

BIODIVERSIDAD INTRAESPECÍFICA EN ANFIBIOS EN SISTEMAS MONTAÑOSOS – IMPLICACIONES EVOLUTIVAS Y DE CONSERVACIÓN EN EL PARQUE NACIONAL DE PICOS DE EUROPA

JOSÉ MANUEL CANO ARIAS¹, ALFREDO G. NICIEZA², GEMMA PALOMAR³, LETICIA VIESCA⁴,
CHIKAKO MATSUBA⁵

RESUMEN

Mediante secuenciación genómica y medición de variación en expresión génica, hemos caracterizado un gran número de marcadores y regiones genómicas relacionados con rasgos ligados a historia de vida en poblaciones de anfibios. Estos marcadores abren la puerta para la determinación de unidades de conservación a escala intraespecífica, no solo en toda la red de parques nacionales de España, sino en toda el área de distribución de la rana bermeja (*Rana temporaria*). Comparando poblaciones de origen térmico y altitudinal contrastados hemos encontrado unos 2000 genes expresados diferencialmente, identificado polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en genes relacionados con funciones metabólicas y respuesta inmune, detectado 112 SNPs con extrema divergencia alélica y se han localizado loci ligados a caracteres fenotípicos (QTL) con alto valor adaptativo.

Dada la elevada homología genética entre anfibios, estos recursos pueden ser transferibles a otras especies estrechamente emparentadas (e.g. *Rana iberica* y *Rana pyrenaica*), presentes también en la red de parques nacionales.

Palabras clave: Conservación, genómica, *Rana temporaria*, anfibios, loci de caracteres cuantitativos, polimorfismos de nucleótido simple, QTL, SNP, adaptación local.

¹ Unidad Mixta de Investigación en Biodiversidad, Universidad de Oviedo-Campus de Mieres. Ed. de Investigación 5ª Planta, C/ Gonzalo Gutiérrez Quirós sn, 33600-Mieres, Asturias. Teléfono: +35 840 02 11532. E-mail: canoarias@gmail.com

² Unidad Mixta de Investigación en Biodiversidad, Universidad de Oviedo-Campus de Mieres. Ed. de Investigación 5ª Planta, C/ Gonzalo Gutiérrez Quirós sn, 33600-Mieres, Asturias. Teléfono: 985 10 47 88. E-mail: agnic@uniovi.es

³ Unidad Mixta de Investigación en Biodiversidad, Universidad de Oviedo-Campus de Mieres. Ed. de Investigación 5ª Planta, C/ Gonzalo Gutiérrez Quirós sn, 33600-Mieres, Asturias. Teléfono: 985 10 30 00 (ext. 5935). E-mail: gemma.palomar@yahoo.es

⁴ Unidad Mixta de Investigación en Biodiversidad, Universidad de Oviedo-Campus de Mieres. Ed. de Investigación 5ª Planta, C/ Gonzalo Gutiérrez Quirós sn, 33600-Mieres, Asturias. Teléfono: 985 10 30 00 (ext. 5939). E-mail: viescaleticia@gmail.com

⁵ Unidad Mixta de Investigación en Biodiversidad, Universidad de Oviedo-Campus de Mieres. Ed. de Investigación 5ª Planta, C/ Gonzalo Gutiérrez Quirós sn, 33600-Mieres, Asturias. Teléfono: 985 10 30 00 (ext. 5934). E-mail: chikako.matsuba@live.com

INTRASPECIFIC AMPHIBIAN BIODIVERSITY IN MOUNTAIN SYSTEMS – EVOLUTIONARY AND CONSERVATION IMPLICATIONS FOR THE PICOS DE EUROPA NATIONAL PARK

ABSTRACT

By whole genome sequencing, and measurement of differential gene expression, we found a large number of genomic regions and markers related to life history traits in amphibians. These markers allow the characterization of conservation units at intraspecific level, not only within the network of Spanish national parks but in all the distribution range of the common frog (*Rana temporaria*). We found ca. 2000 differentially expressed genes in populations from contrasting thermal/altitudinal origins. We identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes related to metabolic functions and immune response. We identified 112 SNPs with extreme divergence among high and low altitude populations. We also located quantitative trait loci (QTL) linked to life history traits.

These molecular resources are highly transferable, due to the high genetic homology, to closely related species (e.g. *Rana iberica* and *Rana pyrenaica*) inhabiting within the network of Spanish national parks.

Keywords: Conservation, genomics, *Rana temporaria*, amphibians, quantitative trait loci, single nucleotide polymorphisms, QTL, SNP, local adaptation.

