vengosh, 2003; Kaushal *et al.*, 2005). Los factores principales que intervienen en la salinización se pueden clasificar en función de su distancia a la costa (Herbert *et al.*, 2015). Herbert *et al.* (2015) señalaron que, en las masas de agua epicontinentales más alejadas de la costa, los factores principales que provocan la salinización son: la eliminación de vegetación (Macumber, 1990; Eamus *et al.*, 2006), la irrigación intensiva (Smedema & Shiati, 2002), regulaciones en los cauces de los ríos (Boon *et al.*, 2008; Jolly *et al.*, 2008; Crosbie *et al.*, 2009), actividades mineras o de extracción de materiales (Kessler *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2013; Vengosh *et al.*, 2014), y la aplicación de sales para el deshielo de carreteras o aeropuertos (Kaushal *et al.*, 2005; Findlay & Kelly, 2011). En el caso de las aguas epicontinentales más costeras, los procesos que dan lugar a la salinización se asocian principalmente a la intrusión de agua de mar vinculada a la elevación del nivel freático (Winn *et al.*, 2006; Wood & Harrington, 2014), la reducción de los flujos fluviales de agua dulce que desembocan en bahías o estuarios costeros (Montagna *et al.*, 2002; Enright & Culberson, 2009), la extracción de agua dulce de zonas costeras (Barlow & Reichard, 2010; Ferguson & Gleeson, 2012; Mazi *et al.*, 2014), las actividades que modifican la geomorfología costera (Oude Essink, 2001; Krauss *et al.*, 2012; Manda *et al.*, 2014) y las inundaciones ciclónicas o *storm surges* (Schuerch *et al.*, 2013).

El aumento de las concentraciones salinas en las masas de agua epicontinentales tiene como consecuencia la degradación de los ecosistemas, afectando negativamente a los organismos que habitan en ellas (Herbert *et al.*, 2015; Kaushal, 2016; Kefford *et al.*, 2016; Berger *et al.*, 2018; Schuler *et al.*, 2018). A altas concentraciones, las sales son tóxicas para muchos organismos de agua dulce, aunque el grado de tolerancia varía entre especies (Cañedo-Argüelles *et al.*, 2013). El principal problema de la salinización para los organismos de agua dulce está relacionado con la acumulación de determinados iones en las células y la interrupción de la absorción de otros iones esenciales (Schuler *et al.*, 2017; Hintz *et al.*, 2018). Los iones principales que afectan a los organismos en los procesos de salinización son el Na^+ y el Cl^- . Sin embargo, otros iones como el Mg^{2+} , el K^+ y el SO_4^{2-} también son tóxicos para los organismos (Mount *et al.*, 1997; Hintz *et al.*,

2018). Por lo tanto, la consecuencia directa de la salinización suele ser una gran pérdida de biodiversidad (Pinder *et al.*, 2005; Lorenz, 2014; Schuler *et al.*, 2018; Venâncio *et al.*, 2018). Herbert *et al.* (2015) expusieron tres hipótesis, compatibles entre ellas, sobre cómo la salinización afectará a las comunidades microbianas. Una de las hipótesis expone la posibilidad de que las especies de agua dulce sean reemplazadas por otras análogas con mayor resistencia a salinidad (Hobbie, 1988; Hart *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 2003). Una segunda hipótesis prevé que no se producirán cambios en las comunidades microbianas (pero sí cambios en la función que realizan para el ecosistema) y que podrían sobrevivir gracias a mecanismos que provoquen un aumento de la resiliencia, como la expresión de genes o la adaptación (Edmonds *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2015). Por último, se podrían originar cambios, tanto en la composición como en la función de las comunidades microbianas (Jackson & Vallaire, 2009).

Finalmente, los cambios en la composición y función de los microorganismos estarán relacionados con las condiciones concretas donde tengan lugar los eventos de salinización (Edmonds *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2015). Por ejemplo, Nelson *et al.* (2015) mostraron que los ecosistemas que han sufrido eventos de salinización presentan comunidades adaptadas a salinidad y que, presumiblemente, resistirán cuando tenga lugar otro incremento salino. También Hart *et al.* (1991) observaron que, ciertas cianobacterias sensibles a cambios salinos, pueden adaptarse y sobrevivir cuando el aumento se produce de manera gradual. Por lo tanto, la historia previa de las poblaciones podría modular su respuesta ante un incremento en la salinidad. Estudios recientes alertan de la posibilidad de que la cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing pueda formar *blooms* en aguas salinas (Preece *et al.*, 2017; Tanabe *et al.*, 2018, 2019). Específicamente, en esta tesis se han aplicado experimentos de evolución experimental para discernir si la aparición de cepas resistentes a salinidad de *M. aeruginosa* es consecuencia de la aclimatación o de la adaptación.

1.5.3. Aumento de las concentraciones de herbicidas en los ecosistemas de agua dulce: efecto del diurón y del glifosato sobre organismos fitoplanctónicos

El aumento de las concentraciones de herbicidas en las masas de agua dulce es una de las principales causas de la pérdida de biodiversidad en el Antropoceno y tiene un alto impacto sobre las comunidades microbianas (Villeneuve *et al.*, 2011; Breckels & Kilgour,

2018). Generalmente, está relacionado con la agricultura intensiva, la cual utiliza una gran cantidad de compuestos biocidas (Koenig, 2001; Vila-aiub *et al.*, 2009). La mayoría de los herbicidas son persistentes en el medio ambiente, causando una fuerte presión de selección en numerosas especies (Belfiore & Anderson, 2001; Palumbi, 2001), y obligando a los organismos a responder de manera fisiológica o genética a sus efectos tóxicos (Mcknight *et al.*, 2015). Aunque los herbicidas utilizados en la agricultura no tienen como objetivo eliminar las comunidades microbianas de los ecosistemas de agua dulce, hay que tener en cuenta que muchos de ellos actúan uniéndose al fotosistema II (PSII) y, por lo tanto, tienen un impacto directo sobre los microorganismos acuáticos fotosintéticos (Schuler & Rand, 2008; Villeneuve *et al.*, 2011). Como consecuencia, el aumento de los herbicidas en los medios dulceacuícolas podría conducir a una disminución de la productividad primaria y causar daños importantes en los diferentes niveles del ecosistema (Pérez *et al.*, 2007; Arts & Hanson, 2018; Smedbol *et al.*, 2018)

En esta tesis se han realizado experimentos con dos de los herbicidas más utilizados en la agricultura: diurón [$C_9H_{10}Cl_2N_2O$] y glifosato [$C_3H_8NO_5P$] (Arts & Hanson, 2018). El herbicida diurón actúa inhibiendo el flujo de electrones desde PSII al PSI (Sanderman & Boger, 1986). Por lo tanto, el diurón tiene un efecto directo sobre las comunidades de microorganismos fotosintéticos de agua dulce (Demailly *et al.*, 2019; Beaulieu *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2020). Por otro lado, El glifosato es un herbicida no selectivo de amplio espectro, que se ha utilizado ampliamente para controlar las malas hierbas anuales y perennes en sistemas agrícolas, forestales y acuáticos (Duke & Powles, 2008). Específicamente, el glifosato actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), que está presente en todas las plantas superiores y en algunos microorganismos. Como consecuencia, se interrumpe la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (Amrhein *et al.*, 1980; Steinrücken & Amrhein, 1980; Carlisle & Trevors, 1988). Diferentes estudios han demostrado que el glifosato es tóxico para una gran variedad de organismos acuáticos, pudiendo afectar a microorganismos, peces y anfibios (López-Rodas *et al.*, 2007; Mensah *et al.*, 2011; Arunakumara *et al.*, 2013; Edge *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016; Bridi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Asimismo, estudios recientes alertan sobre el efecto tóxico del glifosato en humanos (Chłopecka *et al.*, 2017; Van Bruggen *et al.*, 2018).

En esta tesis se ha explorado la posibilidad de que dos especies de microalgas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard y *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) Komárek & Perman) y una cianobacteria (*M. aeruginosa*) adquieran

resistencia al diurón y al glifosato. Además, se ha analizado si dicha resistencia ha sido consecuencia de la aclimatación o de la adaptación y se ha estudiado el coste fisiológico que supone la resistencia a estos herbicidas, en términos de tasa de crecimiento y tasa de fotosíntesis.

1.5.4. Relación entre la variabilidad fenotípica y la calidad ambiental

Comprender qué factores ambientales determinan la biodiversidad ha sido una cuestión que empezó a explorarse desde el siglo pasado (Hutchinson, 1959; Brown, 1981; Wright, 1983; Turner, 1986). De hecho, existe un gradiente latitudinal de biodiversidad terrestre con valores más altos en los trópicos y más bajos en los polos, y este patrón puede extenderse a los océanos (Clarke & Crame, 1997; Brown & Lomolino, 2000; Gaston, 2000; Gaston *et al.*, 2000). Aunque no existe una teoría única sobre cómo el ambiente modula la biodiversidad, todas ellas pueden resumirse como “hipótesis de especie/energía” (Clarke & Gaston, 2006). Esta hipótesis postula que la cantidad de energía disponible determina la biodiversidad de un ecosistema. En el caso de la variación interespecífica, se ha observado que depende del clima actual y pasado, y la heterogeneidad del hábitat (Kerr & Packer, 1997; O’Brien *et al.*, 2000; Rahbek & Graves, 2001; Currie & Francis, 2004; Field *et al.*, 2005). A pesar de que la variabilidad intraespecífica puede ser tan alta como la interespecífica (Albert *et al.*, 2010; Schaum *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2017), apenas se han estudiado la relación entre la calidad ambiental y la variabilidad intraespecífica así como su importancia en el mantenimiento de la biodiversidad en los nuevos escenarios generados por el Cambio Global (Reusch *et al.*, 2005; Albert *et al.*, 2010; Sjöqvist & Kremp, 2016). Debido a esto, entender la relación entre la calidad ambiental y la plasticidad fenotípica de los microorganismos fotosintéticos es una parte necesaria para la comprensión y proyección de los cambios en la biodiversidad causados por el Cambio Global.

En esta tesis se ha analizado cómo la calidad ambiental puede modular la plasticidad fenotípica de la microalga verde *C. reinhardtii*. Para ello se generó un gradiente ambiental simulando diferentes escenarios de Cambio Global, como el aumento de CO₂ y temperatura.

1.6. Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral consiste en analizar, con una aproximación de evolución experimental, la dinámica de evolución rápida de organismos fitoplanctónicos de agua dulce ante la presión del deterioro ambiental, y estudiar el coste fisiológico asociado a la resistencia. En relación con este objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos abordados, cada uno de ellos, en capítulos específicos (excepto el objetivo 5, el cual se llevará a cabo en diferentes capítulos):

1. Determinar si la aparición de cepas resistentes de la cianobacteria *M. aeruginosa* a salinidad es consecuencia de la aclimatación o de la adaptación, así como explorar el límite de la resistencia de diferentes cepas de *M. aeruginosa* a salinidad.
2. Comprobar si la tasa de deterioro ambiental (incremento de salinidad) puede modular el límite de resistencia de diferentes cepas *M. aeruginosa*.
3. Explorar cómo afecta la dispersión y la exposición previa a salinidad sobre la posibilidad de que ocurran eventos de rescate evolutivo en metapoblaciones de *M. aeruginosa* expuestas a condiciones letales de salinidad.
4. Explorar el límite de resistencia de organismos fitoplanctónicos de agua dulce (específicamente de la cianobacteria *M. aeruginosa*, y de las clorofíceas *C. reinhardtii* y *D. chlorelloides*) a dos herbicidas comúnmente utilizados en agricultura (diurón y glifosato). Además, determinar si la aparición de cepas resistentes a los herbicidas es consecuencia de la aclimatación o de la adaptación.
5. Analizar el coste de la resistencia de aquellas cepas que consigan resistencia, a los agentes selectivos, en términos de eficiencia fotosintética, y de tasa de crecimiento.
6. Explorar el efecto de la calidad ambiental sobre la variabilidad fenotípica de *C. reinhardtii*.

1.7. Objectives

The principal objective of this thesis is to analyze, with an Experimental Evolution approach, the evolution dynamics of some freshwater phytoplankton organism exposed to new environmental scenarios generated by global change, and explore the physiological cost associated with the resistance to new conditions. According with the principal aim, the following specific objectives addressed in specific chapters (objective 5 will be performed in different chapters):

1. To Determine whether the occurrence of resistant strains of *M. aeruginosa* to salinity is a consequence of acclimatization or adaptation. As well as exploring the limit of the resistance of different strains of *M. aeruginosa* to salinity.
2. To study if the rate of environmental deterioration (salinity increment) can determinate the limit of resistance of different strains *M. aeruginosa* to salinity.
3. To explore how dispersion among populations and pre-salinity exposure affects the possibility the occurrence of evolutionary rescue events occurring on metapopulations of *M. aeruginosa* exposed to lethal salinity conditions.
4. To Determine the resistance limit of different phytoplanktonic organisms (specifically, the cyanobacteria *M. aeruginosa*, and the chlorophyceans *C. reinhardtii* y *D. chlorelloides*) to two herbicides commonly used in agriculture (diuron and glyphosate). As well as disentangle the mechanism related with the resistance (acclimation vs. adaptation)
5. To Analyze the resistance cost of resistant strains on photosynthetic efficiency and growth rate.
6. To Explore the effect of environmental quality on phenotypic variability of *C. reinhardtii*.



CAPÍTULO 2

La resistencia de la cianobacteria tóxica de agua dulce *Microcystis aeruginosa* a salinidad se logra mediante la selección de mutaciones espontáneas

“Mutation is random; natural selection is the very opposite of random”

Richard Dawkins, 1941 – PRESENT

The Blind Watchmaker, 1986



2.1. Introducción

Cuando una población se expone a una presión selectiva no letal, los organismos sufren modificaciones de la expresión génica que ocurren en horas o días; todos los cambios que acontecen se denominan, globalmente, aclimatación (Bradshaw & Hardwick, 1989; Belfiore & Anderson, 2001). Sin embargo, cuando la presión selectiva sigue aumentando y supera la capacidad de aclimatación, la supervivencia de la población solo es posible por adaptación, es decir, si se seleccionan nuevas variantes genéticas que confieran resistencia (Sniegowski & Lenski, 1995; Hughes, 1999). El “análisis de fluctuación” de Luria y Delbrück (1943), convenientemente modificado, permite diferenciar entre ambos mecanismos. Este experimento fue diseñado, en primer lugar, para cultivos sólidos de bacterias; sin embargo Costas *et al.* (2001) y López-Rodas *et al.* (2001) lo adaptaron para trabajar con cultivos líquidos. Desde entonces, se ha utilizado para explorar la posibilidad de supervivencia y el mecanismo de resistencia de microalgas y cianobacterias a diferentes agentes tóxicos (Costas *et al.*, 2001, 2007, 2008, 2014; López-Rodas *et al.*, 2001, 2007, 2008 a, b, c, 2009; Flores-Moya *et al.*, 2005; Marvá *et al.*, 2010, 2014; Carrera-Martínez *et al.*, 2011; Romero-López *et al.*, 2012; Fernández-Arjona *et al.*, 2013; Baselga-Cervera *et al.*, 2016a; Martín-Clemente *et al.*, 2019; Melero-Jiménez *et al.*, 2019). Sin embargo, los trabajos anteriores no contemplan escenarios en los cuales la presión selectiva aumenta ya que la concentración del agente selectivo era fija. Por lo tanto, no permitían analizar la máxima presión selectiva a la cual sería posible la supervivencia de la población. De hecho, los ensayos experimentales que exploran los límites de la resistencia de microalgas y cianobacterias ante un agente selectivo son escasos (Reboud *et al.*, 2007; Huertas *et al.*, 2010, 2011; Romero-López *et al.*, 2012; Rouco *et al.*, 2014; Martín-Clemente *et al.*, 2019; Melero-Jiménez *et al.*, 2019, 2020), a pesar de que resulta fundamental conocer los límites adaptativos de los organismos para la gestión global frente a los cambios ambientales que se están produciendo en la actualidad.

La salinidad está aumentando en los cuerpos de agua dulce en todo el mundo debido, principalmente, a actividades humanas tales como la agricultura intensiva y la extracción de agua de la capa freática en áreas costeras (Williams, 2001; Nielsen *et al.*, 2003; Kundzewicz, 2008; Cañedo-Argüelles *et al.*, 2016). El aumento de la salinidad afecta de manera negativa a la fisiología de las cianobacterias dulceacuícolas debido a

que origina un desajuste del equilibrio osmótico celular (Hagemann, 2011). Como consecuencia, se produce una disminución en la tasa de crecimiento (Tonk *et al.*, 2007) y un impacto en la actividad fotosintética del PSII (Lu & Vonshak, 2002; Ross *et al.*, 2019). Entre las especies de cianobacterias de agua dulce, *M. aeruginosa* es de especial interés ya que produce un gran número de floraciones (*blooms*) tóxicas en aguas eutróficas (Oberholster *et al.*, 2004; Harke *et al.*, 2016). Los efectos nocivos de los *blooms* de *M. aeruginosa* pueden afectar a humanos y animales domésticos, así como a la fauna silvestre (Falconer, 1999; Carmichael *et al.*, 2001; Žegura *et al.*, 2003; Lehman *et al.*, 2005; Ibelings & Havens, 2008; Ger *et al.*, 2010, 2016; Miller *et al.*, 2010; Acuña *et al.*, 2012). Generalmente, los *blooms* de *M. aeruginosa* en agua dulce se originan por cepas sensibles a altos niveles de salinidad ($>10 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$, Tonk *et al.*, 2007). Sin embargo, cada vez más, se están observando *blooms* de *M. aeruginosa* en aguas salinas (Preece *et al.*, 2017). Por lo tanto, ¿cómo es posible que este organismo de agua dulce pueda formar *blooms* en aguas salinas? Existen varias hipótesis que podrían explicar esta cuestión; algunos estudios apuntan a la posibilidad de que estos *blooms* se formen en masas de agua dulce y que sean transportados a zonas de mayor salinidad (Miller *et al.*, 2010; Preece *et al.*, 2017) o que la formación del *bloom* esté relacionada con la disminución temporal de la salinidad en esa masa de agua, por ejemplo, debido a un intenso periodo de lluvias (Robson & Hamilton, 2003). No obstante, Tanabe *et al.* (2018) analizaron muestras de *blooms* de zonas de aguas salinas y encontraron tres cepas de *M. aeruginosa* que presentaban genes relacionados con la síntesis de sacarosa (presuntamente responsables del ajuste osmótico que permite la resistencia a salinidad). Estos genes no son frecuentes en *M. aeruginosa*; además, mediante análisis comparativos del genoma, observaron una diversidad genética extremadamente baja en los genes que intervienen en la síntesis de sacarosa en comparación con otros genes, por lo que concluyeron que esos genes se han incorporado en el genoma recientemente, posiblemente mediante transferencia horizontal. No obstante, Tanabe *et al.* (2019) observaron una gran distancia genética cuando compararon los genes de síntesis de sacarosa de las cepas anteriores con otra cepa de *M. aeruginosa* aislada en las aguas salinas del lago Abashir (Japón). Estos autores sugirieron la posibilidad de que *M. aeruginosa* perdiera los genes de síntesis de sacarosa en el curso de la evolución. Sin embargo, la posible aparición de resistencia de *M. aeruginosa* a salinidad, basada en la selección de nuevas variantes genéticas derivadas de mutaciones espontáneas, no se ha abordado previamente.

El objetivo de este capítulo ha sido analizar la posibilidad de desarrollar resistencia al aumento de salinidad en *M. aeruginosa*, sobre la base de dos enfoques evolutivos experimentales. Por un lado, se ha identificado el mecanismo que permite la resistencia a una concentración fija de salinidad: es decir, si es por aclimatación o por adaptación. En segundo lugar, se realizó un experimento de trinquete para determinar el nivel de salinidad más elevado que podría ser soportado por las células. Debe destacarse que todos los experimentos llevados a cabo en este capítulo se realizaron con una cepa de *M. aeruginosa* aislada de una masa de agua dulce. La integración de los resultados de los dos experimentos permitiría predecir la posible adaptación de *M. aeruginosa* en un escenario futuro de aumento de salinidad en ecosistemas de agua dulce.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Organismo experimental y condiciones de cultivo

En los experimentos se ha utilizado, como organismo experimental, la cepa MaAVc de la cianobacteria *M. aeruginosa*. La cepa fue proporcionada por la Colección de Cultivo de Algas (ACC-UCM) del Laboratorio de Genética, de la Universidad Complutense (Madrid, España); fue aislada en el embalse de Valmayor (Comunidad de Madrid, España) en abril de 2011. Los detalles de los procedimientos de aislamiento fueron descritos en Carrillo *et al.* (2003). Debe destacarse que, en las condiciones de cultivo, las células crecen sin formar colonias (*M. aeruginosa* puede formar colonias palmeloides en la naturaleza). La cepa se mantuvo en cajas de cultivo de 250 mL con tapones de rosca con filtro (Greiner; Bio-One, Longwood, NJ, EEUU), que contenían 60 mL de medio *Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution* (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania), diluido al 50%, (BG11-50%), pH 7,2 (los componentes del medio de cultivo se detallan en el Anexo 1: Tabla A1). Todos los experimentos se realizaron con medio BG11-50% ya que no se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento de *M. aeruginosa* si se usaba BG11 sin diluir o diluido al 50% (datos no mostrados). Los cultivos se incubaron a una temperatura de 20 ± 2 °C y a una irradiancia de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR, 400–700 nm) proporcionada por lámparas fluorescentes (Sylvania Grolox 36W, Erlangen, Alemania), sin fotoperiodo. Los cultivos se mantuvieron en fase

exponencial de crecimiento (Cooper, 2012) mediante transferencia semanal de un inóculo (1-3 mL) a medio de cultivo nuevo (60 mL). Además, la posición de los cultivos en las cámaras se cambió aleatoriamente una vez al día con el fin de asegurar una mayor homogeneidad de las condiciones ambientales.

2.2.2. Efecto de la salinidad sobre la tasa de crecimiento

Para estudiar el efecto de salinidad sobre la tasa de crecimiento de *M. aeruginosa*, se tomaron muestras de los cultivos en fase exponencial bajo las condiciones previamente descritas y se realizó un recuento celular a tiempo inicial (N_0). Posteriormente, los cultivos se mantuvieron 7 d a diferentes concentraciones de NaCl con el fin de poder cuantificar el crecimiento a cada concentración. Específicamente, se preparó una solución stock de BG11-50% con 24 g L⁻¹ NaCl y, a partir de diluciones, se obtuvieron concentraciones de 2, 4, 8 y 16 g L⁻¹ NaCl. El control se realizó en medio BG11-50%. Se prepararon tres réplicas de cada concentración de NaCl. La tasa de crecimiento de *M. aeruginosa* se calculó con la ecuación de Crow & Kimura (1970):

$$m \text{ (divisiones d}^{-1}\text{)} = \frac{\ln(N_t/N_0)}{t} \quad [\text{ec. 1}]$$

donde, N_t es el número de células después de $t = 7$ d.

La concentración celular de *M. aeruginosa* (CC_m) se determinó a través de una regresión lineal entre el número de células (estimado mediante un hemocitómetro) y la absorbancia a $\lambda = 750$ nm (A_{750}) medida en un espectrofotómetro (Selecta UV-2005, Barcelona, España):

$$CC_m \text{ (células mL}^{-1}\text{)} = 1,1 \times 10^7 \times A_{750} \text{ (} r^2 = 0,980, n = 18 \text{)} \quad [\text{ec. 2}]$$

2.2.3. Análisis de fluctuación de la sensibilidad a la resistencia a salinidad

Se ha realizado el experimento de análisis de fluctuación para estudiar el mecanismo de resistencia de *M. aeruginosa* ante un escenario de incremento salino repentino que supera la dosis letal. El diseño consistió en dos “sets” de experimentos (Figura 2). El “set” 1

estuvo constituido por 90 tubos independientes en los que se inocularon 10^2 células por tubo (número de células relativamente bajo para reducir la probabilidad de encontrar mutantes resistentes y, en consecuencia, con una variabilidad genética casi nula), y se incubaron hasta alcanzar la concentración de 10^6 en 13 mL de BG11-50%. Luego, los cultivos se centrifugaron a 8000 g durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se le añadió, al *pellet* de células, el medio selectivo (BG11-50% suplementado con 14 g L^{-1} NaCl). Los cultivos se expusieron a una concentración de 14 g L^{-1} NaCl, superior a la dosis letal, la cual se determinó como se explicó anteriormente (sección 2.2.2.). El “set” 2 estuvo constituido por 35 cultivos independientes. En este caso todos los cultivos se inocularon directamente con 10^6 células del mismo cultivo de la cepa silvestre que se usó para el “set” 1, y el medio de cultivo en el que se inocularon las células contenía el agente selectivo a la misma concentración salina utilizada en el “set” 1 (14 g L^{-1} NaCl). Ambos “sets” se mantuvieron en condiciones selectivas durante 60 d, al cabo de los cuales se determinó la presencia o ausencia de células en los tubos. Finalmente se determinó el número de células de cada tubo y se calculó la media y varianza de cada “set”.

Del experimento de análisis de fluctuación se pueden obtener tres resultados en el “set” 1. En el primer caso (Figura 2, 1A), se podría obtener un número similar de células resistentes en cada uno de los cultivos, indicando que las células resistentes surgieron después de la exposición al agente selectivo, como consecuencia de procesos de aclimatación. La explicación reside en que todos los tubos contienen un número de células resistentes similar puesto que todas las células tienen la misma posibilidad de desarrollar resistencia. Por el contrario, si se encuentra alta variación en el número de células resistentes entre los cultivos del “set” 1, es posible afirmar que las células resistentes aparecieron mediante la selección de mutaciones espontáneas que ocurrieron antes de estar expuestas al agente selectivo (Figura 2, 1B). En esta situación, los cultivos presentan diferentes concentraciones celulares, dependiendo de la generación celular en la que haya tenido lugar la mutación. Finalmente, podría ocurrir que no se encontraran células resistentes (Figura 2, 1C), lo que indicaría que no es posible que se desarrolle resistencia.

El “set” 2 es el control del experimento puesto que mide la varianza del error experimental. Por lo tanto, si se encuentra una gran variación en este “set”, no es posible extraer una conclusión de los resultados derivados del “set” 1. Por el contrario, si es baja, se deduce que el error experimental es despreciable y, en consecuencia, se puede hacer una inferencia adecuada del resultado que se obtenga en el “set” 1.

Finalmente, los coeficientes de variación (CV) del set 1 y 2 son comparados mediante el Test Z de una cola para distinguir entre la adaptación (CV del set 1 > CV del set 2) o aclimatación (CV del set 1 = CV del set 2).

En el caso de que la resistencia sea fruto de la selección de nuevas variantes genéticas, se puede estimar la tasa de mutación (μ) con la siguiente ecuación:

$$\mu \text{ (n}^\circ \text{ de células mutantes división}^{-1}\text{)} = -\frac{\ln P_0}{N_t - N_0} \quad [\text{ec. 3}]$$

donde P_0 es la proporción de tubos del “set” 1 que no presentan crecimiento alguno, y N_0 y N_t son los números de células inicial (10^2) y final (10^6) del periodo de incubación respectivamente.

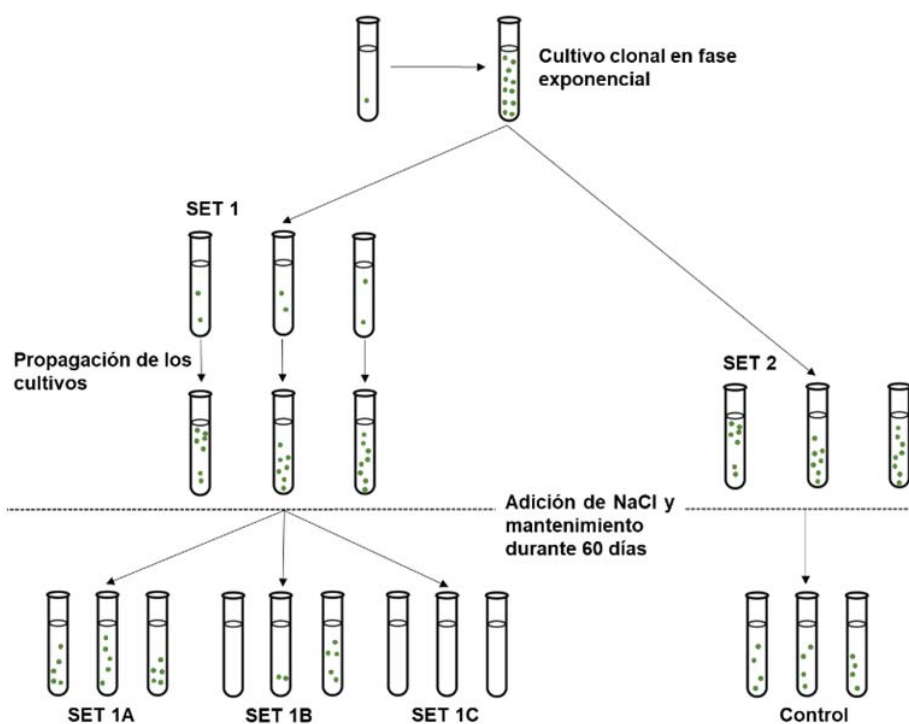


Figura 2. Diagrama esquemático de los posibles resultados obtenidos en el experimento de análisis de fluctuación. “set” 1: noventa cultivos de la cianobacteria *M. aeruginosa* (cada uno comenzó a partir de un pequeño inóculo, $N_0 = 10^2$ células) fueron propagados en condiciones no selectivas, hasta alcanzar una población de 10^6 células ($N_t = 10^6$ células), en ese momento los cultivos se expusieron a condiciones selectivas. Si surgieron células resistentes durante la exposición al agente selectivo la resistencia podría deberse a la aclimatación o adaptación. En el caso de que el número de células resistentes en todos los cultivos sea similar (“set” 1A) podremos concluir que se ha producido aclimatación celular. Si encontramos que el número de células en cada cultivo es muy diferente, podremos afirmar que las células resistentes surgieron por mutaciones espontáneas que ocurren durante propagación de cultivos (es decir, antes de la exposición al agente selectivo) y por tanto la resistencia se debe a la adaptación (“set” 1B). Finalmente, es

(continuación Figura 2) posible no encontrar resistencia (“set” 1C). El “set” 2, este “set” sirve como control del “set” 1, pues al fundar una población de gran tamaño (N_t) la probabilidad de que haya células resistentes es similar en todos los cultivos y, por lo tanto, el número células al terminar el experimento en cada cultivo debe de ser similar.

2.2.4. Equilibrio mutación-selección

Es posible que, en poblaciones naturales, estén presentes individuos que contengan la mutación que permita la resistencia a salinidad. Sin embargo, debido a que la presencia de los alelos que confieren la resistencia podrían ser perjudiciales en ausencia de salinidad (debido a una disminución de la tasa de crecimiento de las células resistentes), la mayoría de estos mutantes se eliminarán por acción de la selección natural (Crow & Kimura, 1970; Spiess, 1989). Esto implica que, en cualquier momento, habrá un cierto número de células resistentes que aún no se hayan eliminado puesto que, en cada generación, aparecen nuevos mutantes. De acuerdo con Kimura & Maruyama (1966), el equilibrio entre la tasa de mutación (μ) y la tasa de eliminación selectiva determinará el número promedio de tales mutantes en una población:

$$q = \frac{\mu}{\mu+s} \quad [\text{ec. 4}]$$

donde q es la frecuencia del alelo resistente a salinidad y s el coeficiente de selección, (Ayala & Kiger, 1980) calculado de la siguiente manera:

$$s = 1 - \left(\frac{m^r}{m^s}\right) \quad [\text{ec. 5}]$$

donde m^r y m^s son las tasas de crecimiento de células resistentes y sensibles a la salinidad, respectivamente, medidas en condiciones no selectivas (es decir, en medio BG11-50%).

2.2.5. Detección del límite de resistencia a salinidad

Cuando la resistencia se debe a la selección de nuevas variantes genéticas que surgen por mutaciones espontáneas, es relevante explorar el límite de resistencia al agente selectivo, es decir, ¿cuál es la máxima presión selectiva a la cual no es posible que aparezcan

organismos resistentes? Para ello, se llevó a cabo un experimento de trinquete (Reboud *et al.*, 2007) como se describe en Huertas *et al.* (2010, 2011), Romero-Lopez *et al.* (2012), Rouco *et al.* (2014), Martín-Clemente *et al.* (2019), y Melero-Jiménez *et al.* (2019, 2020). Este diseño implica una fuerte presión de selección y un tamaño de población lo suficientemente elevado como para asegurar la aparición de nuevas mutaciones que confieran resistencia. Se partía de cultivos experimentales que tenían una alta densidad celular inicial que fueron expuestos a tres niveles selectivos diferentes en cada ciclo de trinquete (Figura 3). Todos los experimentos se cuadruplicaron para cada una de las tres dosis iniciales. Paralelamente, se fundaron cuatro cultivos no expuestos al agente selectivo al inicio del experimento (controles). Antes de la realización de los experimentos se aisló una única célula, mediante diluciones sucesivas, para minimizar la probabilidad de que hubiera mutantes resistentes previos que pudieran estar presentes en los cultivos. Los cultivos experimentales se mantuvieron por separado en placas (ClearLine®) de 24 pocillos (2 mL por pocillo), inoculados con 3×10^5 células, un número de células lo suficientemente elevado como para asegurar una población final elevada después de aplicar un aumento de salinidad. Las tres dosis de salinidad iniciales en el primer ciclo de trinquete fueron 3, 4,5 y 6,8 g L⁻¹ NaCl (Figura 3). Los cultivos se mantuvieron bajo el nivel de salinidad de cada ciclo de trinquete, al menos, durante 14 d. En este punto, se compararon las concentraciones celulares de los cultivos experimentales con el control. Cuando la concentración celular del cultivo experimental era igual o superior a la del cultivo control, se aumentaba la salinidad del cultivo experimental por un factor de $\times 1,5$. Por otro lado, las poblaciones experimentales que mostraban una concentración celular inferior al control no se transfirieron al siguiente ciclo de trinquete, manteniéndose a la misma concentración de NaCl. El experimento terminó cuando no se observó crecimiento celular después de 100 d.

Finalmente, se estableció el nivel máximo de resistencia como la salinidad más alta que permitió la aparición y el crecimiento celular. El número de generaciones (g) durante los ciclos de trinquete se calculó de acuerdo con Novick & Szilard (1950):

$$g = \frac{\log_e\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{\log_e 2} \quad [\text{ec. 6}]$$

donde N_t y N_0 son el número de células en el tiempo t (cuando la cantidad de células es igual, o superior, a la del control) y al inicio del experimento, respectivamente.

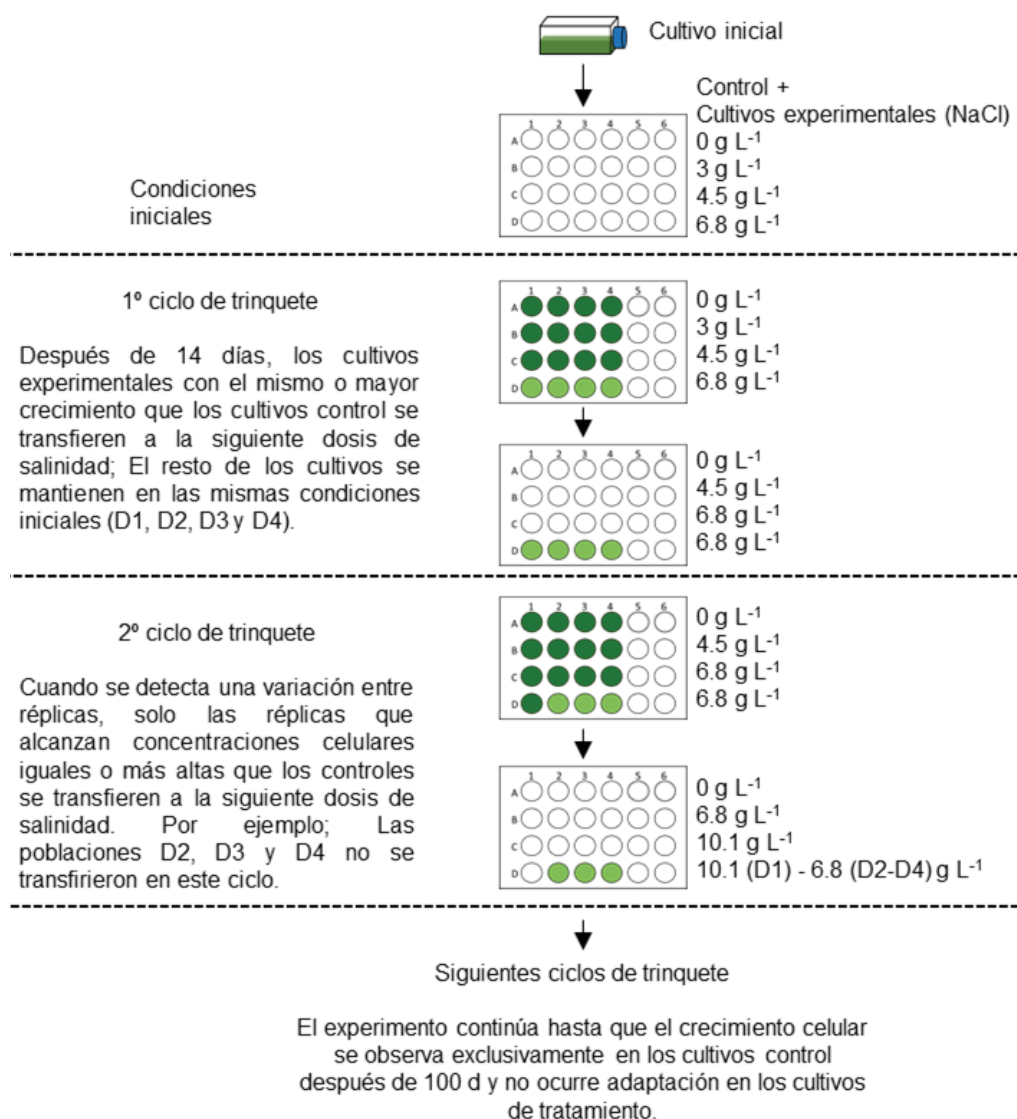


Figura 3. Representación esquemática del experimento de trinquete. Cuatro réplicas de los controles y cuatro réplicas de cada uno de los niveles iniciales del agente selectivo (NaCl), se representan en cada ciclo de trinquete. Los cultivos se transfieren al siguiente ciclo de trinquete (aumento de salinidad) cuando la concentración celular es similar, o superior, a la que se alcanza en los controles. En el caso de que el cultivo no alcance la concentración celular del control, se mantienen en el mismo nivel de selección. El límite de la resistencia se registra como el nivel más alto del agente selectivo bajo el cual se observa división celular. El experimento incluyó los siguientes ciclos de trinquete: 3, 4,5, 6,8, 10,1, 15,2 y 22,6 g L⁻¹ NaCl.

2.2.6. El coste fisiológico de la resistencia en la tasa de crecimiento

Para analizar el coste fisiológico de la resistencia a salinidad en términos de tasa de crecimiento, se seleccionó un cultivo al azar derivado del experimento de trinquete, que mostró la máxima resistencia. Este cultivo se mantuvo en la fase de crecimiento

exponencial mediante transferencias semanales a medio de cultivo nuevo con la misma salinidad a la que se obtuvo en el experimento de trinquete (BG11-50% con 15,1 g L⁻¹ NaCl).

Posteriormente, se preparó una solución stock de BG11-50% con 24 g L⁻¹ NaCl y, a partir de diluciones, se obtuvieron las siguientes concentraciones: 8, 10 y 15 g L⁻¹ NaCl. Cada cultivo experimental se inoculó con 6×10⁵ células de la cepa MaAVc^s (sensible a salinidad, control) o 6×10⁵ células de la cepa MaAVc^{rt} (resistente a salinidad obtenido del experimento de trinquete). En ambos casos, las células se tomaron de cultivos en crecimiento exponencial. Se prepararon tres réplicas de cada concentración de NaCl. El control se realizó en medio BG11-50% sin adición de sal. La tasa de crecimiento (*m*) se calculó como se describió previamente (ec. 1).

2.2.7. El coste de la resistencia en la tasa neta de fotosíntesis y en la tasa de transporte de electrones

Para analizar el coste fisiológico de la resistencia a salinidad en términos de características fotosintéticas se seleccionó un cultivo al azar derivado del experimento de trinquete, que mostró la máxima resistencia. Las tasas fotosintéticas fueron estimadas a partir de la producción de O₂ medido con un electrodo oxígeno (Hansatech Instruments Ltd, Sheffield, UK) conectado a un controlador de temperatura (20±1 °C). La agitación de los cultivos se realizó mediante un agitador magnético situado en la base de la cámara. Las muestras (2 mL) fueron incubadas durante 10 min en oscuridad y luego se expusieron a un gradiente creciente de irradiancia (5, 15, 25, 50, 100, 150, 200 y 300 μmol fotones m⁻² s⁻¹). Las irradiancias se obtuvieron mediante lámparas fluorescentes (Sylvania GroLux 36W, Erlangen, Alemania), las cuales se ajustaron mediante un sensor de PAR (del acrónimo en inglés *photosynthetically active radiation*) circular (Li-Cor Model Quamtum, Lincoln, NE, USA) conectado a un radiómetro radiometer (Model Li-250 Light Meter, Lincoln, NE, USA). La tasa de respiración (DR, del acrónimo en inglés *dark rate*) se midió como consumo de O₂ en oscuridad. Los datos de la tasa de fotosíntesis (NPR, del acrónimo en inglés *net photosynthesis rate*) se ajustaron a la ecuación de Edwards & Walker (1983):

$$NPR = NPR_{max} \left(\frac{I - I_c}{I + I_{0,5c}} \right) \quad [\text{ec. 7}]$$

donde NPR_{max} es la tasa de fotosíntesis neta saturada por la irradiancia, I_c es el punto de compensación para la luz, e $I_{0,5}$ es la constante de semisaturación. La eficiencia fotosintética (α^{NPR}) se calculó mediante el ajuste lineal de los cuatro primeros valores de la curva $NPR-I$ (tasa de fotosíntesis neta en función de la irradiancia).

La tasa de transporte de electrones (ETR , del acrónimo en inglés *electron transport rate*) se midió usando un fluorímetro de pulso de amplitud modulada Water-PAM (Walz, Effeltrich, Alemania). Cuatro alícuotas (2 mL) de cada cultivo, del mismo stock utilizado para las mediciones de oxígeno, se incubaron en una cámara a temperatura controlada (20 ± 1 °C) para estimar los parámetros de fluorescencia. La ETR se estableció a partir de mediciones de la eficiencia fotoquímica del PSII [$Y(II)$] usando la ecuación propuesta por Genty *et al.* (1989):

$$ETR = I \times a \times 0,36 \times Y(II) \quad [\text{ec. 8}]$$

donde a es la absorptancia, sección transversal de absorción óptica específica de la clorofila calculada como en Dubinsky *et al.* (1987), el factor 0,36 representa el 36% de irradiancia absorbida por el PSII (Johnsen & Sakshaug, 2007), e $Y(II)$ corresponde al rendimiento cuántico efectivo del PSII calculado a partir de la siguiente ecuación (Genty *et al.*, 1989):

$$Y(II) = \frac{F'_m - F_t}{F'_m} \quad [\text{ec. 9}]$$

donde F'_m y F_t son la fluorescencia máxima y transitoria de las células preincubadas en luz, respectivamente. Finalmente, la eficiencia de la ETR (α^{ETR}) se calculó mediante el ajuste lineal de los cuatro primeros valores de la curva $ETR-I$ (tasa de transporte de electrones en función de la irradiancia). Los datos de la curva $ETR-I$ se ajustaron a la ecuación de Platt *et al.* (1980):

$$ETR = ETR_{max} \times \left[1 - e^{-\left(\frac{\alpha^{ETR} \times I}{ETR_{max}}\right)} \right] \times e^{-\left(\frac{\beta I}{ETR_{max}}\right)} \quad [\text{ec. 10}]$$

donde I es la irradiancia, ETR_{\max} es la tasa de transporte de electrones máxima (sino hubiese fotoinhibición), β caracteriza la pendiente negativa de la curva a alta irradiancia, es decir, el “parámetro de fotoinhibición”.

Los parámetros fotosintéticos de cepas silvestres y resistentes se compararon mediante la prueba t de Student de dos colas. La homogeneidad de las varianzas de los datos se comprobó previamente con la prueba de Levene (1961).

2.3. Resultados

2.3.1. Efecto de la salinidad sobre la tasa de crecimiento

Se observó una inhibición lineal progresiva del valor de m de la cepa MaAVc de *M. aeruginosa* al aumentar la concentración salina:

$$m_{\text{MaAVc}} = -0,042 \times [\text{g L}^{-1} \text{ NaCl}] + 0,424 \quad (r^2 = 0,95, n = 9) \quad [\text{ec. 11}]$$

No se observó división celular a concentraciones $\geq 10 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ (Figura 4). En consecuencia, la dosis letal derivada del ajuste lineal fue de $10 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$. De acuerdo con este valor, se seleccionó una concentración salina de $14 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ para realizar el experimento de análisis de fluctuación.

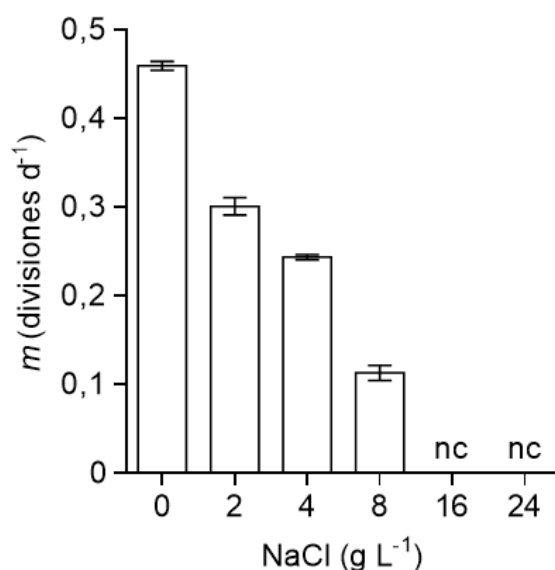


Figura 4. Efecto de la salinidad (NaCl) sobre la tasa de crecimiento (m ; media $\pm \sigma$, $n = 3$; nc: crecimiento celular no detectado) de la cepa MaAVc de *Microcystis aeruginosa*.

