

APROXIMACIONES GENÓMICAS Y SU UTILIDAD EN LA IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN ADAPTACIÓN LOCAL EN ECTOTERMOS, CON ÉNFASIS EN HERPETOFAUNA

GENOMIC APPROACHES AND THEIR USEFULNESS IN THE IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN LOCAL ADAPTATIONS IN ECTOTHERMS, WITH AN EMPHASIS ON HERPETOFAUNA

Luis Pastenes^{1*}, Marcela Salazar-Viedma^{2,3}, Alejandro Zúñiga^{4,5} & Marta Fuentealba¹

¹Laboratorio de Genética y Microevolución, Departamento de Biología y Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Católica del Maule. Avenida San Miguel #3605, Talca, Chile.

²Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile. Cinco Poniente #1670, Talca, Chile.

³Departamento de Genética y Ecología Molecular, Fundación Biota Integra. Vilches Alto, km 67 s/n, San Clemente, Chile.

⁴Departamento de Ciencias Químicas y Biológicas, Universidad Bernardo O'Higgins. General Gana #1702, Santiago, Chile.

⁵Instituto de Ciencias Naturales, Universidad de Las Américas. Manuel Montt #948, Santiago, Chile.

*Correspondence: lpastenes@ucm.cl

Received: 2024-03-11. Accepted: 2024-05-10. Published: 2024-08-06.

Editor: Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea, México.

Uno de los desafíos de la biología evolutiva es comprender los procesos y mecanismos de la adaptación local. Kawecki y Ebert (2004) definen la adaptación local como “*El cambio genético que ocurre en una población en respuesta a una presión selectiva localizada geográficamente*” (Cuadro 1). En este sentido, los estudios de adaptación local aportan información trascendente acerca del poder de la selección natural sobre el flujo génico y otros mecanismos evolutivos, pero además, permiten evaluar hipótesis evolutivas acerca de los rasgos que son favorecidos por factores ambientales específicos.

Los ambientes naturales son a menudo heterogéneos, aunque una condición ambiental local persistente puede imponer selección divergente, por lo que las poblaciones desarrollarán diferencias en sus características fenotípicas, proporcionando una mayor adecuación biológica (*fitness*) bajo esos entornos particulares. De este modo, la adaptación local suele ser estudiada en organismos que exhiben diferencias fenotípicas en ambientes específicos, es decir, en poblaciones que exhiben variación geográfica (Whitman & Ananthakrishnan, 2009; Barrett & Hoekstra, 2011). En ectotermos, por ejemplo, la temperatura ha sido descrita como un factor determinante asociado con la

adaptación local, por lo que se espera encontrar diferencias en los rasgos de historia de vida (Cuadro 2) de poblaciones que viven en ambientes que contrastan térmicamente (Laurila et al., 2002; Méndez & Correa-Solis, 2009; Terribile et al., 2009; Grorud-Colvert & Sponaugle, 2011; Orizaola et al., 2013; por mencionar algunos).

Ahora bien, numerosos estudios han evaluado adaptación local en ambientes particulares, no obstante, los fundamentos genéticos que subyacen a tal respuesta adaptativa aún no se han dilucidado. Por ende, se hace necesario identificar aquellos mecanismos genéticos que determinan este tipo de respuesta y, de esta manera, comenzar a develar una serie de interrogantes evolutivas (e.g. ¿Cuántos genes influyen en estas respuestas? ¿Cuáles son sus tamaños de efectos relativos y cuáles muestran evidencia de evolución no-neutral? ¿Qué agentes evolutivos mantienen la variación en esos *loci*? ¿Ambientes similares favorecen a los mismos genes, o es posible lograr un fenotipo similar con diferentes mecanismos genéticos?). Para avanzar en estas respuestas, un requisito previo es poder identificar los genes que influyen en los rasgos de importancia evolutiva. Además, estas preguntas deben ser respondidas en un número



Cuadro 1: Adaptación local

La heterogeneidad ambiental, a lo largo de la distribución geográfica de las especies, ejercería presiones selectivas que actuarían para maximizar el *fitness* individual dentro de ambientes específicos (Kawecki & Ebert, 2004). Este proceso se conoce como adaptación local, en el cual individuos de una población local exhiben un *fitness* mayor en su ambiente local, comparado con individuos de una población y ambiente diferentes. Entonces, se argumenta que la selección puede estar contrarrestada por el flujo génico o hacerse menos eficiente por la deriva genética, que las extinciones y recolonizaciones frecuentes pueden obstaculizar el proceso hacia la adaptación local, y que la intensidad o la dirección de la selección en relación a la heterogeneidad ambiental pueden variar temporalmente, favoreciendo a genotipos generalistas y/o a la plasticidad fenotípica en la adaptación local *per-se* (Fraser et al., 2011).

Las condiciones necesarias para que se verifique adaptación local (Kawecki & Ebert, 2004) incluyen: i) flujo génico bajo (de baja dispersión o de alta fidelidad de hábitat), ii) una ventana de variación temporal mayor en la selección, y iii) fluctuaciones pequeñas o insignificantes en la calidad del hábitat y/o donde existan costos o restricciones a la plasticidad. Para estos autores, los criterios a establecer para evidenciar adaptación local son los siguientes:

1. Las poblaciones deben exhibir *fitness* diferentes a través de ambientes diversos.
2. Una población debe exhibir un *fitness* mayor en su ambiente local (o bajo condiciones experimentales parecidas a aquellas del ambiente local) comparado con poblaciones foráneas en el mismo ambiente (criterio "local vs. foráneo").
3. Se debe evidenciar que las diferencias de *fitness* entre las poblaciones tienen una base hereditaria; mientras que los efectos maternos, la plasticidad fenotípica, los efectos de la experiencia previa y los artefactos experimentales deben ser descartados o controlados.