INTRODUCCIÓN

La determinación de unidades de conservación a gran escala es una tarea compleja, especialmente si el objetivo es establecer qué unidades hay que conservar a nivel intraespecífico. La dificultad radica en que los procesos de adaptación local, que son el motor que genera la divergencia entre poblaciones de una especie, son de difícil estimación. Idealmente habría que identificar y medir el grado de diferenciación en rasgos que influyan en la eficacia biológica (i.e. producción de descendientes a lo largo del ciclo vital). Sin embargo, dentro de una misma especie, esos rasgos no siempre pueden identificarse con una examinación externa de los individuos, requiriendo de complejos métodos de medición. Por ejemplo, las poblaciones de anfibios que habitan en ambientes diferenciados en cuanto a las

oportunidades de crecimiento (e.g. de orígenes térmicos y/o altitudinales contrastados) presentan una marcada divergencia en tasas de crecimiento y de desarrollo (LAUGEN et al., 2003; CANO et al., 2004).

Ante semejante reto se ha optado por métodos indirectos, como el uso de marcadores genéticos con variación neutral, para detectar unidades evolutivas significativas. Tradicionalmente, los marcadores más empleados han sido secuencias de ADN mitocondrial y microsatélites (FRANKHAM et al., 2002). Desgraciadamente, ese tipo de marcadores tiende a reflejar diferencias de origen histórico (i.e. ADN mitocondrial) o demográficos (i.e. microsatélites) que no tienen por qué estar directamente relacionadas con procesos de divergencia evolutiva/adaptación local (CRANDALL et al., 2000; CANO

et al., 2008). Es más, estas limitaciones para informar sobre cambios evolutivos recientes son especialmente problemáticas en el contexto actual de cambio climático.

Las tasas recientes de calentamiento acelerado suponen una amenaza de gran importancia dada su repercusión global y el elevado ritmo al que las actividades humanas modifican el medio natural. Las respuestas ecológicas al cambio climático reciente son ya claramente visibles en la fenología, fisiología, rangos de distribución y la composición/dinámica de las comunidades (BROOK et al., 2008). Por lo tanto, para medir la distribución de la biodiversidad a escala intraspecífica, se necesitan métodos que informen sobre la capacidad de las poblaciones para responder a cambios ambientales (CHEVIN et al., 2010).

Existe una amplia evidencia de que los procesos microevolutivos son comunes en poblaciones naturales, permitiendo adaptarse a cambios ambientales en unas pocas generaciones (HENDRY & KINNISON 2001, GIENAPP et al., 2008). Dichos cambios evolutivos rápidos implican que las poblaciones están diferenciadas genéticamente por el efecto de la selección natural divergente (REUSCH & WOOD 2007), formando unidades localmente adaptadas merecedoras de un estatus especial de conservación. Sin embargo, condicionantes logísticos inherentes a los estudios de genética cuantitativa para estimar la variación genética aditiva (i.e. la determinante a corto plazo del potencial evolutivo) impiden su aplicación a una escala macroecofisiológica (NIKIMMAA & WASER 2007; e.g. en un número representativo de poblaciones en el Parque Nacional de Picos de Europa). Ahora que las técnicas de secuenciación de “última generación” son más accesibles, es posible localizar polimorfismos genéticos funcionales relacionados con rasgos de historia de vida y fisiología (ELLEGREN 2008, STORZ & WHEAT 2010, WHEAT 2010). Los patrones de variación en esos po-

limorfismos pueden usarse para detectar divergencia adaptativa entre poblaciones ligada a las condiciones ambientales a gran escala. Es más, la caracterización de genotipos funcionales raros puede usarse para determinar el valor de conservación de las poblaciones (BONIN et al., 2007).

Los anfibios son el taxón más amenazado entre todos los vertebrados, al borde de la sexta extinción masiva (STUART et al., 2004; WAKE & VREDENBURG 2008). Especialmente vulnerables son las poblaciones de altitudes elevadas, ya que suelen tener tamaños efectivos pequeños resultando en una menor capacidad para desplegar una respuesta adaptativa a cambios ambientales bruscos (LANDE 1982; LANDE 1988). Además, las poblaciones que habitan en los límites de su nicho fisiológico han sufrido fuertes procesos selectivos, resultando en genotipos localmente adaptados y con poca variabilidad para hacer frente a cambios futuros (HOFFMANN & PARSONS 1997).

Rana temporaria es una especie ampliamente distribuida por toda Europa y que ha sido muy estudiada en el contexto de la biología evolutiva. Sus poblaciones están localmente adaptadas a ambientes fríos —como los montanos— acelerando su tasa de desarrollo como respuesta a la corta estación de crecimiento (LAUGEN et al., 2003). Se ha demostrado que esos patrones adaptativos están causados por la acción de la selección direccional (CANO et al., 2004) aunque sus implicaciones fisiológicas y sus posibles consecuencias respecto a su capacidad para tolerar un calentamiento acelerado están por dilucidar (SØRENSEN et al., 2009).