2.3.2. Análisis de fluctuación de la transformación de la sensibilidad a la resistencia a salinidad

Al inicio del experimento de análisis de fluctuación, la concentración celular disminuyó drásticamente en todos los cultivos de los “sets” 1 y 2, debido a la muerte masiva de las células. Sin embargo, después de un periodo de exposición de 60 d, se observó un aumento de la concentración celular en algunos cultivos, aparentemente debido al crecimiento de variantes resistentes a salinidad. Se encontró una alta fluctuación en el número de células resistentes por cultivo (de 0 a $>10^5$ células) en el “set” 1 pero no en el “set” 2 (Tabla 1). De hecho, el coeficiente de variación del “set” 1 fue significativamente mayor ($p < 0,0001$; Z-test) que el encontrado en el “set” 2 (Tabla 1), lo que sugiere que la gran variabilidad en la concentración celular observada en los cultivos del “set” 1 no fue consecuencia del error experimental. Aún más, este resultado también indica que las células resistentes a salinidad surgieron antes de la exposición a las condiciones letales de salinidad debido a la aparición mutaciones espontáneas que les confirieron resistencia, y no por la expresión de genes durante la exposición a salinidad.

Acorde con la proporción de cultivos del “set” 1 donde no se detectaron células resistentes, el valor estimado de μ de la cepa MaAVc de *M. aeruginosa* fue de $7,3 \times 10^{-7}$ células mutantes por división celular (Tabla 1). Además, se aisló un cultivo de células resistentes, seleccionado al azar del “set” 1, y se añadió a la colección de cultivos como MaAVc^r (bajo $14 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$). La tasa de crecimiento de la cepa resistente ($0,09 \pm 0,02$ divisiones d^{-1} , $n = 4$) fue significativamente menor ($t = 30,12$; $p < 0,001$) que la de las células sensibles ($0,46 \pm 0,01$ divisiones d^{-1} , $n = 4$) en ausencia del agente selectivo. Estos valores se utilizaron para calcular el coeficiente de selección (s) de mutantes resistentes a salinidad, el cual fue de 0,804. Los valores de μ y s se utilizaron para calcular la frecuencia de los alelos resistentes a salinidad (q), siendo de 9,7 células resistentes a salinidad por cada 10^7 células en total.

Tabla 1. Análisis de fluctuación para determinar el mecanismo de resistencia de la cepa MaAVc de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* a salinidad. ^a se perdió un cultivo del “set” 1 mientras se realizó el experimento; *** p<0,0001

	“set” 1	“set” 2
N.º de réplicas en cada “set”:	89 ^a	35
N.º. de cultivos que contenían el siguiente No. de células resistentes a salinidad:		
0	43	0
1-10 ⁵	5	0
> 10 ⁵	41	35
CV del N.º de células resistentes a salinidad por cultivo:	1,223	0,065
Test Z de una cola para comparar los CVs:		30,614***
Mecanismo de resistencia:		adaptación
μ (nº de células mutantes división ⁻¹):		7,3×10 ⁻⁷

2.3.3. Detección del límite de resistencia a salinidad

Tras realizar el experimento de trinquete, se observó que algunos cultivos de *M. aeruginosa* sobrevivieron a una concentración salina por encima de la dosis utilizada en el análisis de fluctuación (14 g L⁻¹ NaCl). Específicamente, tres cultivos mostraron una capacidad de resistencia a niveles de salinidad casi 1,5 veces más altos que la dosis letal inicial (10 g L⁻¹ NaCl). Debido a que cada réplica se puede considerar como una población independiente, cada una de ellas tuvo una historia evolutiva propia. Las mayores diferencias se detectaron a medida que avanzaba el experimento, especialmente cuando se alcanzaron salinidades más altas. Por ejemplo, tres réplicas de *M. aeruginosa* pudieron crecer a 15,1 g L⁻¹ NaCl después de aproximadamente 20 generaciones, mientras que las células de la cuarta réplica no desarrollaron resistencia y la población se extinguió (Tabla 2). Además, se detectó que la mayor capacidad de resistencia tuvo lugar en aquellos cultivos expuestos a mayores concentraciones iniciales de NaCl (Tabla 2).

Tabla 2. Número de días (*t*) y número de generaciones (*g*) requeridas para crecer bajo una concentración creciente de NaCl durante los ciclos del experimento de trinquete. Se realizaron tres experimentos que diferían en la concentración inicial (de 0 a 3, de 0 a 4,5 y de 0 a 6,8 g L⁻¹ NaCl). El sombreado gris en el aumento de la concentración de NaCl de 6,8 a 10,1 g L⁻¹ corresponde al rango que incluye la dosis letal inicial (ver Figura 4).

Réplica	0 → 3		3 → 4,5		4,5 → 6,8		6,8 → 10,1		10,1 → 15,1	
	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>
1	28	10	28	10	28	10	28	10	nc	nc
2	28	10	28	10	28	10	28	10	nc	nc
3	28	10	28	10	28	10	28	10	nc	nc
4	28	10	28	10	28	10	28	10	nc	nc

Réplica	0 → 4,5		4,5 → 6,8		6,8 → 10,1		10,1 → 15,1		
	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	
1		28	10	28	10	28	10	nc	nc
2		28	10	28	10	28	10	nc	nc
3		28	10	28	10	28	10	nc	nc
4		28	10	28	10	28	10	nc	nc

Réplica	0 → 6,8		6,8 → 10,1		10,1 → 15,1		15,1 → 22,6		
	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	
1		28	10	28	10	56	20	nc	nc
2		28	10	28	10	56	20	nc	nc
3		28	10	28	10	nc	nc	nc	nc
4		28	10	28	10	56	20	nc	nc

nc: no se detectó crecimiento celular

2.3.4. El coste fisiológico de la resistencia a salinidad en la tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento de las células sensibles a salinidad (MaAVc^s) fue significativamente mayor que el observado en las células resistentes (MaAVc^{rt}: obtenidas del experimento de trinquete, Tabla 2), en ausencia del agente selectivo (Figura 5). Además, la tasa de crecimiento de las células resistentes a salinidad se mantuvo constante al aumentar la salinidad, mientras que no se observó división en las células sensibles a salinidades mayores de 10 g L⁻¹ NaCl (Figura 5).

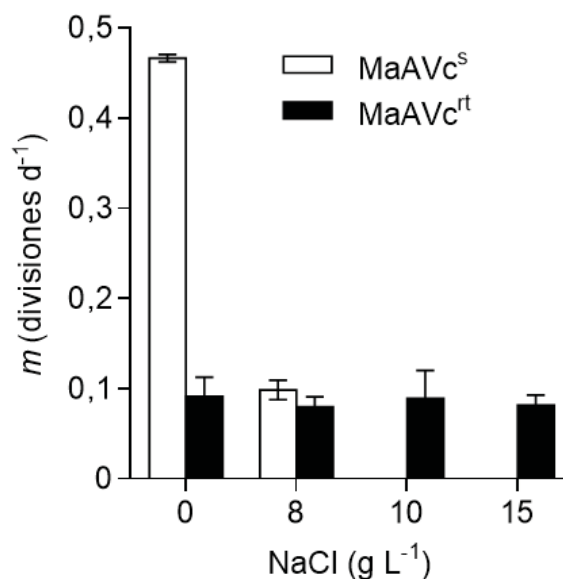


Figura 5. Tasa de crecimiento (m ; media \pm σ , $n = 3$) de las cepas MaAVc^s y MaAVc^{rt} (obtenidas del experimento de trinquete) en ausencia y presencia de distintas concentraciones salinas.

2.3.5. El coste de la resistencia a salinidad en la tasa neta de fotosíntesis y en la tasa de transporte de electrones

Los valores de NPR_{max} de la cepa MaAVc^s fueron mayores que los observados en la cepa MaAVc^{rt}, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la eficiencia fotosintética α^{NPR} (Figura 6, Tabla 3). El punto de compensación (I_c) de las células resistentes fue significativamente mayor que el observado en las células sensibles (Tabla 3), mientras que la tasa de respiración (DR) fue aproximadamente 1,5 veces mayor en la cepa resistente que en la sensible (Tabla 3).

En cuanto a la ETR_{max} se observó que la cepa sensible alcanzaba valores cercanos al doble que los observados en la cepa resistente, y que la irradiancia saturante fue dos veces menor para la cepa resistente (Figura 6, Tabla 3). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas para α^{ETR} .

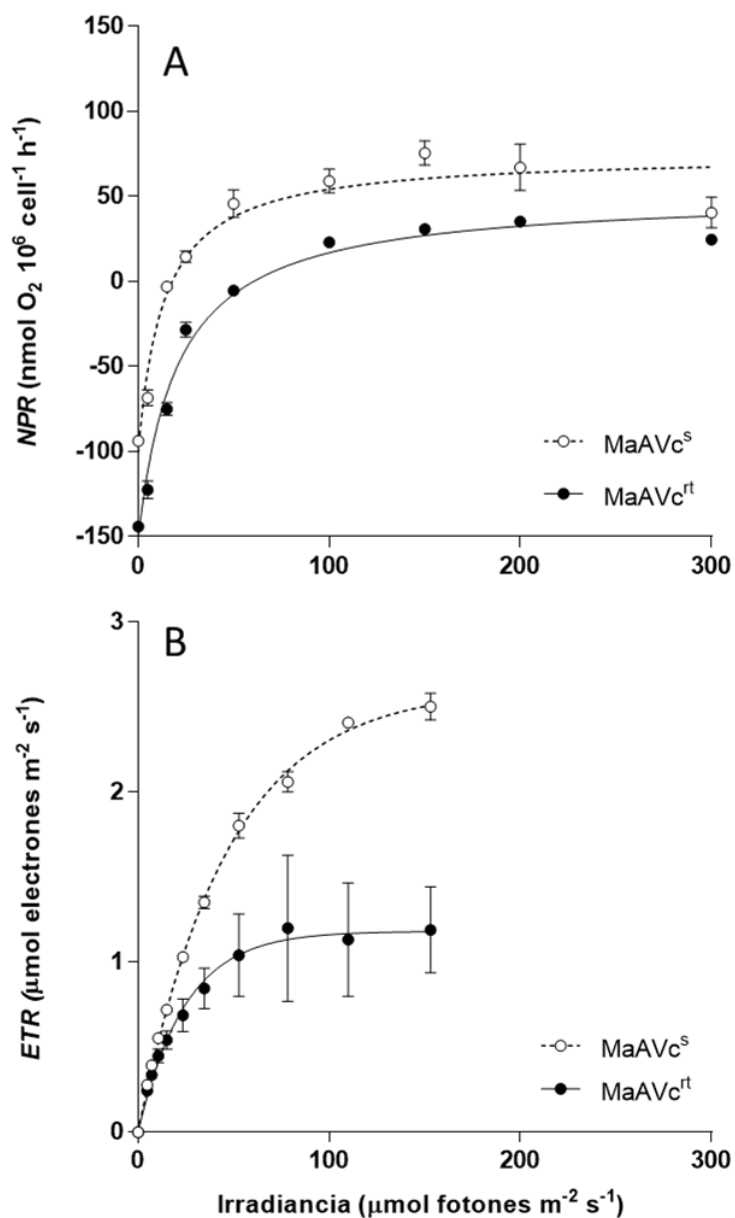


Figura 6. Tasa fotosintética neta (*NPR*) (A) y tasa transporte de electrones (*ETR*) (B) en función de la irradiancia de las cepas de *M. aeruginosa* sensibles a salinidad (MaAVc^s) y resistente a salinidad (derivada del experimento de trinquete, MaAVc^{rt}). Los puntos representan la media $\pm \sigma$ ($n = 5$ y 4 para *NPR* y *ETR*, respectivamente). Las líneas indican los valores del ajuste de la ecuación de Edwards y Walker (1983) para *NPR-I* y de la ecuación de Platt *et al.* (1980) para *ETR-I*.

Tabla 3. Comparación de los valores de los parámetros de la curva *NPR-I* y *ETR-I* según las ecuaciones de Edwards y Walker (1983) y Platt *et al.* (1980), respectivamente, para las células sensibles y resistentes a salinidad en BG11-50% sin adición de sal (*M. aeruginosa*) mediante la prueba *t* de Student.

Ajuste	Parámetro	MaAVc ^s	MaAVc ^{rt}	<i>t</i>	<i>gl</i>	<i>p</i>
Edwards y Walker (1983)	<i>NPR</i> _{max}	51,23 ± 6,30	39,27 ± 2,28	3,99	8	0,003
	DR	-93,78 ± 2,90	-144,10 ± 3,29	25,62	8	<0,001
	<i>I</i> _{0,5}	10,197 ± 0,82	17,80 ± 1,24	-11,37	8	<0,001
	<i>I</i> _c	20,03 ± 1,83	68,89 ± 2,04	-39,51	8	<0,001
	α^{NPR}	4,58 ± 0,14	4,65 ± 0,87	-1,81	8	0,106
Platt <i>et al.</i> (1980)	<i>ETR</i> _{max}	2,32 ± 0,17	1,04 ± 0,37	6,22	6	<0,001
	α^{ETR}	0,05 ± 0,001	0,04 ± 0,004	4,62	6	0,003

2.4. Discusión

La tolerancia de *M. aeruginosa* a salinidad es muy variable, habiéndose encontrado cepas que toleran desde 1 hasta 14 g L⁻¹ NaCl (Preece *et al.*, 2017). La cepa MaAVc puede tolerar hasta 10 g L⁻¹ NaCl. Como consecuencia, se observó un declive de las poblaciones cuando fueron expuestas a 14 g L⁻¹ en el experimento de análisis de fluctuación. Sin embargo, se detectó crecimiento después de algunas semanas debido a la aparición de células resistentes. La gran fluctuación en el número de células resistentes observadas en el “set” 1, en contraste con la escasa variación en el “set” 2, demuestra que la resistencia fue fruto de la selección de mutaciones espontáneas previas a la exposición a salinidad.

La tasa de mutación de la cepa MaAVc para la resistencia a salinidad fue de $7,3 \times 10^{-7}$ células mutantes por división celular, orden de magnitud idéntico al de las tasas encontradas en esta especie para la resistencia al herbicida glifosato ($3,1-3,6 \times 10^{-7}$; López-Rodas *et al.*, 2007) o a aguas sulfurosas ($7,1 \times 10^{-7}$; Fernández-Arjona *et al.*, 2013), pero un orden de magnitud menor que la encontrada para la resistencia al cobre ($1,8 \times 10^{-6}$; García-Villada *et al.*, 2004) y al aumento de temperatura ($1,2 \times 10^{-6}$; Costas *et al.*, 2014), y dos órdenes de magnitud menor que la encontrada para la resistencia al petróleo y al diésel ($1,7 \times 10^{-5}$ y $1,8 \times 10^{-5}$; Romero-Lopez *et al.*, 2012).

La disminución de la tasa de crecimiento de las células resistentes a salinidad, en comparación con las células sensibles en ausencia del agente selectivo, refleja el coste fisiológico de la resistencia de las células sensibles de *M. aeruginosa*. La diferencia en las tasas de crecimiento da lugar a que se produzca un equilibrio mutación-selección, pues

en las poblaciones naturales de *M. aeruginosa* que no están sometidas a salinidad, las células resistentes son desplazadas por genotipos más aptos. Se ha determinado el equilibrio mutación-selección a partir de las tasas de crecimiento de las células sensibles y las resistentes derivadas del análisis de fluctuación: una frecuencia, en el equilibrio, de aproximadamente 1 célula resistente por cada 10^6 células sensibles a salinidad. El equilibrio mutación-selección fue del mismo orden de magnitud que para otros agentes selectivos naturales como aguas sulfurosas (1 célula resistente por cada 10^6 células sensibles; Fernández-Arjona *et al.*, 2013) y el aumento de temperatura (1 célula resistente por cada 10^6 células sensibles; Costas *et al.*, 2014). Sin embargo, fue dos órdenes de magnitud menor que el observado para el herbicida glifosato (6–7 células resistentes por cada 10^4 células sensibles; López-Rodas *et al.*, 2007). La proporción de células resistentes a salinidad debería ser suficiente para asegurar la adaptación y, por lo tanto, la supervivencia de poblaciones naturales de *M. aeruginosa* expuestas a aumentos de salinidad. Por lo tanto, es posible plantear la hipótesis de que, en un escenario de aumento de salinidad en cuerpos de agua dulce que contengan *M. aeruginosa*, podrían desarrollarse poblaciones resistentes a salinidad de esta especie, aunque su contribución a la producción primaria sería significativamente menor que la que ocurre en ecosistemas inalterados, puesto que su tasa de crecimiento es menor que la de los congéneres de agua dulce.

El límite de la resistencia de *M. aeruginosa* se evaluó mediante el experimento de trinquete. Los resultados mostraron que las células de esta cepa podían crecer a una concentración de NaCl 1,5 veces mayor que la dosis letal inicial. El aumento de la tolerancia no es elevado si lo comparamos con otros agentes selectivos; *M. aeruginosa* puede tolerar 4–12 veces la dosis letal inicial de cobre (Rouco *et al.*, 2014), nueve veces la dosis letal inicial del herbicida simazina (Huertas *et al.*, 2010) y seis veces la dosis letal inicial de petróleo y diésel (Romero-López *et al.*, 2012). La explicación podría ser que la resistencia a salinidad en las cianobacterias se basa en diversos procesos celulares controlados por múltiples genes (Hagemann, 2011). Por ejemplo, en un estudio de *microarrays* de ADN realizado con la cepa 6803 de la cianobacteria *Synechocystis*, se observó que entre 200 y 300 genes se vieron afectados cuando las células se expusieron a condiciones de alta salinidad (Kanesaki *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2003, 2004). Específicamente, las cianobacterias presentan una estrategia *salt out* que implica la exclusión de iones tóxicos como Na^+ y Cl^- a través de diferentes transportadores de membrana (Hagemann, 2011). Se ha observado que varias proteínas de transporte desempeñan un papel fundamental en la exclusión de Na^+ , como los antiportadores de

$\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (Inaba *et al.*, 2001). Menos se conoce sobre la exclusión de Cl^- que, probablemente, ocurre a través de canales (Marin *et al.*, 2004). No obstante, la resistencia a la sal en las cianobacterias también está relacionada con la acumulación de solutos compatibles que mantienen la turgencia celular (Reed *et al.*, 1986). En el caso de *M. aeruginosa*, los principales solutos compatibles son el monosacárido glucosa y el disacárido trehalosa. Aunque, la presencia de los genes responsables de la síntesis del disacárido sacarosa es poco frecuente en cepas de *M. aeruginosa* (Tanabe *et al.*, 2018), se ha observado la existencia de estos genes (*sppA*, *spsA* y *susA*) en varias cepas obtenidas en aguas salobres (Sandrini *et al.*, 2015; Tanabe *et al.*, 2018, 2019), lo que podría ser el resultado de procesos de transferencia horizontal de genes (Tanabe *et al.*, 2018, 2019).

El experimento de trinquete no está diseñado para diferenciar entre aclimatación y adaptación. No obstante, los resultados obtenidos del análisis de fluctuación demostraron que la resistencia a salinidad es consecuencia de la selección de nuevas variantes genéticas. Ejemplo de ello es que las células resistentes al nivel de salinidad más alto (15,1 g L⁻¹ NaCl, aisladas del experimento de trinquete) tienen una tasa de crecimiento significativamente menor en ausencia de salinidad que las células sensibles a salinidad. Además, *NPR* y *ETR* fue menor en las células resistentes que en las sensibles, lo que sugiere que los cambios genéticos que proporcionan la resistencia a salinidad tienen un coste fisiológico que también incide en la fotosíntesis (al menos, en las reacciones que acontecen en la fase luminosa). Este resultado concuerda con estudios recientes donde se ha observado que el aumento de salinidad tiene un efecto negativo en la actividad fotosintética de *M. aeruginosa* debido a la disminución de la regulación de genes que codifican proteínas pertenecientes a ambos fotosistemas (Ross *et al.*, 2019; Des Aulnois *et al.*, 2020).

Cabe mencionar que, en el experimento de trinquete, los “errores de muestreo” que conducen a eventos de deriva genética eran extremadamente improbables, debido a que se transfirieron 3×10^5 células en cada paso del experimento. Sin embargo, en escenarios naturales, donde ocurran procesos de salinización, es posible se produzcan eventos de evolución neutral o deriva genética, como se ha sugerido recientemente (Shirani & Hellweger, 2017).

El experimento de trinquete se ha utilizado para explorar el límite de la resistencia a salinidad de una cepa de *M. aeruginosa*. Los resultados derivados de este estudio junto con los obtenidos en trabajos previos (Huertas *et al.*, 2010; Rouco *et al.*, 2014; Martín-Clemente *et al.*, 2019; Melero-Jiménez *et al.*, 2019, 2020) ofrecen una posible imagen del

comportamiento futuro de las poblaciones de *M. aeruginosa* bajo diferentes escenarios afectados por el aumento de las concentraciones de agentes selectivos. No obstante, es necesario mencionar que los resultados obtenidos están basados en una sola cepa de partida y, por lo tanto, no pueden extrapolarse a toda la especie. Seguramente, a nivel de especie se excederán los límites obtenidos en estos experimentos debido a que en medios naturales se partiría de una variabilidad genética inicial mucho más elevada.

Finalmente, es posible que en ambientes naturales las células de *M. aeruginosa* puedan encontrarse formando colonias. Como consecuencia, las células de la zona central de las mismas podrían estar más protegidas del ambiente externo que las células individuales (Liu *et al.*, 2018). Por lo tanto, teniendo en cuenta que los experimentos realizados en este estudio se efectuaron con inóculos de cultivos unicelulares no formadores de colonias, es posible hipotetizar que la resistencia de *M. aeruginosa* a salinidad en condiciones naturales podría ser mayor si las células se encuentran formando colonias.



CAPÍTULO 3

**El límite de la resistencia a salinidad en la cianobacteria de agua dulce
Microcystis aeruginosa está modulado por la tasa de aumento de
salinidad**

“There is in evolution a continual balancing of the two advantages: the advantage of increasing specialization in sufficiently stable conditions, the advantage of versatility in changing conditions.”

George Gaylord Simpson, 1902 – 1984

The Meaning of Evolution, 1949





3.1. Introducción

Los ecosistemas naturales se ven sometidos a presiones que tienen efectos negativos en las poblaciones que en él proliferan. Cuando las condiciones cambian de manera puntual, como podría ser un aumento de salinidad en medios dulceacuícolas, es posible que las poblaciones de cianobacterias sufran una disminución del número de individuos, pero también es probable que se recuperen cuando la salinidad disminuya. Sin embargo, cuando el cambio ambiental no es puntual, sino que se mantiene o incluso aumenta a lo largo del tiempo superando los límites fisiológicos de los individuos, lo más probable es que se extingan las poblaciones si no consiguen adaptarse (Bell, 2017). En esta situación, la recombinación de genes y la aparición de mutaciones da lugar a nuevos genotipos resistentes (adaptación) que podrían permitir la supervivencia de las poblaciones (Belfiore & Anderson, 2001). Además de la variabilidad genotípica existente de la población, se ha sugerido que la adaptación también podría depender de la tasa de cambio ambiental (Collins *et al.*, 2007; Collins & de Meaux, 2009; Ashander *et al.*, 2016). Se ha observado que un incremento gradual del estrés podría favorecer la supervivencia de la población debido a la selección del alelo o alelos responsables de la supervivencia en condiciones de estrés subletal (Bell & Collins, 2008; Perron *et al.*, 2008; Collins & de Meaux, 2009; Samani & Bell, 2010; Bell & Gonzalez, 2011; Bell, 2013; Gonzalez & Bell, 2013; Kirkpatrick & Peischl, 2013; Lindsey *et al.*, 2013; Carlson *et al.*, 2014). Al mismo tiempo, cuando el estrés se produce de manera gradual, no suele ocurrir una reducción drástica de la población y, como consecuencia, hay una menor probabilidad de que los alelos beneficiosos se pierdan por efectos de deriva genética (Lande *et al.*, 2003). Por el contrario, un cambio ambiental repentino podría causar una fuerte reducción de la capacidad de reacción de las poblaciones, lo que llevaría a una disminución repentina en el número de individuos (con lo que, en consecuencia, disminuiría la diversidad genética) y, por lo tanto, se reduciría la posibilidad de que aparezcan organismos resistentes en la población (Collins *et al.*, 2007; Bell & Collins, 2008). La consecuencia última sería que el límite de resistencia de una población estaría determinado por la tasa de cambio ambiental, como se ha demostrado, por ejemplo, para la resistencia a antibióticos en *E. coli* (Perron *et al.*, 2006, 2008). Igualmente, se ha observado que la posibilidad de que ocurran eventos de rescate evolutivo es mayor cuando la tasa de cambio ambiental es

progresiva (Perron *et al.*, 2008; Samani & Bell, 2010; Bell & Gonzalez, 2011; Gonzalez & Bell, 2013; Lindsey *et al.*, 2013; Killeen *et al.*, 2017).

Como se ha comentado en el capítulo anterior, la salinidad está aumentando en las masas de agua dulce de todo el planeta; este escenario podría beneficiar a la expansión de algunas cianobacterias en comparación con otros organismos fitoplanctónicos (Paerl & Huisman, 2009; Huisman *et al.*, 2018). Algunas especies tóxicas de cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Microcystis* y *Nodularia* pueden ser, en ocasiones, más tolerantes que las especies eucariotas de fitoplancton de agua dulce (Paerl & Huisman, 2009). Este hecho se ve reflejado en un aumento de *blooms* de cianobacterias de agua dulce en masas de aguas salobres (Dumont, 1998; Matthiensen *et al.*, 2000; Kanoshina *et al.*, 2003; Robson & Hamilton, 2003; Albay *et al.*, 2005; Lehman *et al.*, 2005; Suikkanen *et al.*, 2007; Preece *et al.*, 2017). Una de las especies de cianobacterias tóxicas que podría verse beneficiada es *M. aeruginosa*, debido al gran rango de tolerancia a la salinidad (Preece *et al.*, 2017). Los efectos del estrés salino en distintas cepas de *M. aeruginosa* han sido ampliamente abordados (Prinsloo & Pieterse, 1994; Otsuka *et al.*, 1999; Orr *et al.*, 2004; Verspagen *et al.*, 2006; Tonk *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Martínez de la Escalera *et al.*, 2017; Rosen *et al.*, 2018). Específicamente, cuando el aumento de salinidad supera los límites fisiológicos de *M. aeruginosa* se induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la muerte celular programada (Ross *et al.*, 2006, 2019). Sin embargo, los estudios previamente citados no permiten conocer el límite máximo de resistencia a salinidad que podría tolerar *M. aeruginosa* e incluso formar *blooms*, ya que esos resultados se deben interpretar como evidencias de procesos de aclimatación al haberse realizado con muy pocas generaciones de células (Borowitzka, 2018). Por el contrario, solo unos pocos estudios se han realizado sometiendo poblaciones de *M. aeruginosa* a incrementos salinos durante un gran número de generaciones, en algunos casos, de varios centenares (Des Aulnois *et al.*, 2019; Melero-Jiménez *et al.*, 2019, 2020). En el capítulo anterior, se demostró que una cepa de *M. aeruginosa*, a la que el aumento de salinidad afectaba significativamente, se podía adaptar a niveles de salinidad originalmente letales mediante la selección de nuevas variantes genéticas originadas por mutación. No obstante, en este capítulo se pretende abordar dos cuestiones más; (i) ¿podría la tasa de deterioro determinar el límite de la resistencia?; y (ii) ¿afectaría a diferentes cepas por igual?

El objetivo de este capítulo fue analizar si la tasa de deterioro ambiental (incremento de salinidad) puede modular el límite de resistencia de diferentes cepas *M.*

aeruginosa. Los mecanismos de resistencia (aclimatación vs. adaptación) también fueron estudiados. Finalmente, se analizó el coste de la resistencia en términos de tasa de crecimiento, rendimiento del PSII, amortiguamiento fotoquímico y amortiguamiento no fotoquímico.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Organismo experimental y condiciones de cultivo

Se utilizaron tres cepas de la cianobacteria *M. aeruginosa* (Ma1Vc, Ma5Vc y MaAVc) que fueron proporcionadas por la Colección de Cultivo de Algas del Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria (Universidad Complutense, Madrid, España). Todas las cepas se aislaron en abril de 2011 del embalse de Valmayor (Madrid, España). Las condiciones de cultivo fueron similares a las descritas en el capítulo 2 (sección 2.2.1.). El efecto de la salinidad sobre la tasa de crecimiento de las cepas se calculó de manera similar a la descrita en el capítulo 2 (sección 2.2.2.).

3.2.2. Diseño experimental: protocolo de trinquete a diferentes tasas de deterioro

A diferencia del capítulo 2, en este caso se realizaron dos experimentos de trinquete a diferentes tasas de incremento de salinidad con tres cepas de *M. aeruginosa*. La metodología empleada es similar a la explicada en el capítulo anterior (sección 2.2.5.), pero se introducen una serie de modificaciones que se detallan a continuación. En este caso, los cultivos se mantuvieron durante 7 d antes de comparar con el control. Además, las dosis iniciales de NaCl fueron más bajas (0,1, 0,3 y 0,9 g L⁻¹) y la concentración de NaCl aumentó ×3 en cada ciclo de trinquete hasta que los cultivos alcanzaron una concentración de 2,7 g L⁻¹ NaCl, es decir, antes de superar una concentración letal en el siguiente ciclo. En ese punto, los cultivos tomaron dos rutas diferentes de tasa de incremento de salinidad: lenta (tasa de aumento ×1,5) o rápida (tasa de aumento ×3). Por lo tanto, las concentraciones fueron de 4, 6,1, 9,1, 13,6 y 20,5 g L⁻¹ NaCl en el trinquete lento, mientras que en el trinquete rápido fueron de 8,1 y 24,3 g L⁻¹ NaCl (Figura 7).

Finalmente, se estableció el límite de la resistencia como la salinidad más alta a la que se detectó crecimiento celular. Previamente a la realización de los experimentos, se aisló mediante diluciones sucesivas una sola célula del cultivo inicial de cada cepa para minimizar la probabilidad de que hubiera mutantes resistentes que pudieran estar presente en los cultivos. Los cultivos experimentales se mantuvieron por separado en placas de 24 pocillos (2 mL por pocillo), inoculados con 3×10^5 células.

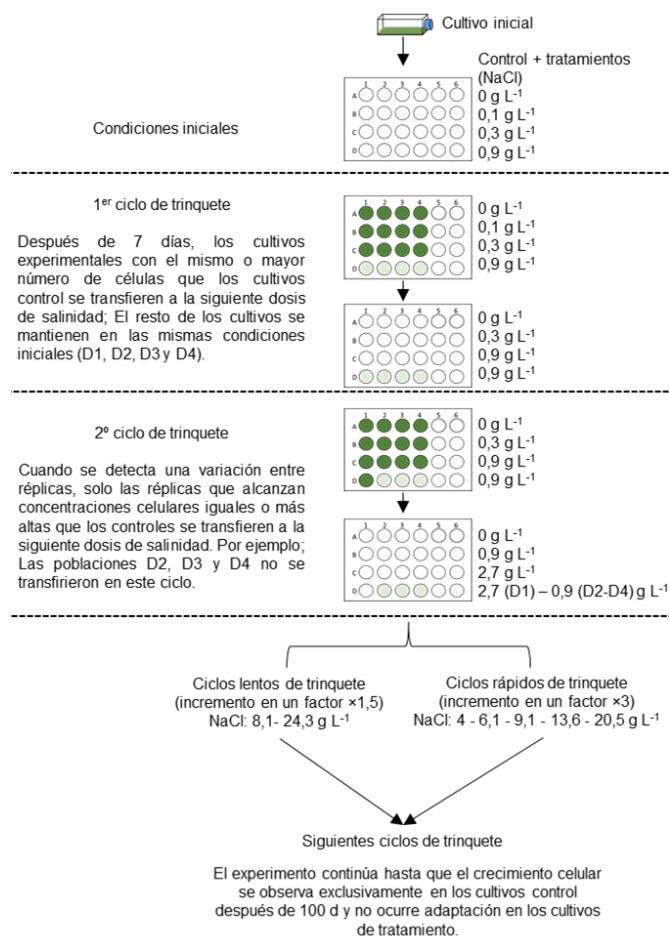


Figura 7. Representación esquemática del diseño experimental de trinquete a distintas tasas de deterioro. Se incubaron cuatro réplicas (1-4 pocillos) de los cultivos de control (pocillos de la fila A) y cuatro réplicas de cultivos en cada una de las tres dosis iniciales de NaCl (pocillos de las filas B-D, respectivamente) en cada ciclo de trinquete. Cada cultivo se transfirió a la siguiente concentración de NaCl siguiendo un factor de $\times 3$, cuando se observó una concentración celular similar o mayor que en los cultivos control. Los cultivos experimentales, que no alcanzaron una concentración celular similar o mayor que el control, se mantuvieron en el mismo ciclo de trinquete (misma salinidad). Cuando los cultivos experimentales alcanzaron la concentración de $2,7 \text{ g L}^{-1}$ NaCl, se aplicaron dos tasas diferentes de deterioro ambiental. Específicamente, las concentraciones de NaCl comenzaron a aumentar por un factor de $\times 1,5$ o $\times 3$ en el trinquete lento y rápido, respectivamente. El límite de la resistencia corresponde a la salinidad máxima a la que se detectó división celular.

3.2.3. Aclimatación vs. adaptación

El diseño experimental de trinquete no permite discernir si las células resistentes son resultado de la aclimatación o de la adaptación, como ocurre con el análisis de fluctuación (sección 2.2.3.). Sin embargo, es posible hacer un experimento relativamente simple, con las células que muestren la máxima resistencia, para poder indagar en esta cuestión, sin tener que realizar análisis genéticos o un análisis de fluctuación (Figura 8). Este experimento complementario se basa en que, al menos en bacterias, los efectos de la aclimatación, incluidos los eventos epigenéticos, pueden abarcar de dos a tres generaciones (Bennett & Lenski, 1997).

Para realizar este experimento, se utilizaron cuatro cultivos independientes fundados a partir de las células que alcanzaron el nivel máximo de resistencia. En primer lugar, se inocularon 6×10^5 células en 20 mL de medio BG11-50%. Los cultivos se incubaron durante 15 d en las mismas condiciones de crecimiento que las descritas anteriormente (~ 4 generaciones). Tras ese periodo de tiempo, se determinaron los valores de la tasa de crecimiento (m_1) como se explicó en el capítulo 2 (sección 2.2.2.). En segundo lugar, las células se transfirieron e incubaron durante otros 15 d en medio BG11-50% suplementado con $9,1 \text{ g L}^{-1}$ NaCl para la cepa Ma1Vc y $13,6 \text{ g L}^{-1}$ NaCl para las cepas Ma5Vc y MaAVc (estos valores corresponden a la máxima salinidad a la que se detectó crecimiento celular en cada cepa en el experimento de trinquete), y el valor de tasa de crecimiento (m_2) se midió nuevamente (Figura 8). Los valores de m de las células sensibles, las células resistentes en medio BG11-50% (m_1) y las células resistentes en BG11-50% suplementado con NaCl (m_2), se compararon utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó la prueba de Mann-Whitney, con la corrección de Bonferroni. Los análisis estadísticos se realizaron con el software libre R Core Team (2013).

Se considera que la adaptación ocurre cuando los valores de m_1 y m_2 son similares, es decir, la tasa de crecimiento de las células resistentes a salinidad no muestra diferencias significativas cuando se cultivan en sus condiciones ancestrales (control) y en presencia de altas concentraciones de NaCl (en su límite de resistencia). Por el contrario, la aclimatación ocurre cuando el valor de tasa de crecimiento medido tras la exposición a salinidad (m_2) es menor que el medido en las condiciones control (m_1).

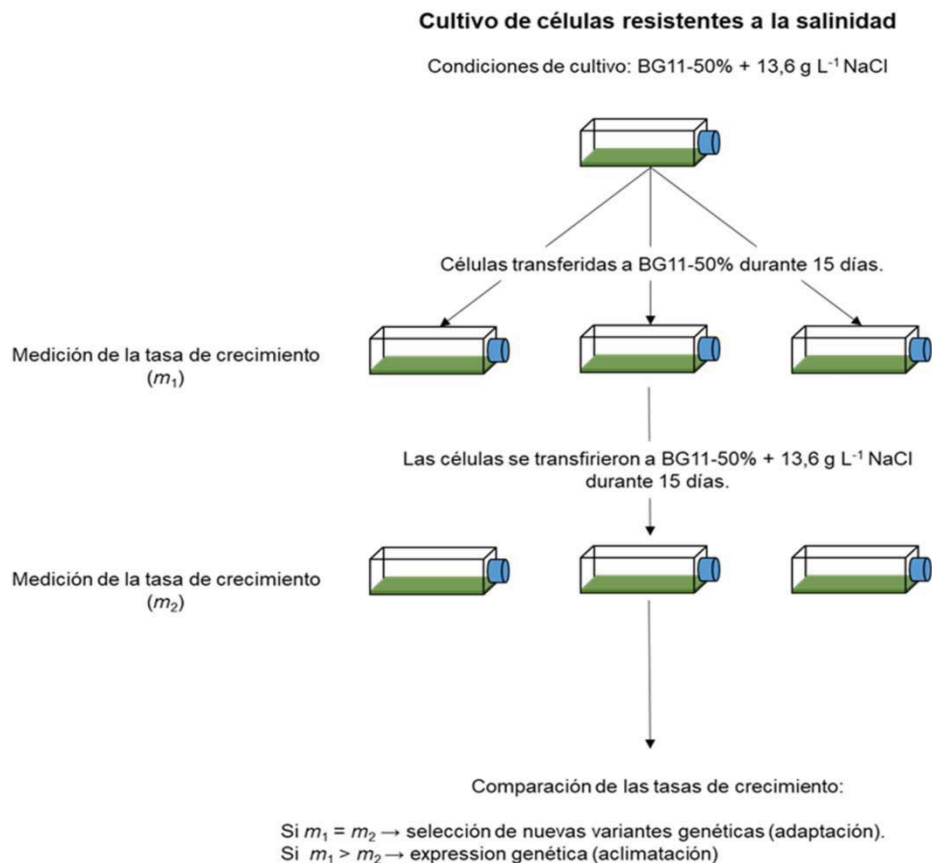


Figura 8. Diseño experimental para determinar el mecanismo de resistencia que permite la supervivencia de los cultivos del experimento de trinquete. En el primer paso, los cultivos que se adaptaron al nivel de salinidad más alto después de realizar el experimento de trinquete (9,1 g L⁻¹ NaCl para la cepa Ma1Vc, y 13,6 g L⁻¹ NaCl para las cepas Ma5Vc y MaAVc, como se muestra en la figura) se expusieron durante 15 días a BG11-50% medio (sin adición de NaCl) y se determinó la tasa de crecimiento (m_1). Posteriormente, las células se transfirieron durante otros 15 días a BG11-50% suplementado con la concentración de NaCl correspondiente, y las tasas de crecimiento (m_2) se calcularon nuevamente. La adaptación puede reconocerse por valores similares de m_1 y m_2 , mientras que, si m_2 es significativamente menor que m_1 , se puede inferir que la resistencia se debió principalmente a la aclimatación.

3.2.4. Rendimiento cuántico efectivo, amortiguamiento fotoquímico y amortiguamiento no fotoquímico de las cepas sensibles y resistentes

El cálculo del $Y(II)$ del PSII se detalló en el capítulo 2 (sección 2.2.7.). El amortiguamiento fotoquímico (q_p , *photochemical quenching*) es la eficiencia de la vía fotoquímica durante el proceso de disipación de la energía de la Chl *a* (Maxwell & Johnson, 2000); por lo tanto, estima el equilibrio entre la excitación de los centros de PSII

y la traslocación de los electrones del PSII a la cadena de transporte de electrones. El valor de q_p se calculó como:

$$q_p = \frac{(F'_m - F_t)}{(F'_m - F'_0)} \quad [\text{ec. 12}]$$

donde, F'_m , F_t y F'_0 son la fluorescencia máxima, transitoria y mínima de las células preincubadas en luz, respectivamente. El valor de F'_0 se determinó de la siguiente manera:

$$F'_0 = \frac{F_0}{\left(\frac{F_v - F_0}{F_m - F'_m}\right)} \quad [\text{ec. 13}]$$

donde F_0 es la fluorescencia mínima o basal de las células preincubadas en oscuridad (con todos los centros de reacción de PSII abiertos) y F_v es la fluorescencia variable (calculada como $F_m - F_0$).

El amortiguamiento no fotoquímico (q_N) engloba aquellos procesos no fotoquímicos y que también disipan la energía; fundamentalmente, consiste en la disipación de calor (Maxwell & Johnson, 2000). El amortiguamiento no fotoquímico se puede dividir en dos rutas diferentes nombradas como $Y(NO)$ e $Y(NPQ)$. El parámetro $Y(NO)$ refleja la fracción de energía que se disipa pasivamente como calor y fluorescencia (mecanismo no regulado), mientras que $Y(NPQ)$ corresponde a la fracción de energía disipada como calor debido a la actuación de los mecanismos de fotoprotección (mecanismo regulado). El amortiguamiento no fotoquímico, sus dos rutas, y el parámetro de amortiguamiento no fotoquímico (NPQ), se calcularon de la siguiente manera:

$$q_N = 1 - \frac{(F'_m - F_0)}{(F_m - F_0)} \quad [\text{ec. 14}]$$

$$Y(NO) = \frac{F_t}{F_m} \quad [\text{ec. 15}]$$

$$Y(NPQ) = \frac{F_t}{F'_m} - \frac{F_t}{F_m} \quad [\text{ec. 16}]$$

$$NPQ = \frac{Y(NPQ)}{Y(NO)} \quad [\text{ec. 17}]$$

Las medidas se realizaron con las cepas Ma1Vc y Ma5Vc. El análisis estadístico de los datos de este epígrafe se basó en la comparación de las pendientes de los ajustes lineales en función de los seis valores iniciales de irradiancia, de manera similar a Bañares-España *et al.* (2016). En este caso, los valores de irradiancia estaban comprendidos entre 5-35 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Todos los parámetros de fluorescencia de la Chl *a* anteriormente mencionados se midieron usando un fluorímetro Water-PAM (Walz, Effeltrich, Alemania).

3.3. Resultados

3.3.1. Efecto de la salinidad sobre la tasa de crecimiento

Se observó una inhibición progresiva de la tasa de crecimiento, de las cepas Ma5Vc y Ma1Vc de *M. aeruginosa*, al aumentar la concentración salina. No se detectó división celular a concentraciones $\geq 8 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ (Figura 9). Ambas cepas presentan menor tolerancia a la salinidad que la cepa MaAVc (analizada en el capítulo 2). Las dosis letales se estimaron por ajuste lineal de m en función de la concentración de NaCl:

$$m_{\text{Ma1Vc}} = -0,057 \times [\text{g L}^{-1} \text{ NaCl}] + 0,402 \quad (r^2 = 0,989, n = 9) \quad [\text{ec. 18}]$$

$$m_{\text{Ma5Vc}} = -0,055 \times [\text{g L}^{-1} \text{ NaCl}] + 0,396 \quad (r^2 = 0,995, n = 9) \quad [\text{ec. 19}]$$

Las cepas Ma1Vc y Ma5Vc presentaron una dosis letal (es decir, $m = 0$) de $7 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$.

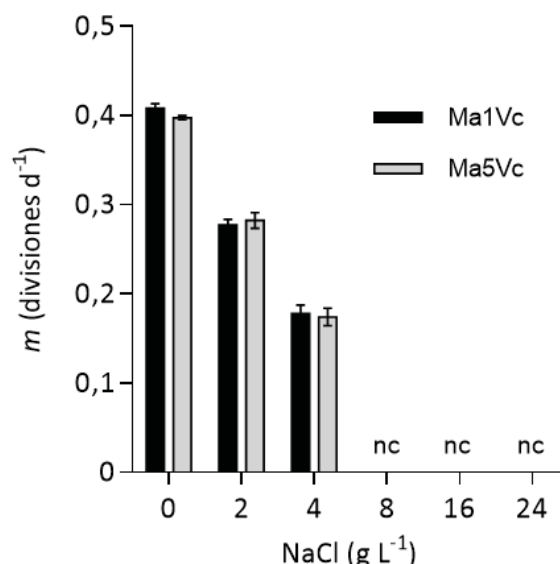


Figura 9. Efecto del incremento de salinidad (NaCl) sobre la tasa de crecimiento (m ; media $\pm \sigma$, $n = 3$; nc: crecimiento celular no detectado) de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc de *Microcystis aeruginosa*.

3.3.2. El límite de la resistencia a salinidad en función de la tasa de incremento salino

Cuando la tasa de incremento de salinidad fue rápida ($\times 3$) no se observaron diferencias en el límite de resistencia de las tres cepas (8,1 g L⁻¹ NaCl; Figura 10). Además, se observó que la concentración salina inicial determinaba el límite de la resistencia de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc. Por ejemplo, todas las poblaciones de la cepa Ma1Vc fueron capaces de desarrollar resistencia a 8,1 g L⁻¹ NaCl cuando la salinidad inicial fue de 0,1 g L⁻¹ NaCl. Sin embargo, solo una de las cuatro poblaciones desarrolló resistencia a 8,1 g L⁻¹ NaCl cuando la concentración de partida fue de 0,3 g L⁻¹ NaCl. Por último, cuando el punto de partida fue de 0,9 g L⁻¹ NaCl, ninguna población fue capaz de manifestar resistencia a 8,1 g L⁻¹ NaCl (Figura 10).

La dinámica de la resistencia fue diferente cuando la tasa de aumento de salinidad fue lenta ($\times 1,5$). En este caso, el límite de la resistencia difirió entre las cepas (9,1 g L⁻¹ NaCl para la cepa Ma1Vc, y 13,6 g L⁻¹ NaCl para las cepas Ma5Vc y MaAVc). En este caso, el número de generaciones requeridas para alcanzar la dosis letal fue menor que la encontrada para el trinquete rápido (Tabla 4). Finalmente, se detectó variación entre réplicas de la cepa Ma1Vc; por ejemplo, solo una de las poblaciones consiguió adaptarse a 8,1 g L⁻¹ de NaCl cuando la salinidad fue 0,3 g L⁻¹ de NaCl (trinquete rápido), mientras

que dos réplicas de la cepa Ma1Vc requirieron un número mayor de generaciones durante los ciclos de trinquete cuando la salinidad fue $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl (trinquete lento).