Box 1. Brief explanation of the concept "local adaptation".

Cuadro 1. Cuadro explicativo del concepto "adaptación local".

de organismos que incluyan y se extiendan más allá de los organismos modelo tradicionales, representando así a diversos grupos taxonómicos y distintas historias de vida evolutivas.

En las últimas dos décadas, la accesibilidad a recursos genéticos, tecnologías moleculares de alto rendimiento y enfoques analíticos diversos, han permitido identificar genes

implicados en las bases genéticas de la adaptación local en las poblaciones naturales, direccionando así el estudio de los mecanismos de selección natural (Savolainen et al., 2013; Hoban et al., 2016). En este sentido, Stapley et al. (2010) señalan que durante la búsqueda de genes candidatos, los esfuerzos se deben centrar en el estudio de un conjunto de genes que se sabe están involucrados en una vía que afectan el fenotipo.

Cuadro 2: Rasgos de historia de vida

Según Stearns & Hoekstra (2005), los rasgos de historia de vida son aquellos atributos que están directamente asociados con la reproducción y la supervivencia, incluyendo el tamaño de la cría (o el tamaño a la metamorfosis, en el caso de artrópodos y anfibios), la tasa de crecimiento, la edad y el tamaño a la madurez, el número de descendencia, la frecuencia de reproducción y el período de vida.

Un concepto importante en biología evolutiva es que los rasgos de historia de vida son los componentes principales del *fitness*. El término *fitness* es una abreviatura para “éxito reproductivo”, sin embargo, esta no es una definición muy precisa. Stearns & Hoekstra (2005) lo definen como “el éxito relativo en la vida reproductiva, que incluye la probabilidad de sobrevivir para reproducirse”. Esto implica que un rasgo heredable es favorecido por la selección natural si los individuos que portan ese rasgo tienen un *fitness* promedio superior (o, si se quiere, un éxito reproductivo mayor) que individuos sin ese rasgo (para más detalles ver Stearns, 2000).

Box 2. Brief explanation of the concept “life history traits”.

Cuadro 2. Cuadro explicativo del concepto “rasgos de historia de vida”.

Posteriormente, la secuenciación del gen (o de los genes) en individuos con fenotipos divergentes permitirá identificar mutaciones asociadas con variación adaptativa. Esto significa que sólo será posible proponer genes candidatos de selección en un subconjunto de genes que muestren cambios evolutivos en su expresión génica. Por ello, un enfoque útil en el estudio de los mecanismos genéticos de adaptación en organismos no-modelo, para los que secuencias del genoma completo no están disponibles, consiste en emplear conjuntamente distintas técnicas genómicas para la identificación de genes candidatos de selección.

Dado que experimentamos un acelerado cambio climático, preocupa que las poblaciones adaptadas localmente no puedan adaptarse a estas nuevas condiciones, o bien, que los organismos no tengan la capacidad de migrar a otros lugares donde sortear este clima cambiante y, en consecuencia, no sobrevivan o prosperen en las nuevas condiciones ambientales (Merilä & Hendry, 2014). En este sentido, las herramientas genómicas pueden ayudarnos a evaluar estas inquietudes, permitiéndonos contribuir al desarrollo de estrategias de mitigación en aras de preservar poblaciones, especies, interacciones entre especies y ecosistemas (ver Gracey & Cossins, 2003; Lee & Mitchell-Olds, 2006; Savolainen et al., 2013). Por consiguiente, en este ensayo buscamos exponer el avance de la investigación en genómica

evolutiva, centrándonos en aquellos reportes que muestran evidencia de genes candidatos que permiten evaluar adaptación local en organismos ectotermos no-modelo, con énfasis en herpetozoos.

Por otro lado, no pretendemos profundizar en los fundamentos moleculares que subyacen a las distintas técnicas genómicas existentes (Fig. 1), sino más bien, abordarlas desde el punto de vista de su utilidad concreta en la identificación de genes candidatos de selección para indagar en las causas y los mecanismos de la adaptación local. No obstante, si el lector desea ahondar en detalles técnicos sobre estas aproximaciones genómicas, sugerimos revisar la literatura específica clásica asociada a cada herramienta molecular comentada.

LOCÍ DE RASGOS CUANTITATIVOS (QTL).

Los rasgos cuantitativos son atributos que están bajo control poligénico y que a menudo muestran variación entre o dentro de poblaciones de manera continua (ver Erickson et al., 2004). Se considera que la evolución de atributos importantes que representan evolución adaptativa (e.g. rasgos conductuales, morfológicos o de historia de vida) reflejan la evolución de muchos *loci*. Por ende, resulta interesante examinar las bases genéticas de estos caracteres, incluyendo el número de genes que

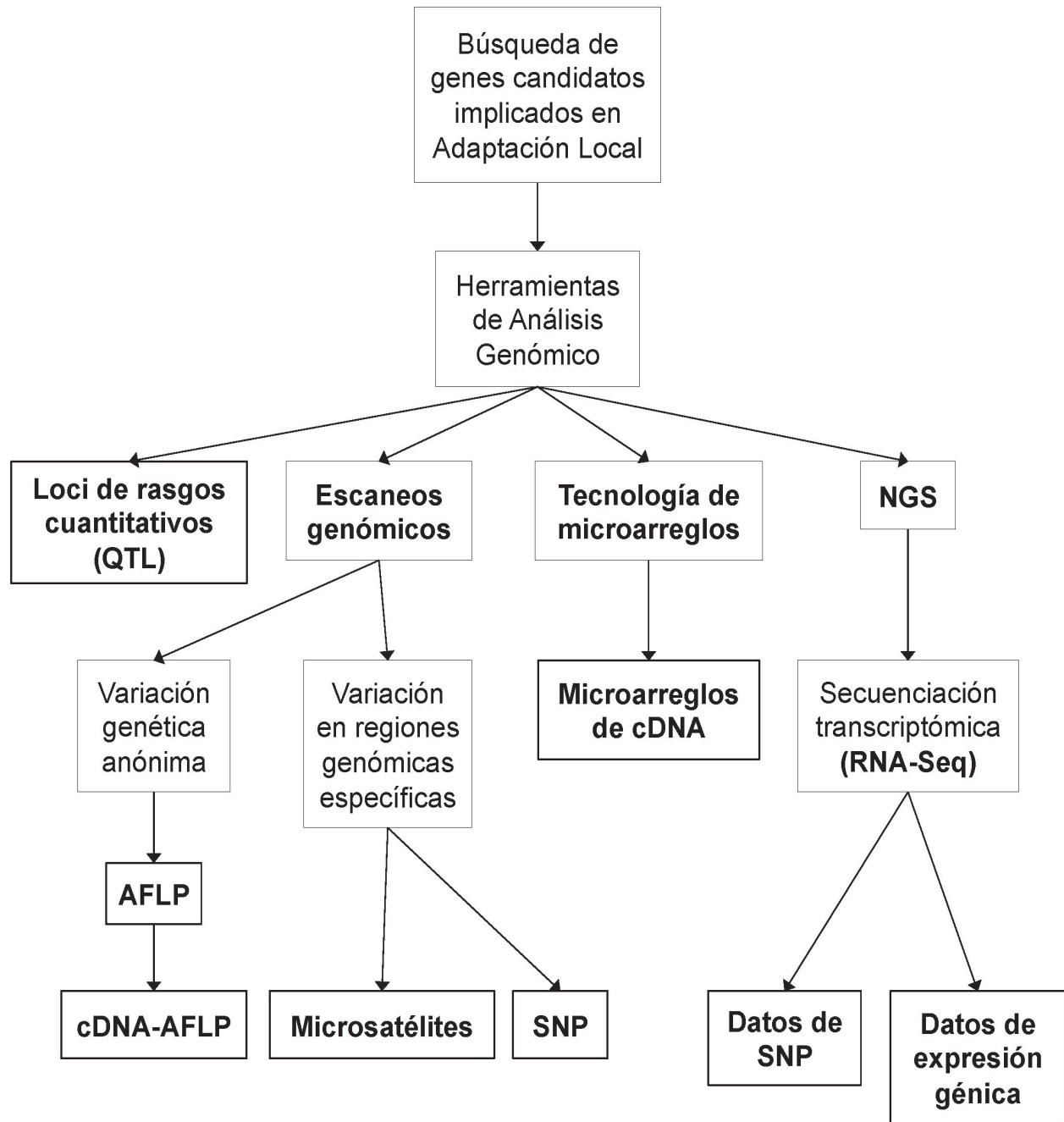


Figure 1. Genomic analysis paths to identify candidate genes for selection (e.g. candidate genes for local adaptation). AFLP, amplified fragment length polymorphisms; cDNA, complementary DNA; NGS, next generation sequencing (e.g. high-throughput sequencing); SNP, single nucleotide polymorphisms; RNA-Seq, RNA sequencing.

Figura 1. Rutas de análisis genómico para la identificación de genes candidatos de selección (e.g. genes candidatos de adaptación local). AFLP, polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados; cDNA, ADN complementario; NGS, secuenciación de próxima generación (e.g. secuenciación masiva); SNP, polimorfismos de nucleótido simple; RNA-Seq, secuenciación de ARN.

afectan a rasgos complejos, los efectos relativos de estos genes y sus modos de expresión génica, que como un todo constituyen la arquitectura genética de los organismos (Liu et al., 2001; Corre & Kremer, 2012).

Los avances tecnológicos en el área de marcadores moleculares y el desarrollo paralelo de programas para el análisis combinado de datos genéticos y fenotípicos, han permitido la aplicación de los QTL en diversos estudios ecológicos y evolutivos. Por ejemplo, Palomar et al. (2019) realizaron un mapeo de QTL para la segregación de rasgos de historia de vida en *Rana temporaria*. El resultado permitió detectar nueve QTL (tres son significativos) para rasgos tales como tasa metabólica, tasa de crecimiento, tiempo de desarrollo y peso en la metamorfosis. Además, el estudio develó regiones genómicas que afectan rasgos de historia de vida en las larvas de anuros, proporcionando de esta manera un recurso valioso para profundizar en las bases genómicas de la evolución de los anfibios.