Tabla 4. Aumento de la tolerancia a salinidad con respecto a la dosis letal inicial (expresada en porcentaje) de las tres cepas de *M. aeruginosa* después de realizar el experimento de trinquete lento y rápido (Figura 10). Entre paréntesis se muestra el número de cultivos que superaron la dosis letal inicial ($n = 12$).

Cepa	Incremento de la tolerancia a salinidad (%)	
	Trinquete lento	Trinquete rápido
Ma1Vc	30 (8)	11 (5)
Ma5Vc	94 (11)	11 (8)
MaAVc	36 (12)	0 (12)

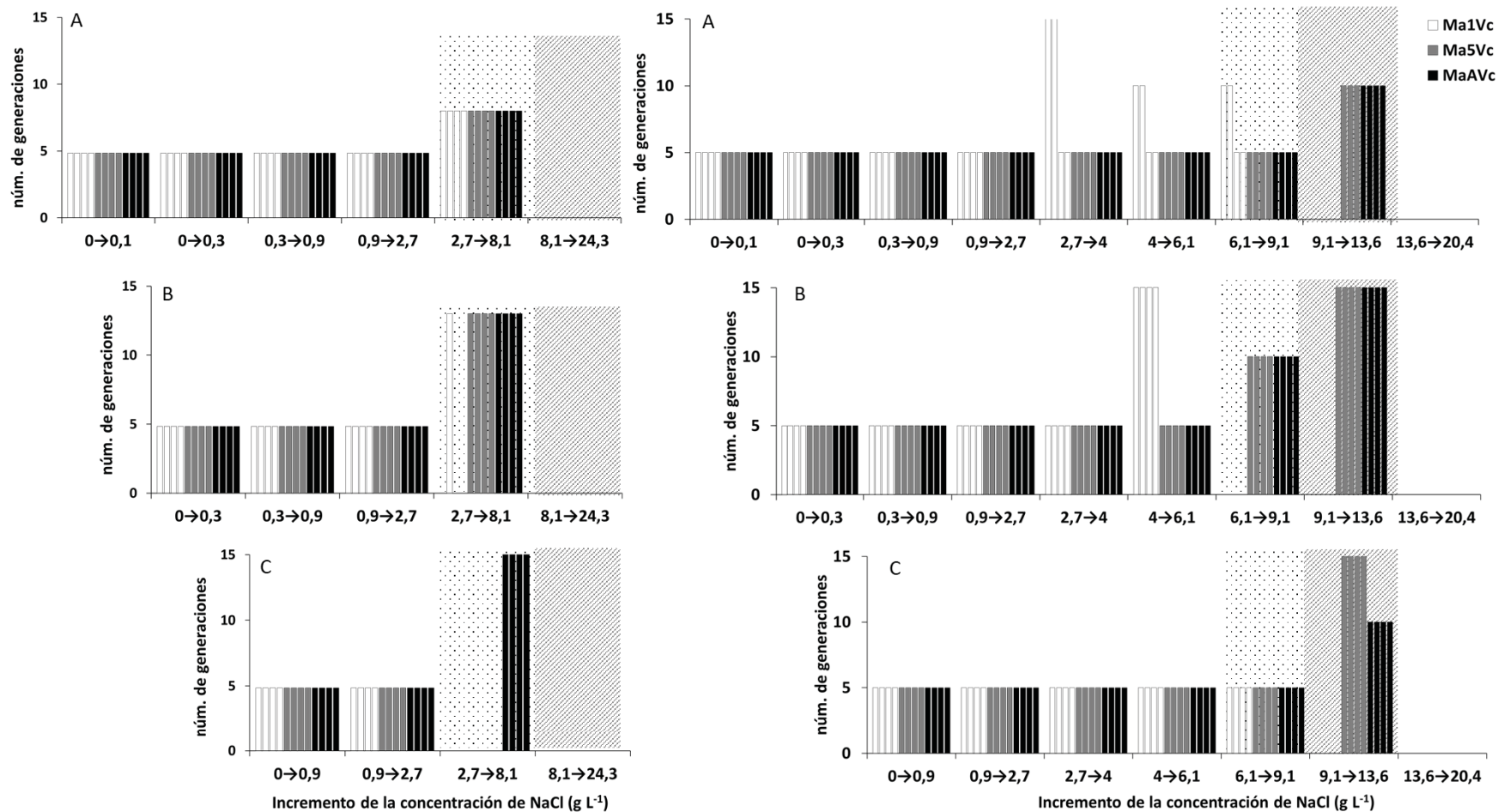


Figura 10. Número de generaciones requeridas para crecer bajo dosis crecientes de NaCl durante el experimento de trinquete. Las letras A, B y C representan diferentes concentraciones iniciales de salinidad (0, 0,3, 0,9 g L⁻¹ NaCl, respectivamente). El experimento se realizó con cuatro cultivos independientes (columnas) por cada cepa (escala de grises de las columnas). Las dosis letales iniciales están representadas por texturas; punteadas (Ma1Vc y Ma5Vc) y rayadas (MaAVc).

3.3.3. Aclimatación vs. adaptación

Para determinar si la resistencia a la salinidad fue debida a procesos de aclimatación o de adaptación, se calcularon las tasas de crecimiento (m) de las células que mostraron división celular al nivel de salinidad más alto. Los valores de m de las células ancestrales fueron 2,2-2,6 veces más elevados que los observados en las células resistentes a salinidad, en las tres cepas analizadas (Tabla 5). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los valores de m de las células resistentes a salinidad, cultivadas en ausencia o en presencia de NaCl (Tabla 5), lo que indica que la resistencia a salinidad es consecuencia de la selección de nuevas variantes genéticas (adaptación).

Tabla 5. Tasa de crecimiento (m) de las células sensibles en medio BG11-50%, y de las células resistentes a salinidad después de los experimentos de trinquete, cultivadas durante 15 días en BG11-50% (m_1) y después de ser transferidas a BG11-50% con 9,1 g L⁻¹ NaCl (cepa Ma1Vc) o 13,6 g L⁻¹ NaCl (cepas Ma5Vc y MaAVc) (m_2). Las diferencias significativas se obtuvieron mediante la prueba de Kruskal-Wallis (H). Las letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por la prueba post-hoc de Mann-Whitney entre los valores de m . Los datos son la media \pm σ ($n = 3$ y 4 para células sensibles y resistentes a salinidad, respectivamente).

Cepa	m (división celular d ⁻¹)			Test H	p
	Células sensibles	Células resistentes (- NaCl)	Células resistentes (+ NaCl)		
Ma1Vc	0,41 \pm 0,01 ^a	0,18 \pm 0,02 ^b	0,18 \pm 0,01 ^b	6,215	0,044
Ma5Vc	0,39 \pm 0,01 ^a	0,18 \pm 0,02 ^b	0,17 \pm 0,03 ^b	6,845	0,032
MaAVc	0,45 \pm 0,01 ^a	0,17 \pm 0,02 ^b	0,17 \pm 0,01 ^b	6,385	0,041

3.3.4. Diferencias en rendimiento cuántico efectivo, amortiguamiento fotoquímico y amortiguamiento no fotoquímico de las cepas sensibles y resistentes

Los valores de $Y(II)$ mostraron una curva descendente a medida que aumentó la irradiancia para las cepas sensibles y resistentes a salinidad de ambas cepas de *M. aeruginosa* (Figura 11). No se encontraron diferencias significativas en las pendientes de los ajustes lineales de los valores de $Y(II)$ a bajas irradiancias (Tabla 6).

Tabla 6. Pendientes obtenidas del ajuste lineal de los diferentes parámetros fotosintéticos a bajas irradiancias (todos ellos adimensionales) de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc de *Microcystis aeruginosa*. Las diferencias significativas de las pendientes para las células sensibles y resistentes a salinidad se obtuvieron mediante la prueba F (*F-test*).

Ma1Vc						
	Sensibles	Resistentes	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	diferencias significativas
<i>Y(II)</i>	-0,0061 ± 0,0081	-0,0064 ± 0,0006	1 y 52	0,13	0,719	no
<i>q_P</i>	-0,00563 ± 0,0005	-0,0061 ± 0,0011	1 y 44	0,15	0,700	no
<i>q_n</i>	0,0044 ± 0,0011	0,0106 ± 0,0011	1 y 44	15,36	0,0003	si
<i>NPQ</i>	0,0044 ± 0,0011	0,0168 ± 0,0015	1 y 44	45,46	<0,0001	si
<i>Y(NO)</i>	0,0018 ± 0,0006	-0,0007 ± 0,0007	1 y 44	6,48	0,01	si
<i>Y(NPQ)</i>	0,0024 ± 0,00005	0,0061 ± 0,0004	1 y 44	31,661	<0,0001	si

Ma5Vc						
	Sensibles	Resistentes	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	diferencias significativas
<i>Y(II)</i>	-0,0059 ± 0,0009	-0,0081 ± 0,0016	1 y 52	1,45	0,23	no
<i>q_P</i>	-0,0072 ± 0,0017	-0,0089 ± 0,0023	1 y 44	0,31	0,57	no
<i>q_n</i>	0,0034 ± 0,0006	0,0067 ± 0,0038	1 y 37	0,55	0,46	no
<i>NPQ</i>	-0,00031 ± 0,0032	0,0149 ± 0,0077	1 y 37	1,71	0,19	no
<i>Y(NO)</i>	0,0014 ± 0,0006	0,0022 ± 0,0042	1 y 37	0,03	0,86	no
<i>Y(NPQ)</i>	0,0021 ± 0,0003	0,0055 ± 0,0019	1 y 37	2,36	0,13	no

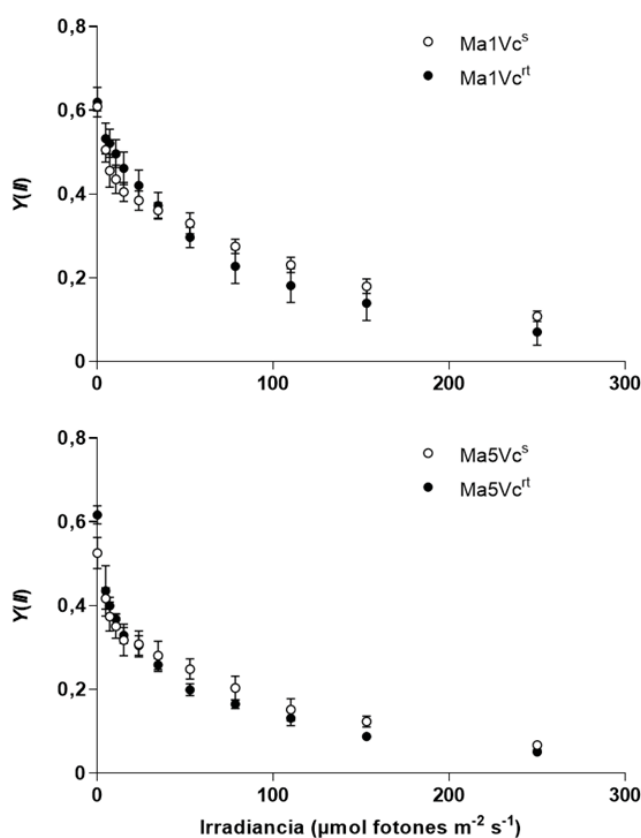


Figura 11. Rendimiento cuántico efectivo del PSII de las células sensibles y resistentes a salinidad de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc de *M. aeruginosa*. Media ± σ ($n = 4$).

Los valores q_p de las células sensibles y resistentes de *M. aeruginosa* de ambas cepas disminuyeron al aumentar la irradiancia (Figura 12). Esta disminución fue lineal a bajos niveles de irradiancia; ambas cepas mostraron pendientes similares (Tabla 6). Por el contrario, q_N aumentó en función de la irradiancia en ambas cepas (Figura 12). Al igual que en el caso anterior, se observó una relación lineal a bajos niveles de irradiancia. En este caso, se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de las variedades sensible y resistente de la cepa Ma1Vc (Figura 12), sin embargo, no se observaron diferencias significativas para las variedades de la cepa Ma5Vc (Tabla 6).

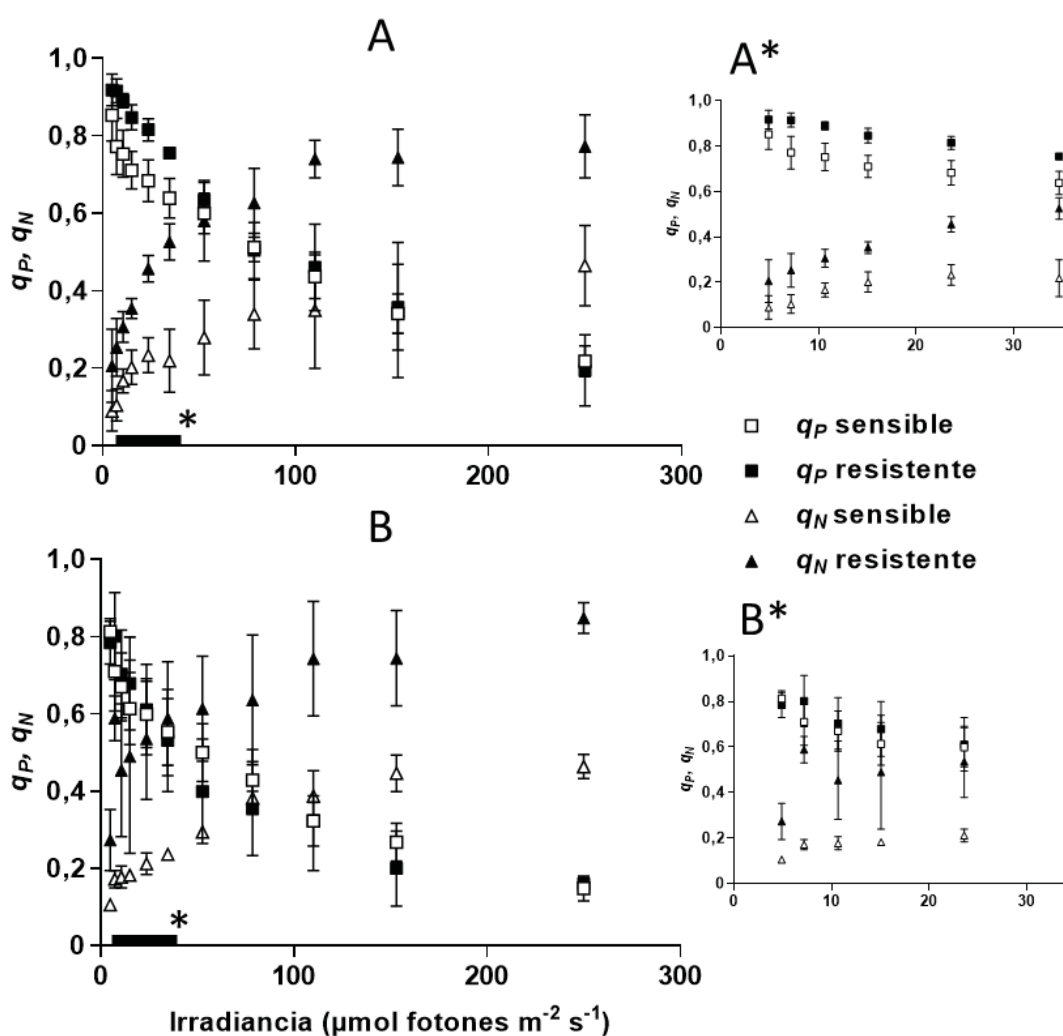


Figura 12. Amortiguamiento fotoquímico (q_p) y no fotoquímico (q_N) de las células sensibles y resistentes a salinidad de las cepas Ma1Vc (A) y Ma5Vc (B) de *M. aeruginosa* en función de la irradiancia. Media \pm σ ($n = 4$, excepto para los valores de q_N de Ma5Vc sensible donde $n = 3$). El símbolo * indica los valores comprendidos entre 0-35 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Los componentes del rendimiento cuántico no fotoquímico aumentaron en función de la irradiancia, excepto el valor de $Y(NO)$ de las células resistentes de la cepa Ma1Vc que se mantuvo constante (Figura 13). En el caso de la cepa Ma1Vc, la pendiente calculada para el ajuste lineal $Y(NPQ)$ frente a los valores más bajos de irradiancia fue mayor en las células resistentes que en las sensibles (Tabla 6), sin embargo, se observó el caso contrario para los valores $Y(NO)$, donde la pendiente fue mayor en las células sensibles que en las resistentes (Tabla 6). En cuanto a la cepa Ma5Vc, no se observaron diferencias significativas entre las pendientes de los ajustes lineales de $Y(NPQ)$ e $Y(NO)$ a bajas irradiancias entre las células sensibles y resistentes (Tabla 6). El valor de NPQ aumentó con la irradiancia para ambas cepas (Figura 14). Se observó que a altas irradiancias ($>100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) el valor para las células resistentes (1.43 ± 0.39 y 1.78 ± 0.79 , para las cepas Ma1Vc y Ma5Vc, respectivamente) fue más del doble de las células sensibles ($0,37 \pm 0,19$ para Ma1Vc; $0,38 \pm 0,02$ para Ma5Vc). Además, se observaron diferencias significativas entre las pendientes de NPQ de las células sensibles y resistentes de la cepa Ma1Vc a irradiancias bajas. Por el contrario, para esas mismas irradiancias no se observaron diferencias significativas entre las pendientes de NPQ para células sensibles y resistentes de la cepa Ma5Vc (Tabla 6).

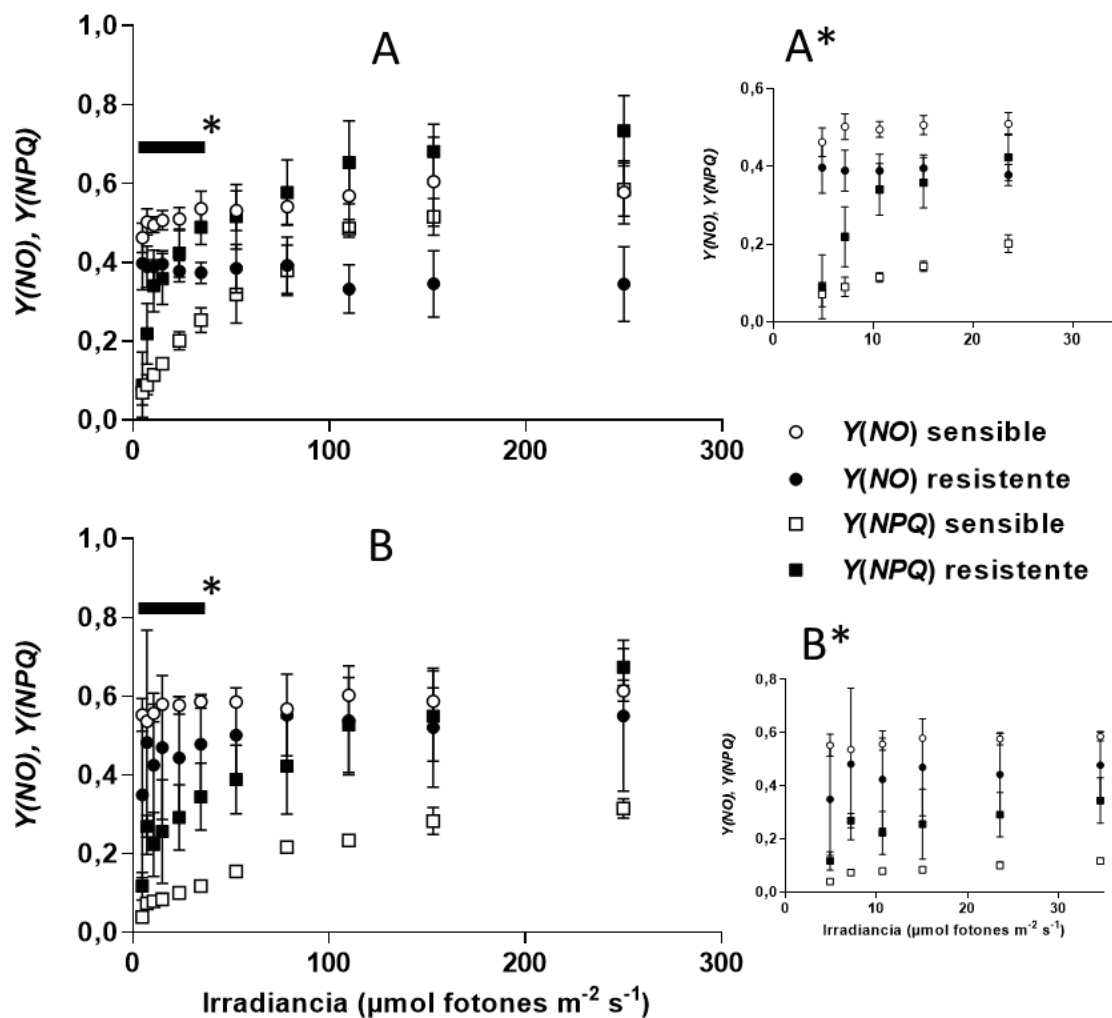


Figura 13. Representación de la pérdida de energía no fotoquímica no regulada en PSII ($Y[NO]$; círculos) y la pérdida de energía no fotoquímica regulada en PSII ($Y[NPQ]$; cuadrados) de las células sensibles y resistentes a salinidad cepas Ma1Vc (A) y Ma5Vc (B) de *M. aeruginosa* en función de la irradiancia. Los puntos representan la media $\pm \sigma$ ($n = 4$, excepto para los valores de Ma5Vc sensible donde $n = 3$). El símbolo * indica los valores comprendidos entre $0\text{-}35 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

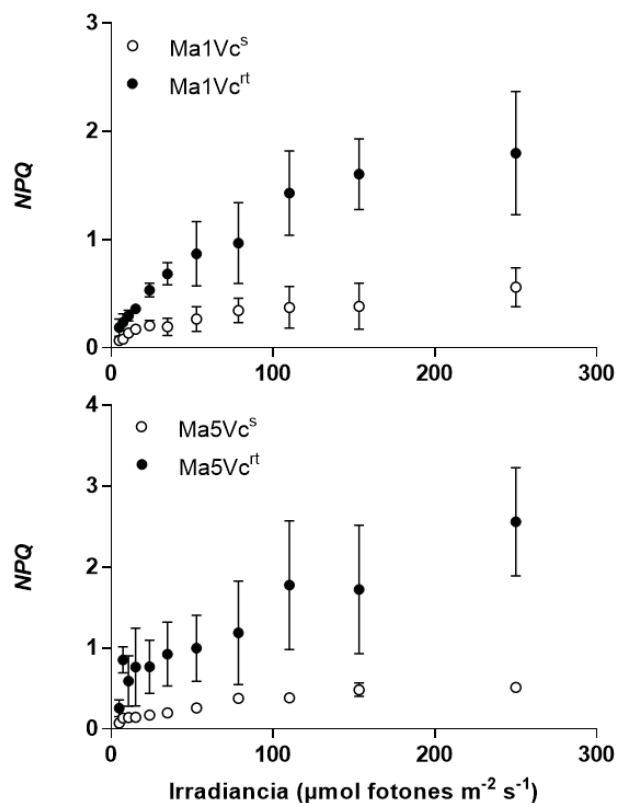


Figura 14. Representación del parámetro de amortiguamiento no fotoquímico (NPQ) de las células sensibles y resistentes a salinidad de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc de *M. aeruginosa* en función de la irradiancia. Los puntos representan la media $\pm \sigma$ ($n = 4$, excepto para los valores de Ma5Vc sensible donde $n = 3$).

3.4. Discusión

¿La tasa de cambio ambiental puede modular el límite máximo resistencia? Los resultados muestran que las poblaciones de *M. aeruginosa* expuestas a una tasa lenta de incremento salino tienen menor probabilidad de extinguirse, y un límite de resistencia a salinidad más elevado, que las poblaciones que se expusieron a un incremento rápido. De hecho, en la mayoría de las poblaciones experimentales, el número de generaciones requeridas para observar supervivencia a un nivel de salinidad por encima de la dosis letal inicial fue menor cuando la tasa de incremento de salinidad fue lenta (alrededor de 5-10 en trinquete lento vs. trinquete rápido). Estudios previos también mostraron que tasas más lentas de cambio ambiental conducen a una menor extinción o incluso a poblaciones mejor adaptadas (Perron *et al.*, 2008; Collins & de Meaux, 2009; Bell & Gonzalez, 2011;

Killeen *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos proporcionan una demostración empírica de cómo la trayectoria evolutiva de un organismo puede estar determinada por la tasa de cambio ambiental a la que ha estado expuesto. En particular, se ha abordado el potencial adaptativo de tres cepas de *M. aeruginosa* a diferentes tasas de aumento de salinidad. Teóricamente, cuando una población está expuesta a una situación de estrés, los individuos con mayor aptitud en el nuevo entorno persisten y los más sensibles son eliminados por acción de la selección natural (Bell, 2017). Como consecuencia, la recuperación de la población está determinada por la velocidad y la gravedad inicial del deterioro ambiental (Bell & Collins, 2008). Si la gravedad inicial no es suficiente para eliminar a toda la población, se producirá una selección de los organismos más resistentes. Sin embargo, una vez que se haya superado este estrés inicial, la supervivencia estaría determinada por la tasa de deterioro (Bell & Collins, 2008). La mayoría de los estudios se han centrado en comprender el rango de tolerancia de un organismo a un agente selectivo en lugar de explorar el límite de resistencia (es decir, cuando se excede la dosis letal inicial).

Los experimentos de trinquete demostraron que las cepas de *M. aeruginosa* pueden proliferar a niveles de salinidad de hasta 9,1-13,6 g NaCl L⁻¹, dependiendo de la cepa. El valor para la cepa MaAVc, 13,6 g L⁻¹ NaCl, fue ligeramente inferior al límite de resistencia observado en otro experimento de trinquete con la misma cepa (15.1 g L⁻¹ NaCl; Melero-Jiménez *et al.*, 2019). Sin embargo, la tasa de incremento de salinidad fue diferente, por lo que los resultados no son estrictamente comparables. Como se ha comentado anteriormente, el experimento de trinquete no permite distinguir si la resistencia a salinidad es consecuencia de la aclimatación o adaptación. En el capítulo 2, mediante un análisis de fluctuación, se observó que la resistencia de la cepa MaAVc, para una concentración salina de 14 g L⁻¹ NaCl, está basada en mutaciones espontáneas (adaptación). En este capítulo, para distinguir entre aclimatación y adaptación se realizó un experimento complementario basado la premisa de que, al menos para las bacterias, cualquier cambio relacionado con procesos de aclimatación, incluidos los eventos epigenéticos, se perdería en dos, a lo sumo tres, generaciones (Bennett & Lenski, 1997; Cooper, 2012). En este sentido, para comprobar si una mutación que confiere resistencia ha sido fijada en la población resistente, es posible probar su aptitud (estimada por la tasa de crecimiento) en ausencia (condición ancestral) y en presencia de NaCl (en el límite de resistencia), por no más de 4 generaciones (un mayor número de generaciones aumentará la probabilidad de que ocurran nuevas mutaciones). Con un diseño experimental similar

se demostró que el límite de la resistencia al cobre en *M. aeruginosa* estaba respaldado por la selección de nuevas variantes genéticas (Rouco *et al.*, 2014). En este caso, se ha observado que los valores de m de las células resistentes a salinidad no retornaron a los valores iniciales de la población ancestral (en las condiciones control), por lo que puede hipotetizarse que el límite máximo de resistencia se debe a procesos de adaptación.

Las mutaciones generalmente imponen un coste fisiológico (Keightley & Lynch, 2003). En el caso de *M. aeruginosa*, se ha observado que el coste de la mutación, además de una reducción de m , también puede manifestarse como una disminución de la eficiencia del PSII (Bañares-España *et al.*, 2016). En el caso de la resistencia a salinidad, los análisis realizados demuestran que no existen diferencias significativas en $Y(II)$ y q_P entre las células sensibles y resistentes de ambas cepas (Ma1Vc y Ma5Vc). Este resultado indica que la capacidad para mantener abiertos los centros de reacción y aportar electrones a la cadena de transporte desde el PSII es similar para células sensibles y resistentes a salinidad. Sin embargo, se observan diferencias significativas en los valores q_N , sugiriendo que la disipación de energía por la vía no fotoquímica es diferente en células sensibles y resistentes. Las diferencias entre los valores de q_N se incrementan a medida que aumenta la irradiancia. Para poder comprender la causa de dichas diferencias, es necesario descomponer q_N en los dos mecanismos principales de disipación de la energía: $Y(NO)$ e $Y(NPQ)$. Las células sensibles y resistentes de la cepa Ma1Vc muestran diferencias significativas para $Y(NO)$, tanto a baja como a alta irradiancia; sin embargo, en las células de la cepa Ma5Vc no se observan diferencias. Este resultado indica que las células resistentes de la cepa Ma1Vc disipan más energía pasivamente (calor y fluorescencia) y que tienen menor capacidad (no regulada) para protegerse contra daños por irradiancia elevada. En el caso de $Y(NPQ)$ se observa que el valor de las células resistentes es mayor que el de las células sensibles para ambas cepas a medida que aumenta la irradiancia. La fracción de energía disipada a través de los mecanismos fotoprotectores regulados también se puede observar con el parámetro NPQ (Figura 12), donde los valores también fueron mayores en las células resistentes que en las sensibles. Como los valores altos de $Y(NO)$ y los valores bajos de $Y(NPQ)$ o NPQ a irradiancia saturante indican valores subóptimos de reacciones fotoprotectoras (Klughammer & Schreiber, 2008), cabe sugerir que la resistencia a salinidad supone una disminución de la capacidad de fotoprotección de las células resistentes.

Los resultados obtenidos en el experimento de trinquete a distintas tasas de cambio ambiental, y con diferentes cepas, pueden servir para comprender, al menos en parte, la

elevada variabilidad de la tolerancia a salinidad de las poblaciones naturales de *M. aeruginosa*. Estudios previos han observado que la tolerancia oscila desde 1 hasta 14 g L⁻¹ NaCl (Sellner *et al.*, 1988; Otsuka *et al.*, 1999; Verspagen *et al.*, 2006; Tonk *et al.*, 2007; Orr & Unckless, 2014; Preece *et al.*, 2017) lo que, en gran parte, podría estar relacionada con una alta variabilidad genética entre las cepas de esta especie. Es posible que la historia selectiva previa por salinidad de cada cepa de lugar a una distinta selección de genes y, por lo tanto, a una gran variabilidad en la tolerancia a salinidad. Por ejemplo, se ha observado que un alto porcentaje de variación fenotípica en varios rasgos de esta cianobacteria es consecuencia de la variabilidad genética de las poblaciones naturales (Bañares-España *et al.*, 2006, 2007; López-Rodas *et al.*, 2006; Rico *et al.*, 2006). Estudios recientes han explorado los genes implicados en la resistencia a salinidad de *M. aeruginosa*. Des Aulnois *et al.* (2019) observaron la presencia de genes relacionados con la síntesis de sacarosa en una cepa de *M. aeruginosa* aislada de aguas salinas; sin embargo, en una cepa obtenida de agua dulce detectaron que la tolerancia a salinidad estaba relacionada con la síntesis de trehalosa, concluyendo que el uso de uno u otro soluto para mantener el equilibrio osmótico podría ser una de las causas de la diferencia en la tolerancia a salinidad. Otros estudios mencionan que la presencia de esos genes se debe a eventos de transferencia horizontal de genes (Tanabe *et al.*, 2018, 2019).

La naturaleza tóxica de *M. aeruginosa* implica que este estudio sea relevante desde un punto de vista eco-toxicológico (Loftin *et al.*, 2016; Rosen *et al.*, 2018). En este sentido, Tonk *et al.* (2007) señalaron que las fluctuaciones de salinidad en aguas salobres pueden no solo favorecer a *M. aeruginosa* sobre otras especies de fitoplancton de agua dulce, sino que multitud de organismos se podrían ver afectados debido a que salinidades superiores a 10 g L⁻¹ NaCl no limitan la supervivencia de las poblaciones de *M. aeruginosa*, mientras que se produce un aumento en la concentración extracelular de la toxina microcistina.

Finalmente, es necesario enfatizar que los ensayos de evolución experimental representan una simplificación de los procesos naturales, por lo que se necesitan más estudios para alcanzar una comprensión más profunda del comportamiento de estos microorganismos en la naturaleza.

CAPÍTULO 4

Roles de la dispersión y la tasa de incremento en el rescate evolutivo de *Microcystis aeruginosa* bajo selección por salinidad

“We cannot expect to explain cellular evolution if we stay locked into the classical Darwinian mode of thinking.”

Carl Woese, 1928 – 2012

The Evolution of Cells, 2002



4.1. Introducción

Cuando una población es expuesta a un cambio ambiental con efecto negativo y regular en el tiempo, el número de individuos sensibles disminuirá hasta tal punto que se produzca la extinción de la población. Sin embargo, es posible que en la población estén presentes, o aparezcan, individuos resistentes que puedan tener descendencia y, por lo tanto, evitar la extinción. No obstante, los organismos resistentes deben tener descendencia lo suficientemente rápido como para contrarrestar la tasa de deterioro (Bell, 2013). Si los organismos resistentes son capaces de evitar la extinción de la población es posible afirmar que ha ocurrido un evento de rescate evolutivo (RE). Este fenómeno se está abordando principalmente desde los campos de la Biología de la Conservación y de la Medicina (Bell, 2017). Desde el punto de vista de la Biología de la Conservación resulta muy interesante conocer como las poblaciones que son expuestas a nuevas condiciones selectivas (generalmente provocadas por actividades humanas) pueden evitar la extinción. Al mismo tiempo, es necesario entender los procesos de RE en el campo de la Medicina, para poder comprender la resistencia de virus, bacterias o de células cancerosas a los agentes/tratamientos utilizados para exterminarlos (Bell, 2017). A pesar de que los conceptos teóricos son similares para ambos campos de investigación, actualmente están bastante aislados, con muy pocas citas cruzadas (Alexander *et al.*, 2014).

De manera general, cuando una población queda expuesta a condiciones selectivas, se produce una disminución exponencial de los organismos sensibles y un aumento generalmente exponencial de los organismos resistentes, lo que daría como resultado una trayectoria general de abundancia en forma de U (Figura 15). Las curvas en forma de U fueron descritas por primera vez por Gomulkiewicz & Holt (1995). Recientemente, los modelos matemáticos que describen este patrón en U han sido ampliados por Orr & Unckless (2014) mientras que, experimentalmente las curvas en forma de U se han observado únicamente en algunos ensayos con bacterias y levaduras (Bell & Gonzalez, 2009; Agashe *et al.*, 2011; Ramsayer *et al.*, 2013).

La probabilidad de que una población logre evitar la extinción mediante un evento de RE depende de una serie de variables relacionadas directamente con la población (principalmente, su tamaño y su variabilidad genética) e indirectamente, como son las condiciones ambientales, en particular, la velocidad y la intensidad del deterioro ambiental (Carlson *et al.*, 2014). Se ha observado que, en las poblaciones con un gran

número de individuos, la probabilidad de que ocurran eventos de RE es mayor, posiblemente porque estas poblaciones tienen una mayor variabilidad genética (Bell, 2017). Específicamente, la principal fuente de variabilidad genética son los procesos de recombinación genética que tienen lugar en la meiosis (Falconer & Mackay, 1996). En el caso de aquellos organismos que solo presentan reproducción asexual, la variabilidad genética se consigue principalmente por mutaciones al azar, aunque también es posible que ocurra por transferencia horizontal de genes. Por lo tanto, cuanto mayor sea el número de individuos, mayor será la probabilidad de que la mutación que confiera resistencia ya esté presente, o aparezca, en la población. Como consecuencia, un mayor tamaño poblacional implica la posibilidad de encontrar mayor número de individuos resistentes capaces de tener descendencia; esto provocará que la disminución de la población no se produzca de manera abrupta y que pueda dar tiempo a que aparezcan nuevas mutaciones que permitan la recuperación de la población ante las nuevas condiciones adversas (Gomulkiewicz & Holt, 1995; Lande & Shannon, 1996). No obstante, es posible encontrar individuos resistentes en poblaciones pequeñas pero, evidentemente, la probabilidad de que ocurra un evento de RE será menor debido a la estocasticidad demográfica (Kendall, 1949). En el caso de no encontrarse organismos resistentes en la población (en concentraciones subletales), el tiempo necesario para que ocurra un evento de rescate será mayor, debido a que debe transcurrir un periodo de tiempo para que la primera mutación exitosa comience a extenderse (Orr & Unckless, 2008). Experimentos de laboratorio con levaduras (Bell & Gonzalez, 2009, 2011; Samani & Bell, 2010) y bacterias (Ramsayer *et al.*, 2013) han demostrado que la probabilidad de que ocurra un evento de RE depende del tamaño inicial de la población. Por ejemplo, Samani & Bell (2010) realizaron un experimento que consistió en exponer diferentes tamaños poblacionales de levaduras a concentraciones crecientes de sal. Después de un periodo de tiempo, compararon el número de colonias resistentes en función del tamaño inicial y observaron que en las poblaciones con un tamaño inicial mayor se encontraban mayor número de colonias resistentes. Además, como cada población era inicialmente isogénica, se demostró que en las poblaciones más grandes se producían mayor número de mutaciones y que estas permitían a los organismos ser más resistentes.

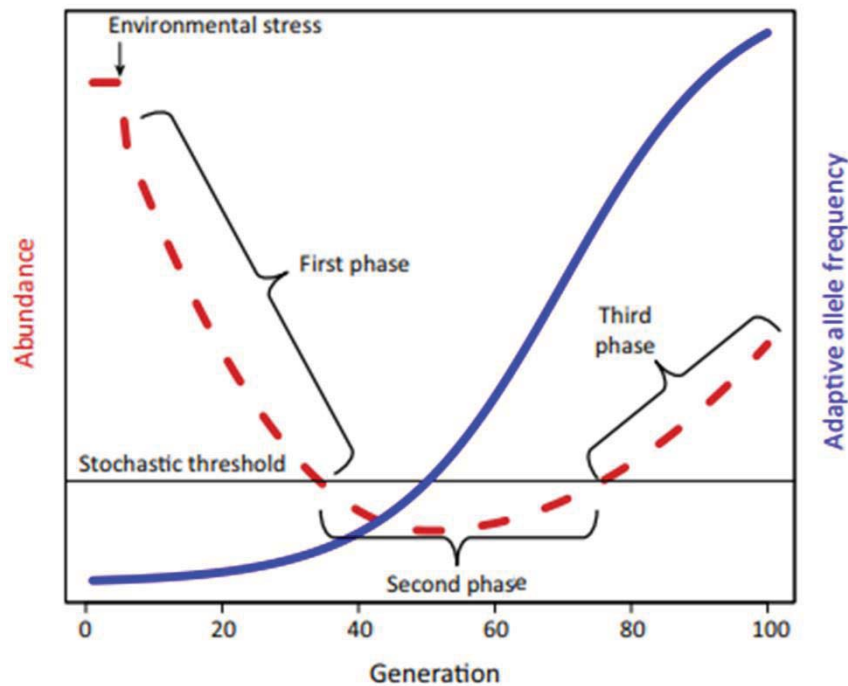


Figura 15. Fases del rescate evolutivo: curva en forma de U, esta forma está relacionada con el aumento correspondiente de una frecuencia de alelos que seleccionan fenotipos/genotipos más adaptados al nuevo entorno. En la primera fase la abundancia de la población disminuye debido a que los organismos no se encuentran adaptados al nuevo entorno, en la segunda fase la población cae por debajo de un umbral estocástico donde cada vez más posible la extinción, y en la fase final se produce un crecimiento positivo el cual restaura la población. Fuente: Carlson *et al.* (2014).

Otro de los factores que afecta directamente a la posibilidad de que ocurra RE es la dispersión de individuos entre poblaciones, pudiendo tener tanto un efecto negativo como positivo. Concretamente, la dispersión puede favorecer el RE debido a que produce un aumento del tamaño poblacional (Holt & Gomulkiewicz, 1997) y de la variabilidad genética (Lenormand, 2002). No obstante, se postula que la dispersión puede tener un efecto negativo en las especies con reproducción sexual debido a la inclusión de alelos no adaptados al nuevo entorno (Bolnick & Nosil, 2007; Lopez *et al.*, 2008; Schiffers *et al.*, 2013). Además, la dispersión puede limitar el RE de aquellas poblaciones que funcionan como fuente debido a una reducción en la abundancia y la disponibilidad de alelos beneficiosos (Holt, 2011). A pesar de la expectativa teórica de que la dispersión puede influir positiva o negativamente en la probabilidad de RE, los experimentos realizados concluyen que la probabilidad de rescate aumenta con la dispersión (Perron *et al.*, 2008; Bell & Gonzalez, 2011; Martín-Clemente *et al.*, 2019). Este resultado contradictorio se debe, fundamentalmente, a que los experimentos previos analizan la posibilidad de rescate en poblaciones sumidero y no en las poblaciones fuente. Además,

esos experimentos han utilizado organismos con reproducción asexual como organismo modelo (levaduras con reproducción sexual inhibida por las condiciones de cultivo, bacterias y cianobacterias). Por lo tanto, se espera que los clones no adaptados se extingan (Carlson *et al.*, 2014). A modo de ejemplo, Perron *et al.* (2008) mostraron que las poblaciones de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* que no reciben individuos de otras poblaciones a menudo se extinguen cuando se exponen a rifampicina, mientras que en aquellas poblaciones que recibieron individuos de otras poblaciones los eventos de RE fueron elevados. Bell & Gonzalez (2011) también demostraron que la dispersión favorece los eventos de RE en levaduras, siendo aproximadamente dos veces más frecuentes cuando se permitió la dispersión entre poblaciones que cuando las poblaciones estaban completamente aisladas. Finalmente, se ha observado como la dispersión favorece el RE de la cianobacteria *M. aeruginosa* bajo selección por sulfuro (Martín-Clemente *et al.*, 2019).

Con respecto al grado de deterioro ambiental, los modelos en los que se asume que la variabilidad genética aumenta a partir de mutaciones, muestran que el RE es más probable cuando las condiciones ambientales cambian de manera paulatina (Lynch & Lande, 1993). En este sentido, Bürger & Lynch (1995) mostraron que la tasa máxima de cambio ambiental que puede mantenerse indefinidamente es equivalente a aproximadamente 0,1 desviaciones estándar por generación del fenotipo. Sin embargo, esto podría ser mucho menor en poblaciones muy pequeñas, porque la estocasticidad demográfica es más pronunciada (Gabriel & Bürger, 1992). Además, no es razonable suponer que no hay límite para el grado de tolerancia que se puede lograr, de modo que el deterioro prolongado puede conducir a condiciones que no pueden ser soportadas por ningún fenotipo dentro del rango potencial de variación de la población (Bell, 2017). Además, este autor señala que es improbable que una mutación que confiera resistencia al nivel actual de estrés sea tan específica que también pueda conferir un grado de resistencia a niveles de estrés algo más altos. Por lo tanto, si el nivel de estrés aumenta lentamente, es posible que una población persista durante un tiempo lo suficientemente prolongado en un entorno deteriorado para que ocurra una segunda mutación, que confiera tolerancia a niveles superiores de dicho estrés. Los resultados obtenidos de manera experimental han mostrado que, cuando una población se expone cambios ambientales de manera gradual, la probabilidad de que ocurran eventos de RE es mayor (Perron *et al.*, 2008; Samani & Bell, 2010; Bell & Gonzalez, 2011; Gonzalez & Bell, 2013; Lindsey *et al.*, 2013). Por ejemplo, Lindsey *et al.* (2013) experimentaron con

poblaciones de la bacteria *E. coli* exponiéndolas al antibiótico rifampicina y observaron que los eventos de RE dependían de la tasa de deterioro ambiental. En su trabajo registraron pocos eventos de RE en aquellas poblaciones que experimentaron un cambio abrupto en la dosis del antibiótico, mientras que las poblaciones expuestas a un aumento gradual de la dosis sobrevivieron en su mayoría. Otro ejemplo de la importancia de deterioro ambiental es el experimento realizado por Gonzalez & Bell (2013), quienes expusieron poblaciones de dos especies de levadura a concentraciones subletales de sal durante ocho ciclos de crecimiento; luego, las transfirieron a concentraciones letales. Observaron que la exposición previa a altas concentraciones subletales incrementó la frecuencia de eventos de RE en *Saccharomyces cerevisiae* pero no en su especie hermana, *Saccharomyces paradoxus*. Esta diferencia fue atribuida a la mayor tolerancia de *S. cerevisiae* a altas concentraciones de sal. Otra serie de experimentos se han centrado en evaluar la posible interacción entre la dispersión y el grado de deterioro ambiental (Perron *et al.*, 2008; Bell & Gonzalez, 2011). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que los eventos de RE fueron más frecuentes cuando el cambio ambiental fue lento y los individuos pudieron dispersarse.

De manera general, los experimentos de RE se han centrado en analizar qué factores determinan el RE en una población; sin embargo, son escasos los trabajos que exploran el RE en metapoblaciones o en comunidades. El primer trabajo experimental que se realizó con el objetivo de comprender qué factores intervienen en el RE en metapoblaciones fue el trabajo de Bell & Gonzalez (2011). Este trabajo tiene una gran relevancia debido a que se demuestra que el RE puede ocurrir a través de metapoblaciones para prevenir la extinción de especies. A pesar de la importancia que tiene el RE, son escasos los trabajos que se han realizado con metapoblaciones de microorganismos fotosintéticos, como cianoanacterias o microalgas (Martín-Clemente *et al.*, 2019; Fugère *et al.*, 2020). La importancia ecológica de estos organismos es muy relevante; por lo tanto, resulta necesario realizar más estudios con estos organismos e intentar extender los resultados obtenidos a la naturaleza.

En la misma línea de los capítulos 2 y 3, el objetivo de este capítulo ha sido estudiar la dinámica de RE en metapoblaciones de una cepa *M. aeruginosa* en un escenario de aumento de salinidad. Específicamente se ha abordado el efecto de la tasa de deterioro previo, intensidad del deterioro (concentración salina) y la dispersión entre poblaciones sobre la posibilidad de que ocurran eventos de RE.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Organismo experimental y condiciones de cultivo

En este capítulo se utilizó la cepa Ma5Vc de la cianobacteria *M. aeruginosa*. Los detalles sobre su aislamiento y las condiciones de cultivo en laboratorio se detallaron en el capítulo 3 (sección 3.2.1). El efecto tóxico de la salinidad sobre la tasa de crecimiento se mostró en el capítulo 3 (sección 3.3.1).