MARCADORES CONVENCIONALES PARA ESCANEOS GENÓMICOS (AFLP, MICROSATÉLITES Y SNP)

La aplicación de marcadores genéticos tradicionales cubre dos categorías generales: 1) marcadores que detectan variación genética anónima, y 2) marcadores que identifican variación genética en segmentos específicos del genoma. Los primeros incluyen: i) amplificación azarosa de ADN polimórfico (RAPD); ii) polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP); y iii) polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP). La segunda comprende: iv) análisis de sitios de restricción en *loci* específicos de genomas mitocondriales (ADNmt) y cloroplásticos (ADNcp) o en genes nucleares específicos; v) microsatélites en secuencias no-codificantes específicas; y vi) polimorfismos de nucleótido simple (SNP) con variación a lo largo de todo el genoma (e.g. regiones codificantes y no-codificantes, microsatélites, ADNmt y ADNcp). Revisaremos aquellos de más amplio uso en estudios evolutivos.

Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Técnica relativamente barata, fácil, rápida, confiable y de alta resolución que permite generar cientos de marcadores genéticos informativos (ver Vos et al., 1995; Mueller & Wolfenbarger, 1999; Meudt & Clarke, 2007). La característica clave es su capacidad para examinar simultáneamente muchas regiones diferentes del ADN, distribuidas aleatoriamente a través del genoma. Los AFLP muestran ser útiles en la evaluación de diferencias genéticas entre individuos, entre poblaciones e independientemente entre linajes evolutivos, tales como especies (Mattersdorfer et al.,

2012). Su principal desventaja es la dificultad en la identificación de marcadores homólogos (alelos), haciéndola menos útil en estudios que requieren la asignación precisa de estados alélicos (e.g. análisis de heterocigosidad) (Bonin, 2008). Un método alternativo derivado es el ADNc-AFLP, el cual permite el análisis de transcriptomas y no requiere datos previos de secuencias de ADN. Esta técnica, utilizada exitosamente en muchos organismos diferentes (ver Ouborg & Vriezen, 2007), logra determinar de manera precisa los perfiles de expresión génica debido al análisis cuantitativo de las intensidades de las bandas amplificadas. Asimismo, permite la detección de genes escasamente expresados y la determinación de diferencias sutiles en la actividad transcripcional, haciendo factible estudiar cambios evolutivos a nivel de expresión génica y permitiendo encontrar y examinar posibles genes candidatos involucrados en la adaptación local.

Esta aproximación genómica resulta ser relevante, pues ha permitido estudiar el impacto del cambio climático en la biodiversidad, actuando como una herramienta útil al definir políticas de conservación y manejo de poblaciones. En este sentido, Milá et al. (2010) utilizaron marcadores AFLP para examinar la estructura genético-poblacional del tritón *Calotriton asper* en cuatro arroyos principales de los Pirineos franceses. La variación en 382 *loci* AFLP fue alta y reveló un patrón claro de aislamiento por distancia, consistente con la restricción a largo plazo del flujo génico en tres escalas espaciales: entre los cuatro arroyos principales, entre sitios dentro de los arroyos, y entre poblaciones adyacentes (separadas por <4 km). Más recientemente, Han et al. (2018) emplearon AFLP de ADNmt para investigar la estructura genético-poblacional del pez *Ammodytes personatus*, el cual se distribuye en diferentes corrientes del Pacífico noroccidental. Los resultados mostraron que *A. personatus* está compuesto por al menos dos especies crípticas divergentes, las cuales se aislaron probablemente en dos eventos durante el Pleistoceno, y en la actualidad poseen un patrón geográfico de distribución característico, exhibiendo adaptaciones locales para enfrentar diferentes condiciones térmicas en estas corrientes oceánicas.

Microsatélites: Estos marcadores son conocidos como repeticiones de secuencia simple (SSR) o repeticiones en tándem cortas (STR). Consisten en motivos de uno a seis nucleótidos repetidos varias veces que tienen un comportamiento mutacional característico (ver Schlotterer & Tautz, 1992; Kelkar et al., 2010). Como consecuencia de sus elevadas tasas de mutación, los SSR son típica y altamente polimórficos, es decir, distintos individuos exhiben variación manifestada como diferencias en el número de repeticiones (Guichoux et al., 2011). Sus ventajas sobre los

SNP (los cuales tienden a ser usados cada vez más) incluyen alta diversidad alélica y relativa facilidad de transferencia metodológica entre especies cercanamente relacionadas. En sus inicios, los SSR mostraron algunos inconvenientes tales como una fase de desarrollo larga y costosa, y un rendimiento relativamente bajo debido a las dificultades de automatización y manejo de datos, especialmente cuando se comparan con los SNP (Guichoux et al., 2011). Sin embargo, la aparición de tecnologías de secuenciación masiva ha permitido que la identificación de SSR sea más barata y rápida. Además, la co-amplificación de múltiples microsátelites en un cóctel único de PCR (e.g. *multiplex*) es mucho más fácil, dado que los productos de múltiples reacciones de amplificación pueden ser combinados en una sola corrida de electroforesis capilar (e.g. *pseudo-multiplexing* o *pool-plexing*) (ver Ghislain et al., 2004).