4.2.2. Experimento de rescate evolutivo

Para comprender los efectos del deterioro ambiental y la dispersión sobre la dinámica de RE en metapoblaciones de la cianobacteria *M. aeruginosa* en un escenario de incremento de salinidad, se utilizó un diseño experimental similar al utilizado por Bell & Gonzalez (2011). Recientemente, se ha aplicado este enfoque para explorar como el deterioro ambiental y la dispersión determinan el número de eventos RE en metapoblaciones de *M. aeruginosa* bajo selección por sulfuro (Martín-Clemente *et al.*, 2019).

El diseño experimental consistió en generar una serie de metapoblaciones que estuvieran sometidas a diferentes combinaciones de tasa de deterioro previo y tipo de dispersión. Para generar las metapoblaciones fue necesario generar poblaciones individuales; para ello, se utilizaron placas de 96 pocillos (Greiner; Bio-One, Longwood, EE. UU.), de tal manera que cada pocillo corresponde a una población individual. Para minimizar la probabilidad de incluir mutaciones anteriores que pudieran haberse acumulado durante el mantenimiento de los cultivos, el cultivo utilizado para fundarlas metapoblaciones de *M. aeruginosa* se obtuvo a partir de una sola célula a través de diluciones seriadas (Andersen & Kawachi, 2005) en una placa de 96 pocillos, de tal manera que, la variación genética fue mínima al principio del experimento y, a partir de entonces, fue generada por mutaciones. Por otro lado, para simular un rango de hábitats dentro de las metapoblaciones se estableció un gradiente de salinidad en la placa desde oeste a este (Figura 16).

Específicamente, el diseño experimental comprende seis combinaciones diferentes en función del deterioro previo y la dispersión: las combinaciones consisten

dos tipos de aumento de salinidad (control -no deterioro- y deterioro progresivo; Figura 16a) y tres modos de dispersión (control -no dispersión-, dispersión local y dispersión global; Figura 16b). Los cultivos bajo cada combinación de ambos tratamientos se sometieron a cuatro gradientes de estrés salino (G), que incluyeron cinco concentraciones crecientes de NaCl por gradiente: G₁ (0, 1, 2, 3, 4 g L⁻¹ NaCl), G₂ (2, 3, 4, 5, 6 g L⁻¹ NaCl), G₃ (4, 5, 6, 7, 8 g L⁻¹ NaCl) y G₄ (8, 9, 10, 11, 12 g L⁻¹ NaCl; Figura 16a). En el último gradiente (G₄) todas las concentraciones salinas superaban la dosis letal inicial (7 g L⁻¹ NaCl; ver sección 3.3.1), lo cual es necesario para observar eventos de RE. Se utilizaron seis cultivos independientes para cada concentración de NaCl en cada gradiente. En total, el experimento comprendió 720 poblaciones (5 concentraciones salinas, 6 réplicas en cada concentración, 6 combinaciones de los factores y 4 réplicas del experimento) comenzando en el nivel de salinidad más bajo (G₁). El experimento comenzó con una densidad celular de $1,5 \times 10^5$ células mL⁻¹ y se cultivó en medio BG11-50% a pH 7,2 con la concentración salina correspondiente.

Para simular los dos escenarios de tasa de deterioro (sin deterioro y progresivo), los cultivos se transfirieron al siguiente gradiente de salinidad a diferentes tiempos. En el tratamiento con deterioro, las poblaciones se transfirieron al siguiente gradiente cada cuatro semanas (Figura 16a). Sin embargo, en el tratamiento sin deterioro, los cultivos permanecieron en el nivel G₁ durante 12 semanas antes de la transferencia al nivel G₄ (condiciones letales). Finalmente, en todos los tratamientos los cultivos se mantuvieron en el nivel G₄ durante 4 semanas, tras lo cual se calculó el número de eventos ER (Figura 16a).

Para simular los tres tipos de dispersión, todos los cultivos (independientemente de la tasa deterioro) se transfirieron cada semana de tres formas diferentes (Figura 16b). En el tratamiento sin dispersión, los cultivos se renovaron semanalmente a partir de la transferencia de una alícuota (3 µL) a medio de cultivo nuevo. La dispersión local se simuló mezclando los seis cultivos (seis poblaciones) sometidos a la misma concentración salina (Figura 16b). Para este propósito, se tomaron 50 µL de cada cultivo y se mezclaron en un tubo Eppendorf. De esta mezcla, se transfirieron seis alícuotas de 3 µL a seis pocillos nuevos con medio fresco. Para la simulación de la dispersión global, las 30 poblaciones del tratamiento se mezclaron independientemente de la concentración salina (todas las poblaciones de la placa, Figura 16b) como se indicó anteriormente, y 30 alícuotas de 3 µL se transfirieron a los nuevos pocillos con el medio de cultivo correspondiente (NaCl).

Para estimar las tasas de crecimiento (m) a lo largo del experimento, se midió la absorbancia a $\lambda = 750$ nm (A_{750}) cada semana en cada población para calcular la densidad celular. Para este propósito, m se calculó como en el capítulo 2 (sección 2.2.2.). En este caso, se utilizó un espectrofotómetro de placa (EON, BioTek, Winooski, VT, USA) y el número de células se estimó mediante ajuste de regresión lineal entre la densidad celular (ecuación 2).

Finalmente, se consideró que acontecía un evento de RE cuando la tasa de crecimiento al final de las cuatro semanas en G_4 fue positiva. Con esta asunción consideramos que puede ocurrir un evento de RE sin que se alcance la densidad inicial de la población previa al estrés. No obstante, al ser la tasa de crecimiento positiva, es posible afirmar que el RE ha ocurrido y que la población evita la extinción.

Para conocer qué factores determinaban que ocurriera un evento de RE en las poblaciones de *M. aeruginosa*, se utilizó un modelo lineal generalizado (regresión de Poisson). Los factores que compusieron el modelo fueron la tasa de deterioro (factor con dos niveles: sin deterioro y progresivo), el modo de dispersión (factor con tres niveles: sin dispersión, local y global) y la concentración de sal (covariable continua). Las diferencias significativas de los factores explicativos del modelo se detectaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal & Wallis (1952) junto a la prueba post-hoc de Dunn con la corrección de Bonferroni (Dunn, 1961). Los análisis se realizaron con el software libre R Core Team (2013). Es necesario especificar que se han aplicado pruebas no paramétricas debido a que la variable a explicar (número de eventos de RE) no cumplió el requisito de normalidad (prueba de Wilk & Shapiro, 1965).

En segundo lugar, para poder estimar el número de eventos de RE de toda la metapoblación (máximo 30), se realizó un segundo modelo lineal generalizado (regresión de Poisson) y se utilizó como variable dependiente el número de eventos de RE de cada metapoblación en función de la combinación entre la tasa de deterioro y el tipo de dispersión.

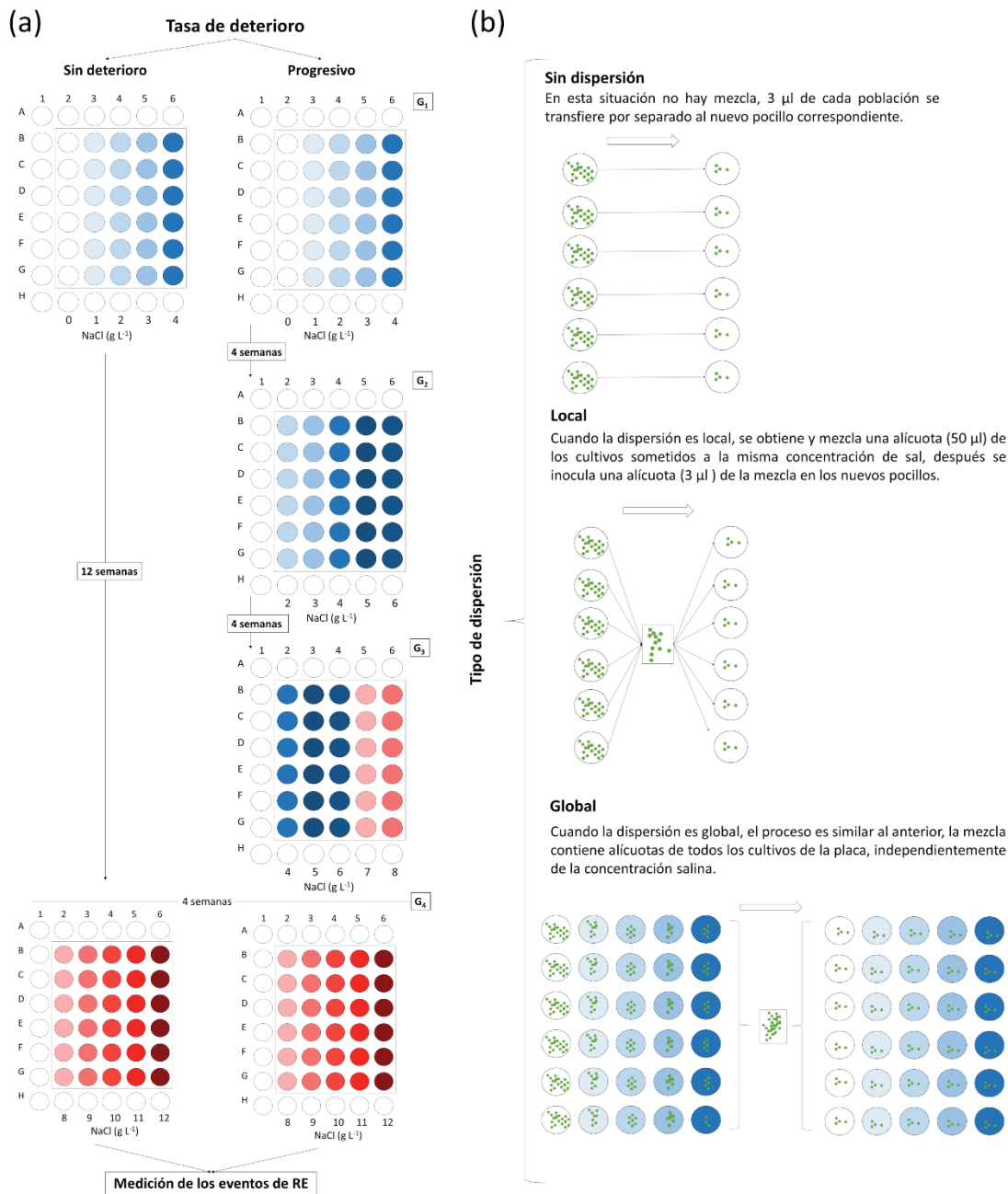


Figura 16. Diagrama esquemático del experimento de rescate evolutivo. (a) Los cultivos se transfirieron cada semana a un nuevo pocillo con medio fresco, la salinidad depende de la tasa de deterioro (sin deterioro y deterioro progresivo) y de la semana, la dispersión de los cultivos varía según la combinación con la dispersión (b). Cada gradiente de NaCl (de G₁ a G₄) comprendió cinco concentraciones crecientes de NaCl (representadas por diferentes intensidades de verde) y estas concentraciones se incrementaron en cada nuevo gradiente de NaCl de G₁ (0, 1, 2, 3, 4 g L⁻¹ NaCl) a G₂ (2, 3, 4, 5, 6 g L⁻¹ NaCl), G₃ (4, 5, 6, 7, 8 g L⁻¹ NaCl) y G₄ (8, 9, 10, 11, 12 g L⁻¹ NaCl) como se indica en (a). Cada concentración se ensayó en seis poblaciones diferentes (filas B-G). En el tratamiento sin deterioro, las poblaciones permanecieron en el gradiente inicial de NaCl durante doce semanas, hasta la transferencia al gradiente G₄ (donde se supone que todas las concentraciones de NaCl ensayadas son letales). El tratamiento de deterioro progresivo pasó

(continuación Figura 16) por G_2 y G_3 , durante 4 semanas cada uno. Las poblaciones permanecieron 4 semanas en G_4 para todos los tratamientos ensayados. Semanalmente, la dispersión entre las poblaciones varió en función del tratamiento: en el tratamiento sin dispersión, las transferencias se hicieron directamente (de pocillo a pocillo). En la condición de dispersión local, las seis poblaciones expuestas a la misma concentración de NaCl se mezclaron, y se fundaron seis nuevas poblaciones desde el cultivo mezclado. En la dispersión global, todas las poblaciones de las 5 concentraciones diferentes de NaCl (30 poblaciones en total) se mezclaron, y las 30 nuevas poblaciones (cinco concentraciones con seis réplicas cada una) se fundaron desde esta mezcla global.

4.3. Resultados

Durante las primeras doce semanas, la tasa de crecimiento de las poblaciones expuestas al deterioro progresivo ($n = 24$), y sin dispersión, disminuyó desde $0,45 \pm 0,1 \text{ d}^{-1}$ en la primera semana ($0 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$) hasta $0,36 \pm 0,17 \text{ d}^{-1}$ en la semana doce ($4 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$). Por el contrario, la tasa de crecimiento de la población sin deterioro o dispersión se mantuvo constante, con un valor medio global de $0,48 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$. Cuando los cultivos se expusieron a las condiciones inicialmente letales en la semana trece, se produjo una disminución significativa del valor de m en cultivos sin deterioro previo; sin embargo, el impacto fue menor en los cultivos que fueron expuestos previamente al estrés salino. Al final del experimento, en algunos casos, se detectó un valor positivo de m (evento de RE). Por ejemplo, sólo se detectó un 4% de eventos de RE en los cultivos aislados (sin dispersión) y sin deterioro cuando la salinidad inicial fue de $0 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$, mientras que se registró un 33% en los cultivos aislados (sin dispersión) pero con deterioro previo. Este porcentaje aumentó hasta el 79% cuando las poblaciones fueron sometidas a un deterioro previo y dispersión global.

La tasa de deterioro y el tipo de dispersión afectaron significativamente al número de eventos RE en las poblaciones de *M. aeruginosa* en condiciones letales de NaCl; sin embargo, el gradiente de concentración salina dentro de la metapoblación no tuvo efecto sobre el número de eventos de RE (Tabla 7). Además, no se observaron interacciones significativas entre la tasa de deterioro, el tipo de dispersión y la concentración salina (Tabla 7).

Tabla 7. Modelo lineal generalizado (regresión de Poisson; $\chi^2= 33.33$, $gl= 11$, $p = 2,61\times 10^{-7}$) aplicado al estudio del efecto de la tasa de deterioro (niveles del factor: constante y progresivo), modo de dispersión (niveles del factor: sin dispersión, local y global), y concentración salina (covariable continua) sobre el número medio de eventos de RE en las poblaciones de *M. aeruginosa* tras 4 semanas expuestas a condiciones letales de salinidad.

Variable explicativa	<i>gl</i>	χ^2	<i>p</i>
Tipo de dispersión (DI)	2	15,793	$3,72\times 10^{-4}$
Tasa de deterioro (DE)	1	7,723	$5,45\times 10^{-3}$
Concentración salina (NaCl)	1	0,928	0,335
DI \times DE	2	2,064	0,356
DI \times NaCl	2	5,717	0,057
DE \times NaCl	1	0,065	0,798
DI \times DE \times NaCl	2	1,140	0,565
Error	108		

De acuerdo con los *p*-valores de la regresión de Poisson, la contribución de la dispersión fue mayor que la contribución del tipo de deterioro (Tabla 7). Específicamente, el número de eventos de RE fue significativamente mayor cuando hubo dispersión dentro de la metapoblación ($H=21,87$, $gl=2$, $p=1,77\times 10^{-5}$; Figura 17), independientemente de si la dispersión era local o global (Figura 18). También se observó que la exposición previa a incrementos salinos favoreció que ocurriera un mayor número de eventos de RE (Tabla 7). En concreto, el número de eventos de RE fue significativamente mayor cuando las poblaciones estuvieron expuestas a incrementos de salinidad progresivos ($H=11,38$, $gl=1$, $p=7,39\times 10^{-4}$; Figura 18).

Los resultados obtenidos a nivel poblacional se reflejaron cuando se realizó el ajuste de los datos a nivel metapoblacional. Es decir, no se observó interacción entre la tasa de deterioro y el tipo de dispersión. Finalmente, el número de eventos de RE de una metapoblación (máximo 30) se puede obtener para cada combinación de tasa de deterioro y tipo dispersión a través de la siguiente ecuación ($\chi^2=24.51$, $gl=3$, $p=3.15\times 10^{-5}$):

$$N^{\circ} \text{ de eventos de RE} = e^{2,64+0,28a + 0,21b-0,28c} \quad (r^2 = 0,82, n = 24) \quad [\text{ec. 20}]$$

donde *a* tiene valor 1 cuando la metapoblación ha sido expuesta a deterioro progresivo y 0 cuando no ha sufrido deterioro previo. Los parámetros *b* y *c* están relacionados con el tipo de dispersión: *b* tiene valor 1 cuando la dispersión es global pero, si no es así, el valor

de b sería 0; mientras que c tiene valor 1 cuando no hay dispersión pero, si no es así, el valor de c sería 0.

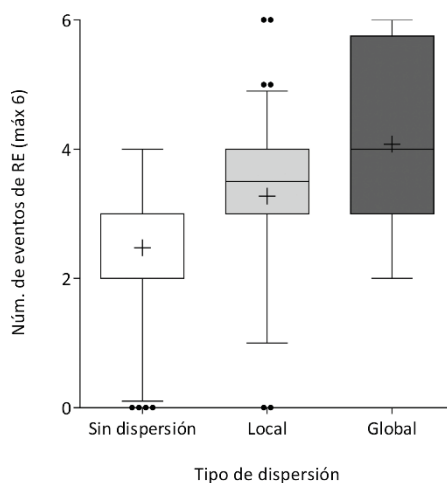


Figura 17. Número de eventos de rescate evolutivo (RE) en función del tipo de dispersión (sin dispersión, local o global), observados después de la exposición de la cepa Ma5Vc de *M. aeruginosa* a condiciones letales de salinidad. Los datos se representan mediante un gráfico de cajas y bigotes donde se muestra la media (cruz, $n = 40$), la mediana (en el caso de Sin dispersión la mediana coincide con el percentil 75), los percentiles 25 y 75 (extensión de la caja), y las barras de error para los percentiles 10 y 90 (las observaciones que exceden dichos límites se representan como puntos). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los eventos de RE para cada tratamiento detectado por la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis junto con la prueba post-hoc de Dunn ($p < 0,05$).

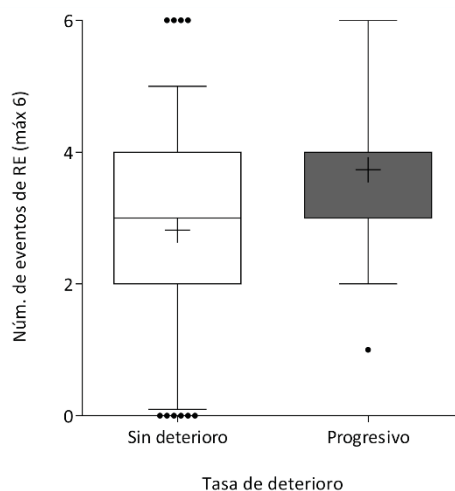


Figura 18. Número de eventos de rescate evolutivo (RE) en función de la tasa de deterioro (Sin deterioro o Progresivo), observados después de la exposición de la cepa Ma5Vc *M. aeruginosa* a condiciones letales de salinidad. Los datos se representan mediante un gráfico de cajas y bigotes donde se muestra la media (cruz, $n = 60$), la mediana (en el caso de deterioro progresivo la mediana coincide con el percentil 75), los percentiles 25 y 75, y las barras de error para los percentiles 10 y 90 (los valores que exceden dichos límites se representan como puntos). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los eventos de RE para cada tratamiento detectado por la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

4.4. Discusión

En este capítulo se ha demostrado que metapoblaciones de *M. aeruginosa* pueden sobrevivir a condiciones letales de salinidad debido a la ocurrencia de eventos de RE. Los eventos de RE estuvieron condicionados por la tasa de deterioro y por la dispersión entre las poblaciones. Sin embargo, el gradiente salino dentro de la metapoblación no afectó significativamente al número de eventos de RE.

Se ha observado que cuanto menor es la dispersión entre las poblaciones, más bajo es el número de eventos de RE. Este resultado es similar a lo que predicen los postulados teóricos de RE (Holt & Gomulkiewicz, 1997; Lenormand, 2002; Uecker *et al.*, 2014), que afirman que la dispersión entre poblaciones favorece la posibilidad de que individuos resistentes presentes en una población puedan llegar a otras poblaciones y evitar la extinción de la misma. Aunque las demostraciones empíricas son escasas, los resultados han apoyado los postulados teóricos (Perron *et al.*, 2008; Bell & Gonzalez, 2011; Martín-Clemente *et al.*, 2019). No obstante, resulta importante recalcar que los experimentos que exploran el efecto de la dispersión en el RE solo han utilizado organismos modelo con reproducción asexual. Sería interesante realizar experimentos con organismos con reproducción sexual, pues teóricamente se ha hipotetizado que el efecto puede ser tanto negativo como positivo (Carlson *et al.*, 2014), aunque no se ha podido comprobar empíricamente.

Se observó que la exposición previa a salinidad dificulta la extinción cuando las poblaciones se enfrentan posteriormente a una concentración que normalmente es letal. Además, la exposición a salinidad durante las primeras 12 semanas del experimento es un factor determinante para poder predecir el número de eventos de RE. Este resultado concuerda con estudios experimentales previos donde también se observó la influencia de la exposición previa en la probabilidad de rescate poblacional y comunitario (Perron *et al.*, 2006, 2008; Bell & Gonzalez, 2009, 2011; Samani & Bell, 2010; Fussmann & Gonzalez, 2013; Gonzalez & Bell, 2013; Lindsey *et al.*, 2013; Low-Décarie *et al.*, 2015; Martín-Clemente *et al.*, 2019). Tanto la aclimatación como la adaptación podrían provocar que el RE se favorezca por la exposición previa al agente selectivo. No obstante, debido a que no se han registrado eventos de RE en todas las poblaciones, es posible afirmar que en esta situación el RE es favorecido por la aparición de nuevas variantes genéticas que confieren resistencia. Además, este resultado es coherente con lo obtenido

en el capítulo 3, pues el límite de resistencia de *M. aeruginosa* a salinidad fue mayor cuanto menor fue la tasa de deterioro.

Trabajos previos mostraron que la interacción entre la tasa de deterioro y el tipo de dispersión determinan el número de eventos de RE (Perron *et al.*, 2008; Bell & Gonzalez, 2011). El RE en esos experimentos fue más frecuente cuando las poblaciones estuvieron expuestas previamente al agente selectivo y, además, hubo dispersión. Sin embargo, en este trabajo no se encontró una interacción significativa entre esos factores, al igual que en el trabajo de Martín-Clemente *et al.* (2019). Por lo tanto, estos resultados llevan a pensar que la interacción entre estos factores puede depender tanto del agente selectivo como de la especie.

Los resultados obtenidos permiten ampliar el conocimiento de cómo será la recuperación en comunidades sometidas a estrés ambiental, pues los factores que modulan el RE son similares a nivel metapoblacional y comunidad (Fugère *et al.*, 2020). Es posible afirmar, junto con los estudios previos (Low-Décarie *et al.*, 2015; Bell *et al.*, 2019; Fugère *et al.*, 2020), que aquellas comunidades que hayan estado expuestas a niveles no letales del agente selectivo tendrán más posibilidades de evitar la extinción gracias a eventos de RE. Al igual que a nivel poblacional, la exposición previa a un agente selectivo produce la selección de los tipos resistentes en niveles intermedios de estrés, posibilitando que la propagación de organismos resistentes a un cierto nivel de estrés permita a la comunidad resistir un mayor nivel de estrés (Bell, 2017; Fugère *et al.*, 2020). De hecho, recientemente se ha observado que el deterioro previo determina en gran medida el RE en comunidades fitoplanctónicas en ambientes acidificados (Bell *et al.*, 2019) o en presencia del herbicida glifosato (Fugère *et al.*, 2020). También se ha observado que la dispersión entre comunidades facilita el RE (Low-Décarie *et al.*, 2015). Finalmente, aunque no se ha abordado en esta tesis, es importante mencionar que la diversidad de especies de una comunidad también tendrá un papel importante sobre los eventos de RE, pues una mayor diversidad poblacional asegurará la presencia de especies capaces de adaptarse a mayores niveles de estrés, facilitando así el RE (Low-Décarie *et al.*, 2015). Como ejemplo, recientemente se ha observado que las comunidades fitoplanctónicas con mayor número de especies soportan mejor los aumentos de temperatura sin disminuir su producción primaria (Bestion *et al.*, 2020). Comprender los factores que determinan el RE en comunidades es fundamental para poder hacer estimaciones más exactas de las consecuencias del Cambio Global.

Desde un punto de vista ecológico, este trabajo ayuda a comprender algunos factores que influyen en la supervivencia de *M. aeruginosa* en aguas salobres y, por lo tanto, en la aparición recurrente de *blooms* en aguas donde la salinidad está aumentando. En consecuencia, es posible afirmar que eventos de RE podrían restaurar una población de *M. aeruginosa* expuesta a niveles inicialmente letales de salinidad. Por lo tanto, las masas de aguas donde el incremento salino sea progresivo y tenga contribuciones de diferentes poblaciones (la dispersión favorece los eventos de RE), serán más propicias para que tengan lugar los eventos de RE. Además, en el caso de *M. aeruginosa*, la dispersión podría ser un factor fundamental porque se ha sugerido que la transferencia horizontal de genes puede actuar transfiriendo las secuencias genéticas relacionadas con la tolerancia a salinidad (Tanabe *et al.*, 2018, 2019). Al mismo tiempo, la probabilidad de que ocurran eventos de RE será mayor cuanto mayor sea el tamaño poblacional (Bell & Gonzalez, 2009; Bell, 2013), debido a que es posible que un pequeño número de células resistentes ya esté presente en la población. Es necesario añadir que en este trabajo se ha asumido un solo cambio ambiental (incremento de salinidad); sin embargo, el Cambio Global involucra a varias variables (como podría ser un aumento de la temperatura o CO₂) que pueden tener a su vez efectos sinérgicos, por lo que los resultados pueden ofrecer una imagen general de lo que podría ocurrir, dado que este tipo de experimentos no permiten estimar de manera precisa el resultado de la selección cuando la adaptación implica varias variables ambientales (Bell, 2013).

El estado actual de los postulados teóricos sobre el RE queda extensamente recogido en las revisiones de Carlson *et al.* (2014) y Bell (2017). Ambas revisiones muestran que los factores clave para entender el RE son la velocidad a la que incrementa el estrés, la gravedad general del estrés, el tamaño de la población afectada y la cantidad de variación genética disponible para la selección natural. Estas conclusiones se mantienen en una amplia gama de modelos (Gomulkiewicz & Holt, 1995; Holt & Gomulkiewicz, 1997; Bell & Collins, 2008; Orr & Unckless, 2008, 2014). Sin embargo, aún queda mucho por abordar desde el punto de vista empírico.



CAPÍTULO 5

El límite de la resistencia a herbicidas en organismos fitoplanctónicos de agua dulce

It is an error to imagine that evolution signifies a constant tendency to increased perfection. That process undoubtedly involves a constant remodelling of the organism in adaptation to new conditions; but it depends on the nature of those conditions whether the direction of the modifications effected shall be upward or downward.

Thomas Henry Huxley

The Struggle for Existence in Human Society (1888)



5.1. Introducción

Uno de los escenarios provocados por el Cambio Global es el aumento de herbicidas en las masas de agua dulce, principalmente causado por la agricultura intensiva (Koenig, 2001; Vila-aiub *et al.*, 2009; Arts & Hanson, 2018). El uso indiscriminado de herbicidas, junto con procesos de escorrentía, posibilita la llegada de estas sustancias biocidas a estas masas de agua (Nitschke & Schüssler, 1998; Graymore *et al.*, 2001; Field *et al.*, 2003; Abrahão *et al.*, 2011; Lorente *et al.*, 2015; Merchán *et al.*, 2018). Como consecuencia, los herbicidas están considerados como los contaminantes orgánicos más comunes en medios dulceacuícolas (Arts & Hanson, 2018). Además, se ha detectado su presencia incluso décadas después de ser prohibidos, como en el caso de la atrazina en las aguas subterráneas alemanas a pesar de su prohibición de 1991 (Vonberg *et al.*, 2014) o el diurón que, a pesar de ser considerado como sustancia peligrosa prioritaria (DMA, 2000/60 / CE), se encuentra con frecuencia en ríos de toda Europa (Loos *et al.*, 2009). Por ejemplo, se registró con alta frecuencia en los ríos españoles Llobregat y Guadalquivir (Köck-Schulmeyer *et al.*, 2012; Robles-Molina *et al.*, 2014).

Multitud de trabajos han demostrado que la presencia de herbicidas en las masas de agua dulce afecta negativamente a una gran variedad de organismos (Peterson *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 2003; de Brito Rodrigues *et al.*, 2017; Breckels & Kilgour, 2018). Los productores primarios acuáticos son los organismos más susceptibles a los efectos nocivos de muchos herbicidas (Roshon *et al.*, 1999; Malaj *et al.*, 2014). Esto se debe a que la gran mayoría de los herbicidas son inhibidores del sistema fotosintético (las vías de transporte de electrones son similares en plantas terrestres, algas y cianobacterias; Allen *et al.*, 2011). Por lo tanto, la presencia de herbicidas en las masas de agua dulce puede provocar una reducción de la producción primaria debido a la reducción de la eficiencia fotosintética y a la inhibición de la tasa de crecimiento de los organismos fitoplanctónicos (AbdEl-Aty & El-Dib, 2009; Nwani *et al.*, 2011; El-Dib & Abdel-Aty, 2012; Kumar *et al.*, 2014; De Stefano *et al.*, 2018; Smedbol *et al.*, 2018). Además, pueden causar daños relevantes en diferentes niveles de las redes tróficas (DeNoyelles *et al.*, 1982; Bester *et al.*, 1995; Dorigo & Leboulanger, 2001; Reish *et al.*, 2004; Occhipinti-Ambrogi & Sheppard, 2007; Arts & Hanson, 2018; Smedbol *et al.*, 2018).

Las cianobacterias y microalgas verdes son los principales productores primarios de las masas de agua dulce (Kirk, 1994). Por lo tanto, conocer el efecto de los herbicidas

sobre estos microorganismos será fundamental para poder cumplir los objetivos establecidos por la Directiva Marco de Agua de la UE (DMA) (2000/60 / CE), donde se indica que el fitoplancton es uno de los indicadores biológicos para conocer el estado ecológico de las masas de agua. De hecho, estos microorganismos se han utilizado como biosensores para detectar e incluso cuantificar la presencia de compuestos tóxicos en las masas de agua dulce (Altamirano *et al.*, 2004; Peña-Vázquez *et al.*, 2009; García-Balboa *et al.*, 2012; Tsopela *et al.*, 2016), y existen protocolos de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) que estiman la toxicidad de determinados productos a través del análisis del efecto tóxico sobre estos organismos (OCDE, 1984; USEPA, 2002). En esa línea, conocer la sensibilidad de estos microorganismos y explorar sus límites de resistencia a diferentes herbicidas puede servir de ayuda para mejorar las herramientas y los métodos de evaluación de la contaminación, así como para caracterizar los impactos ecológicos en sistemas acuáticos.

Estudios previos han demostrado que algunas cianobacterias y microalgas pueden adquirir resistencia a diferentes herbicidas a través de la selección de nuevas variantes genéticas que aparecen por mutación (López-Rodas *et al.*, 2001; Huertas *et al.*, 2010; Marvá *et al.*, 2010; Baselga-Cervera *et al.*, 2016b; Cameron *et al.*, 2019). Sin embargo, las concentraciones máximas de herbicidas a las cuales no es posible la resistencia de cianobacterias y microalgas, han sido escasamente exploradas (Reboud *et al.*, 2007; Huertas *et al.*, 2010; Rouco *et al.*, 2014). Además, otra cuestión de interés ecológico es el coste fisiológico asociado a la resistencia al herbicida. Se ha observado que la resistencia de cianobacterias y microalgas a un agente selectivo conlleva un coste fisiológico que puede expresarse como una disminución de la tasa de crecimiento y fotosíntesis (García-Villada *et al.*, 2002; Romero-López *et al.*, 2012; Fernández-Arjona *et al.*, 2013; Rouco *et al.*, 2014; Bañares-España *et al.*, 2016; Melero-Jiménez *et al.*, 2019). También se han observado cambios drásticos en la morfología celular (Costas & López-Rodas, 2006; Bañares-España *et al.*, 2016).

El objetivo de este capítulo es explorar el límite de la resistencia a herbicidas (diurón y glifosato) y el coste fisiológico de la misma, en tres organismos fitoplanctónicos. Aunque se han realizado multitud de estudios que han explorado el efecto tóxico de estos herbicidas en cianobacterias y microalgas (Vendrell *et al.*, 2009; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013; Camuel *et al.*, 2017; Smedbol *et al.*, 2018; Beaulieu *et al.*, 2020), los límites de resistencia de estos organismos a dichos herbicidas no han

sido previamente estudiados. En primer lugar, se utilizó el protocolo de trinquete para determinar los límites de la resistencia en la cianobacteria *M. aeruginosa*, y de las clorofíceas *C. reinhardtii* y *D. chlorelloides*. En segundo lugar, se exploró el coste fisiológico asociado a la resistencia en términos de tasa de crecimiento y de fotosíntesis. Los resultados de este capítulo permiten conocer el impacto que puede tener el incremento de la concentración de herbicidas sobre los organismos fitoplanctónicos y la producción primaria de las masas de agua dulce. Además, esta información es relevante para poder diseñar herramientas de detección y evaluación del estado ecológico las masas de agua dulce.

5.2. Material y métodos

5.2.1. Organismos experimentales y condiciones de cultivo

En este capítulo se utilizaron las cepas MaAVc de la cianobacteria *M. aeruginosa*, y Dc1M y ChlaA, de las clorofíceas *D. chlorelloides* y *C. reinhardtii*, respectivamente. Todos los organismos fueron proporcionados por la Colección de Cultivo de Algas (ACC-UCM) del Laboratorio de Genética, de la Universidad Complutense (Madrid, España). Específicamente, *D. chlorelloides* se aisló de un lago prístino en Sierra Nevada (Andalucía, España), mientras que *C. reinhardtii* se aisló en el Parque Nacional de Doñana (Andalucía, España). Los detalles de la cepa MaAVc y las condiciones de cultivo de todos los organismos se detallan en el capítulo 2 (sección 2.2.1.).

5.2.2. Efecto tóxico de los herbicidas sobre la tasa de crecimiento

El diurón (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea: $C_9H_{10}Cl_2N_2O$) y el glifosato (N-fosfonometil glicina; $C_3H_8NO_5P$) son dos herbicidas que afectan de manera diferente a los organismos fitoplanctónicos debido a que tienen diferentes mecanismos de acción; el diurón es un inhibidor del fotosistema II (PSII) y actúa compitiendo con la plastoquinona en el sitio de unión Q_B de la proteína D_1 en el centro de reacción del PSII, impidiendo así la transferencia de electrones del PSII al PSI (Sanderman & Boger, 1986; Hess, 2000).

Por otro lado, el glifosato es un inhibidor de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), que se requiere en la ruta del ácido shikímico para sintetizar aminoácidos aromáticos necesarios para la producción de metabolitos secundarios (Franz *et al.*, 1997). Estudios previos han demostrado que estos herbicidas pueden inhibir el crecimiento de cianobacterias y microalgas (Singh *et al.*, 2016; Mansano *et al.*, 2017; Lam *et al.*, 2020). En este caso, el efecto tóxico de ambos herbicidas sobre la tasa de crecimiento de los organismos experimentales se determinó de la siguiente manera; en el caso del diurón (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania) se preparó un stock en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyó en los cultivos a concentraciones de 0,1, 1, 1,5 y 2 μM y 0,05% (v/v) DMSO (Costas & López-Rodas, 2006). En el caso del glifosato (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania) se preparó una solución stock de 800 ppm en medio BG11-50% para obtener concentraciones de 0, 10, 25, 50, 100 y 150 ppm. La solución stock se esterilizó usando un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro. Cada cultivo experimental se inoculó con $1,5 \times 10^5$ células provenientes de cultivos en fase exponencial. Se prepararon cuatro réplicas de cada concentración de herbicida, cuatro controles sin herbicida y cuatro controles que contenían DMSO al 0,05% (v/v). La tasa de crecimiento (m) se calculó de manera similar a como se mostró en el capítulo 2 (sección 2.2.2.).

La concentración celular de *C. reinhardtii* (CC_c) y *D. chlorelloides* (CC_d) se determinaron a través de una regresión lineal entre el número de células (estimado mediante un hemocitómetro) y la absorbancia a $\lambda = 750 \text{ nm}$ (A_{750}) medida en un espectrofotómetro de placa (EON, BioTek, Winooski, VT, USA):

$$CC_c \text{ (células mL}^{-1}\text{)} = 4,35 \times 10^7 \times A_{750} \text{ (} r^2 = 0,981, n = 28 \text{)} \quad [\text{ec. 21}]$$

$$CC_d \text{ (células mL}^{-1}\text{)} = 7,87 \times 10^6 \times A_{750} \text{ (} r^2 = 0,978, n = 28 \text{)} \quad [\text{ec. 22}]$$

5.2.3. El límite de la resistencia a herbicidas

A diferencia del capítulo 3 y 4, en este caso se realizaron dos experimentos de trinquete independientes con ambos herbicidas (diurón y glifosato) y utilizando, como organismos experimentales, una cianobacteria y dos clorofíceas. En este experimento, los cultivos se

mantuvieron durante 7 d en observación antes de comparar con el control y se eliminaron las diferentes concentraciones iniciales del experimento, siendo 0,5 μM o 10 ppm las concentraciones iniciales para el experimento de diurón y glifosato, respectivamente. Finalmente, el factor de incremento de la concentración de herbicida fue $\times 2$. Por lo tanto, los ciclos de trinquete posteriores fueron 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 μM diurón, y 10, 20, 40, 80, 160 ppm glifosato (Figura 19). Previamente a la realización de los experimentos, se aisló mediante diluciones sucesivas una sola célula del cultivo inicial (para cada especie) para minimizar la probabilidad de que hubiera mutantes resistentes previos que pudieran estar presentes en los cultivos. Los cultivos experimentales se mantuvieron por separado en placas de 24 pocillos (2 mL por pocillo), inoculados con 3×10^5 células. Finalmente, se estableció el nivel máximo de resistencia como la concentración de herbicida más alta que permitió el crecimiento celular.

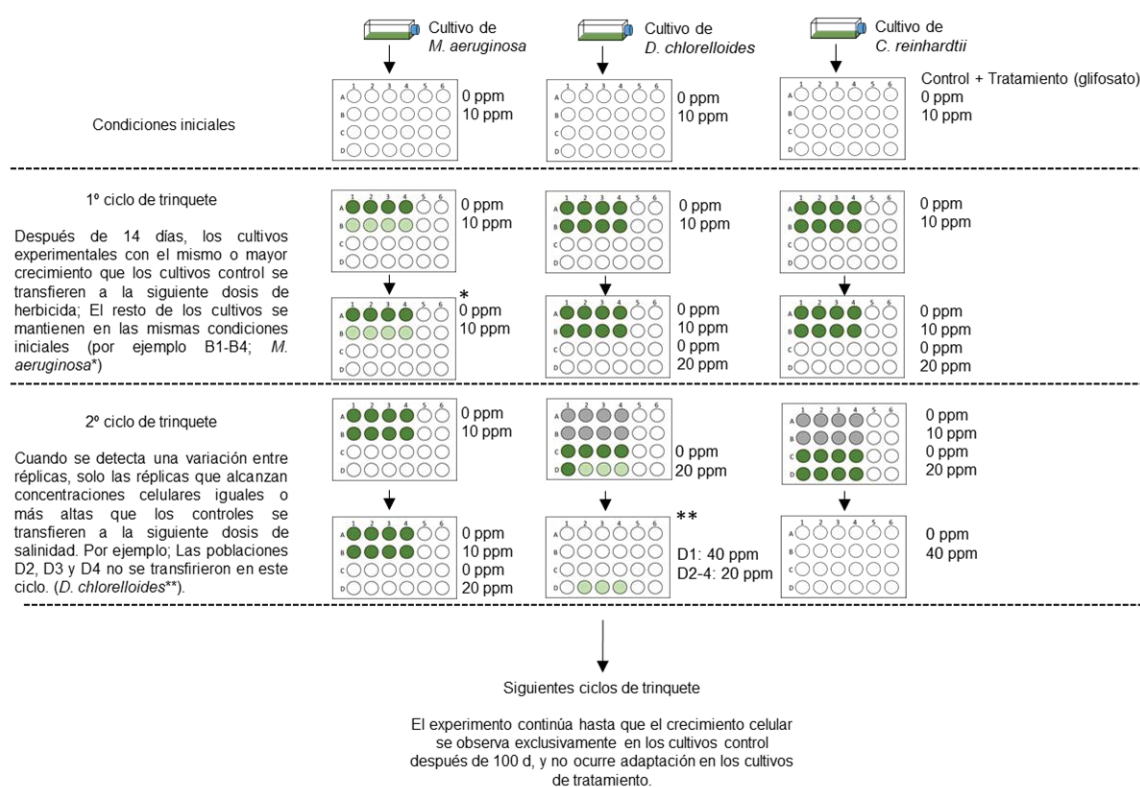


Figura 19. Representación esquemática del experimento de trinquete (herbicida: glifosato). El experimento consta de cuatro réplicas (1-4 pocillos) de los cultivos control (línea A) y cuatro réplicas de los cultivos de tratamiento a la dosis inicial de glifosato (línea B). Los cultivos se transfieren al siguiente ciclo de trinquete (aumento de la concentración de herbicida) cuando la concentración celular es similar, o superior, a la que se alcanza en los cultivos control. En el caso de que el cultivo experimental no alcance la concentración celular del control, el cultivo experimental se mantiene en el mismo nivel de selección. El límite de la resistencia corresponde al nivel más alto de glifosato bajo el cual se observa crecimiento.

5.2.4. El coste fisiológico de la resistencia a herbicidas

Se ha observado que la resistencia de organismos fitoplanctónicos a herbicidas implica una disminución de la tasa de crecimiento (Rouco *et al.*, 2014) y de fotosíntesis (Knauer *et al.*, 2010; Smedbol *et al.*, 2017). Por este motivo, se ha explorado el coste fisiológico de las cepas resistentes (obtenidas del experimento de trinquete) sobre m de manera similar a como se ha realizado en el capítulo 3 (sección 3.2.3). En este caso, se utilizaron los cultivos resistentes a la máxima concentración de herbicidas para las tres especies. Específicamente, se inocularon 6×10^5 células (4 réplicas) de los cultivos resistentes en 20 mL de medio BG11-50%, sin ninguna adición de herbicida. Los cultivos se incubaron durante 15 d en las mismas condiciones de crecimiento que las descritas anteriormente (~ 4 generaciones). Tras ese periodo de tiempo, se determinaron los valores iniciales de la tasa de crecimiento (m_1). En segundo lugar, las células se transfirieron e incubaron durante otros 15 d a medio BG11-50% suplementado con la máxima concentración de herbicida alcanzada en el experimento de trinquete, y la tasa de crecimiento se midió nuevamente (m_2). Los valores m , m_1 y m_2 se compararon utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó la prueba de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni. Los análisis se realizaron con el software libre R Core Team (2013). Este experimento complementario permite discernir si la resistencia de los organismos fitoplanctónicos es producto de la aclimatación o de la adaptación.

El coste fisiológico en términos de producción de oxígeno y tasa de transporte de electrones se calculó de manera similar a la descrita en el capítulo 2 (sección 2.2.7.). No obstante, es necesario mencionar que, en el caso de las clorofíceas, el factor que representa el porcentaje de la luz absorbida es 0,5. Por lo tanto, en el caso de *C. reinhardtii* y *D. chlorelloides*. Por lo tanto, se sustituiría, en la ecuación 8, el coeficiente 0,36 por el valor de 0,5. Los parámetros fotosintéticos derivados de los ajustes de las curvas *NPR-I* y *ETR-I* (sección 2.2.7) se compararon utilizando un ANOVA. La homogeneidad de las varianzas se comprobó previamente con la prueba de Levene (1961).

5.3. Resultados

5.3.1. Efecto de los herbicidas sobre la tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento de las tres especies disminuyó con el aumento de la concentración de ambos herbicidas; el efecto fue más drástico en *M. aeruginosa* y *D. chlorelloides* que en *C. reinhardtii* (Figura 20). Una concentración de 1 μM diurón o 40 ppm glifosato inhibió completamente el crecimiento de *M. aeruginosa* y *D. chlorelloides*, mientras que se detectó crecimiento de *C. reinhardtii* hasta 2 μM diurón o 90 ppm glifosato.

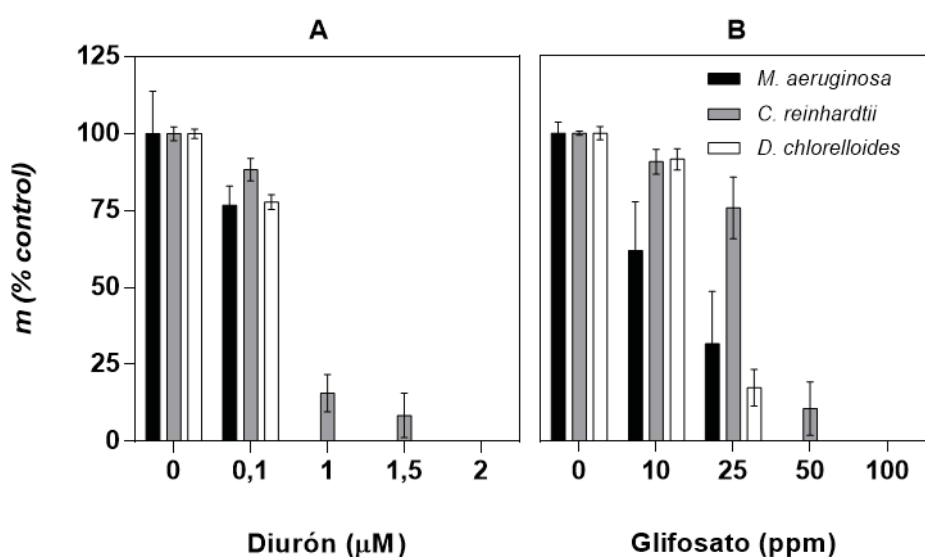


Figura 20. Efecto del diurón (A) y el glifosato (B) sobre la tasa de crecimiento (m , porcentaje con respecto al control sin herbicida) de las diferentes especies de fitoplancton de agua dulce utilizadas en el experimento de trinquete. Los valores de m se calcularon después de 6 d de exposición a concentraciones crecientes de cada herbicida. Las líneas verticales indican la media $\pm \sigma$ ($n = 4$).

5.3.2. Detección del límite de la resistencia a herbicidas

Tras realizar el experimento de trinquete, se observó que *C. reinhardtii* tiene una mayor capacidad de resistencia a ambos herbicidas que *M. aeruginosa* y *D. chlorelloides* (Figura 21). Específicamente, se observó que *C. reinhardtii* aumentó su resistencia hasta 16 μM diurón y 160 ppm glifosato (Figura 21). Por el contrario, *M. aeruginosa* y *D. chlorelloides* solo pudieron tolerar hasta 8 μM diurón y 80 ppm glifosato tras el experimento de trinquete (Figura 21). Además, se observó que las poblaciones de la

misma especie necesitan un número diferente de generaciones para alcanzar la misma concentración celular que los cultivos de control, especialmente a las concentraciones de herbicida más altas (Figura 21). Por ejemplo, las poblaciones 1, 2 y 4 de *D. chlorelloides* pudieron crecer a 40 ppm glifosato, mientras que la población 2 de la misma cepa no pudo sobrevivir a esa concentración. Además, en la mayor parte de los casos, solo una de las cuatro poblaciones pudo tolerar la máxima concentración de herbicida. Dado que cada réplica es una población independiente, las diferencias observadas sugieren que el mecanismo que permite la resistencia a la máxima concentración de ambos herbicidas y para todas las especies es la adaptación.

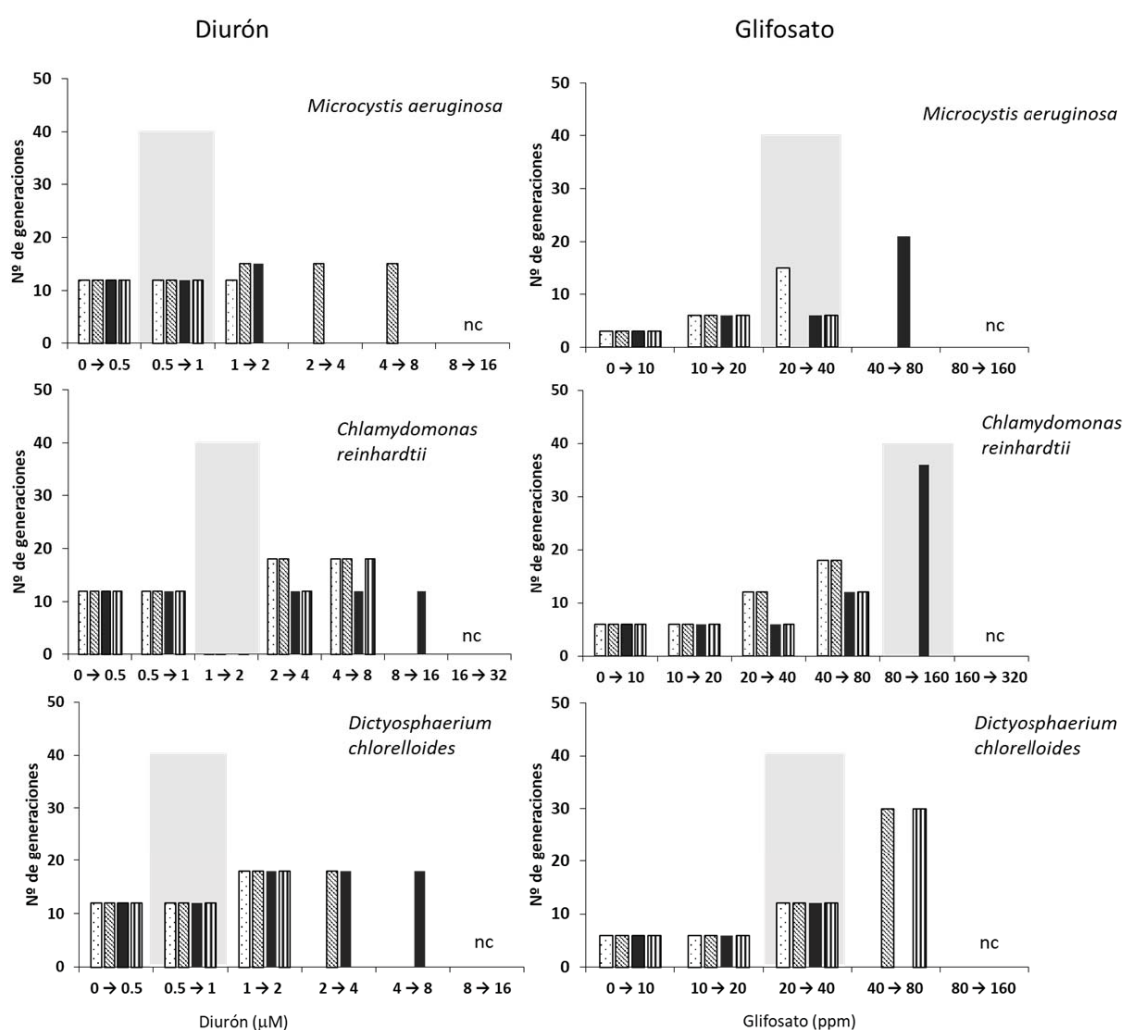


Figura 21. Número de generaciones (con respecto al control) de cada especie necesarias para crecer bajo dosis crecientes de diurón y glifosato durante el experimento de trinquete. Cada columna representa una población independiente por cada herbicida y especie. El experimento de trinquete se terminó cuando no se observó crecimiento en ninguna de las cuatro réplicas (nc: crecimiento celular no detectado). La sombra gris sobre un ciclo de trinquete indica que la concentración probada es igual o superior a la dosis letal inicial para cada herbicida y especie (Figura 20).

5.3.3. El coste fisiológico de la resistencia a herbicidas en la tasa de crecimiento

Con el objeto de discernir entre aclimatación o adaptación como mecanismo responsable de la resistencia a herbicidas, se calcularon las tasas de crecimiento de las células que pudieron proliferar a las concentraciones más altas de herbicida. Los valores de m de las células ancestrales fueron 2-3 veces más elevados que los de las células resistentes a herbicidas en las tres especies (Figura 22). No se detectaron diferencias significativas entre los valores de m de las células resistentes cultivadas en ausencia o presencia del herbicida (Figura 22), indicando que la resistencia a cada herbicida se consiguió por adaptación.

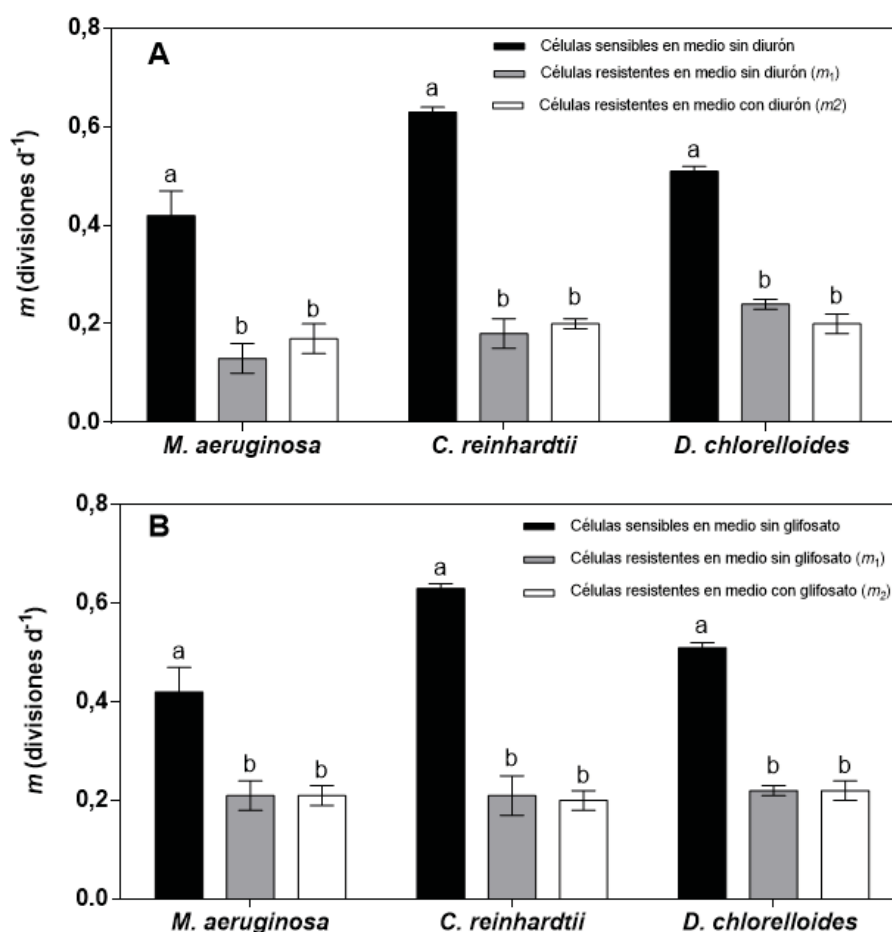


Figura 22. Tasa de crecimiento (m) de las células sensibles y resistentes a herbicidas (A: diurón; B: glifosato) obtenidas tras 15 d en medio sin herbicida (4 generaciones) y otros 15 d en medio con herbicida (4 generaciones). Las diferencias significativas entre los valores de m , detectadas por la prueba de Kruskal-Wallis H y la prueba post hoc de Mann-Whitney ($p < 0,05$), se indican con letras diferentes. Los datos son la media $\pm \sigma$ ($n = 4$ y 3 para células sensibles y resistentes, respectivamente).

3.3.4. El coste de la resistencia a herbicidas en la tasa neta de fotosíntesis y en la tasa de transporte de electrones

Los parámetros fotosintéticos derivados de las curvas *NPR-I* y *ETR-I* en ausencia de herbicida se muestran en la Tabla 8. La capacidad fotosintética (estimada por producción de oxígeno) de las células sensibles fue aproximadamente 2-3 veces mayor que la observada en las células resistentes para ambas clorofíceas (Figura 23). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en los valores de NPR_{max} de las células de *M. aeruginosa*. En relación con la ETR_{max} , se observó una disminución significativa en las células resistentes de las clorofíceas para ambos herbicidas. Esto indica que ambos herbicidas afectan a la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, no se observó que la resistencia al glifosato produjera una disminución de la ETR_{max} para *M. aeruginosa*. Además, se observó que la resistencia a ambos herbicidas no implicó una reducción de α^{GPR} (a excepción de las células de *D. chlorelloides* resistentes al glifosato). Finalmente, se detectó que la resistencia al diurón produce una mayor disminución de α^{ETR} que la resistencia al glifosato.

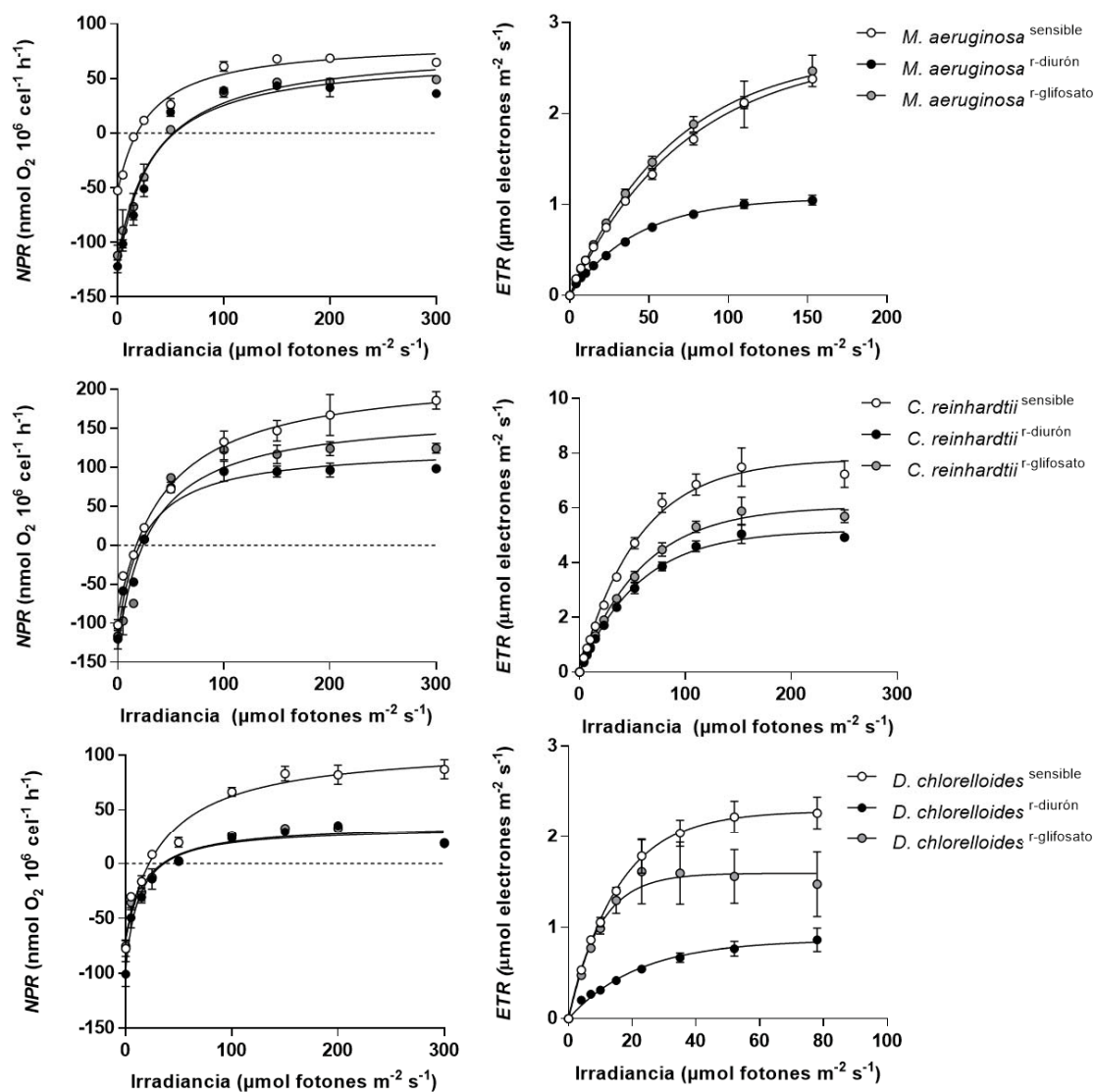


Figura 23. Tasa de fotosíntesis neta (*NPR*) y tasa de transporte de electrones (*ETR*) en función de la irradiancia de las cepas resistentes y sensibles a herbicidas de cada especie. Los datos son medias \pm DE ($n = 4$). Las líneas indican los valores del ajuste a la ecuación de Edwards y Walker (1983) para *NPR-I* y a la ecuación de Platt *et al.* (1980) para la *ETR-I*.

Tabla 8. Parámetros fotosintéticos derivados de las curvas *NPR-I* y *ETR-I* de las cepas sensibles y resistentes a herbicidas de cada especie. Las diferencias significativas entre los parámetros se detectaron mediante un ANOVA y el test de Tukey, las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los datos son medias $\pm \sigma$ ($n = 4$). Unidades: α^{NPR} (nmol $O_2 \cdot h^{-1} \cdot 10^6 \cdot células^{-1}$ [$mmol \cdot fotones \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$] $^{-1}$); α^{ETR} (mol e^- [mol fotones] $^{-1}$).

<i>M. aeruginosa</i>					
	sensibles	r-diurón	r-glifosato	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>NPR</i> _{max}	84,75 \pm 2,64 ^a	70,68 \pm 4,03 ^b	78,89 \pm 4,09 ^a	15,32	<0,01
α^{NPR}	2,65 \pm 0,07 ^a	2,68 \pm 0,17 ^a	2,74 \pm 0,11 ^a	0,66	0,53
<i>ETR</i> _{max}	3,65 \pm 0,12 ^a	1,07 \pm 0,04 ^b	2,68 \pm 0,24 ^a	130,44	<0,01
α^{ETR}	0,039 \pm 0,001 ^a	0,024 \pm 0,002 ^b	0,039 \pm 0,001 ^a	189,71	<0,01
<i>C. reinhardtii</i>					
	sensibles	r-diurón	r-glifosato	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>NPR</i> _{max}	222,9 \pm 15,35 ^a	126,17 \pm 4,09 ^c	170,9 \pm 5,13 ^b	100,87	<0,01
α^{NPR}	4,49 \pm 0,26 ^a	4,45 \pm 0,40 ^a	4,71 \pm 0,21 ^a	0,797	0,43
<i>ETR</i> _{max}	7,73 \pm 0,40 ^a	5,19 \pm 0,22 ^c	6,05 \pm 0,33 ^b	61,49	<0,01
α^{ETR}	0,11 \pm 0,003 ^a	0,08 \pm 0,003 ^c	0,09 \pm 0,002 ^b	146,47	<0,01
<i>D. chlorelloides</i>					
	sensibles	r-diurón	r-glifosato	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>NPR</i> _{max}	109,47 \pm 10,64 ^a	34,54 \pm 2,82 ^b	36,30 \pm 3,74 ^b	162,25	<0,01
α^{NPR}	3,01 \pm 0,18 ^a	2,83 \pm 0,46 ^a	2,14 \pm 0,26 ^b	8,92	<0,01
<i>ETR</i> _{max}	2,28 \pm 0,19 ^a	0,86 \pm 0,14 ^c	1,59 \pm 0,30 ^b	38,99	<0,01
α^{ETR}	0,107 \pm 0,004 ^a	0,030 \pm 0,002 ^c	0,099 \pm 0,006 ^a	367,58	<0,01

5.4. Discusión

La aplicación indiscriminada del diurón y glifosato ha provocado que estos herbicidas se puedan detectar en lagos y ríos cercanos a zonas agrícolas y urbanas (Kolpin *et al.*, 2006; Kaonga *et al.*, 2015). La presencia de estos productos puede provocar desequilibrios en los ecosistemas acuáticos relacionados con el aumento de las especies tolerantes en detrimento de las especies sensibles. A pesar de que los organismos fitoplanctónicos son los más afectados (Roshon *et al.*, 1999; Malaj *et al.*, 2014), los límites de la resistencia de estos organismos cuando son expuestos a concentraciones crecientes de herbicidas han sido escasamente explorados (Reboud *et al.*, 2007; Huertas *et al.*, 2010; Rouco *et al.*, 2014). Por ello, el objetivo principal de este capítulo fue analizar el límite de resistencia de tres organismos fitoplanctónicos al diurón y glifosato, y determinar el coste fisiológico asociado a la resistencia.

Estudios previos han mostrado que la tolerancia a los herbicidas de los organismos fitoplanctónicos varía según la especie (Knauert *et al.*, 2009; Vendrell *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2010; Marvá *et al.*, 2010; Rouco *et al.*, 2014). Generalmente, la

resistencia de las clorofíceas es mayor que la de las cianobacterias (Hadjoudja *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2010; Rouco *et al.*, 2014; Smedbol *et al.*, 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron diferencias de la toxicidad del diurón y el glifosato sobre la tasa de crecimiento de *D. chlorelloides* y *M. aeruginosa*. Es más, se observó que *M. aeruginosa* y *D. chlorelloides* son menos tolerantes al diurón y glifosato que *C. reinhardtii*.

El protocolo de trinquete se ha utilizado previamente para explorar los límites adaptativos de organismos fitoplanctónicos a herbicidas como el cobre o la atrazina (Reboud *et al.*, 2007; Marvá *et al.*, 2010; Rouco *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos mostraron que *C. reinhardtii* puede llegar a tolerar hasta 16 μM diurón y 160 ppm glifosato, mientras que *D. chlorelloides* y *M. aeruginosa* toleraron hasta 8 μM diurón y 80 ppm glifosato. Por lo tanto, se observó que estos organismos son capaces de resistir a una concentración 8 y 2 veces mayor que las dosis letales de diurón y glifosato, respectivamente. El aumento de la tolerancia a diurón de las clorofíceas no es elevado si lo comparamos con otros herbicidas como la simazina o el cobre, donde se han observado células de *D. chlorelloides* que pueden tolerar 90 y 22 veces la dosis letal inicial, respectivamente (Huertas *et al.*, 2010; Rouco *et al.*, 2014). En el caso de *M. aeruginosa*, el nivel de tolerancia alcanzado para el diurón es similar a otros herbicidas como la simazina o el cobre, donde *M. aeruginosa* puede tolerar 9 y 4-12 veces la dosis letal inicial, respectivamente. Además, el aumento de la tolerancia al glifosato es mucho menor que el diurón. Este resultado es coherente con los resultados de trabajos anteriores, donde se ha observado que la tasa de mutación que confiere resistencia al glifosato es menor que para la resistencia a otros herbicidas (Baselga-Cervera *et al.*, 2016b).

La adquisición de resistencia a ambos herbicidas supuso un coste fisiológico en las tres especies. Esto fue evidente cuando las poblaciones resistentes se cultivaron en ausencia de diurón y glifosato. Aunque se puede suponer que el mecanismo de resistencia para concentraciones que exceden la dosis letal inicial podría ser genético, es necesario realizar un experimento complementario para demostrarlo (Rouco *et al.*, 2014). En este sentido, es posible afirmar que la resistencia está relacionada con la aparición de nuevas variantes genéticas (adaptación) si se observan valores similares de tasa de crecimiento (m) de las células resistentes al herbicida, cultivadas primero en medio sin herbicida y más tarde en presencia de una alta concentración de herbicida (después de 4 generaciones). Alternativamente, si la aclimatación fuese la causa de la resistencia, el valor m en ausencia de herbicida debería ser mayor que en presencia de éste y debería ser

similar al de las células control. Esta aproximación ha permitido demostrar que el límite de resistencia al cobre y a salinidad de *M. aeruginosa* se conseguía por adaptación (Rouco *et al.*, 2014; Melero-Jiménez *et al.*, 2019). En este caso, se observa que los valores de m para las células resistentes al herbicida fueron similares en ambas situaciones, por lo que este resultado puede considerarse una evidencia de que la resistencia es consecuencia de la adaptación. Además, se observó cierta variabilidad en el número de generaciones necesarias para pasar al siguiente ciclo de trinquete cuando las concentraciones de herbicidas aumentaron. Esto se debe a que la aparición de mutaciones que generaron la resistencia ocurrió en diferentes momentos en cada una de las poblaciones. Sin embargo, si no se observa variabilidad en el número de generaciones entre las poblaciones, cabe pensar que lo que está ocurriendo es un proceso de aclimatación. Por lo tanto, el proceso de aclimatación podría ocurrir a concentraciones más bajas de herbicidas mientras que la adaptación posibilitaría la supervivencia a concentraciones más altas (Rouco *et al.*, 2014).

La adaptación del fitoplancton a condiciones desfavorables puede provocar una alteración de sus características fotosintéticas (García-Villada *et al.*, 2004; Fernández-Arjona *et al.*, 2013; Bañares-España *et al.*, 2016). En el caso del diurón, la resistencia conduce a una reducción en los valores de NPR_{max} y ETR_{max} en todos los organismos. Aunque en este trabajo no se han llevado a cabo análisis genéticos, estudios previos han mostrado que la resistencia de algunas microalgas a herbicidas inhibidores del PSII se debe a mutaciones del gen *psbA*, que es el encargado de codificar el sitio de unión entre la proteína D1 y el diurón. (Galloway & Mets, 1984; Erickson *et al.*, 1985, 1989; Oettmeier, 1999; Dupraz *et al.*, 2016). Específicamente, la modificación de un solo nucleótido en la secuencia *psbA*, provocó la resistencia al diurón en las microalgas verdes *C. reinhardtii* (Dupraz *et al.*, 2016) y *Tetraselmis suecica* (Oettmeier, 1999). Por lo tanto, es posible que estas mutaciones provoquen una reducción de la capacidad fotosintética de estos organismos. En el caso del glifosato, se ha observado que la resistencia produce una reducción en los valores de NPR_{max} y ETR_{max} en las especies de clorofíceas, pero no en *M. aeruginosa*. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la estructura del PSII (Smedbol *et al.*, 2017), dado que las antenas recolectoras de luz se sitúan en las membranas tilacoidales libres en las células en cianobacterias, mientras que en las clorofíceas estas membranas se encuentran en el interior de los cloroplastos (Govindjee *et al.*, 2010). Además, los complejos proteínicos de estas antenas están principalmente compuestos por ficobilisomas en las cianobacterias y pueden moverse entre el PSII y el PSI permitiendo la distribución de la energía a través de los centros de reacción (Joshua

& Mullineaux, 2004). En este sentido, Smedbol *et al.* (2017) sugieren que el efecto del glifosato sobre la cantidad de energía atrapada por el PSII podría estar relacionada con los mecanismos de estado-transición (paso de energía del PSII al PSI). Esto podría explicar por qué la resistencia al glifosato no implica un coste fotosintético en *M. aeruginosa*, al contrario que lo observado en las clorofíceas. No obstante, existen otros estudios donde se sugiere que el efecto del glifosato sobre el PSII está relacionado con su daño a la membrana tilacoidal o la interrupción del flujo de carbono (Choi *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2012).

Desde un punto de vista ecológico, es necesario mencionar que estos organismos podrían adaptarse y sobrevivir en ambientes contaminados por estos herbicidas (dependiendo de la velocidad del deterioro y la concentración). Sin embargo, las células resistentes exhibirán un coste fisiológico y, en consecuencia, se podrían dar cambios en la estructura de la comunidad fitoplanctónica y, finalmente, la producción primaria en los ecosistemas acuáticos se podría ver alterada.



CAPÍTULO 6

The role of changes in environmental quality in multitrait plastic responses to environmental and social change in the model microalga

Chlamydomonas reinhardtii.

“Variation is not just noise; it is also the stuff of evolution and a central attribute of living systems. The physiological differences between individuals in the same species or population, and also the patterns of variation in different groups, must not be ignored.”

George A. Bartholomew, 1919 – 2006

'Interspecific comparison as a tool for ecological physiologists', in *New Directions in Ecological Physiology* (1987)



The role of changes in environmental quality in multitrait plastic responses to environmental and social change in the model microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Ignacio J. Melero-Jiménez^{1*}, Antonio Flores-Moya¹, Sinéad Collins².

¹Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

²Institute of Evolutionary Biology, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

Journal: Ecology and Evolution (In Production), **DOI:** 10.1002/ece3.7179

***Corresponding author** E-mail address: imelero@uma.es (Ignacio J. Melero-Jiménez)

Abstract

Intraspecific variation plays a key role in species' responses to environmental change; however, little is known about the role of changes in environmental quality (the population growth rate an environment supports) on intraspecific trait variation. Here, we hypothesize that intraspecific trait variation will be higher in ameliorated environments than in degraded ones. We first measure the range of multitrait phenotypes over a range of environmental qualities for three strains and two evolutionary histories of *Chlamydomonas reinhardtii* in laboratory conditions. We then explore how environmental quality and trait variation affect the predictability of lineage frequencies when lineage pairs are grown in indirect co-culture. Our results show that environmental quality has the potential to affect intraspecific variability both in terms of the variation in expressed trait values, and in terms of the genotype composition of rapidly growing populations. We found low phenotypic variability in degraded or same-quality environments and high phenotypic variability in ameliorated conditions. This variation can affect population composition, as monoculture growth rate is a less reliable predictor of lineage frequencies in ameliorated environments. Our study highlights that understanding whether populations experience environmental change as an increase or a decrease in quality relative to their recent history affects the changes in trait variation during plastic responses, including growth responses to the presence of conspecifics. This points towards a fundamental role for changes in overall environmental quality in driving phenotypic variation within closely-related populations, with implications for microevolution.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, environmental quality, intraspecific variation, maximum growth rate, carbon dioxide, temperature, light, carbon use efficiency, photosynthesis, reactive oxygen, plasticity

CAPÍTULO 7

Discusión General

“Humans have wandered the Earth for thousands of years but never has our capacity to alter the Earth’s ecosystem at a larger scale been more prominent than it is today.”

Kat Lahr

Parallelism of Cyclicity (2015)



7.1. Discusión General

En esta tesis se exploraron diferentes factores que afectan al RE, el límite de resistencia y el coste fisiológico asociado a la resistencia, en diferentes organismos fitoplanctónicos expuestos a diferentes escenarios de Cambio Global. Además, se analizó si los cambios ambientales, que abarcan tanto la mejora como la degradación del medio, determinan la variabilidad fenotípica. Para ello se utilizaron tres especies fitoplanctónicas (*M. aeruginosa*, *C. reinhardtii* y *D. chlorelloides*) como organismos modelo, mientras que los escenarios de Cambio Global incluyeron los aumentos de salinidad, concentración de herbicidas, temperatura y niveles CO₂. Los objetivos declarados inicialmente se han abordado a través de experimentos de laboratorio y se han discutido en detalle en los capítulos anteriores. No obstante, resulta necesario, y a la vez interesante, hacer una reflexión sobre lo que aportan los resultados obtenidos a la comprensión del Antropoceno. Consecuentemente, este capítulo tiene como objetivo integrar los resultados obtenidos y reflexionar sobre cómo la información derivada de los experimentos de laboratorio puede ayudar a comprender la respuesta evolutiva de los microorganismos fotosintéticos ante los retos ambientales que caracterizan el Antropoceno.

Actualmente se está observando una pérdida de biodiversidad sin precedentes como consecuencia de diferentes actividades humanas (Barnosky *et al.*, 2011; Crist *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2017; Pecl *et al.*, 2017; Turvey & Crees, 2019). De hecho, se ha propuesto que posiblemente estemos entrando en un nuevo periodo de extinción global: “La sexta extinción” (Chapin *et al.*, 2000; Ceballos *et al.*, 2010, 2015, 2017; Ceballos & Ehrlich, 2018). Sin embargo, mientras que el efecto del Cambio Global sobre comunidades de organismos pluricelulares, o sus efectos sobre cambios en los hábitats han sido ampliamente estudiados, el futuro de los microorganismos en el Antropoceno ha sido escasamente explorado (Cavicchioli *et al.*, 2019). Recientemente, más de una veintena de investigadores de diferentes países firmaron un trabajo titulado *The urgent need for microbiology literacy in society* donde exponen la importancia de los microorganismos en la sociedad actual (Timmis *et al.*, 2019). Por ejemplo, los microorganismos son clave en los ciclos biogeoquímicos, así como en la sanidad vegetal, animal y humana. En este sentido, los microorganismos fitoplanctónicos constituyen una de las comunidades microbianas más relevantes, siendo responsables de más del 45% de la producción primaria neta anual de la biosfera y, además, tienen un papel clave tanto en

los ciclos de los nutrientes como en el secuestro de carbono (Falkowski, 1994; Kirk, 1994; Falkowski & Raven, 1997; Field *et al.*, 1998). Por lo tanto, explorar las posibilidades adaptativas de estos microorganismos en escenarios futuros resulta crucial.

Se asume que la gran mayoría de linajes de microorganismos fitoplanctónicos han superado los diversos eventos de extinción que han acontecido a lo largo de la historia de la vida. Este es el caso de las cianobacterias, las cuales están presentes en la Tierra desde hace más de 3.000 millones de años (Schopf & Packer, 1987), así como de los primeros eucariotas fotosintéticos, que surgieron hace aproximadamente 1.500 millones de años (Knoll, 1992). De hecho, la vida en la Tierra tal y como la conocemos actualmente, es consecuencia del “Gran Evento de Oxidación” causado por la proliferación de cianobacterias hace aproximadamente 2.400 millones de años (Cavalier-Smith *et al.*, 2006), caracterizando el inicio del eón Proterozoico (Sleep, 2001; Holland, 2006). La supervivencia del fitoplancton a lo largo de la historia de la vida indica que estos organismos tienen una alta capacidad para adaptarse y sobrevivir en multitud de ambientes *a priori* extremos o letales. No obstante, los organismos fitoplanctónicos se enfrentan a un nuevo reto: la supervivencia en el Antropoceno. En este nuevo escenario los organismos fitoplanctónicos tendrán que enfrentarse a las nuevas situaciones derivadas de la actividad humana, como el cambio acelerado de diferentes variables ambientales o la introducción de nuevas sustancias tóxicas no presentes en la biosfera anteriormente. Por lo tanto, es necesario abordar las siguientes cuestiones: ¿podrán los microorganismos fitoplanctónicos sobrevivir en los nuevos escenarios ambientales generados por la actividad humana?, ¿cuáles son los límites que pueden resistir estos organismos? o ¿cuál es el papel del RE en el Antropoceno? La evolución experimental permite abordar estas cuestiones en los microorganismos fitoplanctónicos debido sus las características inherentes: tamaños de población elevados, tasas de crecimiento altas y una alta variabilidad genética y fenotípica (Reusch & Boyd, 2013).

Antes de empezar a discutir acerca de las cuestiones previas, es necesario subrayar que los experimentos realizados en esta tesis son aproximaciones experimentales simplificadas de la realidad. La multitud de variables que afectan a estos organismos en la naturaleza, así como la complejidad de estas, son prácticamente imposibles de reproducir en el laboratorio. De la misma manera, los experimentos de esta tesis se han realizado con cultivos de una sola especie, lo que provoca una falta de interacción entre la especie estudiada y el resto de las especies que puedan encontrarse en el medio natural. No obstante, como en la mayoría de las ramas de conocimiento, la representación exacta

de la realidad resulta imposible, pues la mayoría de los diseños experimentales presentan limitaciones (tiempo, espacio, etc.). Reconocer estas limitaciones permite una mejor interpretación de los resultados y la posibilidad de plantear mejores diseños experimentales futuros.

Los organismos fitoplanctónicos proliferan en entornos fluctuantes (Harris *et al.*, 1987; Reynolds, 1990), los cuales están siendo cada vez más alterados por cambios derivados de las actividades del ser humano (Dudgeon, 2019). Estos cambios, suelen ser unidireccionales como el aumento continuo de salinidad, de la concentración de herbicidas o de la temperatura, y pueden generar situaciones donde la presión selectiva sea tan elevada que conlleve a la eliminación de determinadas especies fitoplanctónicas. No obstante, la capacidad de repuesta del fitoplancton para tolerar los cambios ambientales es elevada debido a sus grandes tamaños poblacionales y a sus tasas de elevadas tasas de crecimiento (Lynch *et al.*, 1991). Esto implica que exista una gran variabilidad genética en las poblaciones de estos organismos que permite dar una respuesta evolutiva rápida cuando queden expuestas a condiciones selectivas (Rengefors *et al.*, 2017). La variabilidad genética se sostiene en mutaciones espontáneas, a las que se suman la recombinación genética en aquellos linajes que presentan reproducción sexual (Rengefors *et al.*, 2017). Además, se ha demostrado que las mutaciones son el principal mecanismo que permite la supervivencia de poblaciones de fitoplancton tras multitud de generaciones expuestas a situaciones selectivas como las que pueden ocurrir en un futuro cercano en el escenario de Cambio Global (López-Rodas *et al.*, 2001, 2007, 2008c; Collins & Bell, 2004; Flores-Moya *et al.*, 2008, 2012; Sánchez-Fortún *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2010, 2011; Rouco *et al.*, 2011; Lohbeck *et al.*, 2012; Marvá *et al.*, 2014; Rouco *et al.*, 2014; Schlüter *et al.*, 2014, 2016; Cameron *et al.*, 2019). A pesar de ello, Rengefors *et al.* (2017) recalcan que la base genética de este cambio adaptativo es actualmente esquiva, y que no se sabe qué tipo de mutaciones subyacentes o incluso epigenéticos soportan la capacidad de adaptación.

Los experimentos realizados en esta tesis (capítulos 2, 3 y 5) vuelven a poner de manifiesto que la supervivencia de cianobacterias y microalgas en las nuevas condiciones de Cambio Global dependerán principalmente de la selección de nuevas variantes genéticas y en parte por aclimatación. En primer lugar, se estudió la posibilidad de supervivencia y el límite de resistencia de una cepa de la cianobacteria *M. aeruginosa* al incremento de salinidad (capítulo 1). Abordar esta cuestión es relevante debido a que uno de los escenarios esperados en el Antropoceno es el aumento de salinidad en los

ecosistemas de agua dulce (Cañedo-Argüelles *et al.*, 2013, 2016), y diversos estudios han mostrado que es posible que el aumento de salinidad favorezca la expansión de las cianobacterias de agua dulce frente a otros organismos fitoplanctónicos (Paerl & Huisman, 2009; Paerl, 2014). La existencia de cepas tóxicas de *M. aeruginosa*, así como, su capacidad para formar *blooms* hacen que sea necesario comprender el comportamiento evolutivo de *M. aeruginosa* en situaciones de aumento de salinidad. Para abordar dichas cuestiones, se aplicaron los experimentos de análisis de fluctuación (capítulo 2) y el protocolo de trinquete (capítulos 2 y 3). Estos diseños experimentales han sido previamente utilizados para explorar la posibilidad y los límites adaptativos de multitud de especies fitoplanctónicas expuestas a agentes selectivos naturales y antropogénicos (revisado por Baselga-Cervera *et al.*, 2016b). Específicamente, el análisis de fluctuación permitió discernir si la resistencia de *M. aeruginosa* a salinidad fue consecuencia de la aclimatación o de la adaptación, mientras que el protocolo de trinquete permitió conocer el límite máximo de salinidad que es capaz de tolerar *M. aeruginosa*. Tras realizar dichos experimentos, se ha podido concluir que las células de *M. aeruginosa* pudieron sobrevivir en ambientes previamente letales de salinidad gracias a la selección de nuevas variantes genéticas que aparecieron por mutaciones espontáneas. Este mismo mecanismo evolutivo permitió explicar la adaptación de *M. aeruginosa* a ciertos ambientes naturales extremos (Costas *et al.*, 2008; Fernández-Arjona *et al.*, 2013; Martín-Clemente *et al.*, 2019). Desde un punto de vista ecológico, estudios recientes indican que cada vez es más común la presencia de *M. aeruginosa* en aguas salobres (Preece *et al.*, 2015, 2017; Martínez de la Escalera *et al.*, 2017; Bormans *et al.*, 2019). En este sentido, los resultados obtenidos en los capítulos 2 y 3 sugieren que la selección de nuevas variantes genéticas resistentes a salinidad podría justificar el incremento de proliferaciones de *M. aeruginosa* en agua salobre. Aún más, estudios recientes indican que la transferencia horizontal de genes también podría estar implicada en la adaptación de *M. aeruginosa* a la salinidad (Tanabe *et al.*, 2018, 2019).

La selección de variantes genéticas adaptadas es esencial cuando los organismos se enfrentan a situaciones selectivas. Sin embargo, ¿qué ocurrirá cuando un organismo se enfrenta a un agente selectivo de origen antrópico con el que no ha tenido una historia evolutiva previa? La liberación de xenobióticos al medio ambiente es cada vez mayor y, por lo tanto, comprender la respuesta evolutiva del fitoplancton ante estas sustancias es fundamental. Por ese motivo, en esta tesis se estudió el límite de resistencia de la cianobacteria *M. aeruginosa* y de dos microalgas verdes, *C. reinhardtii* y *D. chlorelloides*, a dos herbicidas: glifosato y diurón. Para abordar dicha cuestión, se aplicó

el protocolo de trinquete (capítulo 5) y, en aquellos casos donde se alcanzó la máxima resistencia, se realizó un experimento complementario para distinguir si el límite de resistencia estaba soportado por mecanismos de aclimatación o de adaptación. En primer lugar, se observó que ambos herbicidas son altamente tóxicos para las tres especies. Sin embargo, tras el experimento de trinquete todas ellas lograron sobrevivir por encima de su dosis letal inicial gracias a la selección de nuevas variantes genéticas. El límite de resistencia para ambos herbicidas fue similar en *M. aeruginosa* y *D. chlorelloides*. Sin embargo, para el caso del cobre (Huertas *et al.*, 2010) y simazina (Rouco *et al.*, 2014) el límite de *D. chlorelloides* fue mayor que el observado en *M. aeruginosa*. Además, se observó que *C. reinhardtii* tiene mayor límite de resistencia para estos últimos herbicidas que las otras dos especies. Estos resultados vuelven a poner de manifiesto que el límite de resistencia puede variar entre cianobacterias y microalgas frente a diferentes contaminantes de origen antrópico (Costas *et al.*, 2001; López-Rodas *et al.*, 2001, 2008b; García-Villada *et al.*, 2002; Marvá *et al.*, 2010; Rouco *et al.*, 2014; Baselga-Cervera *et al.*, 2016a). Por lo tanto, la introducción de contaminantes antropogénicos posiblemente provocará una reestructuración de las comunidades fitoplanctónicas debido a las diferencias en los límites de resistencia de cada especie, siendo el grupo de los clorófitos quienes más se podrían beneficiar de esta situación.

En resumen, los resultados derivados de los experimentos de análisis de fluctuación y protocolo de trinquete, junto con los obtenidos en estudios previos de otros autores (Costas *et al.*, 2001, 2007, 2008, 2014; López-Rodas *et al.*, 2001, 2007, 2008a, b, c, 2009; Flores-Moya *et al.*, 2005; Marvá *et al.*, 2010, 2014; Carrera-Martínez *et al.*, 2011; Romero-López *et al.*, 2012; Fernández-Arjona *et al.*, 2013; Baselga-Cervera *et al.*, 2016a; Martín-Clemente *et al.*, 2019), permiten concluir que la posibilidad de supervivencia del fitoplancton, ante agentes selectivos naturales o antropogénicos, estará principalmente determinada por la selección de variantes genéticas que se generan por mutaciones espontáneas (aunque no se debe desechar la transferencia horizontal de genes y la recombinación en el caso de los linajes con capacidad de reproducción sexual (Cameron *et al.*, 2019)). Sin embargo, esto suscita otra cuestión ¿cuál es el coste de sobrevivir en un ambiente *a priori* letal? Las variantes genéticas resistentes suelen tener un coste fisiológico que se refleja en una disminución de su *fitness* en condiciones no selectivas (Andersson & Levin, 1999; Coustau *et al.*, 2000; Purrington, 2000; Strauss *et al.*, 2002; Andersson & Hughes, 2010). El coste fisiológico está asociado tanto a la acumulación de mutaciones neutras como a la fijación de alelos beneficiosos; ambos mecanismos pueden

producir una ventaja en un ambiente, pero efectos negativos en otros (Travisano & Lenski, 1996; Reboud & Bell, 1997). Estudios previos han demostrado que la adaptación de cianobacterias y microalgas a diferentes agentes selectivos conlleva un coste expresado en una disminución de la tasa de crecimiento y de la capacidad fotosintética (García-Villada *et al.*, 2002; Romero-López *et al.*, 2012; Fernández-Arjona *et al.*, 2013; Rouco *et al.*, 2014; Bañares-España *et al.*, 2016; Melero-Jiménez *et al.*, 2019), al igual que hemos obtenido en esta tesis. Cabe destacar, que el coste fisiológico puede estar determinado por la tasa de deterioro ambiental (la velocidad a la que cambian las condiciones selectivas), pues se ha observado que cuando la tasa varía de manera gradual, el coste fisiológico es más bajo que cuando cambia rápidamente (Collins & de Meaux, 2009). Además, es posible que el coste fisiológico se reduzca tras un periodo de tiempo, mediante la aparición de adaptaciones compensatorias (Levin *et al.*, 2000). Consecuentemente, conocer el tiempo necesario para que las poblaciones vuelvan a recuperar su *fitness* inicial puede ser interesante para poder predecir con mayor exactitud las variaciones de la producción primaria en los diferentes escenarios del Antropoceno.

En el primer capítulo de esta tesis, se estimó el equilibrio mutación-selección de *M. aeruginosa* en ambientes salinos (derivado del experimento de análisis de fluctuación), y se observó que está dentro del rango observado (una célula que porta el alelo resistente por cada 10^4 – 10^7 células que no lo portan) en otros organismos fitoplanctónicos expuestos a agentes selectivos naturales (Costas *et al.*, 2007, 2008; López-Rodas *et al.*, 2008a,b; Martín-Clemente *et al.*, 2019). Curiosamente, estudios previos han demostrado que la frecuencia del alelo mutante puede ser entre 3-4 órdenes de magnitud mayor para contaminantes antropogénicos que para agentes selectivos naturales (López-Rodas *et al.*, 2001, 2008c; García-Villada *et al.*, 2002, 2004; Sánchez-Fortún *et al.*, 2009; Marvá *et al.*, 2010). Esto sugiere que el fitoplancton podría requerir menos tiempo para adaptarse a la introducción de compuestos de origen antropogénico de lo que se esperaría. Como conclusión, los organismos fitoplanctónicos posiblemente podrán adaptarse a las nuevas condiciones selectivas asociadas al Antropoceno, aunque con diferencias inter- e intra- específicas. Sin embargo, el coste fisiológico ligado a la adaptación producirá seguramente una disminución de la *fitness* de las poblaciones y, en consecuencia, una disminución de la producción primaria.