Utilizando este marcador, Percino-Daniel et al. (2016) estudiaron la diversidad genética de cinco poblaciones de salamandras del género *Ambystoma* en lagos de la Cuenca Oriental de México. Una de las hipótesis fue probar si las poblaciones de dos lagos salobres de esta cuenca muestran flujo genético restringido, posiblemente como resultado de una adaptación local a esos microhábitats. Los resultados mostraron que el intercambio genético entre lagos salobres y de agua dulce es insignificante, a pesar del flujo continuo de genes entre lagos de agua dulce, por lo que la evolución de la pedomorfosis en *Ambystoma taylori* probablemente fue favorecida por la adaptación local a condiciones salinas, aumentando así su aislamiento genético. Por otra parte, Shimada et al. (2011) examinaron genes fisiológicamente importantes en el pez *Gasterosteus aculeatus*, los cuales exhiben respuestas transcripcionales en ambientes particulares o en condiciones de desarrollo específicas. Empleando marcadores microsátelites localizados dentro de o cercanamente ligados a genes candidatos, evaluaron la posibilidad de que estos genes hayan estado sujetos a selección direccional y sean responsables de la adaptación local que evidencian algunas poblaciones de esta especie. De todos los loci estudiados, 21 son candidatos de selección direccional (v.g., genes de respuesta térmica), indicando fuertes presiones selectivas en genes fisiológicamente importantes, lo cual sugiere que poseen funciones significativas en la adaptación evolutiva a la heterogeneidad ambiental.

Polimorfismos de nucleótido simple (SNP): Son marcadores atractivos por muchas razones, tales como la disponibilidad de altos números de SNP anotados, tasas de error con bajos puntajes, la relativa facilidad de calibración entre laboratorios (comparados con marcadores basados en longitud) y la capacidad asociada entre laboratorios para reunir conjuntos de datos temporales

y espaciales combinados (ver Garvin et al., 2010). Además, su potencial de genotipado masivo, un modelo de mutación simple y su capacidad de examinar tanto la variación neutral como las regiones bajo selección, ofrecen en los SNP un alcance sin precedentes para la detección amplia de genomas y muestras poblacionales naturales de gran tamaño (ver Helyar et al., 2011).

Al respecto, Jin et al. (2022) examinaron la diferenciación genética del anuro *Microhyla fissipes* a lo largo de clinas geográficas, con el fin de identificar señales de selección direccional que cambian geográficamente con la variación de la temperatura y la precipitación. Los resultados revelaron una diferenciación genética significativa entre poblaciones, detectándose numerosos SNP *outliers* asociados con la variación tanto en la temperatura promedio anual (69 SNP) como en la precipitación (248 SNP). En otra arista, Takeuchi et al. (2019) estudiaron la variación genética del molusco *Pinctada fucata* de 24 poblaciones que se distribuyen entre Japón, China, islas Nansei, Birmania y Cambodia. Se concluyó que existe variabilidad genética efectiva entre las poblaciones, particularmente en dos de ellas (encontraron 66 *loci* correspondientes a 42 secuencias codificantes), y que esta variabilidad se correlaciona con variables ambientales, siendo la temperatura de la superficie marina y la concentración de oxígeno significativas, e indicando que existe adaptación local a condiciones ambientales particulares.

Tecnología de microarreglos (*microarrays*)

Es ampliamente aceptado que la variación en la expresión génica tiene grandes consecuencias funcionales y es un componente importante para la adaptación ambiental en las poblaciones naturales (Oleksiak et al., 2002). Los microarreglos, cuando se emplean en conjunto con técnicas genéticas clásicas y la bioinformática, surgen como una herramienta importante en la generación de datos de expresión génica (ver Schena et al., 1995). Actualmente, existen varias maneras de distribuir sondas de ácidos nucleicos (e.g. marcadas con fluoróforos) en una densidad alta para la exploración de muestras de ARNm etiquetadas. Las dos tecnologías de uso más común son los microarreglos de ADNc (ver Gibson, 2002) y las matrices de oligonucleótidos de expresión (ver Lockhart et al., 1996; Gibson, 2002), pero sólo la primera es generalmente aplicable a organismos no-modelo, pues requiere que sólo una biblioteca grande de ADNc esté disponible como fuente de clones para ser sembrados. Sin embargo, una desventaja de esta tecnología es que presenta un acotado rango dinámico de aplicación, pues no permite detectar y analizar genes con baja expresión, isoformas (variantes por *splicing*) o transcritos desconocidos (Bumgarner, 2013).

Al respecto, Larsen et al. (2008) aplicaron microarreglos de ADNc para estudiar las diferencias de expresión de cuatro genes involucrados en la osmorregulación y estrés de dos poblaciones del lenguado *Platichthys flesus* que se distribuyen en un gradiente de salinidad natural en los mares del Norte y del Báltico. Aunque los genes asociados a los procesos osmorregulatorios se muestran altamente plásticos, se detectó una sobre-expresión de seis veces para el gen *hsp70* en individuos del Mar del Norte, así como diferencias de expresión significativas para el gen *5-aminolevulinato sintasa* en respuesta a diferentes salinidades entre individuos del Norte y del Báltico. Estos resultados sugieren que la expresión génica en los lenguados estaría influenciada por la adaptación a condiciones ambientales locales. Empleando esta misma aproximación, Czypionka et al. (2018) examinaron las causas de la expresión diferencial de 2.800 genes en larvas de *Salamandra salamandra* que habitan arroyos permanentes y estanques efímeros de un bosque de Alemania y cuyos regímenes térmicos difieren notablemente. Los experimentos de temperatura controlada revelaron que el 28% de la divergencia en la expresión genética observada entre las muestras podría atribuirse a la plasticidad relacionada con la temperatura del agua y que los patrones de expresión de sólo un pequeño número de 101 genes se vieron afectados por el genotipo. Estos resultados serían evidencia de que los factores genéticos determinaron la divergencia en la expresión genética entre los ecotipos de estanques y arroyos, pudiendo estar involucrados en la evolución adaptativa de esta especie.

Tecnología de secuenciación masiva (o de alto rendimiento)

La secuenciación de próxima generación (NGS) ha transformado la capacidad de identificar genes que sustentan la adaptación. Según Stapley et al. (2010), la aplicación de esta herramienta genómica en diversas “especies ecológicas modelo” como *Arabidopsis lyrata*, *Heliconius melpomene*, *Littorina saxatilis*, *Coregonus* spp, *Salvelinus namaycush* y *Gasterosteus aculeatus*, permitirá abordar algunas de las preguntas que han intrigado a biólogos evolucionistas durante décadas (v.g., ¿Cuántos genes están involucrados en la adaptación? ¿Qué tipos de variación genética son responsables de la adaptación? ¿La adaptación utiliza la variación genética pre-existente o requiere nuevas mutaciones que surgen seguidas de un cambio ambiental?).

La NGS comprende varias tecnologías diferentes que poseen su propio conjunto de características (e.g. Roche 454®, ABI SOLiD®, Illumina/Solexa®, Ion Torrent® Systems, SMRT® PacBio, Oxford Nanopore® Technologies; para detalles ver Reuter et al., 2015). Un atributo destacado de las tecnologías NGS es que generan enormes cantidades de datos de secuencias a través de las aproximaciones genómica o transcriptómica. En esta última,

ADNc es producido a partir de ARNm desde un tejido o etapa de vida específicos, para luego construir bibliotecas de ADNc y proceder con la secuenciación transcriptómica (e.g. *RNA-Sequencing* o *RNA-Seq*). Los ensayos RNA-Seq son muy versátiles, ya que permiten un rango más amplio de aplicaciones (Stark et al., 2019). Al respecto, dos estrategias importantes son: i) El estudio de la expresión diferencial de genes (análisis similar al de los microarreglos), donde se busca detectar diferencias de expresión genética producto de condiciones o tratamientos contrastantes; y ii) el ensamble transcriptómico *de novo*, cuyo objetivo es generar transcriptomas de referencia para organismos no-modelo (de los cuales no existe información disponible en las bases de datos genéticas públicas) de manera rápida y a un costo no muy alto.

En lo que respecta a estudios de especiación ecológica, se han utilizado escaneos genómicos amplios para indagar en la asociación entre aislamiento poblacional y especiación. Por ejemplo, Singhal et al. (2022) condujeron un análisis *ddRAD-Seq* en Illumina HiSeq 4000 para estudiar la relación entre el aislamiento poblacional y la tasa de especiación de varias especies del orden Squamata (e.g. lagartos y serpientes) muestreadas en el extenso bioma Neotropical sudamericano. La cuantificación de la estructura genómica poblacional en el conjunto de taxa co-distribuidos mostró que los patrones de formación de especies a gran escala están desacoplados de los procesos demográficos y genéticos que promueven la formación de poblaciones aisladas, sugiriendo que la variabilidad interespecífica en la propensión al aislamiento tiene poca influencia en las tasas de especiación de esos taxa.

En el caso de la tecnología *RNA-Seq*, Pastenes et al. (2017) indagaron en las bases genéticas de la adaptación local térmica en una población del sapo andino *Rhinella spinulosa* que habita en los arroyos geotérmicos de El Tatio, Chile, comparándola con otra población que habita en arroyos de agua fría. Larvas de ambas poblaciones fueron expuestas a temperaturas contrastantes (25 vs. 20 °C). Esta comparación evidenció 194.469 SNP, 1.507 genes bajos selección positiva y 1.593 genes diferencialmente expresados. La búsqueda bioinformática para genes candidatos reveló un total de 70 genes implicados en la respuesta adaptativa de la población del hábitat geotérmico, la cual también evidencia disminución de la plasticidad transcripcional y variación genética reducida. En otro estudio, Campbell-Staton et al. (2018) investigaron los cambios de expresión génica del lagarto *Anolis carolinensis* al ser expuesto a condiciones térmicas contrastantes. Se indagó en los mecanismos adaptativos de tolerancia térmica de lagartos provenientes de diferentes poblaciones en un transecto latitudinal, midiendo su tolerancia al frío, la tasa

metabólica, el tamaño del corazón y la concentración sanguínea de lactato. Los resultados mostraron que la tolerancia al frío depende en parte de la zona geográfica de origen. Lagartos de zonas más templadas poseen plasticidad adaptativa mayor a la esperada si son expuestos a un periodo de aclimatación, contrario a lo que pasa con otros lagartos de este género.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A pesar de la numerosa evidencia de adaptación local en diversos taxones (e.g. vertebrados e invertebrados, e incluso plantas), las bases genéticas que subyacen a esta respuesta adaptativa aún no se han develado por completo. Las herramientas moleculares disponibles para la exploración de genomas o transcriptomas completos permiten localizar genes involucrados en la variación del *fitness* y en los mecanismos de adaptación, utilizando a especies silvestres como organismos no-modelo. Además, estas tecnologías reforzarán los estudios genómicos a nivel poblacional, evolutivo y de conservación, facilitando el análisis simultáneo de un gran número de genes a lo largo de todo el genoma, conduciendo así a la identificación de *loci outliers* involucrados en selección, los cuales llamaremos blancos genéticos o “genes candidatos de selección”.