Siendo la selección de nuevas variantes genéticas lo que determinará principalmente la supervivencia del fitoplancton en el Antropoceno, la posibilidad de que las poblaciones no se extingan ante una situación de estrés/selección dependerá también

tanto de la naturaleza del cambio ambiental como de las condiciones demográficas (Carlson *et al.*, 2014; Hufbauer *et al.*, 2015; Bell, 2017). En los experimentos de análisis de fluctuación y de trinquete no se exploran factores como la dispersión entre poblaciones o la intensidad del cambio ambiental. Sin embargo, estos factores determinan en gran medida la posibilidad de que ocurra RE (Carlson *et al.*, 2014). De hecho, cada vez son más los investigadores que se esfuerzan en desarrollar postulados teóricos, así como demostraciones experimentales, que permitan comprender las variables que modulan el RE (Lynch *et al.*, 1991; Gomulkiewicz & Holt, 1995; Orr & Unckless, 2008, 2014; Bell & Gonzalez, 2009, 2011; Johannesson *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2013; Ramsayer *et al.*, 2013; Gonzalez & Bell, 2013; Kirkpatrick & Peischl, 2013; Lindsey *et al.*, 2013; Killeen *et al.*, 2017; Martín-Clemente *et al.*, 2019; Batarseh *et al.*, 2020; Vinton & Vasseur, 2020; Klausmeier *et al.*, 2020). Según Bell (2017) el experimento más simple donde se puede detectar RE consiste en exponer una población a una presión de selección severa y comprobar si es capaz de sobrevivir en dicho ambiente (*pulse experiments*). A partir de los datos de tasa de mutación y equilibrio mutación-selección computados con los resultados de los análisis de fluctuación se pudo estimar el tamaño poblacional idóneo para poder detectar eventos de RE (Bell & Gonzalez, 2009). Por lo tanto, los experimentos basados en cambios “bruscos” pueden ofrecer información acerca de cómo la variación genética inicial (presencia de individuos resistentes) interviene en la posibilidad de que ocurra RE. Por otro lado, Bell (2017) señaló que los experimentos en los que se expone a las poblaciones a situaciones crecientes de estrés (*press experiments*), donde se podría encuadrar el protocolo de trinquete. Los experimentos de “presión” permiten conocer los límites del RE, es decir, el nivel de resistencia que puede alcanzar la población. Bell & Gonzalez (2009) combinaron ambos diseños experimentales (presión-pulso) en dos fases: en la primera, expusieron poblaciones de levaduras a un entorno selectivo no letal y, en la segunda, las poblaciones se expusieron condiciones selectivas previamente letales. Este experimento permitió evaluar cómo la exposición previa al estrés influía sobre la probabilidad de que ocurrieran eventos de RE. Además, Bell & Gonzalez (2011) elaboraron un segundo diseño experimental que permitía evaluar, en un mismo experimento, los efectos de la dispersión (estimador grosero de la variabilidad genética), de la exposición previa al estrés y de la combinación de ambos factores, sobre la probabilidad de que ocurran eventos de RE.

No obstante, son escasos los experimentos que exploran los límites del RE (Klausmeier *et al.*, 2020) y los que consideran el efecto de la dispersión de las poblaciones

(Perron *et al.*, 2008; Bell & Gonzalez, 2011; Martín-Clemente *et al.*, 2019). La falta de demostraciones experimentales, sobre el límite del RE así como el efecto de la dispersión de las poblaciones, motivó que en esta tesis se abordaran dos experimentos. El primero de ellos consistió en aplicar diferentes tasas de incremento del agente selectivo en el protocolo de trinquete (capítulo 3) con el objeto de determinar si la velocidad del deterioro podría condicionar los límites adaptativos y, por lo tanto, el límite del RE. En el segundo, se aplicó el diseño de Bell & Gonzalez (2011) para comprender cómo la dispersión, la exposición al estrés y la interacción de ambos factores, determinan la probabilidad de que ocurra RE en poblaciones de *M. aeruginosa* expuestas a concentraciones letales de salinidad (capítulo 4). Los resultados obtenidos mostraron que la probabilidad y el límite del RE fue mayor en aquellas poblaciones de *M. aeruginosa* que se sometieron a incrementos más lentos de salinidad. Un resultado similar se encontró cuando esta especie se expuso a incrementos paulatinos de sulfuro (Martín-Clemente *et al.*, 2019). Por lo tanto, es posible afirmar que el incremento gradual del agente selectivo favorecerá la probabilidad de que ocurra RE y que la presión selectiva que pueden soportar las poblaciones sea más intensa. Esto concuerda con estudios previos, donde se ha observado que son posibles un mayor número de vías evolutivas cuando el cambio ambiental es gradual (Collins & de Meaux, 2009; Lindsey *et al.*, 2013; Killeen *et al.*, 2017). Por otro lado, cuando las poblaciones de *M. aeruginosa* experimentaron un cambio súbito o una tasa de deterioro mayor, la probabilidad de que ocurriera RE se redujo. En estos casos, el cambio súbito provocó una disminución muy rápida de la población, lo que implicó una menor probabilidad de encontrar variantes genéticas resistentes (Gomulkiewicz & Holt, 1995; Bell & Gonzalez, 2011; Lindsey *et al.*, 2013; Killeen *et al.*, 2017; Martín-Clemente *et al.*, 2019). En cuanto al efecto de la dispersión sobre el RE, el experimento realizado en esta tesis demostró que la probabilidad de que ocurra es mayor cuando existe intercambio de individuos entre poblaciones, como se ha observado en trabajos previos (Perron *et al.*, 2008; Bell & Gonzalez, 2011; Martín-Clemente *et al.*, 2019). Curiosamente, en los experimentos realizados en esta tesis y en los abordados por Martín-Clemente *et al.*, (2019) no se observó interacción significativa entre la dispersión y la tasa de deterioro a diferencia de lo encontrado por otros autores (Carlson *et al.*, 2014; Bell, 2017). Esto lleva a pensar que la combinación de ambos factores variará en función del tipo agente selectivo y el organismo.

Se conoce que las poblaciones experimentales de levaduras y microalgas que han mostrado RE tienen mayor probabilidad de extinguirse cuando se exponen a una nueva

situación de estrés generada por otro agente selectivo (Samani & Bell, 2016; Lachapelle *et al.*, 2017). Por lo tanto, es posible que el “coste” del RE sea que las poblaciones posean una menor capacidad adaptativa posiblemente como consecuencia de una reducción de la variabilidad genética.

Los experimentos de RE son una herramienta clave para explorar las respuestas evolutivas de las poblaciones ante las presiones selectivas impuestas por el Cambio Global. No obstante, es necesario recalcar sus limitaciones para poder hacer una correcta interpretación de lo que ocurrirá en los nuevos escenarios previstos para el Antropoceno. En este sentido, Bell (2017) señaló que una de las principales limitaciones en los experimentos de RE es que solo se pueden explorar los roles jugados por la variabilidad genética y por la aparición de mutaciones espontáneas, pero no el de otros mecanismos que incrementen la variabilidad genética. Por ejemplo, no se puede analizar el papel de las improntas epigenéticas, que podrían transmitirse durante varias generaciones tal y como ocurre en poblaciones de *Chlamydomonas* tolerantes a salinidad (Lachapelle & Bell, 2012). Otra de las limitaciones importantes, es que la extrapolación de los resultados experimentales de RE a organismos multicelulares es casi impracticable, pues proyectar la información obtenida de grandes poblaciones con tiempos de generación cortos a pequeñas poblaciones con tiempos de generación más elevados no es viable. En este sentido, Bell (2017) expone que si queremos comprender cómo las poblaciones de grandes organismos multicelulares responderán al estrés severo es necesario hacer algún tipo de calibración de la información obtenida en los experimentos de RE. Por último, en la naturaleza interactúan muchos factores simultáneamente de forma estocástica (Lande *et al.*, 2003), lo que podría provocar diferencias significativas con los resultados obtenidos en el laboratorio derivados de experimentos en los que se varían muy pocos factores y minimizando el azar (Start *et al.*, 2020).

Aunque la aparición de nuevas variantes genéticas sea el principal mecanismo que permita la supervivencia de las poblaciones en situaciones de presiones selectivas intensas de Cambio Global, diversos estudios recalcan la necesidad de comprender que papel tendrá la plasticidad fenotípica en el Antropoceno (Des Roches *et al.*, 2018; Bonamour *et al.*, 2019). La plasticidad fenotípica puede actuar como tampón y permitir a una población sobrevivir al cambio ambiental hasta que ocurran mutaciones que confieran resistencia (Charmantier *et al.*, 2008; Levis & Pfennig, 2016). De hecho, se ha relacionado la plasticidad fenotípica con la colonización de nuevos entornos y el éxito de especies invasoras (Davidson *et al.*, 2011; Lande, 2015). Por lo tanto, explorar como los

cambios ambientales pueden afectar a las respuestas fenotípicas podría aportar información más precisa del efecto del Cambio Global sobre la biodiversidad (Matesanz *et al.*, 2010; Reusch, 2014; Gibbin *et al.*, 2017; Gibert *et al.*, 2019).

Aunque la mayoría de los estudios que exploran las respuestas de los microorganismos fotosintéticos en situaciones de Cambio Global se han realizado simulando deterioro ambiental (Collins, 2016), hay que tener en cuenta que también se producirán situaciones que favorezcan a estas organismos (Howes *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha observado que el incremento de CO₂, de nutrientes o de la temperatura, estimula la formación de *blooms* de microorganismos fotosintéticos (El-Shehawy *et al.*, 2012; Paerl & Paul, 2012; Davidson *et al.*, 2014). Curiosamente, cuando las condiciones favorecen la *fitness* se pueden dar situaciones que induzcan lo que se conoce como *Prodigal Son Dynamics* (Collins, 2016). Esta dinámica consiste en que el aumento de la tasa de crecimiento, sustentado por un enriquecimiento del medio, puede no ser sostenible a largo plazo debido a la producción de moléculas dañinas derivadas del aumento de la actividad metabólica (Fischer *et al.*, 2006; Glaeser *et al.*, 2011). Como consecuencia, si no se producen cambios genéticos, la tasa de crecimiento puede retornar a su estado inicial o incluso disminuir (Collins, 2016). Esta dinámica se ha observado en poblaciones de microalgas expuestas a incrementos de CO₂ (Collins & Bell, 2006; Low-Décarie *et al.*, 2013; Schaum & Collins, 2014). Por lo tanto, el diseño de experimentos donde los microorganismos fotosintéticos se expongan a un medio favorable (entendido como aquel que estimula la tasa de crecimiento) permitirá comprender mejor su comportamiento en el Antropoceno.

En el capítulo 6 de esta tesis se exploró si el rango de respuestas fenotípicas de la microalga *C. reinhardtii* está determinado por la calidad ambiental. Partimos de la hipótesis de que cuando las poblaciones se exponen a condiciones favorables que pueden surgir en el Antropoceno (accesibilidad a más recursos o a un recurso novedoso y beneficioso) se podría diversificar la gama de fenotipos. Cuando las poblaciones de *C. reinhardtii* se expusieron a una mejora de la calidad ambiental se observó una mayor variabilidad fenotípica. Esto sugiere que, cuando se generen situaciones que incrementen la tasa de crecimiento de estos organismos (como el enriquecimiento de CO₂ o el enriquecimiento de nutrientes), habrá un aumento inicial de la variabilidad fenotípica de las poblaciones (Stevenson *et al.*, 2008; Gudmundsdottir *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2017; Burson *et al.*, 2018; Richardson *et al.*, 2019).

En resumen, en esta tesis se ha explorado la respuesta evolutiva y fisiológica de tres organismos fitoplanctónicos de agua dulce en diversas situaciones de Cambio Global. De estos trabajos, podemos inferir que la selección de nuevas variantes genéticas que aparecen por mutaciones espontáneas podría permitir la supervivencia del fitoplancton en los nuevos escenarios selectivos que impone el Cambio Global. No obstante, dado el coste fisiológico de la adaptación, podría disminuir la producción primaria en los ecosistemas acuáticos, provocando un efecto cascada en los siguientes niveles de la red trófica y alterando tanto la estructura de las comunidades como los ciclos biogeoquímicos.



CONCLUSIONES



“A conclusion is the place where you got tired thinking.”

Martin H. Fischer, 1879 – 1962



7.1. Conclusiones

1. *Microcystis aeruginosa* consigue sobrevivir a condiciones letales de salinidad mediante la selección de nuevas variantes genéticas que aparecen por mutación. Mutaciones posteriores consiguen elevar el límite de resistencia hasta 15,1 g L⁻¹ NaCl.
2. El límite de la resistencia a salinidad de *M. aeruginosa* estuvo modulado por la tasa de deterioro ambiental (incremento de salinidad), siendo mayor cuanto menor fue la tasa de incremento de salinidad.
3. La posibilidad de que ocurran eventos de rescate evolutivo, en metapoblaciones de *M. aeruginosa* expuestas a condiciones letales de salinidad, estuvo determinada por la velocidad del deterioro y el grado de dispersión entre las poblaciones.
4. Los límites de la resistencia a herbicidas (diurón y glifosato) difirió en las tres especies estudiadas (*M. aeruginosa*, *C. reinhardtii* y *D. chlorelloides*), siendo mayor en la cloroficea *C. reinhardtii* que en las otras dos especies. En todos los casos, la máxima resistencia se alcanzó por la selección de nuevas variantes genéticas que aparecen por mutaciones.
5. La adaptación de los organismos fitoplanctónicos a condiciones selectivas (salinidad y herbicidas) conllevó un coste fisiológico, que se puso de manifiesto en menores tasas de crecimiento y en alteraciones de las características fotosintéticas.
6. La diversidad fenotípica de *C. reinhardtii* fue más alta en condiciones favorecedoras que en entornos selectivos. Además, se observó que la tasa de crecimiento en condiciones monocultivo es un predictor de las frecuencias de linaje menos efectivo cuando las poblaciones se encuentran en condiciones favorecedoras.

7.2. Conclusions

1. *Microcystis aeruginosa* can survive on lethal salinity conditions by the selection of new genetic variants that appear by mutation. Subsequent mutations increase the salinity resistance limit to 15.1 g L⁻¹ NaCl.
2. Salinity resistance limit of *M. aeruginosa* was modulated by environmental deterioration rate (increased salinity), the maximum value was reached when the rate of salinity increase was low.
3. The occurrence of evolutionary rescue events in metapopulations of *M. aeruginosa* exposed to lethal salinity conditions was determined by the rate of deterioration and the degree of dispersion among populations.
4. The limits of herbicide resistance (diuron and glyphosate) vary in the three species studied (*M. aeruginosa*, *C. reinhardtii* and *D. chlorelloides*). It was higher in the chlorophycean *C. reinhardtii* than in the other two species. In all cases, the maximum resistance was achieved by the selection of new genetic variants that appear by mutations.
5. Adaptation of phytoplankton organism to selective conditions (salinity and herbicides) produced a physiological cost, it was evident in a lower growth rate and alterations of photosynthetic characteristics.
6. Multitrait variability of *C. reinhardtii* was higher in ameliorated conditions than in selective environments. Additionally, it was observed that monoculture growth rate is a less effective predictor of lineage frequencies when populations are in high-quality environments

REFERENCIAS



- AbdEl-Aty AM, El-Dib MA. 2009. Uptake and the effects of cyanazine on *Scenedesmus obliquus* and *Anabaena flos-aquae*. *Desalination* 249: 1294–1297.
- Abrahão R, Causapé J, García-Garizábal I, Merchán D. 2011. Implementing irrigation: water balances and irrigation quality in the Lerma basin (Spain). *Agricultural Water Management* 102: 97–104.
- Acuña S, Baxa D, Teh S. 2012. Sublethal dietary effects of microcystin producing *Microcystis* on threadfin shad, *Dorosoma petenense*. *Toxicon* 60: 1191–1202.
- Agashe D, Falk JJ, Bolnick DI. 2011. Effects of founding genetic variation on adaptation to a novel resource. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* 65: 2481–2491.
- Albay M, Matthiensen A, Codd GA. 2005. Occurrence of toxic blue-green algae in the Kucukcekmece lagoon (Istanbul, Turkey). *Environmental Toxicology* 20: 277–284.
- Albert CH, Thuiller W, Yoccoz NG, Douzet R, Aubert S, Lavorel S. 2010. A multi-trait approach reveals the structure and the relative importance of intra-vs. interspecific variability in plant traits. *Functional Ecology* 24: 1192–1201.
- Albert JS, Destouni G, Duke-Sylvester SM, Magurran AE, Oberdorff T, Reis RE, Winemiller KO, Ripple WJ. 2020. Scientists' warning to humanity on the freshwater biodiversity crisis. *Ambio*: 1–10.
- Alexander HK, Martin G, Martin OY, Bonhoeffer S. 2014. Evolutionary rescue: Linking theory for conservation and medicine. *Evolutionary Applications* 7: 1161–1179.
- Allen JF, de Paula WBM, Puthiyaveetil S, Nield J. 2011. A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends in Plant Science* 16: 645–655.
- Altamirano M, García-Villada L, Agrelo M, Sánchez-Martín L, Martín-Otero L, Flores-Moya A, Rico M, López-Rodas V, Costas E. 2004. A novel approach to improve specificity of algal biosensors using wild-type and resistant mutants: An application to detect TNT. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 1319–1323.
- Amrhein N, Deus B, Gehrke P, Steinrücken HC. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate: II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. *Plant Physiology* 66: 830–834.
- Andersen RA, Kawachi M. 2005. Microalgae isolation techniques. In: Andersen RA, ed. *Algal Culturing Techniques*. Amsterdam: Elsevier, 83–100.
- Andersson DI, Hughes D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology* 8: 260–271.
- Andersson DI, Levin BR. 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 2: 489–493.
- Andersson DI. 2006. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Current Opinion in Microbiology* 9: 461–465.
- Arts G, Hanson M. 2018. Effects of herbicides on freshwater ecosystems. In: Korres NE, Nilda BR, Duke

- SO, eds. Weed Control: Sustainability, Hazards, and Risks in Cropping Systems Worldwide. CRC Press Taylor & Francis Group, 64–76.
- Arunakumara KKIU, Walpola BC, Yoon M. 2013. Metabolism and degradation of glyphosate in aquatic cyanobacteria : A review. *African Journal of Microbiology Research* 7: 4084–4090.
- Ashander J, Chevin LM, Baskett ML. 2016. Predicting evolutionary rescue via evolving plasticity in stochastic environments. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283.
- Ayala FJ, Kiger Jr JA. 1980. *Modern Genetics*. Menlo Park: Benjamin-Cummings.
- Aylward B, Bandyopadhyay J, Belausteguigotia JC, Borkey P, Cassar AZ, Meadors L, *et al.* 2005. Freshwater ecosystem services. In: Chopra K, *et al.*, eds. *Ecosystems and Human Well-Being: Policy Responses*. Washington, D.C.: Island Press, 213–255.
- Balian EV, Lévêque C, Segers H, Martens K. 2008. The freshwater animal diversity assessment: an overview of the results. In: Balian EV, Lévêque C, Segers H, Martens K, eds. *Freshwater Animal Diversity Assessment. Developments in Hydrobiology*. Dordrecht: Springer, 627–637.
- Bañares-España E, del Mar Fernández-Arjona M, García-Sánchez MJ, Hernández-López M, Reul A, Mariné MH, Flores-Moya A. 2016. Sulphide resistance in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: a comparative study of morphology and photosynthetic performance between the sulphide-resistant mutant and the wild-type strain. *Microbial Ecology* 71: 860–872.
- Bañares-España E, López-Rodas V, Costas E, Salgado C, Flores-Moya A. 2007. Genetic variability associated with photosynthetic pigment concentration, and photochemical and nonphotochemical quenching, in strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 449–455.
- Bañares-España E, López-Rodas V, Salgado C, Costas E, Flores-Moya A. 2006. Inter-strain variability in the photosynthetic use of inorganic carbon, exemplified by the pH compensation point, in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Botany* 85: 159–162.
- Barlow PM, Reichard EG. 2010. Saltwater intrusion in coastal regions of North America. *Hydrogeology Journal* 18: 247–260.
- Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, Marshall C, McGuire JL, Lindsey EL, Maguire KC, *et al.* 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471: 51–57.
- Baron JS, Poff NL, Angermeier PL, Dahm C, Gleick PH, Hairston NG, Jackson RB, Johnston CA, Richter BD, Steinman AD. 2004. Sustaining healthy freshwater ecosystems. *University Council on Water Resources. Water Resources Update* 127: 52–58.
- Baron JS, Poff NL, Angermeier PL, Dahm CN, Gleick PH, Hairston Jr NG, Jackson RB, Johnston CA, Richter BD, Steinman AD. 2002. Meeting ecological and societal needs for freshwater. *Ecological Applications* 12: 1247–1260.
- Bartosiewicz M, Przytulska A, Deshpande BN, Antoniadis D, Cortes A, MacIntyre S, Lehmann MF,

- Laurion I. 2019. Effects of climate change and episodic heat events on cyanobacteria in a eutrophic polymictic lake. *Science of the Total Environment* 693: 133414.
- Baselga-Cervera B, Costas E, Bustillo-Avendaño E, García-Balboa C. 2016a. Adaptation prevents the extinction of *Chlamydomonas reinhardtii* under toxic beryllium. *PeerJ* 4: e1823.
- Baselga-Cervera B, López-Rodas V, Balboa G, Huertas IE, Costas E. 2016b. Mechanisms of rapid adaptation to environmental stressors in phytoplankton. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* 6: 405.
- Baselga-Cervera B, Romero-López J, García-Balboa C, Costas E, López-Rodas V. 2018. Improvement of the uranium sequestration ability of a *Chlamydomonas* sp.(ChlSP strain) isolated from extreme uranium mine tailings through selection for potential bioremediation application. *Frontiers in Microbiology* 9: 523.
- Batarseh TN, Hug SM, Batarseh SN, Gaut BS. 2020. Genetic mutations that drive evolutionary rescue to lethal temperature in *Escherichia coli*. *Genome Biology and Evolution* 12: 2029–2044.
- Bates BC, Kundzewicz ZW, Wu S, Palutikof JP. 2008. *Climate Change and Water. Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*. Geneva: IPCC Secretariat.
- Batista AMM, Figueredo CC, Giani A. 2018. Variability in a permanent cyanobacterial bloom: species-specific responses to environmental drivers. *FEMS Microbiology Ecology* 94: fiy197.
- Beaulieu M, Cabana H, Huot Y. 2020. Adverse effects of atrazine, DCMU and metolachlor on phytoplankton cultures and communities at environmentally relevant concentrations using Fast Repetition Rate Fluorescence. *Science of the Total Environment* 712: 136239.
- Beckmann A, Schaum CE, Hense I. 2019. Phytoplankton adaptation in ecosystem models. *Journal of Theoretical Biology* 468: 60–71.
- Belfiore NM, Anderson SL. 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 489: 97–122.
- Bell G, Collins S. 2008. Adaptation, extinction and global change. *Evolutionary Applications* 1: 3–16.
- Bell G, Fugère V, Barrett R, Beisner B, Cristescu M, Fussmann G, Shapiro J, Gonzalez A. 2019. Trophic structure modulates community rescue following acidification. *Proceedings of the Royal Society B* 286: 20190856.
- Bell G, Gonzalez A. 2009. Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. *Ecology Letters* 12: 942–948.
- Bell G, Gonzalez A. 2011. Adaptation and evolutionary rescue in metapopulations experiencing environmental deterioration. *Science* 332: 1327–1330.
- Bell G. 2013. Evolutionary rescue and the limits of adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368: 20120080.
- Bell G. 2017. Evolutionary rescue. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 48: 605–627.

- Béné C, Arthur R, Norbury H, Allison EH, Beveridge M, Bush S, Campling L, Leschen W, Little D, Squires D. 2016. Contribution of fisheries and aquaculture to food security and poverty reduction: assessing the current evidence. *World Development* 79: 177–196.
- Bennett AF, Lenski RE. 1997. Evolutionary adaptation to temperature. VI. Phenotypic acclimation and its evolution in *Escherichia coli*. *Evolution* 51: 36–44.
- Berger E, Frör O, Schäfer RB. 2018. Salinity impacts on river ecosystem processes: a critical mini-review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374: 20180010.
- Bester K, Hühnerfuss H, Brockmann U, Rick HJ. 1995. Biological effects of triazine herbicide contamination on marine phytoplankton. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29: 277–283.
- Bestion E, Barton S, García FC, Warfield R, Yvon-Durocher G. 2020. Abrupt declines in marine phytoplankton production driven by warming and biodiversity loss in a microcosm experiment. *Ecology Letters* 23: 457–466.
- Biswas H, Shaik AUR, Bandyopadhyay D, Chowdhury N. 2017. CO₂ induced growth response in a diatom dominated phytoplankton community from SW Bay of Bengal coastal water. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 198: 29–42.
- Bolnick DI, Nosil P. 2007. Natural selection in populations subject to a migration load. *Evolution* 61: 2229–2243.
- Bonamour S, Chevin L-M, Charmantier A, Teplitsky C. 2019. Phenotypic plasticity in response to climate change: the importance of cue variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374: 20180178.
- Boon PI, Raulings E, Roach M, Morris K. 2008. Vegetation changes over a four decade period in Dowd Morass, a brackish-water wetland of the Gippsland Lakes, South-Eastern Australia. *Proceedings of the Royal Society of Victoria* 120: 403–418.
- Bormans M, Amzil Z, Mineaud E, Brient L, Savar V, Robert E, Lance E. 2019. Demonstrated transfer of cyanobacteria and cyanotoxins along a freshwater-marine continuum in France. *Harmful Algae* 87: 101639.
- Borowitzka MA. 2018. The ‘stress’ concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. *Journal of Applied Phycology* 30: 2815–2825.
- Boyce DG, Lewis MR, Worm B. 2010. Global phytoplankton decline over the past century. *Nature* 466: 591–596.
- Boyd PW, Rynearson TA, Armstrong EA, Fu F, Hayashi K, Hu Z, Hutchins DA, Kudela RM, Litchman E, Mulholland MR. 2013. Marine phytoplankton temperature versus growth responses from polar to tropical waters—outcome of a scientific community-wide study. *PLoS ONE* 8: e63091.
- Bradshaw AD, Hardwick K. 1989. Evolution and stress—genotypic and phenotypic components. *Biological Journal of the Linnean Society* 37: 137–155.

- Bradshaw AD. 1991. The Croonian Lecture, 1991. Genostasis and the limits to evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 333: 289–305.
- Brauman KA, Daily GC, Duarte TK, Mooney HA. 2007. The nature and value of ecosystem services: an overview highlighting hydrologic services. *Annual Review of Environment and Resources* 32: 67–98.
- Breckels RD, Kilgour BW. 2018. Aquatic herbicide applications for the control of aquatic plants in Canada: effects to nontarget aquatic organisms. *Environmental Reviews* 26: 333–338.
- Brennan G, Collins S. 2015. Growth responses of a green alga to multiple environmental drivers. *Nature Climate Change* 5: 892–897.
- Bridi D, Altenhofen S, Gonzalez JB, Reolon GK, Denise C. 2017. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology* 392: 32–39.
- Brown JH, Lomolino M V. 2000. Concluding remarks: historical perspective and the future of island biogeography theory. *Global Ecology and Biogeography* 9: 87–92.
- Brown JH. 1981. Two decades of homage to Santa Rosalia: toward a general theory of diversity. *American Zoologist* 21: 877–888.
- Bürger R, Lynch M. 1995. Evolution and extinction in a changing environment: a quantitative-genetic analysis. *Evolution* 49: 151–163.
- Burson A, Stomp M, Greenwell E, Grosse J, Huisman J. 2018. Competition for nutrients and light: testing advances in resource competition with a natural phytoplankton community. *Ecology* 99: 1108–1118.
- Cairns J, Overbaugh J, Miller S. 1988. The origin of mutants. *Nature* 335: 142.
- Cameron ES, Arts MT, Campbell LG, Cameron ES, Arts MT, Campbell LG. 2019. Mutation in algae – the increasing role of anthropogenic environmental stress. *Phycologia* 58: 2–8.
- Camuel A, Guieysse B, Alcántara C, Béchet Q. 2017. Fast algal eco-toxicity assessment: Influence of light intensity and exposure time on *Chlorella vulgaris* inhibition by atrazine and DCMU. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 140: 141–147.
- Cañedo-Argüelles M, Hawkins CP, Kefford BJ, Schäfer RB, Dyaack BJ, Brucet S, Buchwalter D, Dunlop J, Frör O, Lazorchak J, et al. 2016. Saving freshwater from salts. *Science* 351: 914–916.
- Cañedo-Argüelles M, Kefford BJ, Piscart C, Prat N, Schäfer RB, Schulz CJ. 2013. Salinisation of rivers: An urgent ecological issue. *Environmental Pollution* 173: 157–167.
- Carlisle SM, Trevors JT. 1988. Glyphosate in the environment. *Water, Air, and Soil Pollution* 39: 409–420.
- Carlson SM, Cunningham CJ, Westley PAH. 2014. Evolutionary rescue in a changing world. *Trends in Ecology and Evolution* 29: 521–530.
- Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. 2001. Human fatalities from cyanobacteria : Chemical and biological evidence for

- cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109: 663–668.
- Carrera-Martinez D, Mateos-Sanz A, López-Rodas V, Costas E. 2011. Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. *Aquatic Toxicology* 101: 342–350.
- Carrillo E, Ferrero L, Alonso-Andicoberry C, Basanta A, Martin A, López-Rodas V, Costas E. 2003. Interstrain variability in toxin production in populations of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from water-supply reservoirs of Andalusia and lagoons of Doñana National Park (southern Spain). *Phycologia* 42: 269–274.
- Carson R. 1962. *Silent Spring*. Boston: Houghton Mifflin Company.
- Caruso G, Azzaro M, Caroppo C, Decembrini F, Monticelli LS, Leonardi M, Maimone G, Zaccone R, La Ferla R. 2016. Microbial community and its potential as descriptor of environmental status. *ICES Journal of Marine Science* 73: 2174–2177.
- Caruso G. 2015. Microbial parameters as a practical tool for the functional characterization and ecological status assessment of transitional areas. *Journal of Ecosystem & Ecography* 5: e124.
- Cavalier-Smith T, Brasier M, Embley TM. 2006. Introduction: how and when did microbes change the world? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361: 845–850.
- Cavanaugh JE. 1997. Unifying the derivations for the Akaike and corrected Akaike information criteria. *Statistics & Probability Letters* 33: 201–208.
- Cavicchioli R, Ripple WJ, Timmis KN, Azam F, Bakken LR, Baylis M, Behrenfeld MJ, Boetius A, Boyd PW, Classen AT. 2019. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology* 17: 569–586.
- Ceballos G, Ehrlich PR, Barnosky AD, García A, Pringle RM, Palmer TM. 2015. Accelerated modern human-induced species losses : Entering the sixth mass extinction. *Science Advances* 1: e1400253.
- Ceballos G, Ehrlich PR, Dirzo R. 2017. Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: E6089–E6096.
- Ceballos G, Ehrlich PR. 2018. The misunderstood sixth mass extinction. *Science* 360: 1080–1081.
- Ceballos G, García A, Ehrlich PR. 2010. The sixth extinction crisis: loss of animal populations and species. *Journal of Cosmology* 8: 31.
- Chapin FS, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, Reynolds HL, Hooper DU, Lavorel S, Sala OE, Hobbie SE, et al. 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405: 234–42.
- Charmantier A, McCleery RH, Cole LR, Perrins C, Kruuk LEB, Sheldon BC. 2008. Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science* 320: 800–803.
- Chłopecka M, Mendel M, Dziekan N, Karlik W. 2017. The effect of glyphosate-based herbicide Roundup and its co-formulant, POEA, on the motoric activity of rat intestine – In vitro study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 49: 156–162.

- Choi CJ, Berges JA, Young EB. 2012. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll *a* fluorescence: variable responses among freshwater microalgae. *Water Research* 46: 2615–2626.
- Clarke A, Crame JA. 1997. Diversity, latitude and time: patterns in the shallow sea. In: Ormond RFG, Gage, J.D. Angel MV, eds. *Marine Biodiversity: Patterns and Processes*. Cambridge: Cambridge University Press, 122–147.
- Clarke A, Gaston KJ. 2006. Climate, energy and diversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273: 2257–2266.
- Collins S, Bell G. 2004. Phenotypic consequences of 1,000 generations of selection at elevated CO₂ in a green alga. *Nature* 431: 566–569.
- Collins S, Bell G. 2006. Evolution of natural algal populations at elevated CO₂. *Ecology Letters* 9: 129–135.
- Collins S, Boyd PW, Doblin MA. 2019. Evolution, microbes, and changing ocean conditions. *Annual Review of Marine Science* 12: 181–208.
- Collins S, de Meaux J, Acquisti C. 2007. Adaptive walks toward a moving optimum. *Genetics* 176: 1089–1099.
- Collins S, de Meaux J. 2009. Adaptation to different rates of environmental change in *Chlamydomonas*. *Evolution* 63: 2953–2965.
- Collins S, Schaum CE. 2019. Diverse strategies link growth rate and competitive ability in phytoplankton responses to changes in CO₂ levels. *bioRxiv*: 651471.
- Collins S. 2010. Competition limits adaptation and productivity in a photosynthetic alga at elevated CO₂. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 247–255.
- Collins S. 2016. Growth rate evolution in improved environments under Prodigal Son dynamics. *Evolutionary Applications* 9: 1179–1188.
- Cook GM. 1999. Neo-Lamarckian experimentalism in America: origins and consequences. *The Quarterly Review of Biology* 74: 417–437.
- Cooper S. 2012. *Bacterial Growth and Division: Biochemistry and Tegulation of Prokaryotic and Eukaryotic Division Cycles*. Cambridge: Academic Press.
- Costanza R, De Groot R, Sutton P, Van der Ploeg S, Anderson SJ, Kubiszewski I, Farber S, Turner RK. 2014. Changes in the global value of ecosystem services. *Global Environmental Change* 26: 152–158.
- Costas E, Carrillo E, Ferrero LM, Agrelo M, Garcia-Villada L, Juste J, López-Rodas V. 2001. Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea herbicide. *Phycologia* 40: 391–398.
- Costas E, Flores-Moya A, López-Rodas V. 2008. Rapid adaptation of phytoplankters to geothermal waters

- is achieved by single mutations: were extreme environments ‘Noah’s Arks’ for photosynthesizers during the Neoproterozoic ‘snowball Earth’? *New Phytologist* 180: 922–932.
- Costas E, Flores-Moya A, Perdigones N, Maneiro E, Blanco JL, García ME, López-Rodas V. 2007. How eukaryotic algae can adapt to the Spain’s Rio Tinto: A neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytologist* 175: 334–339.
- Costas E, Huertas E, Baselga-Cervera B, García-Balboa C, López-Rodas V. 2014. Phytoplankton ability to physiological acclimatization and genetic adaptation to global warming. *International Journal of Biology* 6: 24.
- Costas E, López-Rodas V. 2006. Copper sulphate and DCMU-herbicide treatments increase asymmetry between sister cells in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: Implications for detecting environmental stress. *Water Research* 40: 2447–2451.
- Coustau C, Chevillon C, Ffrench-Constant R. 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: Can we count the cost? *Trends in Ecology and Evolution* 15: 378–383.
- Covich AP, Ewel KC, Hall RO, Giller PE, Goedkoop W, Merritt DM. 2004. Ecosystem services provided by freshwater benthos. In: Wall DH, ed. *Sustaining Biodiversity and Ecosystem Services in Soils and Sediments*. Washington, D.C.: Island Press, 45–72.
- Crist E, Mora C, Engelman R. 2017. The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. *Science* 356: 260–264.
- Crosbie RS, McEwan KL, Jolly ID, Holland KL, Lamontagne S, Moe KG, Simmons CT. 2009. Salinization risk in semi-arid floodplain wetlands subjected to engineered wetting and drying cycles. *Hydrological Processes: An International Journal* 23: 3440–3452.
- Crow JF, Kimura M. 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. New York: Harper & Row.
- Crowe SA, Døssing LN, Beukes NJ, Bau M, Kruger SJ, Frei R, Canfield DE. 2013. Atmospheric oxygenation three billion years ago. *Nature* 501: 535.
- Crutzen PJ. 2002. The “anthropocene”. *Journal de Physique IV (Proceedings)* 12: 1–5.
- Currie DJ, Francis AP. 2004. Regional versus climatic effect on taxon richness in angiosperms: reply to Qian and Ricklefs. *The American Naturalist* 163: 780–785.
- d’Herelle F, Smith GH. 1926. *The Bacteriophage and Its Behavior*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Darwall W, Bremerich V, De Wever A, Dell AI, Freyhof J, Gessner MO, Grossart H, Harrison I, Irvine K, Jähnig SC, *et al.* 2018. The *Alliance for Freshwater Life*: A global call to unite efforts for freshwater biodiversity science and conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 28: 1015–1022.
- Davidson AM, Jennions M, Nicotra AB. 2011. Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis. *Ecology Letters* 14: 419–431.
- Davidson K, Gowen RJ, Harrison PJ, Fleming LE, Hoagland P, Moschonas G. 2014. Anthropogenic

- nutrients and harmful algae in coastal waters. *Journal of Environmental Management* 146: 206–216.
- de Brito Rodrigues L, de Oliveira R, Abe FR, Brito LB, Moura DS, Valadares MC, Grisolia CK, de Oliveira DP, de Oliveira GAR. 2017. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36: 1755–1763.
- De Stefano LG, Gattás F, Vinocur A, Cristos D, Rojas D, Cataldo D, Pizarro H. 2018. Comparative impact of two glyphosate-based formulations in interaction with *Limnoperna fortunei* on freshwater phytoplankton. *Ecological Indicators* 85: 575–584.
- Del Giorgio PA, Gasol JM. 2008. Physiological structure and single-cell activity in marine bacterioplankton. In: Kirchman DL, ed. *Microbial Ecology of the Oceans*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 243–298.
- Demailly F, Elfeky I, Malbezin L, Le Guédard M, Eon M, Bessoule J-J, Feurtet-Mazel A, Delmas F, Mazzella N, Gonzalez P. 2019. Impact of diuron and S-metolachlor on the freshwater diatom *Gomphonema gracile*: Complementarity between fatty acid profiles and different kinds of ecotoxicological impact-endpoints. *Science of the Total Environment* 688: 960–969.
- DeNoyelles F, Kettle WD, Sinn DE. 1982. The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. *Ecology* 63: 1285–1293.
- Des Aulnois GM, Damien R, Robert E, Caruana A, Briand E, Guljamow A, Dittmann E, Amzil Z, Bormans M. 2020. Salt shock responses of *Microcystis* revealed through physiological, transcript , and metabolomic analyses. *Toxins* 12: 1–18.
- Des Aulnois GM, Roux P, Caruana A, Réveillon D, Briand E, Hervé F, Savar V, Bormans M, Amzil Z. 2019. Physiological and metabolic responses of freshwater and brackish-water strains of *Microcystis aeruginosa* acclimated to a salinity gradient: insight into salt tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 85: e01614-19.
- Des Roches S, Post DM, Turley NE, Bailey JK, Hendry AP, Kinnison MT, Schweitzer JA, Palkovacs EP. 2018. The ecological importance of intraspecific variation. *Nature Ecology & Evolution* 2: 57–64.
- Dettman JR, Anderson JB, Kohn LM. 2008. Divergent adaptation promotes reproductive isolation among experimental populations of the filamentous fungus *Neurospora*. *BMC Evolutionary Biology* 8: 35.
- Dijkstra K-DB, Monaghan MT, Pauls SU. 2014. Freshwater biodiversity and aquatic insect diversification. *Annual Review of Entomology* 59: 143-163.
- Dirzo R, Young HS, Galetti M, Ceballos G, Isaac NJB, Collen B. 2014. Defaunation in the Anthropocene. *Science* 345: 401–406.
- Dobzhansky T. 1937. Genetic nature of species differences. *The American Naturalist* 71: 404–420.
- Dodds WK, Perkin JS, Gerken JE. 2013. Human impact on freshwater ecosystem services: a global perspective. *Environmental Science & Technology* 47: 9061–9068.

- Dorigo U, Le Boulanger C. 2001. A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton. *Journal of Applied Phycology* 13: 509–515.
- Dubinsky Z, Falkowski PG, Post AF, Van Hes UM. 1987. A system for measuring phytoplankton photosynthesis in a defined light field with an oxygen electrode. *Journal of Plankton Research* 9: 607–612.
- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata Z-I, Knowler DJ, Lévêque C, Naiman RJ, Prieur-Richard A-H, Soto D, Stiassny MLJ. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81: 163–182.
- Dudgeon D. 2019. Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. *Current Biology* 29: R960–R967.
- Duke SO, Powles SB. 2008. Glyphosate : a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 325: 319–325.
- Dumont HJ. 1998. The Caspian Lake: history, biota, structure, and function. *Limnology and Oceanography* 43: 44–52.
- Dunn O. 1961. J.(1961).“Multiple Comparisons Among Means.” *Journal of the American Statistical Association* 56: 52–64.
- Dupraz V, Coquillé N, Ménard D, Sussarellu R, Haugarreau L, Stachowski-Haberkorn S. 2016. Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures. *Chemosphere* 151: 241–252.
- Dykhuizen DE, Hartl DL. 1983. Selection in chemostats. *Microbiological Reviews* 47: 150.
- Eamus D, Hatton T, Cook P, Colvin C. 2006. *Ecohydrology: Vegetation Function, Water and Resource Management*. Collingwood: Csiro Publishing.
- Ebert D, Haag C, Kirkpatrick M, Riek M, Hottinger JW, Pajunen VI. 2002. A selective advantage to immigrant genes in a *Daphnia* metapopulation. *Science* 295: 485–488.
- Edge CB, Gahl MK, Thompson DG, Houlahan JE. 2013. Field exposure of two species of juvenile amphibians to a glyphosate-based herbicide and *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Science of the Total Environment* 444: 145–152.
- Edmonds JW, Weston NB, Joye SB, Mou X, Moran MA. 2009. Microbial community response to seawater amendment in low-salinity tidal sediments. *Microbial Ecology* 58: 558–568.
- Edwards G, Walker D. 1983. *C3, C4: Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation, of Photosynthesis*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Ehlers E, Krafft T. 2006. Managing global change: earth system science in the Anthropocene. In: Ehlers E, Krafft T, eds. *Earth System Science in the Anthropocene*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 5–12.

- El-Dib MA, Abdel-Aty AM. 2012. Physiological responses of *Ankistrodesmus acicularis* to diuron. *Desalination and Water Treatment* 44: 334–339.
- El-Shehawy R, Gorokhova E, Fernandez-Pinas F, del Campo FF. 2012. Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: What can we learn from experiments? *Water Research* 46: 1420–1429.
- Enright C, Culbertson SD. 2009. Salinity trends, variability, and control in the northern reach of the San Francisco Estuary. *San Francisco Estuary and Watershed Science* 7.
- Erickson JM, Pfister K, Rahire M, Togasaki RK, Mets L, Rochaix J-D. 1989. Molecular and biophysical analysis of herbicide-resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: structure-function relationship of the photosystem II D1 polypeptide. *The Plant Cell* 1: 361–371.
- Erickson JM, Rahire M, Rochaix J-D, Mets L. 1985. Herbicide resistance and cross-resistance: changes at three distinct sites in the herbicide-binding protein. *Science* 228: 204–207.
- Falconer DS, Mackay TFC. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics (4th Edition)*. Harlow: Longman.
- Falconer IR. 1999. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology* 14: 5–12.
- Falkowski P. 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research* 39: 235–258.
- Falkowski PG, Raven JA. 1997. *Aquatic Photosynthesis*. Oxford: Blackwell Science.
- Ferguson G, Gleeson T. 2012. Vulnerability of coastal aquifers to groundwater use and climate change. *Nature Climate Change* 2: 342.
- Fernández-Arjona MM, Bañares-España E, García-Sánchez MJ, Hernández-López M, López-Rodas V, Costas E, Flores-Moya A. 2013. Disentangling mechanisms involved in the adaptation of photosynthetic microorganisms to the extreme sulphureous water from Los Baños de Vilo (S Spain). *Microbial Ecology* 66: 742–751.
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281: 237–240.
- Field JA, Reed RL, Sawyer TE, Griffith SM, Wigington PJ. 2003. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *Journal of Environmental Quality* 32: 171–179.
- Field R, O'Brien EM, Whittaker RJ. 2005. Global models for predicting woody plant richness from climate: development and evaluation. *Ecology* 86: 2263–2277.
- Findlay SEG, Kelly VR. 2011. Emerging indirect and long-term road salt effects on ecosystems. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223: 58–68.
- Finney SC, Edwards LE. 2016. The “Anthropocene” epoch: Scientific decision or political statement. *Gsa Today* 26: 4–10.

- Fischer BB, Wiesendanger M, Eggen RIL. 2006. Growth condition-dependent sensitivity, photodamage and stress response of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to high light conditions. *Plant and Cell Physiology* 47: 1135–1145.
- Flores-Moya A, Costas E, Bañares-España E, García-Villada L, Altamirano M, López-Rodas V. 2005. Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through preselective mutations. *New Phytologist* 166: 655–661.
- Flores-Moya A, Costas E, López-Rodas V. 2008. Roles of adaptation, chance and history in the evolution of the dinoflagellate *Prorocentrum triestinum*. *Naturwissenschaften* 95: 697–703.
- Flores-Moya A, Rouco M, García-Sánchez MJ, García-Balboa C, González R, Costas E, López-Rodas V. 2012. Effects of adaptation, chance, and history on the evolution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* under selection of increased temperature and acidification. *Ecology and Evolution* 2: 1251–1259.
- Franz JE, Mao MK, Sikorski JA. 1997. *Glyphosate: a unique global herbicide*. ACS Monograph No. 189. Washington: American Chemical Society.
- Frickel J, Sieber M, Becks L. 2016. Eco-evolutionary dynamics in a coevolving host–virus system. *Ecology Letters* 19: 450–459.
- Fugère V, Hébert M-P, da Costa NB, Xu CCY, Barrett RDH, Beisner BE, Bell G, Fussmann GF, Shapiro BJ, Yargeau V. 2020. Community rescue in experimental phytoplankton communities facing severe herbicide pollution. *Nature Ecology & Evolution* 4: 578–588.
- Fussmann GF, Gonzalez A. 2013. Evolutionary rescue can maintain an oscillating community undergoing environmental change. *Interface Focus* 3: 20130036.
- Gabriel W, Bürger R. 1992. Survival of small populations under demographic stochasticity. *Theoretical Population Biology* 41: 44–71.
- Galloway RE, Mets LJ. 1984. Atrazine, bromacil, and diuron resistance in *Chlamydomonas*: a single non-mendelian genetic locus controls the structure of the thylakoid binding site. *Plant Physiology* 74: 469–474.
- García-Balboa C, Costas E, Rodas VL. 2012. Microalgae biosensors for the detection of environmental contaminants: a review. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 6: 51.
- García-Carreras B, Sal S, Padfield D, Kontopoulos DG, Bestion E, Schaum CE, Yvon-Durocher G, Pawar S. 2018. Role of carbon allocation efficiency in the temperature dependence of autotroph growth rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: E7361–E7368.
- García-Villada L, López-Rodas V, Bañares-España E, Flores-Moya A, Agrelo M, Martín-Otero L, Costas E. 2002. Evolution of microalgae in highly stressing environments: An experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene by rare preselective mutations. *Journal of Phycology* 38: 1074–1081.