El enfoque más apropiado para el estudio de los mecanismos genéticos de adaptación en organismos no-modelo, para los que secuencias del genoma completo no están disponibles, consiste en utilizar conjuntamente distintas técnicas genómicas para la identificación de genes candidatos de selección. Estas aproximaciones han sido empleadas con éxito en la identificación de genes candidatos de adaptación local en diversos organismos ectotermos. Además, los estudios genómicos en especies no-modelo se ha favorecido al existir recursos genómicos disponibles para una especie relacionada (e.g. especie de referencia genómica). Actualmente, el incremento en el número de proyectos de secuenciación de genomas completos significará que los llamados organismos ecológicos modelo alcanzarán el *status* de “modelo genético”, pudiendo conducir estudios genómicos en las áreas de ecología, evolución y conservación.

LITERATURA CITADA

Barrett, R. & H. Hoekstra. 2011. Molecular spandrels: tests of adaptation at the genetic level. *Nature Reviews Genetics* 12:767-780.

Bonin, A. 2008. Population genomics: a new generation of genome scans to bridge the gap with functional genomics. *Molecular Ecology* 17:3583-3584.

Bumgarner, R. 2013. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Current Protocols in Molecular Biology* 101:22.1.1-22.1.11.

Campbell-Staton, S.C., A. Bare, J.B. Losos, S.V. Edwards & Z.A. Cheviron. 2018. Physiological and regulatory underpinnings of geographic variation in reptilian cold tolerance across a latitudinal cline. *Molecular Ecology* 27:2243-2255.

Corre, V.L. & A. Kremer. 2012. The genetic differentiation at quantitative trait loci under local adaptation. *Molecular Ecology* 21:1548-1566.

Czypionka, T., D.J. Goedbloed, S. Steinfartz & A.W. Nolte. 2018. Plasticity and evolutionary divergence in gene expression associated with alternative habitat use in larvae of the European Fire Salamander. *Molecular Ecology* 27:2698-2713.

Erickson, D.L., C.B. Fenster, H.K. StenØien & D. Price. 2004. Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. *Molecular Ecology* 13:2505-2522.

Fraser, D.J., L.K. Weir, L. Bernatchez, M.M. Hansen & E.B. Taylor. 2011. Extent and scale of local adaptation in salmonid fishes: review and meta-analysis. *Heredity* 106:404-420.

Garvin, M.R., K. Saitoh & A.J. Gharrett. 2010. Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Molecular Ecology Resources* 10:915-934.

Gibson, G. 2002. Microarrays in ecology and evolution: a preview. *Molecular Ecology* 11:17-24.

Gracey, A.Y. & A.R. Cossins. 2003. Application of microarray technology in environmental and comparative physiology. *Annual Review of Physiology* 65:231-259.

Grorud-Colvert, K. & S. Sponaugle. 2011. Variability in water temperature affects trait-mediated survival of a newly settled coral reef fish. *Oecologia* 165:675-686.

Guichoux, E., L. Lagache, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Léger, O. Lepais, C. Lepoittevin, T. Malausa, E. Revardel, F. Salin & R.J. Petit. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11:591-611.



- Han, Z., Z. Wang, T. Gao, T. Yanagimoto & K. Iida. 2018. Assessing the Speciation of a Cold Water Species, Japanese Sand Lance *Ammodytes personatus*, in the Northwestern Pacific by AFLP Markers. *Animals* 8:224-240.
- Helyar, S.J., J. Hemmer-Hansen, D. Bekkevold, M.I. Taylor, R. Ogden, M.T. Limborg, A. Cariani, G.E. Maes, E. Diopere, G.R. Carvalho & E.E. Nielsen. 2011. Application of SNPs for population genetics of non-model organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources* 11(s1):123-136.
- Hoban, S., J.L. Kelley, K.E. Lotterhos, M.F. Antolin, G. Bradburd, D.B. Lowry, M.L. Poss, L.K. Reed, A. Storfer & M. Whitlock. 2016. Finding the genomic basis of local adaptation: Pitfalls, practical solutions, and future directions. *The American Naturalist* 188:379-397.
- Jin, L., W.B. Liao & J. Merilä. 2022. Genomic evidence for adaptive differentiation among *Microhyla fissipes* populations: Implications for conservation. *Diversity and Distributions* 28:2665-2680.
- Kawecki, T.J. & D. Ebert. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7:1225-1241.
- Kelkar, Y.D., N. Strubczewski, S.E. Hile, F. Chiaromonte, K.A. Eckert & K.D. Makova. 2010. What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. *Genome Biology and Evolution* 2:620-635.
- Larsen, P.F., E.E. Nielsen, T.D. Williams & V. Loeschcke. 2008. Intraspecific variation in expression of candidate genes for osmoregulation, heme biosynthesis and stress resistance suggests local adaptation in European flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity* 101:247-259.
- Laurila, A., S. Karttunen & J. Merilä. 2002. Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution* 56:617-627.
- Lee, C.E. & T. Mitchell-Olds. 2006. Preface to the special issue: ecological and evolutionary genomics of populations in nature. *Molecular Ecology* 15:1193-1196.
- Liu, H.C., H.H. Cheng, V. Tirunagaru, L. Sofer & J. Burnside. 2001. A strategy to identify positional candidate genes conferring Marek's disease resistance by integrating DNA microarrays and genetic mapping. *Animal Genetics* 32:351-359.
- Lockhart, D.J., H. Dong, M.C. Byrne, M.T. Follettie, M.V. Gallo, M.S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Norton & E.L. Brown. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* 14:1675-1680.
- Mattersdorfer, K., S. Koblmüller & K.M. Sefc. 2012. AFLP genome scans suggest divergent selection on colour patterning in allopatric colour morphs of a cichlid fish. *Molecular Ecology* 21:3531-3544.
- Méndez, M.A. & M. Correa-Solis. 2009. Divergence in morphometric and life history traits in two thermally contrasting Andean populations of *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Journal of Thermal Biology* 34:342-347.
- Merilä, J. & A.P. Hendry. 2014. Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence. *Evolutionary Applications* 7:1-14.
- Meudt, H.M. & A.C. Clarke. 2007. Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP Applications, Analyses and Advances. *Trends in Plant Science* 12:106-117.
- Milá, B., S. Carranza, O. Guillaume & J. Clobert. 2010. Marked genetic structuring and extreme dispersal limitation in the Pyrenean brook newt *Calotriton asper* (Amphibia: Salamandridae) revealed by genome-wide AFLP but not mtDNA. *Molecular Ecology* 19:108-120.
- Mueller, U.G. & L.L. Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution* 14:389-394.
- Oleksiak, M.F., G.A. Churchill & D.L. Crawford. 2002. Variation in gene expression within and among natural populations. *Nature Genetics* 32:261-266.
- Orizaola, G., E. Dahl, A. Nicieza & A. Laurila. 2013. Larval life history and anti-predator strategies are affected by breeding phenology in an amphibian. *Oecologia* 171:873-881.
- Ouborg, N.J. & W.H. Vriezen. 2007. An ecologist's guide to ecogenomics. *Journal of Ecology* 95:8-16.
- Palomar, G., A. Vasemägi, F. Ahmad, A. Nicieza & J.M. Cano. 2019. Mapping of quantitative trait loci for life history traits segregating within common frog populations. *Heredity* 122:800-808.