- García-Villada L, López-Rodas V, Bañares-España E, Flores-Moya A, Agrelo M, Martín-Otero L, Costas E. 2002. Evolution of microalgae in highly stressing environments: An experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene by rare preselective mutations. *Journal of Phycology* 38: 1074–1081.
- García-Villada L, Rico M, Altamirano M, Sánchez-Martín L, López-Rodas V, Costas E. 2004. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: Characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algacide. *Water Research* 38: 2207–2213.
- Garland T, Rose MR. 2009. *Experimental Evolution: Concepts, Methods, and Applications of Selection Experiments*. Berkeley: University of California Press.
- Gaston KJ, Blackburn TM, Greenwood JJD, Gregory RD, Quinn RM, Lawton JH. 2000. Abundance–occupancy relationships. *Journal of Applied Ecology* 37: 39–59.
- Gaston KJ. 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature* 405: 220–227.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87–92.
- Ger KA, Arneson P, Goldman CR, Teh SJ. 2010. Species specific differences in the ingestion of *Microcystis* cells by the calanoid copepods *Eurytemora affinis* and *Pseudodiaptomus forbesi*. *Journal of Plankton Research* 32: 1479–1484.
- Ger KA, Faassen EJ, Pennino MG, Lüring M. 2016. Effect of the toxin (microcystin) content of *Microcystis* on copepod grazing. *Harmful Algae* 52: 34–45.
- Ghoul M, Mitri S. 2016. The ecology and evolution of microbial competition. *Trends in Microbiology* 24: 833–845.
- Gibbin EM, N’Siala GM, Chakravarti LJ, Jarrold MD, Calosi P. 2017. The evolution of phenotypic plasticity under global change. *Scientific Reports* 7: 1–8.
- Gibert J, Deharveng L. 2002. Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. *BioScience* 52: 473–481.
- Gibert P, Debat V, Ghalambor CK. 2019. Phenotypic plasticity, global change, and the speed of adaptive evolution. *Current Opinion in Insect Science* 35: 34–40.
- Gibson JJ, Fennell J, Birks SJ, Yi Y, Moncur MC, Hansen B, Jasechko S. 2013. Evidence of discharging saline formation water to the Athabasca River in the oil sands mining region, northern Alberta. *Canadian Journal of Earth Sciences* 50: 1244–1257.
- Gilbert JA, Neufeld JD. 2014. Life in a world without microbes. *PLoS Biology* 12: e1002020.
- Glaeser J, Nuss AM, Berghoff BA, Klug G. 2011. Singlet oxygen stress in microorganisms. In: Poole RK, ed. *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier, 141–173.

- Gomes T, Xie L, Brede D, Lind O-C, Solhaug KA, Salbu B, Tollefsen KE. 2017. Sensitivity of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* to gamma radiation: photosynthetic performance and ROS formation. *Aquatic Toxicology* 183: 1–10.
- Gomulkiewicz R, Holt RD. 1995. When does evolution by natural selection prevent extinction? *Evolution* 49: 201–207.
- Gonzalez A, Bell G. 2013. Evolutionary rescue and adaptation to abrupt environmental change depends upon the history of stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 368: 20120079.
- Gonzalez A, Ronce O, Ferriere R, Hochberg ME. 2013. Evolutionary rescue: an emerging focus at the intersection between ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368: 20120404.
- González R, García-Balboa C, Rouco M, López-Rodas V, Costas E. 2012. Adaptation of microalgae to lindane: a new approach for bioremediation. *Aquatic Toxicology* 109: 25–32.
- Gorman DS, Levine RP. 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 54: 1665–1669.
- Govindjee JF, Kern J, Messinger J, Whitmarsh J. 2010. Photosystem II. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). Chichester: John Wiley & Sons, 1–15.
- Gratia A. 1921. Preliminary report on a *Staphylococcus* bacteriophage. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 18: 217–219.
- Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International* 26: 483–495.
- Grosberg RK, Strathmann RR. 2007. The evolution of multicellularity: a minor major transition? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 621–654.
- Gudmundsdottir R, Olafsson JS, Palsson S, Gislason GM, Moss B. 2011. How will increased temperature and nutrient enrichment affect primary producers in sub-Arctic streams? *Freshwater Biology* 56: 2045–2058.
- Hadjoudja S, Vignoles C, Deluchat V, Lenain J-F, Le Jeune A-H, Baudu M. 2009. Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. *Aquatic Toxicology* 94: 255–264.
- Hagemann M. 2011. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiology Reviews* 35: 87–123.
- Hall BG. 1988. Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. I. Mutations involving an insertion sequence. *Genetics* 120: 887–897.
- Harke MJ, Steffen MM, Gobler CJ, Otten TG, Wilhelm SW, Wood SA, Paerl HW. 2016. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp.

- Harmful Algae* 54: 4–20.
- Harris G, Nilsson C, Clementson L, Thomas D. 1987. The water masses of the east coast of Tasmania: seasonal and interannual variability and the influence on phytoplankton biomass and productivity. *Marine and Freshwater Research* 38: 569–590.
- Harrison I, Abell R, Darwall W, Thieme ML, Tickner D, Timboe I. 2018. The freshwater biodiversity crisis. *Science* 362: 1369.
- Hart BT, Bailey P, Edwards R, Hortle K, James K, McMahon A, Meredith C, Swadling K. 1991. A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. *Hydrobiologia* 210: 105–144.
- Haywood AM, Ridgwell A, Lunt DJ, Hill DJ, Pound MJ, Dowsett HJ, Dolan AM, Francis JE, Williams M. 2011. Are there pre-Quaternary geological analogues for a future greenhouse warming? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 369: 933–956.
- Heal G. 2000. Valuing ecosystem services. *Ecosystems* 3: 24–30.
- Herbert ER, Boon P, Burgin AJ, Neubauer SC, Franklin RB, Ardón M, Hopfensperger KN, Lamers LPM, Gell P. 2015. A global perspective on wetland salinization: ecological consequences of a growing threat to freshwater wetlands. *Ecosphere* 6: 1–43.
- Hernández-Allica J, Carrera-Martínez D, López-Rodas V, Flores-Moya A, Costas E. 2011. Highly specific biosensors to herbicides, based on sensitive-and resistant-mutants of microalgae. In: Kortekamp A, ed. *Herbicides and Environment*. Vienna: InTech, 433–442.
- Hess FD. 2000. Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science* 48: 160–170.
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology* 8: 15–25.
- Hintz WD, Jones DK, Relyea RA. 2018. Evolved tolerance to freshwater salinization in zooplankton: life-history trade-offs, cross-tolerance and reducing cascading effects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374: 20180012.
- Hobbie JE. 1988. A comparison of the ecology of planktonic bacteria in fresh and salt water. *Limnology and Oceanography* 33: 750–764.
- Holland HD. 2006. The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361: 903–915.
- Holt RD, Gomulkiewicz R. 1997. How does immigration influence local adaptation? A reexamination of a familiar paradigm. *The American Naturalist* 149: 563–572.
- Holt RD. 2011. Evolution in source-sink environments: implications for niche conservatism. In: Liu J, Hill V, Morzillo AT, Wiens JA, eds. *Sources, Sinks and Sustainability*. Cambridge: Cambridge University Press, 23–57.
- Hou R, Wu Y, Xu J, Gao K. 2020. Solar UV radiation exacerbates photoinhibition of a diatom by

- antifouling agents Irgarol 1051 and diuron. *Journal of Applied Phycology*: 1–9.
- Howes EL, Joos F, Eakin M, Gattuso J-P. 2015. An updated synthesis of the observed and projected impacts of climate change on the chemical, physical and biological processes in the oceans. *Frontiers in Marine Science* 2: 36.
- Huertas E, Rouco M, López-Rodas V, Costas E. 2011. Warming will affect phytoplankton differently: Evidence through a mechanistic approach. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 3534–3543.
- Huertas IE, Rouco M, López-Rodas V, Costas E. 2010. Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: Herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytologist* 188: 478–487.
- Hufbauer RA, Szűcs M, Kasyon E, Youngberg C, Koontz MJ, Richards C, Tuff T, Melbourne BA. 2015. Three types of rescue can avert extinction in a changing environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 10557–10562.
- Hughes AL. 1999. *Adaptive Evolution of Genes and Genomes*. Oxford: Oxford University Press.
- Huisman J, Codd GA, Paerl HW, Ibelings BW, Verspagen JMH, Visser PM. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16: 471–483.
- Hutchinson GE. 1959. Homage to Santa Rosalia or why are there so many kinds of animals? *The American Naturalist* 93: 145–159.
- Huxley J. 1942. *Evolution the Modern Synthesis*. Oxford: George Allen and Unwin.
- Ibelings BW, Havens KE. 2008. Cyanobacterial toxins: a qualitative meta-analysis of concentrations, dosage and effects in freshwater, estuarine and marine biota. In: Hudnell HK, ed. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York: Springer, 675–732.
- Imrich A, Ning Y, Kobzik L. 1999. Intracellular oxidant production and cytokine responses in lung macrophages: evaluation of fluorescent probes. *Journal of Leukocyte Biology* 65: 499–507.
- Inaba M, Sakamoto A, Murata N. 2001. Functional Expression in *Escherichia coli* of Low-Affinity and High-Affinity Na⁺ (Li⁺)/H⁺ Antiporters of *Synechocystis*. *Journal of Bacteriology* 183: 1376–1384.
- Jackson CR, Vallaire SC. 2009. Effects of salinity and nutrients on microbial assemblages in Louisiana wetland sediments. *Wetlands* 29: 277–287.
- Johannesson K, Smolarz K, Grahn M, André C. 2011. The future of Baltic Sea populations: local extinction or evolutionary rescue? *Ambio* 40: 179–190.
- Johnsen G, Sakshaug E. 2007. Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulse-amplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry 1. *Journal of Phycology* 43: 1236–1251.

- Johnson CN, Balmford A, Brook BW, Buettel JC, Galetti M, Guangchun L, Wilmshurst JM. 2017. Biodiversity losses and conservation responses in the Anthropocene. *Science* 356: 270–275.
- Jolly ID, McEwan KL, Holland KL. 2008. A review of groundwater–surface water interactions in arid/semi-arid wetlands and the consequences of salinity for wetland ecology. *Ecohydrology: Ecosystems, Land and Water Process Interactions, Ecohydrogeomorphology* 1: 43–58.
- Joshua S, Mullineaux CW. 2004. Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria. *Plant Physiology* 135: 2112–2119.
- Kanesaki Y, Suzuki I, Allakhverdiev SI, Mikami K, Murata N. 2002. Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 339–348.
- Kanoshina I, Lips U, Leppänen JM. 2003. The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Harmful Algae* 2: 29–41.
- Kaonga CC, Takeda K, Sakugawa H. 2015. Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion contamination for a river passing through an agricultural and urban area in Higashi Hiroshima City, Japan. *Science of the Total Environment* 518: 450–458.
- Kasting JF, Siefert JL. 2002. Life and the evolution of Earth’s atmosphere. *Science* 296: 1066–1068.
- Kaushal SS, Groffman PM, Likens GE, Belt KT, Stack WP, Kelly VR, Band LE, Fisher GT. 2005. Increased salinization of fresh water in the northeastern United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 13517–13520.
- Kaushal SS. 2016. Increased salinization decreases safe drinking water. *Environmental Science & Technology* 50: 2765–2766.
- Kawecki TJ, Lenski RE, Ebert D, Hollis B, Olivieri I, Whitlock MC. 2012. Experimental evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 547–560.
- Kefford BJ, Buchwalter D, Canedo-Argüelles M, Davis J, Duncan RP, Hoffmann A, Thompson R. 2016. Salinized rivers: degraded systems or new habitats for salt-tolerant faunas? *Biology Letters* 12: 20151072.
- Keightley PD, Lynch M. 2003. Toward a realistic model of mutations affecting fitness. *Evolution* 57: 683–685.
- Kendall DG. 1949. Stochastic processes and population growth. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 11: 230–282.
- Kerr JT, Packer L. 1997. Habitat heterogeneity as a determinant of mammal species richness in high-energy regions. *Nature* 385: 252–254.
- Kessler S, Barbour SL, Van Rees KCJ, Dobchuk BS. 2010. Salinization of soil over saline-sodic overburden from the oil sands in Alberta. *Canadian Journal of Soil Science* 90: 637–647.
- Kidwell SM. 2015. Biology in the Anthropocene: challenges and insights from young fossil records.

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 4922–4929.
- Killeen J, Gougat-barbera C, Krenk S, Kaltz O. 2017. Evolutionary rescue and local adaptation under different rates of temperature increase: a combined analysis of changes in phenotype expression and genotype frequency in *Paramecium* microcosms. *Molecular Ecology* 26: 1734–1746.
- Kimura M, Maruyama T. 1966. The mutational load with epistatic gene interactions in fitness. *Genetics* 54: 1337.
- Kirchman DL. 2016. Growth rates of microbes in the oceans. *Annual Review of Marine Science* 8: 285–309.
- Kirk JTO. 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kirkpatrick M, Peischl S. 2013. Evolutionary rescue by beneficial mutations in environments that change in space and time. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 368: 20120082.
- Klausmeier CA, Osmond MM, Kremer CT, Litchman E. 2020. Ecological limits to evolutionary rescue. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375: 20190453.
- Klughammer C, Schreiber U. 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes* 1: 201–247.
- Knauer K, Leimgruber A, Hommen U, Knauert S. 2010. Co-tolerance of phytoplankton communities to photosynthesis II inhibitors. *Aquatic Toxicology* 96: 256–263.
- Knauert S, Dawo U, Hollender J, Hommen U, Knauer K. 2009. Effects of photosystem II inhibitors and their mixture on freshwater phytoplankton succession in outdoor mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 836–845.
- Knauert S, Knauer K. 2008. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. *Journal of Phycology* 44: 311–319.
- Knoll AH. 1992. The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science* 256: 622–627.
- Köck-Schulmeyer M, Ginebreda A, González S, Cortina JL, de Alda ML, Barceló D. 2012. Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain). *Chemosphere* 86: 8–16.
- Koenig F. 2001. Eukaryotic algae, cyanobacteria and pesticides. In: Rai LC, Gaur JP, eds. *Algal Adaptation to Environmental Stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Berlin: Springer-Verlag, 389–406.
- Kolpin DW, Thurman EM, Lee EA, Meyer MT, Furlong ET, Glassmeyer ST. 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment* 354: 191–197.
- Koonin E V, Wolf YI. 2012. Evolution of microbes and viruses: a paradigm shift in evolutionary biology?

- Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2: 119.
- Krauss KW, Whitbeck JL, Howard RJ. 2012. On the relative roles of hydrology, salinity, temperature, and root productivity in controlling soil respiration from coastal swamps (freshwater). *Plant and Soil* 358: 265–274.
- Kruskal WH, Wallis WA. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47: 583–621.
- Kumar KS, Dahms H-U, Lee J-S, Kim HC, Lee WC, Shin K-H. 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll *a* fluorescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104: 51–71.
- Kundzewicz ZW. 2008. Climate change impacts on the hydrological cycle. *Ecohydrology and Hydrobiology* 8: 195–203.
- Kwiatkowski RE, Roff JC. 1976. Effects of acidity on the phytoplankton and primary productivity of selected northern Ontario lakes. *Canadian Journal of Botany* 54: 2546–2561.
- Lachapelle J, Bell G. 2012. Evolutionary rescue of sexual and asexual populations in a deteriorating environment. *Evolution* 66: 3508–3518.
- Lachapelle J, Colegrave N, Bell G. 2017. The effect of selection history on extinction risk during severe environmental change. *Journal of Evolutionary Biology* 30: 1872–1883.
- Lam CH, Kurobe T, Lehman PW, Berg M, Hammock BG, Stillway ME, Pandey PK, Teh SJ. 2020. Toxicity of herbicides to cyanobacteria and phytoplankton species of the San Francisco Estuary and Sacramento-San Joaquin River Delta, California, USA. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 55: 107–118.
- Lande R, Engen S, Saether B-E. 2003. *Stochastic Population Dynamics in Ecology and Conservation*. Oxford: Oxford University Press.
- Lande R, Shannon S. 1996. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution* 50: 434–437.
- Lande R. 2015. Evolution of phenotypic plasticity in colonizing species. *Molecular Ecology* 24: 2038–2045.
- Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. 1992. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology* 5: 227–231.
- Lederberg J, Lederberg EM. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology* 63: 399.
- Lehman PW, Boyer G, Hall C, Waller S, Gehrts K. 2005. Distribution and toxicity of a new colonial *Microcystis aeruginosa* bloom in the San Francisco Bay Estuary, California. *Hydrobiologia* 541: 87–99.

- Lennon JT, Khatana SAM, Marston MF, Martiny JBH. 2007. Is there a cost of virus resistance in marine cyanobacteria? *The ISME Journal* 1: 300–312.
- Lenormand T. 2002. Gene flow and the limits to natural. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 183–189.
- Lenski RE. 1991. Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. *Biotechnology* 15: 173–192.
- Lenski RE. 1998. Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *International Microbiology* 1: 265–270.
- Leu J-Y, Murray AW. 2006. Experimental evolution of mating discrimination in budding yeast. *Current Biology* 16: 280–286.
- Levene H. 1961. Robust tests for equality of variances. In: Olkins I, ed. *Contributions to Probability and Statistics*. Stanford: Stanford University Press, 279–292.
- Levin BR, Lipsitch M, Perrot V, Schrag S, Antia R, Simonsen L, Moore Walker N, Stewart FM. 1997. The population genetics of antibiotic resistance. *Clinical Infectious Diseases* 24: S9–S16.
- Levin BR, Perrot V, Walker N. 2000. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* 154: 985–997.
- Levis NA, Pfennig DW. 2016. Evaluating ‘plasticity-first’ evolution in nature: key criteria and empirical approaches. *Trends in Ecology & Evolution* 31: 563–574.
- Lindberg RT, Collins S. 2020. Quality-quantity tradeoffs drive functional trait evolution in a model microalgal “climate change winner”. *Ecology Letters*: 819326.
- Lindsey HA, Gallie J, Taylor S, Kerr B. 2013. Evolutionary rescue from extinction is contingent on a lower rate of environmental change. *Nature* 494: 463–467.
- Litchman E, Edwards KF, Klausmeier CA. 2015. Microbial resource utilization traits and trade-offs: implications for community structure, functioning, and biogeochemical impacts at present and in the future. *Frontiers in Microbiology* 6: 254.
- Liu L, Huang Q, Qin B. 2018. Characteristics and roles of *Microcystis* extracellular polymeric substances (EPS) in cyanobacterial blooms: a short review. *Journal of Freshwater Ecology* 33: 183–193.
- Loftin KA, Graham JL, Hilborn ED, Lehmann SC, Meyer MT, Dietze JE, Griffith CB. 2016. Cyanotoxins in inland lakes of the United States: Occurrence and potential recreational health risks in the EPA National Lakes Assessment 2007. *Harmful Algae* 56: 77–90.
- Lohbeck KT, Riebesell U, Reusch TBH. 2012. Adaptive evolution of a key phytoplankton species to ocean acidification. *Nature Geoscience* 5: 346–351.
- Loos R, Gawlik BM, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G. 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution* 157: 561–568.
- Lopez S, Rousset F, Shaw FH, Shaw RG, Ronce O. 2008. Migration load in plants: role of pollen and seed dispersal in heterogeneous landscapes. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 294–309.
- López-Rodas V, Agrelo M, Carrillo E, Ferrero LM, Larrauri A, Martín-Otero L, Costas E. 2001. Resistance

- of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *European Journal of Phycology* 36: 179–190.
- López-Rodas V, Costas E, Bañares E, García-Villada L, Altamirano M, Rico M, Salgado C, Flores-Moya A. 2006a. Analysis of polygenic traits of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) strains by Restricted Maximum Likelihood (REML) procedures: 2. Microcystin net production, photosynthesis and respiration. *Phycologia* 45: 243–248.
- López-Rodas V, Costas E, Maneiro E, Marvá F, Rouco M, Delgado A, Flores-Moya A. 2009. Living in Vulcan's forge: Algal adaptation to stressful geothermal ponds on Vulcano Island (southern Italy) as a result of pre-selective mutations. *Phycological Research* 57: 111–117.
- López-Rodas V, Flores-Moya A, Maneiro E, Perdígones N, Marva F, García ME, Costas E. 2007. Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of pre-selective mutations. *Evolutionary Ecology* 21: 535–547.
- López-Rodas V, Marvá F, Costas E, Flores-Moya A. 2008a. Microalgal adaptation to a stressful environment (acidic, metal-rich mine waters) could be due to selection of pre-selective mutants originating in non-extreme environments. *Environmental and Experimental Botany* 64: 43–48.
- López-Rodas V, Marvá F, Rouco M, Costas E, Flores-Moya A. 2008b. Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to stressful acidic, mine metal-rich waters as result of pre-selective mutations. *Chemosphere* 72: 703–707.
- López-Rodas V, Perdígones N, Marvá F, Rouco M, García-Cabrera JA. 2008c. Adaptation of phytoplankton to novel residual materials of water pollution: An experimental model analysing the evolution of an experimental microalgal population under formaldehyde contamination. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80: 158–162.
- Lorente C, Causape J, Glud RN, Hancke K, Merchan D, Muniz S, Val J, Navarro E. 2015. Impacts of agricultural irrigation on nearby freshwater ecosystems: the seasonal influence of triazine herbicides in benthic algal communities. *Science of the Total Environment* 503: 151–158.
- Lorenz JJ. 2014. A review of the effects of altered hydrology and salinity on vertebrate fauna and their habitats in northeastern Florida Bay. *Wetlands* 34: 189–200.
- Low-Décarie E, Fussmann GF, Bell G. 2011. The effect of elevated CO₂ on growth and competition in experimental phytoplankton communities. *Global Change Biology* 17: 2525–2535.
- Low-Décarie E, Jewell MD, Fussmann GF, Bell G. 2013. Long-term culture at elevated atmospheric CO₂ fails to evoke specific adaptation in seven freshwater phytoplankton species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20122598.
- Low-Décarie E, Kolber M, Homme P, Lofano A, Dumbrell A, Gonzalez A, Bell G. 2015. Community rescue in experimental metacommunities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 14307–14312.
- Lu C, Vonshak A. 2002. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina*

- platensis* cells. *Physiologia Plantarum* 114: 405–413.
- Luria SE, Delbrück M. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491.
- Lüring M. 1999. Grazer-induced coenobial formation in clonal cultures of *Scenedesmus obliquus* (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 35: 19–23.
- Lynch AJ, Cooke SJ, Deines AM, Bower SD, Bunnell DB, Cowx IG, Nguyen VM, Nohner J, Phouthavong K, Riley B. 2016. The social, economic, and environmental importance of inland fish and fisheries. *Environmental Reviews* 24: 115–121.
- Lynch M, Gabriel W, Wood AM. 1991. Adaptive and demographic responses of plankton populations to environmental change. *Limnology and Oceanography* 36: 1301–1312.
- Lynch M, Lande R. 1993. Evolution and extinction in response to environmental change. In: Kareiva P, Kingsolver J, Huey R, eds. *Biotic Interactions and Global Change*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 234–250.
- Ma J, Wang P, Wang X, Xu Y, Paerl HW. 2019. Cyanobacteria in eutrophic waters benefit from rising atmospheric CO₂ concentrations. *Science of the Total Environment* 691: 1144–1154.
- Macumber PG. 1990. *Interaction Between Groundwater and Surface Systems in Northern Victoria*. Victoria: Dept. of Conservation and Environment.
- Maisnier-Patin S, Roth JR. 2015. The origin of mutants under selection: how natural selection mimics mutagenesis (adaptive mutation). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a018176.
- Malaj E, Peter C, Grote M, Kühne R, Mondy CP, Usseglio-Polatera P, Brack W, Schäfer RB. 2014. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 9549–9554.
- Manda AK, Giuliano AS, Allen TR. 2014. Influence of artificial channels on the source and extent of saline water intrusion in the wind tide dominated wetlands of the southern Albemarle estuarine system (USA). *Environmental Earth Sciences* 71: 4409–4419.
- Mansano AS, Moreira RA, Dornfeld HC, Freitas EC, Vieira EM, Sarmento H, Rocha O, Selegim MHR. 2017. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142: 312–321.
- Marin K, Kanesaki Y, Los DA, Murata N, Suzuki I, Hagemann M. 2004. Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiology* 136: 3290–3300.
- Marin K, Suzuki I, Yamaguchi K, Ribbeck K, Yamamoto H, Kanesaki Y, Hagemann M, Murata N. 2003. Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 9061–9066.
- Martin G, Aguilée R, Ramsayer J, Kaltz O, Ronce O 2013. The probability of evolutionary rescue : towards a quantitative comparison between theory and evolution experiments. *Philosophical Transactions*

- of the Royal Society B: Biological Sciences* 368: 20120088.
- Martín-Clemente E, Melero-Jiménez IJ, Bañares-España E, Flores-Moya A, García-Sánchez MJ. 2019. Adaptation dynamics and evolutionary rescue under sulfide selection in cyanobacteria: a comparative study between *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria* sp.(cyanobacteria). *Journal of Phycology* 55: 1348–1360.
- Martínez de la Escalera G, Kruk C, Segura AM, Nogueira L, Alcántara I, Piccini C. 2017. Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. *Harmful Algae* 62: 73–83.
- Marvá F, García-Balboa C, Baselga-Cervera B, Costas E. 2014. Rapid adaptation of some phytoplankton species to osmium as a result of spontaneous mutations. *Ecotoxicology* 23: 213–220.
- Marvá F, López-Rodas V, Rouco M, Navarro M, Toro FJ, Costas E, Flores-Moya A. 2010. Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquatic Toxicology* 96: 130–134.
- Matesanz S, Gianoli E, Valladares F. 2010. Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1206: 35–55.
- Matthiensen A, Beattie KA, Yunes JS, Kaya K, Codd GA. 2000. [D-Leu¹] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry* 55: 383–387.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659–668.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press.
- Mazi K, Koussis AD, Destouni G. 2014. Intensively exploited Mediterranean aquifers: resilience to seawater intrusion and proximity to critical thresholds. *Hydrology and Earth System Sciences* 18: 1663–1677.
- McAllister DE, Hamilton AL, Harvey B. 1997. Global freshwater biodiversity: striving for the integrity of freshwater ecosystems. *Sea Wind: Bulletin of Ocean Voice International* 11: 1–140.
- Mcknight US, Rasmussen JJ, Kronvang B, Binning PJ, Bjerg PL. 2015. Sources , occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. *Environmental Pollution* 200: 64–76.
- Melero-Jiménez IJ, Martín-Clemente E, García-Sánchez MJ, Bañares-España E, Flores-Moya A. 2020. The limit of resistance to salinity in the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* is modulated by the rate of salinity increase. *Ecology and Evolution* 10: 5045–5055.
- Melero-Jiménez IJ, Martín-Clemente E, García-Sánchez MJ, Flores-Moya A, Bañares-España E. 2019. Adaptation of the toxic freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to salinity is achieved by the selection of spontaneous mutants. *Phycological Research* 67: 192–201.
- Mensah PK, Muller WJ, Palmer CG. 2011. Acute toxicity of Roundup® herbicide to three life stages of the

- freshwater shrimp *Caridina nilotica* (Decapoda: Atyidae). *Physics and Chemistry of the Earth* 36: 905–909.
- Merchán D, Casali J, De Lersundi JDV, Campo-Bescós MA, Giménez R, Preciado B, Lafarga A. 2018. Runoff, nutrients, sediment and salt yields in an irrigated watershed in southern Navarre (Spain). *Agricultural Water Management* 195: 120–132.
- Miller MA, Kudela RM, Mekebri A, Crane D, Oates SC, Tinker MT, Staedler M, Miller WA, Toy-Choutka S, Dominik C, *et al.* 2010. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: Cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS ONE* 5: 1–11.
- Mittermeier RA, Brooks TM, Farrell TA *et al.* (2010) Introduction. Fresh water: the essence of life. In: Mittermeier RA, Farrell TA, Harrison IJ, *et al.* eds. Fresh water: the essence of life. Virginia: CEMEX & ILCP, 15–41.
- Montagna PA, Alber M, Doering P, Connor MS. 2002. Freshwater inflow: science, policy, management. *Estuaries* 25: 1243–1245.
- Mount DR, Gulley DD, Hockett JR, Garrison TD, Evans JM. 1997. Statistical models to predict the toxicity of major ions to *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* and *Pimephales promelas* (fathead minnows). *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 2009–2019.
- Myers N, Knoll AH. 2001. The biotic crisis and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 5389–5392.
- Nelson TM, Streten C, Gibb KS, Chariton AA. 2015. Saltwater intrusion history shapes the response of bacterial communities upon rehydration. *Science of the Total Environment* 502: 143–148.
- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F. 2010. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science* 15: 684–692.
- Nielsen DL, Brock MA, Rees GN, Baldwin DS. 2003. Effects of increasing salinity on freshwater ecosystems in Australia. *Australian Journal of Botany*: 655–665.
- Nitschke L, Schüssler W. 1998. Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. *Chemosphere* 36: 35–41.
- Novick A, Szilard L. 1950. Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36: 708–719.
- Nwani CD, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Kumar P, Lakra WS. 2011. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 31: 314–322.
- O'Brien EM, Field R, Whittaker RJ. 2000. Climatic gradients in woody plant (tree and shrub) diversity: water-energy dynamics, residual variation, and topography. *Oikos* 89: 588–600.
- O'Donnell DR, Hamman CR, Johnson EC, Kremer CT, Klausmeier CA, Litchman E. 2018. Rapid thermal

- adaptation in a marine diatom reveals constraints and trade-offs. *Global Change Biology* 24: 4554–4565.
- Oberholster PJJ, Botha A-M-M, Grobbelaar JUU. 2004. *Microcystis aeruginosa*: Source of toxic microcystins in drinking water. *African Journal of Biotechnology* 3: 159–168.
- Occhipinti-Ambrogi A, Sheppard C. 2007. Marine bioinvasions: A collection of reviews. *Marine Pollution Bulletin* 55: 299–401.
- OECD. 1984. Algal growth inhibition test. *OECD Guidelines for Testing of Chemicals* 201: 246–259.
- Oettmeier W. 1999. Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 1255–1277.
- Orr HA, Unckless RL. 2008. Population extinction and the genetics of adaptation. *The American Naturalist* 172: 160–169.
- Orr HA, Unckless RL. 2014. The population genetics of evolutionary rescue. *PLoS Genetics* 10: e1004551.
- Orr PT, Jones GJ, Douglas GB. 2004. Response of cultured *Microcystis aeruginosa* from the Swan River, Australia, to elevated salt concentration and consequences for bloom and toxin management in estuaries. *Marine and Freshwater Research* 55: 277.
- Otsuka S, Suda S, Li R, Watanabe M, Oyaizu H, Matsumoto S, Watanabe MM. 1999. Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research* 47: 189–197.
- Oude Essink GHP. 2001. Salt water intrusion in a three-dimensional groundwater system in the Netherlands: a numerical study. *Transport in Porous Media* 43: 137–158.
- Padfield D, Yvon-Durocher G, Buckling A, Jennings S, Yvon-Durocher G. 2016. Rapid evolution of metabolic traits explains thermal adaptation in phytoplankton. *Ecology Letters* 19: 133–142.
- Paerl HW, Huisman J. 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports* 1: 27–37.
- Paerl HW, Paul VJ. 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research* 46: 1349–1363.
- Paerl HW. 2014. Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human-and climatically-impacted world. *Life* 4: 988–1012.
- Palumbi SR. 2001. Humans as the world's greatest evolutionary force the pace of human-induced evolution. *Science* 293: 1786–1790.
- Pang T, Liu J, Liu Q, Zhang L, Lin W. 2012. Impacts of glyphosate on photosynthetic behaviors in *Kappaphycus alvarezii* and *Neosiphonia savatieri* detected by JIP-test. *Journal of Applied Phycology* 24: 467–473.
- Pearce D. 1998. Auditing the Earth: the value of the world's ecosystem services and natural capital. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development* 40: 23–28.

- Pecl GT, Araújo MB, Bell JD, Blanchard J, Bonebrake TC, Chen I-C, Clark TD, Colwell RK, Danielsen F, Evengård B. 2017. Biodiversity redistribution under climate change: Impacts on ecosystems and human well-being. *Science* 355.
- Peña-Vázquez E, Maneiro E, Pérez-Conde C, Moreno-Bondi MC, Costas E. 2009. Microalgae fiber optic biosensors for herbicide monitoring using sol-gel technology. *Biosensors and Bioelectronics* 24: 3538–3543.
- Pérez GL, Torremorell A, Mugni H, Rodríguez P, Vera MS, Nascimento MD, Al. E. 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications* 17: 2310–2322.
- Perron GG, Gonzalez A, Buckling A. 2008. The rate of environmental change drives adaptation to an antibiotic sink. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1724–1731.
- Perron GG, Zaslhoff M, Bell G. 2006. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273: 251–256.
- Peterson HG, Boutin C, Freemark KE, Martin PA. 1997. Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed. *Aquatic Toxicology* 39: 111–134.
- Pinder AM, Halse SA, McRae JM, Shiel RJ. 2005. Occurrence of aquatic invertebrates of the wheatbelt region of Western Australia in relation to salinity. *Hydrobiologia* 543: 1–24.
- Platt T, Gallegos CL, Harrison WG. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research* 38: 687–701.
- Ploug H, Stolte W, Jørgensen BB. 1999. Diffusive boundary layers of the colony-forming plankton alga *Phaeocystis* sp.—implications for nutrient uptake and cellular growth. *Limnology and Oceanography* 44: 1959–1967.
- Preece EP, Hardy FJ, Moore BC, Bryan M. 2017. A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk. *Harmful Algae* 61: 31–45.
- Preece EP, Moore BC, Hardy FJ. 2015. Transfer of microcystin from freshwater lakes to Puget Sound, WA and toxin accumulation in marine mussels (*Mytilus trossulus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122: 98–105.
- Prinsloo JF, Pieterse AJH. 1994. Preliminary observations on the effect of increased concentrations of total dissolved salts on growth and photosynthetic rates in different algal species. *Water SA* 20: 219–222.
- Purrington CB. 2000. Costs of resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 305–308.
- Quintero-Galvis JF, Paleo-López R, Solano-Iguaran JJ, Poupin MJ, Ledger T, Gaitan-Espitia JD, Antoń A, Travisano M, Nespolo RF. 2018. Exploring the evolution of multicellularity in *Saccharomyces cerevisiae* under bacteria environment: An experimental phylogenetics approach. *Ecology and Evolution* 8: 4619–4630.
- R Core Team. 2013. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for

- Statistical Computing.
- Rahbek C, Graves GR. 2001. Multiscale assessment of patterns of avian species richness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 4534–4539.
- Ramsayer J, Kaltz O, Hochberg ME. 2013. Evolutionary rescue in populations of *Pseudomonas fluorescens* across an antibiotic gradient. *Evolutionary Applications* 6: 608–616.
- Ratcliff WC, Denison RF, Borrello M, Travisano M. 2012. Experimental evolution of multicellularity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 1595–1600.
- Ratcliff WC, Herron MD, Howell K, Pentz JT, Rosenzweig F, Travisano M. 2013. Experimental evolution of an alternating uni-and multicellular life cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature Communications* 4: 2742.
- Raven JA, Falkowski PG. 1999. Oceanic sinks for atmospheric CO₂. *Plant, Cell & Environment* 22: 741–755.
- Raven JA, Geider RJ. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytologist* 110: 441–461.
- Reboud X, Bell G. 1997. Experimental evolution in *Chlamydomonas*. III. Evolution of specialist and generalist types in environments that vary in space and time. *Heredity* 78: 507–514.
- Reboud X, Majerus N, Gasquez J, Powles S. 2007. *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system for proactive herbicide resistance evolution research. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 257–266.
- Reed RH, Borowitzka LJ, Mackay MA, Chudek JA, Foster R, Warr SRC, Moore DJ, Stewart WDP. 1986. Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 2: 51–56.
- Reid AJ, Carlson AK, Creed IF, Eliason EJ, Gell PA, Johnson PTJ, Kidd KA, MacCormack TJ, Olden JD, Ormerod SJ. 2019. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews* 94: 849–873.
- Reish DJ, Oshida PS, Mearns AJ, Ginn TC, Buchman M. 2004. Effects of pollution on marine organisms. *Water Environment Research* 76: 2443–2490.
- Rengefors K, Kremp A, Reusch TBH, Wood AM. 2017. Genetic diversity and evolution in eukaryotic phytoplankton: revelations from population genetic studies. *Journal of Plankton Research* 39: 165–179.
- Reusch TBH, Boyd PW. 2013. Experimental evolution meets marine phytoplankton. *Evolution* 67: 1849–1859.
- Reusch TBH, Ehlers A, Hämmerli A, Worm B. 2005. Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 2826–2831.
- Reusch TBH. 2014. Climate change in the oceans: evolutionary versus phenotypically plastic responses of marine animals and plants. *Evolutionary Applications* 7: 104–122.

- Reynolds CS. 1990. Temporal scales of variability in pelagic environments and the response of phytoplankton. *Freshwater Biology* 23: 25–53.
- Reznick DA, Bryga H, Endler JA. 1990. Experimentally induced life-history evolution in a natural population. *Nature* 346: 357.
- Richardson J, Feuchtmayr H, Miller C, Hunter PD, Maberly SC, Carvalho L. 2019. Response of cyanobacteria and phytoplankton abundance to warming, extreme rainfall events and nutrient enrichment. *Global Change Biology* 25: 3365–3380.
- Rico M, Altamirano M, López-Rodas V, Costas E. 2006. Analysis of polygenic traits of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) strains by Restricted Maximum Likelihood (REML) procedures: 1. Size and shape of colonies and cells. *Phycologia* 45: 237–242.
- Robles-Molina J, Gilbert-López B, García-Reyes JF, Molina-Díaz A. 2014. Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain. *Science of the Total Environment* 479: 247–257.
- Robson BJ, Hamilton DP. 2003. Summer flow event induces a cyanobacterial bloom in a seasonal Western Australian estuary. *Marine and Freshwater Research* 54: 139–151.
- Rogers DW, Greig D. 2008. Experimental evolution of a sexually selected display in yeast. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276: 543–549.
- Romero-López J, López-Rodas V, Costas E. 2012. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquatic Toxicology* 124–125: 227–237.
- Rosen BH, Loftin KA, Graham JL, Stahlhut KN, Riley JM, Johnston BD, Senegal S. 2018. *Understanding the Effect of Salinity Tolerance on Cyanobacteria Associated with A Harmful Algal Bloom in Lake Okeechobee, Florida*. Reston: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report.
- Roshon RD, McCann JH, Thompson DG, Stephenson GR. 1999. Effects of seven forestry management herbicides on *Myriophyllum sibiricum*, as compared with other nontarget aquatic organisms. *Canadian Journal of Forest Research* 29: 1158–1169.
- Ross C, Santiago-Vázquez L, Paul V. 2006. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology* 78: 66–73.
- Ross C, Warhurst BC, Brown A, Huff C, Ochrietor JD. 2019. Mesohaline conditions represent the threshold for oxidative stress, cell death and toxin release in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology* 206: 203–211.
- Rozsak DB, Colwell RR. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* 51: 365.
- Roth JR, Kugelberg E, Reams AB, Kofoid E, Andersson DI. 2006. Origin of mutations under selection: the adaptive mutation controversy. *Annual Review of Microbiology* 60: 477–501.
- Roth JR. 2010. Genetic adaptation: a new piece for a very old puzzle. *Current Biology* 20: R15–R17.

- Rouco M, López-Rodas V, Flores-Moya A, Costas E. 2011. Evolutionary changes in growth rate and toxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under a scenario of eutrophication and temperature increase. *Microbial Ecology* 62: 265–273.
- Rouco M, López-Rodas V, Raquel G, Huertas IE, García-Sánchez MJ, Flores-Moya A, Costas E. 2014. The limit of the genetic adaptation to copper in freshwater phytoplankton. *Oecologia* 175: 1179–1188.
- Roy NM, Ochs J, Zambrzycka E, Anderson A. 2016. Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 46: 292–300.
- Samani P, Bell G. 2010. Adaptation of experimental yeast populations to stressful conditions in relation to population size. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 791–796.
- Samani P, Bell G. 2016. The ghosts of selection past reduces the probability of plastic rescue but increases the likelihood of evolutionary rescue to novel stressors in experimental populations of wild yeast. *Ecology Letters* 19: 289–298.
- Sánchez-Fortún S, Marvá F, Rouco M, Costas E, López-Rodas V. 2009. Toxic effect and adaptation in *Scenedesmus intermedius* to anthropogenic chloramphenicol contamination: genetic versus physiological mechanisms to rapid acquisition of xenobiotic resistance. *Ecotoxicology* 18: 481–487.
- Sanderman G, Boger P. 1986. Sites of herbicide inhibition at the photosynthetic apparatus. In: Staehelin LA, Arntzen CJ, eds. *Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin: Springer-Verlag, 595–602.
- Sandrini G, Huisman J, Matthijs HCP. 2015. Potassium sensitivity differs among strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis* and correlates with the presence of salt tolerance genes. *FEMS Microbiology Letters* 362: fnv121.
- Schaum CE, Barton S, Bestion E, Buckling A, Garcia-Carreras B, Lopez P, Lowe C, Pawar S, Smirnov N, Trimmer M. 2017. Adaptation of phytoplankton to a decade of experimental warming linked to increased photosynthesis. *Nature Ecology & Evolution* 1: 1–7.
- Schaum CE, Collins S. 2014. Plasticity predicts evolution in a marine alga. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281: 20141486.
- Schaum CE, Rost B, Millar AJ, Collins S. 2013. Variation in plastic responses of a globally distributed picoplankton species to ocean acidification. *Nature Climate Change* 3: 298–302.
- Schiffers K, Bourne EC, Lavergne S, Thuiller W, Travis JMJ. 2013. Limited evolutionary rescue of locally adapted populations facing climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368: 20120083.
- Schlüter L, Lohbeck KT, Gröger JP, Riebesell U, Reusch TBH. 2016. Long-term dynamics of adaptive evolution in a globally important phytoplankton species to ocean acidification. *Science Advances* 2: e1501660.
- Schlüter L, Lohbeck KT, Gutowska MA, Gröger JP, Riebesell U, Reusch TBH. 2014. Adaptation of a

- globally important coccolithophore to ocean warming and acidification. *Nature Climate Change* 4: 1024–1030.
- Schopf JW, Packer BM. 1987. Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 237: 70–73.
- Schuerch M, Vafeidis A, Slawig T, Temmerman S. 2013. Modeling the influence of changing storm patterns on the ability of a salt marsh to keep pace with sea level rise. *Journal of Geophysical Research: Earth Surface* 118: 84–96.
- Schuler LJ, Rand GM. 2008. Aquatic risk assessment of herbicides in freshwater ecosystems of south Florida. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54: 571–583.
- Schuler MS, Cañedo-Argüelles M, Hintz WD, Dyack B, Birk S, Relyea RA. 2018. Regulations are needed to protect freshwater ecosystems from salinization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374: 20180019.
- Schuler MS, Hintz WD, Jones DK, Lind LA, Mattes BM, Stoler AB, Sudol KA, Relyea RA. 2017. How common road salts and organic additives alter freshwater food webs: in search of safer alternatives. *Journal of Applied Ecology* 54: 1353–1361.
- Schwaderer AS, Yoshiyama K, de Tezanos Pinto P, Swenson NG, Klausmeier CA, Litchman E. 2011. Eco-evolutionary differences in light utilization traits and distributions of freshwater phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 56: 589–598.
- Sellner KG, Lacouture R V., Parrish CR. 1988. Effects of increasing salinity on a cyanobacteria bloom in the Potomac River estuary. *Journal of Plankton Research* 10: 49–61.
- Shan K, Song L, Chen W, Li L, Liu L, Wu Y, Jia Y, Zhou Q, Peng L. 2019. Analysis of environmental drivers influencing interspecific variations and associations among bloom-forming cyanobacteria in large, shallow eutrophic lakes. *Harmful Algae* 84: 84–94.
- Shapiro SS, Wilk MB. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591–611.
- Shirani S, Hellweger FL. 2017. Neutral evolution and dispersal limitation produce biogeographic patterns in *Microcystis aeruginosa* populations of lake systems. *Microbial Ecology* 74: 416–426.
- Simpson GG. 1944. *Tempo and Mode in Evolution*. New York: Columbia University Press.
- Singh DP, Khattar JIS, Kaur G, Singh Y. 2016. Toxicological impact of herbicides on cyanobacteria. *Annual Research & Review in Biology*: 1–39.
- Sjöqvist CO, Kremp A. 2016. Genetic diversity affects ecological performance and stress response of marine diatom populations. *The ISME Journal* 10: 2755–2766.
- Sleep NH. 2001. Oxygenating the atmosphere. *Nature* 410: 317–318.
- Smedbol É, Gomes MP, Paquet S, Labrecque M, Lepage L, Lucotte M, Juneau P. 2018. Effects of low concentrations of glyphosate-based herbicide factor 540® on an agricultural stream freshwater

- phytoplankton community. *Chemosphere* 192: 133–141.
- Smedbol É, Lucotte M, Labrecque M, Lepage L, Juneau P. 2017. Phytoplankton growth and PSII efficiency sensitivity to a glyphosate-based herbicide (Factor 540®). *Aquatic Toxicology* 192: 265–273.
- Smedema LK, Shiati K. 2002. Irrigation and salinity: a perspective review of the salinity hazards of irrigation development in the arid zone. *Irrigation and Drainage Systems* 16: 161–174.
- Smruga S, Samo TJ, Malfatti F, Villareal J, Azam F. 2014. Individual cell DNA synthesis within natural marine bacterial assemblages as detected by ‘click’ chemistry. *Aquatic Microbial Ecology* 72: 269–280.
- Sniegowski PD, Lenski RE. 1995. Mutation and adaptation: the directed mutation controversy in evolutionary perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* 26: 553–578.
- Sniegowski PD. 2005. Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytologist* 166: 360–362.
- Spieß EB. 1989. *Genes in Populations*. New York: Wiley.
- Stachowski-Haberkorn S, Jérôme M, Rouxel J, Khelifi C, Rincé M, Burgeot T. 2013. Multigenerational exposure of the microalga *Tetraselmis suecica* to diuron leads to spontaneous long-term strain adaptation. *Aquatic Toxicology* 140: 380–388.
- Start D, Weis AE, Gilbert B. 2020. Ecological and evolutionary stochasticity shape natural selection. *The American Naturalist* 195: 705–716.
- Steffen W, Persson Å, Deutsch L, Zalasiewicz J, Williams M, Richardson K, Crumley C, Crutzen P, Folke C, Gordon L, *et al.* 2011. The anthropocene: From global change to planetary stewardship. *Ambio* 40: 739–761.
- Steffen W, Rockström J, Richardson K, Lenton TM, Folke C, Liverman D, Summerhayes CP, Barnosky AD, Cornell SE, Crucifix M. 2018. Trajectories of the Earth System in the Anthropocene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: 8252–8259.
- Steinrücken HC, Amrhein N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207–1212.
- Stevenson RJ, Hill BH, Herlihy AT, Yuan LL, Norton SB. 2008. Algae–P relationships, thresholds, and frequency distributions guide nutrient criterion development. *Journal of the North American Benthological Society* 27: 783–799.
- Stoiber TL, Shafer MM, Armstrong DE. 2013. Induction of reactive oxygen species in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to contrasting trace metal exposures. *Environmental Toxicology* 28: 516–523.
- Stoppani A. 1873. *Corso di Geologia, 2. Geologia stratigrafica*. Milano: Bernardoni.
- Strauss SY, Rudgers JA, Lau JA, Irwin RE. 2002. Direct and ecological costs of resistance to herbivory.

Trends in Ecology & Evolution 17: 278–285.

Suikkanen S, Laamanen M, Huttunen M. 2007. Long-term changes in summer phytoplankton communities of the open northern Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 71: 580–592.

Sussman AS, Douthit HA. 1973. Dormancy in microbial spores. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 311–352.

Syvitski JPM, Kettner A. 2011. Sediment flux and the Anthropocene. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 369: 957–975.

Szivák I, Behra R, Sigg L. 2009. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 45: 427–435.

Tada Y, Makabe R, Kasamatsu-Takazawa N, Taniguchi A, Hamasaki K. 2013. Growth and distribution patterns of *Roseobacter/Rhodobacter*, SAR11, and *Bacteroidetes* lineages in the Southern Ocean. *Polar Biology* 36: 691–704.

Tada Y, Taniguchi A, Hamasaki K. 2010. Phylotype-specific growth rates of marine bacteria measured by bromodeoxyuridine immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Aquatic Microbial Ecology* 59: 229–238.

Tanabe Y, Hodoki Y, Sano T, Tada K, Watanabe MM. 2018. Adaptation of the freshwater bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to brackish water is driven by recent horizontal transfer of sucrose genes. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–11.

Tanabe Y, Yamaguchi H, Sano T, Kawachi M. 2019. Environmental Microbiology A novel salt-tolerant genotype illuminates the sucrose gene evolution in freshwater bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 366: fnz190.

Tatters AO, Schnetzer A, Fu F, Lie AYA, Caron DA, Hutchins DA. 2013. Short-versus long-term responses to changing CO₂ in a coastal dinoflagellate bloom: Implications for interspecific competitive interactions and community structure. *Evolution* 67: 1879–1891.

Thomas MK, Aranguren-Gassis M, Kremer CT, Gould MR, Anderson K, Klausmeier CA, Litchman E. 2017. Temperature–nutrient interactions exacerbate sensitivity to warming in phytoplankton. *Global Change Biology* 23: 3269–3280.

Thomas WL. 1956. *Man's Role in Changing the Face of the Earth*. Chicago: The University of Chicago Press.

Timmis K, Cavicchioli R, Garcia JL, Nogales B, Chavarría M, Stein L, McGenity TJ, Webster N, Singh BK, Handelsman J. 2019. The urgent need for microbiology literacy in society. *Environmental microbiology* 21: 1513–1528.

Tonk L, Bosch K, Visser PM, Huisman J. 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology* 46: 117–123.

Travisano M, Lenski RE. 1996. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IV. Targets of selection and the specificity of adaptation. *Genetics* 143: 15–26.

- Tsopela A, Laborde A, Salvagnac L, Ventalon V, Bedel-Pereira E, Séguy I, Temple-Boyer P, Juneau P, Izquierdo R, Launay J. 2016. Development of a lab-on-chip electrochemical biosensor for water quality analysis based on microalgal photosynthesis. *Biosensors and Bioelectronics* 79: 568–573.
- Turner JRG. 1986. Why are there so few butterflies in Liverpool? Homage to Alfred Russel Wallace. *Antenna* 10: 18–24.
- Turvey ST, Crees JJ. 2019. Extinction in the Anthropocene. *Current Biology* 29: R982–R986.
- Tyrrell T. 2011. Anthropogenic modification of the oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 369: 887–908.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 2002. *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. Fourth Edition*. Washington D.C.
- Uecker H, Otto SP, Hermisson J. 2014. Evolutionary rescue in structured populations. *The American Naturalist* 183: E17–E35.
- Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, Morris Jr JG. 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment* 616: 255–268.
- Venâncio C, Castro BB, Ribeiro R, Antunes SC, Abrantes N, Soares A, Lopes I. 2018. Sensitivity of freshwater species under single and multigenerational exposure to seawater intrusion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374: 20180252.
- Vendrell E, de Barreda Ferraz DG, Sabater C, Carrasco JM. 2009. Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82: 538–542.
- Vengosh A, Jackson RB, Warner N, Darrah TH, Kondash A. 2014. A critical review of the risks to water resources from unconventional shale gas development and hydraulic fracturing in the United States. *Environmental Science & Technology* 48: 8334–8348.
- Vengosh A. 2003. Salinization and saline environments. In: Turekian K, Holland H, eds. *Treatise on Geochemistry*. Oxford: Pergamon, 1–35.
- Verspagen JMH, Passarge J, Jöhnk KD, Visser PM, Boers P, Laanbroek HJ, Huisman J, Applications SE, Feb N. 2006. Water management strategies against toxic *Microcystis* Blooms in the Dutch Delta. *Ecological Applications* 16: 313–327.
- Vila-aiub MM, Neve P, Powles SB. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist* 184: 751–767.
- Villeneuve A, Larroudé S, Humbert J-F. 2011. Herbicide contamination of freshwater ecosystems: impact on microbial communities. In: Stoytcheva M, ed. *Pesticides–Formulations, Effects, Fate*. New York: InTech, 285–312.
- Vinton AC, Vasseur DA. 2020. Evolutionary tracking is determined by differential selection on demographic rates and density dependence. *Ecology and Evolution* 10: 5725–5736.

- Visser PM, Verspagen JMH, Sandrini G, Stal LJ, Matthijs HCP, Davis TW, Paerl HW, Huisman J. 2016. How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae* 54: 145–159.
- Vogwill T, Comfort AC, Furió V, MacLean RC. 2016. Persistence and resistance as complementary bacterial adaptations to antibiotics. *Journal of Evolutionary Biology* 29: 1223–1233.
- Vonberg D, Vanderborght J, Cremer N, Pütz T, Herbst M, Vereecken H. 2014. 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Research* 50: 294–306.
- Waters CN, Zalasiewicz J, Summerhayes C, Barnosky AD, Poirier C, Gałuszka A, Cearreta A, Edgeworth M, Ellis EC, Ellis M. 2016. The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. *Science* 351: aad2622.
- Webster NS, Wagner M, Negri AP. 2018. Microbial conservation in the Anthropocene. *Environmental Microbiology* 20: 1925–1928.
- Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2989–3004.
- Wilkinson BH. 2005. Humans as geologic agents: A deep-time perspective. *Geology* 33: 161–164.
- Williams WD. 2001. Anthropogenic salinisation of inland waters. *Hydrobiologia* 466: 329–337.
- Winn KO, Saynor MJ, Eliot MJ, Elio I. 2006. Saltwater intrusion and morphological change at the mouth of the East Alligator River, Northern Territory. *Journal of Coastal Research* 22: 137–149.
- Wolf KKE, Romanelli E, Rost B, John U, Collins S, Weigand H, Hoppe CJM. 2019. Company matters: The presence of other genotypes alters traits and intraspecific selection in an Arctic diatom under climate change. *Global Change Biology* 25: 2869–2884.
- Wood C, Harrington GA. 2014. Influence of seasonal variations in sea level on the salinity regime of a coastal groundwater–fed wetland. *Groundwater* 53: 90–98.
- Woodruff DS. 2001. Declines of biomes and biotas and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 5471–5476.
- Wright DH. 1983. Species-energy theory: an extension of species-area theory. *Oikos*: 496–506.
- Wu L, Qiu Z, Zhou Y, Du Y, Liu C, Ye J, Hu X. 2016. Physiological effects of the herbicide glyphosate on the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology* 178: 72–79.
- World Wildlife Fund (WWF) 2016. *Living Planet Report 2016: Risk and Resilience in a New Era*. Gland, Switzerland: World Wildlife Fund.
- Xiao M, Willis A, Burford MA. 2017. Differences in cyanobacterial strain responses to light and temperature reflect species plasticity. *Harmful Algae* 62: 84–93.
- Yamaguchi N, Gazzard D, Scholey G, MacDonald Dw. 2003. Concentrations and hazard assessment of PCBs, organochlorine pesticides and mercury in fish species from the upper Thames: River

- pollution and its potential effects on top predators. *Chemosphere* 50: 265–273.
- Yoshida T, Hairston Jr NG, Ellner SP. 2004. Evolutionary trade-off between defence against grazing and competitive ability in a simple unicellular alga, *Chlorella vulgaris*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271: 1947–1953.
- Youn S-J, Taylor WW, Lynch AJ, Cowx IG, Beard Jr TD, Bartley D, Wu F. 2014. Inland capture fishery contributions to global food security and threats to their future. *Global Food Security* 3: 142–148.
- Zalasiewicz J, Waters C, Summerhayes C, Williams M. 2018. The anthropocene. *Geology Today* 34: 177–181.
- Zalasiewicz J, Williams M, Fortey R, Smith A, Barry TL, Coe AL, Bown PR, Rawson PF, Gale A, Gibbard P. 2011. Stratigraphy of the Anthropocene. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 369: 1036–1055.
- Zbinden M, Haag CR, Ebert D. 2008. Experimental evolution of field populations of *Daphnia magna* in response to parasite treatment. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1068–1078.
- Žegura B, Sedmak B, Filipič M. 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon* 41: 41–48.
- Zhang Q, Qu Q, Lu T, Ke M, Zhu Y, Zhang M, Zhang Z, Du B, Pan X, Sun L, *et al.* 2018. The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth. *Environmental Pollution* 243: 1106–1112.
- Zhang Y, Xu Q, Xi B. 2013. Effect of NaCl salinity on the growth, metabolites, and antioxidant system of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Freshwater Ecology* 28: 477–487.



Índice de Figuras

Figura 1. (A) Aumento aproximado en las tasas de extinción de mamíferos desde 2010 CE (CE, Common Era; Ma, millones de años). (B) Acumulación de extinciones de vertebrados referido al porcentaje del total de especies. El sombreado indica la diferencia entre tasas menos conservadoras (incluidas extinciones, extinciones en el medio silvestre, y posibles extinciones) y tasas conservadoras (solo extinciones verificadas). Fuente: Waters *et al.* (2016). 33

Figura 2. Diagrama esquemático de los posibles resultados obtenidos en el experimento de análisis de fluctuación. “set” 1: noventa cultivos de la cianobacteria *M. aeruginosa* (cada uno comenzó a partir de un pequeño inóculo, $N_0 = 10^2$ células) fueron propagados en condiciones no selectivas, hasta alcanzar una población de 10^6 células ($N_t = 10^6$ células), en ese momento los cultivos se expusieron a condiciones selectivas. Si surgieron células resistentes durante la exposición al agente selectivo la resistencia podría ser debido a la aclimatación o adaptación. En el caso de que el número de células resistentes en todos los cultivos sea similar (“set” 1A) podremos concluir que se ha producido aclimatación celular. Si encontramos que el número de células en cada cultivo es muy diferente, podremos afirmar que las células resistentes surgieron por mutaciones espontáneas que ocurren durante propagación de cultivos (es decir, antes de la exposición al agente selectivo) y por tanto la resistencia se debe a la adaptación (“set” 1B). Finalmente, es posible no encontrar resistencia (“set” 1C). El “set” 2, este “set” sirve como control del “set” 1, pues al fundar una población de gran tamaño (N_t) la probabilidad de que haya células resistentes es similar en todos los cultivos y, por lo tanto, el número de células al terminar el experimento en cada cultivo debe de ser similar. 54

Figura 3. Representación esquemática del experimento de trinquete. Cuatro réplicas de los controles y cuatro réplicas de cada uno de los niveles iniciales del agente selectivo (NaCl), se representan en cada ciclo de trinquete. Los cultivos se transfieren al siguiente ciclo de trinquete (aumento de salinidad) cuando la concentración celular es similar, o superior, a la que se alcanza en los controles. En el caso de que el cultivo no alcance la concentración celular del control, se mantienen en el mismo nivel de selección. El límite de la resistencia se registra como el nivel más alto del agente selectivo bajo el cual se observa división celular. El experimento incluyó los siguientes ciclos de trinquete: 3, 4,5, 6,8, 10,1, 15,2 y 22,6 g L⁻¹ NaCl. 57

Figura 4. Efecto de la salinidad (NaCl) sobre la tasa de crecimiento (m ; media $\pm \sigma$, $n = 3$; nc: crecimiento celular no detectado) de la cepa MaAVc de *Microcystis aeruginosa*.

..... 60

Figura 5. Tasa de crecimiento (m ; media $\pm \sigma$, $n = 3$) de las cepas MaAVc^s y MaAVc^{rt} (obtenidas del experimento de trinquete) en ausencia y presencia de distintas concentraciones salinas..... 64

Figura 6. Tasa fotosintética neta (*NPR*) (A) y tasa transporte de electrones (*ETR*) (B) en función de la irradiancia de las cepas de *M. aeruginosa* sensibles a salinidad (MaAVc^s) y resistente a salinidad (derivada del experimento de trinquete, MaAVc^{rt}). Los puntos representan la media $\pm \sigma$ ($n = 5$ y 4 para *NPR* y *ETR*, respectivamente). Las líneas indican los valores del ajuste de la ecuación de Edwards y Walker (1983) para *NPR-I* y de la ecuación de Platt *et al.* (1980) para *ETR-I*..... 65

Figura 7. Representación esquemática del diseño experimental de trinquete a distintas tasas de deterioro. Se incubaron cuatro réplicas (1-4 pocillos) de los cultivos de control (pocillos de la fila A) y cuatro réplicas de cultivos en cada una de las tres dosis iniciales de NaCl (pocillos de las filas B-D, respectivamente) en cada ciclo de trinquete. Cada cultivo se transfirió a la siguiente concentración de NaCl siguiendo un factor de $\times 3$, cuando se observó una concentración celular similar o mayor que en los cultivos control. Los cultivos experimentales, que no alcanzaron una concentración celular similar o mayor que el control, se mantuvieron en el mismo ciclo de trinquete (misma salinidad). Cuando los cultivos experimentales alcanzaron la concentración de $2,7 \text{ g L}^{-1}$ NaCl, se aplicaron dos tasas diferentes de deterioro ambiental. Específicamente, las concentraciones de NaCl comenzaron a aumentar por un factor de $\times 1,5$ o $\times 3$ en el trinquete lento y rápido, respectivamente. El límite de la resistencia corresponde a la salinidad máxima a la que se detectó división celular..... 76

Figura 8. Diseño experimental para determinar el mecanismo de resistencia que permite la supervivencia de los cultivos del experimento de trinquete. En el primer paso, los cultivos que se adaptaron al nivel de salinidad más alto después de realizar el experimento de trinquete ($9,1 \text{ g L}^{-1}$ NaCl para la cepa Ma1Vc, y $13,6 \text{ g L}^{-1}$ NaCl para las cepas Ma5Vc y MaAVc, como se muestra en la figura) se expusieron durante 15 días a BG11-50% medio (sin adición de NaCl) y se determinó la tasa de crecimiento (m_1). Posteriormente, las células se transfirieron durante otros 15 días a BG11-50%

suplementado con la concentración de NaCl correspondiente, y las tasas de crecimiento (m_2) se calcularon nuevamente. La adaptación puede reconocerse por valores similares de m_1 y m_2 , mientras que, si m_2 es significativamente menor que m_1 , se puede inferir que la resistencia se debió principalmente a la aclimatación. 78

Figura 9. Efecto del incremento de salinidad (NaCl) sobre la tasa de crecimiento (m ; media $\pm \sigma$, $n = 3$; nc: crecimiento celular no detectado) de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc de *Microcystis aeruginosa*. 81

Figura 10. Número de generaciones requeridas para crecer bajo dosis crecientes de NaCl durante el experimento de trinquete. Las letras A, B y C representan diferentes concentraciones iniciales de salinidad (0, 0,3, 0,9 g L⁻¹ NaCl, respectivamente). El experimento se realizó con cuatro cultivos independientes (columnas) por cada cepa (escala de grises de las columnas). Las dosis letales iniciales están representadas por texturas; punteadas (Ma1Vc y Ma5Vc) y rayadas (MaAVc). 83

Figura 11. Rendimiento cuántico efectivo del PSII de las células sensibles y resistentes a salinidad de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc de *M. aeruginosa*. Media $\pm \sigma$ ($n = 4$). 85

Figura 12. Amortiguamiento fotoquímico (q_p) y no fotoquímico (q_N) de las células sensibles y resistentes a salinidad de las cepas Ma1Vc (A) y Ma5Vc (B) de *M. aeruginosa* en función de la irradiancia. Media $\pm \sigma$ ($n = 4$, excepto para los valores de q_N de Ma5Vc sensible donde $n = 3$). El símbolo * indica los valores comprendidos entre 0-35 μmol fotones $\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ 86

Figura 13. Representación de la pérdida de energía no fotoquímica no regulada en PSII ($Y[NO]$; círculos) y la pérdida de energía no fotoquímica regulada en PSII ($Y[NPQ]$; cuadrados) de las células sensibles y resistentes a salinidad cepas Ma1Vc (A) y Ma5Vc (B) de *M. aeruginosa* en función de la irradiancia. Los puntos representan la media $\pm \sigma$ ($n = 4$, excepto para los valores de Ma5Vc sensible donde $n = 3$). El símbolo * indica los valores comprendidos entre 0-35 μmol fotones $\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ 88

Figura 14. Representación del parámetro de amortiguamiento no fotoquímico (NPQ) de las células sensibles y resistentes a salinidad de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc de *M. aeruginosa* en función de la irradiancia. Los puntos representan la media $\pm \sigma$ ($n = 4$, excepto para los valores de Ma5Vc sensible donde $n = 3$). 89

Figura 15. Fases del rescate evolutivo: curva en forma de U, esta forma está relacionada con el aumento correspondiente de una frecuencia de alelos que seleccionan fenotipos/genotipos más adaptados al nuevo entorno. En la primera fase la abundancia de la población disminuye debido a que los organismos no se encuentran adaptados al nuevo entorno, en la segunda fase la población cae por debajo de un umbral estocástico donde cada vez más posible la extinción, y en la fase final se produce un crecimiento positivo el cual restaura la población. Fuente: Carlson *et al.* (2014). **97**

Figura 16. Diagrama esquemático del experimento de rescate evolutivo. (a) Los cultivos se transfirieron cada semana a un nuevo pocillo con medio fresco, la salinidad depende de la tasa de deterioro (sin deterioro y deterioro progresivo) y de la semana, la dispersión de los cultivos varía según la combinación con la dispersión (b). Cada gradiente de NaCl (de G₁ a G₄) comprendió cinco concentraciones crecientes de NaCl (representadas por diferentes intensidades de verde) y estas concentraciones se incrementaron en cada nuevo gradiente de NaCl de G₁ (0, 1, 2, 3, 4 g L⁻¹ NaCl) a G₂ (2, 3, 4, 5, 6 g L⁻¹ NaCl), G₃ (4, 5, 6, 7, 8 g L⁻¹ NaCl) y G₄ (8, 9, 10, 11, 12 g L⁻¹ NaCl) como se indica en (a). Cada concentración se ensayó en seis poblaciones diferentes (filas B-G). En el tratamiento sin deterioro, las poblaciones permanecieron en el gradiente inicial de NaCl durante doce semanas, hasta la transferencia al gradiente G₄ (donde se supone que todas las concentraciones de NaCl ensayadas son letales). El tratamiento de deterioro progresivo pasó por G₂ y G₃, durante 4 semanas cada uno. Las poblaciones permanecieron 4 semanas en G₄ para todos los tratamientos ensayados. Semanalmente, la dispersión entre las poblaciones varió en función del tratamiento: en el tratamiento sin dispersión, las transferencias se hicieron directamente (de pocillo a pocillo). En la condición de dispersión local, las seis poblaciones expuestas a la misma concentración de NaCl se mezclaron, y se fundaron seis nuevas poblaciones desde el cultivo mezclado. En la dispersión global, todas las poblaciones de las 5 concentraciones diferentes de NaCl (30 poblaciones en total) se mezclaron, y las 30 nuevas poblaciones (cinco concentraciones con seis réplicas cada una) se fundaron desde esta mezcla global. **103**

Figura 17. Número de eventos de rescate evolutivo (RE) en función del tipo de dispersión (sin dispersión, local o global), observados después de la exposición de la cepa Ma5Vc de *M. aeruginosa* a condiciones letales de salinidad. Los datos se representan mediante un gráfico de cajas y bigotes donde se muestra la media (cruz, $n = 40$), la mediana (en el caso de Sin dispersión la mediana coincide con el percentil 75), los percentiles 25 y 75

(extensión de la caja), y las barras de error para los percentiles 10 y 90 (las observaciones que exceden dichos límites se representan como puntos). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los eventos de RE para cada tratamiento detectado por la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis junto con la prueba post-hoc de Dunn ($p < 0,05$). 106

Figura 18. Número de eventos de rescate evolutivo (RE) en función de la tasa de deterioro (Sin deterioro o Progresivo), observados después de la exposición de la cepa Ma5Vc *M. aeruginosa* a condiciones letales de salinidad. Los datos se representan mediante un gráfico de cajas y bigotes donde se muestra la media (cruz, $n = 60$), la mediana (en el caso de deterioro progresivo la mediana coincide con el percentil 75), los percentiles 25 y 75, y las barras de error para los percentiles 10 y 90 (los valores que exceden dichos límites se representan como puntos). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los eventos de RE para cada tratamiento detectado por la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). 106

Figura 19. Representación esquemática del experimento de trinquete (herbicida: glifosato). El experimento consta de cuatro réplicas (1-4 pocillos) de los cultivos control (línea A) y cuatro réplicas de los cultivos de tratamiento a la dosis inicial de glifosato (línea B). Los cultivos se transfieren al siguiente ciclo de trinquete (aumento de la concentración de herbicida) cuando la concentración celular es similar, o superior, a la que se alcanza en los cultivos control. En el caso de que el cultivo experimental no alcance la concentración celular del control, el cultivo experimental se mantiene en el mismo nivel de selección. El límite de la resistencia corresponde al nivel más alto de glifosato bajo el cual se observa crecimiento. 117

Figura 20. Efecto del diurón (A) y el glifosato (B) sobre la tasa de crecimiento (m , porcentaje con respecto al control sin herbicida) de las diferentes especies de fitoplancton de agua dulce utilizadas en el experimento de trinquete. Los valores de m se calcularon después de 6 d de exposición a concentraciones crecientes de cada herbicida. Las líneas verticales indican la media $\pm \sigma$ ($n = 4$). 119

Figura 21. Número de generaciones (con respecto al control) de cada especie necesarias para crecer bajo dosis crecientes de diurón y glifosato durante el experimento de trinquete. Cada columna representa una población independiente por cada herbicida y especie. El experimento de trinquete se terminó cuando no se observó crecimiento en ninguna de las

cuatro réplicas (nc: crecimiento celular no detectado). La sombra gris sobre un ciclo de trinquete indica que la concentración probada es igual o superior a la dosis letal inicial para cada herbicida y especie (Figura 20). **120**

Figura 22. Tasa de crecimiento (m) de las células sensibles y resistentes a herbicidas (A: diurón; B: glifosato) obtenidas tras 15 d en medio sin herbicida (4 generaciones) y otros 15 d en medio con herbicida (4 generaciones). Las diferencias significativas entre los valores de m , detectadas por la prueba de Kruskal-Wallis H y la prueba post hoc de Mann-Whitney ($p < 0,05$), se indican con letras diferentes. Los datos son la media $\pm \sigma$ ($n = 4$ y 3 para células sensibles y resistentes, respectivamente). **121**

Figura 23. Tasa de fotosíntesis neta (NPR) y tasa de transporte de electrones (ETR) en función de la irradiancia de las cepas resistentes y sensibles a herbicidas de cada especie. Los datos son medias \pm DE ($n = 4$). Las líneas indican los valores del ajuste a la ecuación de Edwards y Walker (1983) para $NPR-I$ y a la ecuación de Platt *et al.* (1980) para la $ETR-I$ **123**

Figure 24. Diagrams showing three possible patterns of the relationship between environmental quality and number of multitrait phenotypes. (A): The number of multitrait phenotypes increases when environmental quality increases. (B): The number of multitrait phenotypes increases when the environmental quality increases until reaching a maximum number of strategies. (C): The number of multitrait phenotypes has a maximum in intermediate-quality environments..... **217**

Figure 25. Schematic representation of experimental design. The experiment consists of two parts: In the first part (Part 1), the populations are exposed for 90 growth cycles to two different levels of CO₂: ambient CO₂ (430 μ atm. CO₂) and high CO₂ (2000 μ atm CO₂) (Lindberg & Collins, 2020). Part 1 was carried out before the experiments in this study. Only a single strain is shown here for simplicity; the above was repeated for 3 strains, with 3 independent populations per strain per CO₂ history. In the second part (this study), populations were grown for three weeks at low light (LL) or high light (HL) under the following environmental conditions (see Table 9): Control, Reduced nutrients (RN), High temperature (HT) and High CO₂ (HCO₂). Traits measurements and co-culture experiments were conducted at the end of the three week period. (See Figure 26 for co-culture details).. **135**

Figure 26. Co-culture experiment in microwell plates using ThinCert membranes. Samples were cultured in wells divided by a semi-permeable membrane (ThinCert). Control experiments were inoculated with the same strain inside/outside the membrane. Co-culture experiments were inoculated with cells of the same strain with different evolutionary histories (high-evolved or ambient-evolved). **138**

Figure 27. Population growth rates of *C. reinhardtii* in each experimental environment (C: control; HT: High temperature; RN: Reduced nutrients; HCO₂: High CO₂) in the LL (Column A) and HL (Column B). The symbols represent evolutionary history: ambient-CO₂-evolved populations (circles) and high-CO₂-evolved populations (squares). Each symbol represents an independently-evolved replicate population of a given strain, with three independent replicate measurements per independently-evolved population (mean $\pm \sigma$, n = 3). **141**

Figure 28. Principal Component Analysis (PCA) of the multitrait phenotypes of strains under different environmental conditions (A: ambient-evolved populations, B: high-evolved populations; all strains). Analysis based on the trait values for: *GPR*, *R*, *CUE*, size, *Chl* and ROS. The three principal components here explain 77% and 85% of the variance for A and B respectively. **143**

Figure 29. Relationship between PCA ellipse volume and population growth rate. PCA ellipse volume corresponds to the space that contains all populations of a common evolutionary history in each environment (3 populations for each of 3 strains) with 95% confidence. **144**



Índice de Tablas

Tabla 1. Análisis de fluctuación para determinar el mecanismo de resistencia de la cepa MaAVc de la cianobacteria <i>Microcystis aeruginosa</i> a salinidad. ^a se perdió un cultivo del “set” 1 mientras se realizó el experimento; *** $p < 0.0001$	62
Tabla 2. Número de días (<i>t</i>) y número de generaciones (<i>g</i>) requeridas para crecer bajo una concentración creciente de NaCl durante los ciclos del experimento de trinquete. Se realizaron tres experimentos que diferían en la concentración inicial (de 0 a 3, de 0 a 4,5 y de 0 a 6,8 g L ⁻¹ NaCl). El sombreado gris en el aumento de la concentración de NaCl de 6,8 a 10,1 g L ⁻¹ corresponde al rango que incluye la dosis letal inicial (ver Figura 4).	63
Tabla 3. Comparación de los valores de los parámetros de la curva <i>NPR-I</i> y <i>ETR-I</i> según las ecuaciones de Edwars y Walker (1983) y Platt <i>et al.</i> (1980), respectivamente, para las células sensibles y resistentes a salinidad en BG11-50% sin adicción de sal (<i>M. aeruginosa</i>) mediante la prueba <i>t</i> de Student.	66
Tabla 4. Aumento de la tolerancia a salinidad con respecto a la dosis letal inicial (expresada en porcentaje) de las tres cepas de <i>M. aeruginosa</i> después de realizar el experimento de trinquete lento y rápido (Figura 10). Entre paréntesis se muestra el número de cultivos que superaron la dosis letal inicial ($n = 12$).	82
Tabla 5. Tasa de crecimiento (<i>m</i>) de las células sensibles en medio BG11-50%, y de las células resistentes a salinidad después de los experimentos de trinquete, cultivadas durante 15 días en BG11-50% (m_1) y después de ser transferidas a BG11-50% con 9,1 g L ⁻¹ NaCl (cepa Ma1Vc) o 13,6 g L ⁻¹ NaCl (cepas Ma5Vc y MaAVc) (m_2). Las diferencias significativas se obtuvieron mediante la prueba de Kruskal-Wallis (<i>H</i>). Las letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por la prueba post-hoc de Mann-Whitney entre los valores de <i>m</i> . Los datos son la media $\pm \sigma$ ($n = 3$ y 4 para células sensibles y resistentes a salinidad, respectivamente).....	84
Tabla 6. Pendientes obtenidas del ajuste lineal de los diferentes parámetros fotosintéticos a bajas irradiancias (todos ellos adimensionales) de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc de <i>Microcystis aeruginosa</i> . Las diferencias significativas de las pendientes para las células sensibles y resistentes a salinidad se obtuvieron mediante la prueba F (F-test).....	85

Tabla 7. Modelo lineal generalizado (regresión de Poisson; $\chi^2= 33.33$, $gl= 11$, $p = 2,61 \times 10^{-7}$) aplicado al estudio del efecto de la tasa de deterioro (niveles del factor: constante y progresivo), modo de dispersión (niveles del factor: sin dispersión, local y global), y concentración salina (covariable continua) sobre el número medio de eventos de RE en las poblaciones de *M. aeruginosa* tras 4 semanas expuestas a condiciones letales de salinidad..... **105**

Tabla 8. Parámetros fotosintéticos derivados de las curvas *NPR-I* y *ETR-I* de las cepas sensibles y resistentes a herbicidas de cada especie. Las diferencias significativas entre los parámetros se detectaron mediante un ANOVA y el test de Tukey, las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los datos son medias $\pm \sigma$ ($n = 4$). Unidades: α^{NPR} ($\text{nmol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^6 \cdot \text{células}^{-1} [\text{mmol} \cdot \text{fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]^{-1}$; α^{ETR} ($\text{mol e}^- [\text{mol fotones}]^{-1}$). **124**

Table 9. Details of environments used in the experiment. Units: CO2 level (μatm); Temperature ($^\circ\text{C}$); Nutrients (percentage with respect to the control); LL/HL (continuous photon flux $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)..... **135**

Table 10. Summary of effect sizes and significance levels of three-way ANOVAS for effects of genotype, experimental environment and previous history on the growth rate (*m*), gross photosynthesis rate (*GPR*), respiration (*R*), size, relative chlorophyll autofluorescence per cell (*Chl*) reactive oxygen species production (ROS) and carbon use efficiency (*CUE*) after the experiment. Asterisks represent significance level: < 0.001 ‘***’; < 0.001 ‘**’; < 0.01 ; ‘*’ < 0.05 . All data of each ANOVA are in Table S1 (Annexed 2)..... **142**

Table 11. Results of indirect co-culture experiments. Comparison between expected winners (higher frequency strain based on growth in monoculture) and observed winner in co-culture experiment (higher frequency strain observed in co-culture) (see Annexed 2 Figure S2).. **147**

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Tasa de crecimiento (m).....	52
Ecuación 2. Concentración celular de <i>M. aeruginosa</i> (CC_m).....	52
Ecuación 3. Tasa de mutación (μ)	54
Ecuación 4. Frecuencia de alelos resistentes en poblaciones salvajes (q).....	55
Ecuación 5. Coeficiente de selección (s)	55
Ecuación 6. Número de generaciones (g).....	56
Ecuación 7. Ajuste de Edwards & Walker (1983) para <i>NPR</i>	59
Ecuación 8. Tasa de transporte de electrones (<i>ETR</i>)	59
Ecuación 9. Rendimiento cuántico efectivo del PSII	59
Ecuación 10. Ajuste de Platt <i>et al.</i> (1980) para la <i>ETR</i>	59
Ecuación 11. Ajuste de los valores de m de la cepa MaAVc a concentraciones crecientes de salinidad.....	60
Ecuación 12. Amortiguamiento fotoquímico (q_p).....	79
Ecuación 13. Fluorescencia mínima de muestras preincubadas en luz (F'_0).....	79
Ecuación 14. Amortiguamiento no fotoquímico (q_N).....	79
Ecuación 15. Parámetro $Y(NO)$	79
Ecuación 16. Parámetro $Y(NPQ)$	79
Ecuación 17. Parámetro de amortiguamiento no fotoquímico (<i>NPQ</i>).....	79
Ecuación 18. Ajuste de los valores de m de la cepa Ma1Vc a concentraciones crecientes de salinidad.....	80
Ecuación 19. Ajuste de los valores de m de la cepa Ma5Vc a concentraciones crecientes de salinidad.....	80
Ecuación 20. Número de eventos de rescate evolutivo en metapoblaciones de <i>M. aeruginosa</i> expuestas a salinidad en función de la tasa de deterioro y el tipo de dispersión	105
Ecuación 21. Concentración celular de <i>C. reinhardtii</i> (CC_c).....	116
Ecuación 22. Concentración celular de <i>D. chlorelloides</i> (CC_d)	116
Ecuación 23. Carbon use efficiency (<i>CUE</i>).....	136
Ecuación 24. Growth rate response.	138
Ecuación 25. variation in m_c of ambient - evolved populations.....	145
Ecuación 26. variation in m_c of high - evolved populations.....	145



ANEXOS



Anexo 1. Información complementaria de los organismos experimentales

Los organismos experimentales que se utilizaron en los diferentes experimentos corresponden a dos especies de microalgas verdes y una especie de cianobacteria. A continuación, se detalla la clasificación de dichos organismos, imágenes de los mismos y la composición del medio de cultivo BG11-50%.

Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing

Reino Eubacterias

Phylum Cyanobacteria

Clase Cyanophyceae

Subclase Oscillatoriophycidae

Orden Chroococcales

Familia Microcystaceae

Género Microcystis

Cepas Ma1Vc-Ma5Vc-MaAVc

Chlamydomonas reinhardtii P.A.Dangeard

Reino Plantae

Phylum Chlorophyta

Clase Chlorophyceae

Orden Chlamydomonadales

Familia Chlamydomonadaceae

Género Chlamydomonas

Cepa ChlaA

Dictyosphaerium chlorelloides (Nauman) Komárek & Perman

Reino Plantae

Phylum Chlorophyta

Clase Trebouxiophyceae

Orden Chlorellales

Familia Chlorellaceae

Género Dictyosphaerium

Cepa Dc1M



Figura A1. Imágenes de los organismos experimentales estudiados en la Tesis: A) Células individuales de cianobacteria *M. aeruginosa* obtenidas mediante FlowCam; B) Células individuales de la microalga *C. reinhardtii* obtenidas mediante FlowCam; C) Células individuales de la microalga *D. chlorelloides* obtenidas mediante FlowCam.

Tabla A1. Composición del medio de cultivo BG11-50%

Componente	Concentración (M)
Ácido cítrico	$1,56 \times 10^{-5}$
Citrato férrico-amónico	$1,5 \times 10^{-5}$
NaNO ₃	$0,88 \times 10^{-2}$
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	$0,875 \times 10^{-4}$
MgSO ₄ ·7H ₂ O	$1,52 \times 10^{-4}$
CaCl ₂ ·2H ₂ O	$1,225 \times 10^{-4}$
Na ₂ CO ₃	$0,945 \times 10^{-4}$
Na-EDTA	$1,395 \times 10^{-6}$
Metales traza	
H ₃ BO ₃	$2,32 \times 10^{-5}$
MnCl ₂ ·4H ₂ O	$4,58 \times 10^{-6}$
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	$3,93 \times 10^{-7}$
CuSO ₄ ·5H ₂ O	$1,58 \times 10^{-7}$
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	$0,81 \times 10^{-6}$
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	$0,85 \times 10^{-7}$

Anexo 2. Supplementary information of chapter 6

Esta Información se encuentra disponible en:

Melero-Jiménez, I. J., Flores-Moya, A., Collins, S. (accepted-21-Dec-2020). The role of changes in environmental quality in multitrait plastic responses to environmental and social change in the model microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecology and Evolution*. DOI: 10.1002/ece3.7179

Anexo 3. Artículos publicados en revistas de impacto



Adaptation of the toxic freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to salinity is achieved by the selection of spontaneous mutants

Ignacio José Melero-Jiménez ,* Elena Martín-Clemente , María Jesús García-Sánchez , Antonio Flores-Moya  and Elena Bañares-España 

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

SUMMARY

The cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* causes most of the harmful toxic blooms in freshwater ecosystems. Some strains of *M. aeruginosa* tolerate low-medium levels of salinity, and because salinization of freshwater aquatic systems is increasing worldwide it is relevant to know what adaptive mechanisms allow tolerance to salinity. The mechanisms involved in the adaptation of *M. aeruginosa* to salinity (acclimation vs. genetic adaptation) were tested by a fluctuation analysis design, and then the maximum capacity of adaptation to salinity was studied by a ratchet protocol experiment. Whereas a dose of 10 g NaCl L⁻¹ completely inhibited the growth of *M. aeruginosa*, salinity-resistant genetic variants, capable of tolerating up to 14 g NaCl L⁻¹, were isolated in the fluctuation analysis experiment. The salinity-resistant cells arose by spontaneous mutations at a rate of 7.3×10^{-7} mutants per cell division. We observed with the ratchet protocol that three independent culture populations of *M. aeruginosa* were able to adapt to up to 15.1 g L⁻¹ of NaCl, suggesting that successive mutation-selection processes can enhance the highest salinity level to which *M. aeruginosa* cells can initially adapt. We propose that increasing salinity in water reservoirs could lead to the selection of salinity-resistant mutants of *M. aeruginosa*.

Key words: adaptation, fluctuation analysis, *Microcystis aeruginosa*, ratchet experiment, salinity.

INTRODUCTION

When organisms are exposed to a low selective pressure, adaptation is achieved by modifications of gene expression occurring in hours to days (i.e. acclimation). However, when the limit of physiological adaptation is surpassed, survival is only possible if new mutations that confer resistance emerge (Sniegowski & Lenski 1995; Hughes 1999). A modification of the classic evolutionary experiment of Luria-Delbrück (1943), the fluctuation analysis, is a suitable approach to disentangle the mechanisms (physiological vs. genetic) involved in the adaptation process. In fact, this approach has been successfully applied to study the adaptation of cyanobacteria and microalgae to an extensive array of selective agents (Costas *et al.* 2001, 2007, 2014; López-Rodas *et al.* 2001, 2007, 2008a, 2008b, 2009, 2011; Marvá *et al.* 2010, 2014; Carrera-Martinez *et al.* 2011; Romero *et al.* 2012; Fernández-Arjona *et al.* 2013; Baselga-Cervera *et al.* 2016a, 2016b).

However, experimental assays evaluating the maximum capacity of an organism to adapt to a given selective agent have not been reported until recently (Reboud *et al.* 2007; Romero *et al.* 2012; Huertas *et al.* 2010, 2011; Rouco *et al.* 2014).

Salinity is rising in freshwater bodies worldwide due to many human activities, such as agriculture and water extraction from the phreatic layer in coastal areas (Williams 2001; Nielsen *et al.* 2003; Kundzewicz *et al.* 2008; Cañedo-Argüelles *et al.* 2016). Seawater intrusion also contributes to salinity increase in freshwater bodies (Werner & Gallagher 2006). Among freshwater phytoplankton species, the cosmopolitan cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing is responsible for most toxic blooms in eutrophic waters (Oberholster *et al.* 2004). The harmful effects of *M. aeruginosa* blooms can affect humans and domestic animals as well as wildlife in freshwater and brackish ecosystems (Falconer 1999; Carmichael *et al.* 2001; Žegura *et al.* 2003; Lehman *et al.* 2004; Ibelings & Havens, 2008; Ger *et al.* 2009, 2010; Miller *et al.* 2010; Acuña *et al.* 2012). It has been suggested that artificially increased salinity in freshwater reservoirs could be a useful strategy to reduce *M. aeruginosa* growth (Verspagen *et al.* 2006). However, several strains of *M. aeruginosa* can tolerate salinities ≤ 10 g NaCl L⁻¹, up to 14 g NaCl L⁻¹ (Preece *et al.* 2017). It must be highlighted that previous studies on the effect of increased salinity on *M. aeruginosa* assessed the physiological or biochemical responses of cells after only a few generations under the experimental conditions (Otsuka *et al.* 1999; Orr *et al.* 2004; Verspagen *et al.* 2006; Tonk *et al.* 2007; Martínez de la Escalera *et al.* 2017). Nevertheless, the possible emergence of resistance of *M. aeruginosa* to salinity, based on selection of new genetic variants arising by spontaneous mutations, has not been previously addressed.

The aim of this work was to analyze the adaptation of *M. aeruginosa* to increased salinity based on two experimental evolutionary approaches. Initially, we focused on identification of the salinity adaptation mechanism, i.e. acclimation (based on the expression of genes already present in the populations) vs. adaptation (achieved by selection of cell variants arising by genetic mutations). Since in these experiments we found that the resistance of *M. aeruginosa* to salinity exceeded the initial lethal doses, we then carried out a ratchet experiment in order

*To whom correspondence should be addressed.

Email: imelero@uma.es

Communicating Editor: Ulf Karsten

Received 10 June 2018; accepted 15 December 2018.



ORIGINAL RESEARCH

The limit of resistance to salinity in the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* is modulated by the rate of salinity increase

Ignacio José Melero-Jiménez | Elena Martín-Clemente |
María Jesús García-Sánchez | Elena Bañares-España | Antonio Flores-Moya

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

Correspondence

Ignacio José Melero-Jiménez, Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain.
Email: imelero@uma.es

Funding information

Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España, Grant/Award Number: CGL2017-87314-P; Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España, Grant/Award Number: BES-2015-072984 CGL2014-53862-P

Abstract

The overall mean levels of different environmental variables are changing rapidly in the present Anthropocene, in some cases creating lethal conditions for organisms. Under this new scenario, it is crucial to know whether the adaptive potential of organisms allows their survival under different rates of environmental change. Here, we used an eco-evolutionary approach, based on a ratchet protocol, to investigate the effect of environmental change rate on the limit of resistance to salinity of three strains of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Specifically, we performed two ratchet experiments in order to simulate two scenarios of environmental change. In the first scenario, the salinity increase rate was slow (1.5-fold increase), while in the second scenario, the rate was faster (threefold increase). Salinity concentrations ranging 7–10 gL⁻¹ NaCl (depending on the strain) inhibited growth completely. However, when performing the ratchet experiment, an increase in salinity resistance (9.1–13.6 gL⁻¹ NaCl) was observed in certain populations. The results showed that the limit of resistance to salinity that *M. aeruginosa* strains were able to reach depended on the strain and on the rate of environmental change. In particular, a higher number of populations were able to grow under their initial lethal salinity levels when the rate of salinity increment was slow. In future scenarios of increased salinity in natural freshwater bodies, this could have toxicological implications due to the production of microcystin by this species.

KEYWORDS

adaptation, Cyanobacteria, environmental deterioration rate, ratchet protocol, salinity

1 | INTRODUCTION

The response of organisms to increasing selection pressure initially occurs through the modification of gene expression during a period

extending from hours to few days (i.e., acclimation; Bradshaw & Hardwick, 1989; Fogg, 2001). However, the selective pressure could keep increasing exceeding the physiological limits of the organism. As increasing selection pressure threatens population extinction,

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Ecology and Evolution* published by John Wiley & Sons Ltd.



The role of changes in environmental quality in multitrait plastic responses to environmental and social change in the model microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Ignacio J. Melero-Jiménez^{1*}, Antonio Flores-Moya¹, Sinéad Collins².

¹Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

²Institute of Evolutionary Biology, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

Journal: Ecology and Evolution (In Production), **DOI:** 10.1002/ece3.7179

***Corresponding author** E-mail address: imelero@uma.es (Ignacio J. Melero-Jiménez)

Abstract

Intraspecific variation plays a key role in species' responses to environmental change; however, little is known about the role of changes in environmental quality (the population growth rate an environment supports) on intraspecific trait variation. Here, we hypothesize that intraspecific trait variation will be higher in ameliorated environments than in degraded ones. We first measure the range of multitrait phenotypes over a range of environmental qualities for three strains and two evolutionary histories of *Chlamydomonas reinhardtii* in laboratory conditions. We then explore how environmental quality and trait variation affect the predictability of lineage frequencies when lineage pairs are grown in indirect co-culture. Our results show that environmental quality has the potential to affect intraspecific variability both in terms of the variation in expressed trait values, and in terms of the genotype composition of rapidly growing populations. We found low phenotypic variability in degraded or same-quality environments and high phenotypic variability in ameliorated conditions. This variation can affect population composition, as monoculture growth rate is a less reliable predictor of lineage frequencies in ameliorated environments. Our study highlights that understanding whether populations experience environmental change as an increase or a decrease in quality relative to their recent history affects the changes in trait variation during plastic responses, including growth responses to the presence of conspecifics. This points towards a fundamental role for changes in overall environmental quality in driving phenotypic variation within closely-related populations, with implications for microevolution.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, environmental quality, intraspecific variation, maximum growth rate, carbon dioxide, temperature, light, carbon use efficiency, photosynthesis, reactive oxygen, plasticity



Tesis Doctoral

Ignacio José Melero Jiménez

2021