- Pastenes, L., C. Valdivieso, A. Di Genova, D. Travisany, A. Hart, M. Montecino, A. Orellana, M. Gonzalez, R.A. Gutiérrez, M. Allende, A. Maass & M.A. Méndez. 2017. Global gene expression analysis provides insight into local adaptation to geothermal streams in tadpoles of the Andean toad *Rhinella spinulosa*. *Scientific Reports* 7:1-10.
- Percino-Daniel, R., E. Recuero, E. Vásquez-Domínguez, K.R. Zamudio & G. Parra-Olea. 2016. All grown-up and nowhere to go: paedomorphosis and local adaptation in *Ambystoma* salamanders in the Cuenca Oriental of Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society* 118:582-597.
- Raeymaekers, J.A.M., J.K.J. Van Houdt, M.H.D. Larmuseau, S. Geldof & F.A.M. Volckaert. 2007. Divergent selection as revealed by P(ST) and QTL-based F(ST) in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations along a coastal-inland gradient. *Molecular Ecology* 16:891-905.
- Reuter, J.A., D.V. Spacek & M.P. Snyder. 2015. High-throughput sequencing technologies. *Molecular Cell* 58:586-597.
- Savolainen, O., M. Lascoux & J. Merilä. 2013. Ecological genomics of local adaptation. *Nature Reviews Genetics* 14:807-820.
- Schena, M., D. Shalon, R.W. Davis & P.O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470.
- Schlötterer, C. & D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20:211-215.
- Shimada, Y., T. Shikano & J. Merilä. 2011. A high incidence of selection on physiologically important genes in the Three-spined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Molecular Biology and Evolution* 28:181-193.
- Singhal, S., G.R. Colli, M.R. Grundler, G.C. Costa, I. Prates & D.L. Rabosky. 2022. No link between population isolation and speciation rate in squamate reptiles. *PNAS* 119:e2113388119.
- Stapley, J., J. Reger, P.G. Feulner, C. Smadja, J. Galindo, R. Ekblom, C. Bennisson, A.D. Ball, A.P. Beckerman & J. Slate. 2010. Adaptation genomics: the next generation. *Trends in Ecology & Evolution* 25:705-712.
- Stark, R., M. Grzelak & J. Hadfield. 2019. RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews Genetics* 20:631-656.
- Stearns, S.C. 2000. Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften* 87:476-486.
- Stearns, S.C. & R.F. Hoekstra. 2005. *Evolution: An introduction*. 2nd edition. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Takeuchi, T., T. Masaoka, H. Aoki, R. Koyanagi, M. Fujie & N. Satoh. 2020. Divergent northern and southern populations and demographic history of the pearl oyster in the western Pacific revealed with genomic SNPs. *Evolutionary Applications* 13:837-853.
- Terribile, L.C., M.A. Olalla-Tárraga, J.A.F. Diniz-Filho & M.A. Rodríguez. 2009. Ecological and evolutionary components of body size: geographic variation of venomous snakes at the global scale. *Biological Journal of the Linnean Society* 98:94-109.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijmans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Whitman, D.W. & A.A. Agrawal. 2009. What is phenotypic plasticity and why is it important? p.1-63. En D.W. Whitman & T.N. Ananthkrishnan (Eds.). *Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences*. CRC Press, Enfield, New Hampshire, USA.