La destrucción del hábitat y la emergencia de nuevos patógenos (en sinergia con el calentamiento) están causando una oleada de extinciones de anfibios. Existe, pues, un riesgo obvio de que los efectos directos ligados al presente incremento de temperaturas puedan causar una

segunda ola de extinciones a medio o largo plazo. También existe evidencia de que los efectos negativos del calentamiento serán más severos en especies o poblaciones especializadas en microclimas fríos (BERNARDO & SPOTILA 2006), tales como ambientes montanos o en los límites de su rango de distribución, ya que los reducidos niveles de variación genética (debidos a selección direccional severa) y los tamaños de población pequeña pueden resultar en mayores limitaciones fisiológicas y genéticas (HOFFMANN & PARSONS 1997). Todos estos factores de riesgo confluyen en las poblaciones de *Rana temporaria* en el Parque Nacional de Picos de Europa.

El presente trabajo caracteriza la biodiversidad relacionada con adaptación a ambientes montanos de la rana bermeja (*Rana temporaria*) mediante el uso de técnicas transcriptómicas y mapeado genético. El objetivo es sentar las bases de futuros programas de monitorización de variación funcional dentro de especies, evaluando el potencial de los métodos genómicos recientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio comprende tres tareas complementarias: 1) Estudio de la expresión génica relacionada con la adaptación a calentamiento rápido (medición de niveles de producción de ácido ribonucleico mensajero o ARNm), 2) localización de los genes involucrados en las adaptaciones a ambientes montanos (relacionados con tasa de desarrollo y metabolismo mediante mapeo de rasgos cuantitativos o QTL) y 3) caracterización de los polimorfismos genéticos mediante escaneados genómicos.

Transcriptoma y expresión génica

El objetivo es establecer si dos poblaciones de rana bermeja (*Rana temporaria*) procedentes de franjas altitudinales contrastadas activan genes

en diferente medida como respuesta a incrementos de temperatura repentinos. Las poblaciones seleccionadas fueron Áliva (43°10'41.62" N, 4°45'53.51" O; 1462 m.s.n.m.; Cantabria) en el Macizo Oriental de los Picos de Europa, y Viango (43°22'13.76" N, 4°48'13.46" O; 471 m.s.n.m.; Asturias), al norte de la Sierra del Cuera y en el entorno del parque. Estas dos poblaciones experimentan ambientes térmicos contrastados, siendo más frío en Áliva (menores valores de temperaturas medias y mínimas, mayor oscilación térmica, mayor periodo de cobertura nival).

Durante la primavera de 2012 se procedió a la captura de parentales en ambas poblaciones. Se realizó la fertilización artificial de huevos para cada población por separado y de híbridos. Se obtuvieron 4 familias de hermanos completos para cada tipo de cruce (Viango x Viango, Áliva x Áliva y Viango x Áliva) y se usaron 2 descendientes por cada familia (n = 24). Los descendientes se mantuvieron en el laboratorio a 16 °C y, al alcanzar las larvas el estadio 34 (GOSNER 1960) se sometió a un choque térmico (34 °C) a la mitad de los individuos (i.e. uno por familia; en lo sucesivo larvas tratamiento frente a las larvas control, que no experimentaron choque térmico) y se muestreó el tejido 30 minutos después. Estas muestras se procesaron con las plataformas Roche 454 e Illumina HiSeq para secuenciar el transcriptoma y cuantificar los niveles de ARNm respectivamente. El secuenciado del transcriptoma se realizó a partir del tejido de una larva de Viango. La variación en cantidad de ARN transcrito se estimó a partir del total de las larvas (i.e. 24 larvas). Para el ensamblado del transcriptoma de la larva de Viango se usaron los programas Newbler (MARGULIES et al., 2005) y Trinity (GRABHERR et al., 2011). Para la cuantificación de niveles de ARN mensajero transcrito se usó el programa Bioconductor R (GENT-LEMAN et al., 2004).

Mapa de rasgos cuantitativos

Para esta tarea se realizó un cruce artificial entre un macho de la localidad de Candioches en León (1687 m de altitud; 42°59'4.85" N, 5°55'28.77" O) y una hembra de Bárcena Mayor (Cantabria; 551 m de altitud; 43° 7'50.74" N, 4° 10'25.46" O). La familia obtenida se mantuvo en el laboratorio a 14 °C y alimentada *ad libitum*. Para obtener una estima de la tasa de crecimiento, cada larva se pesó una vez a la semana durante 4 semanas (35, 42, 49 y 56 días después de la fertilización). Al llegar al estadio 33 se midieron las tasas metabólicas basales siguiendo la metodología descrita en ÁLVAREZ & NICIEZA (2005), pero controlando el flujo de agua a través de las cámaras de respirometría mediante una bomba peristáltica y registrando el contenido de oxígeno en las cámaras de forma continuada durante un periodo de 5 min; de esta forma se consigue un flujo constante y estimas más precisas de la tasa de consumo de oxígeno. El tiempo de desarrollo se midió como el tiempo desde la fertilización al estadio 42. También se midió el peso corporal en fresco al final del periodo larvario (estadio 42) y al completar la metamorfosis (estadio 46). Todos estos rasgos se midieron para un total de 162 individuos de la misma familia. Al completar la metamorfosis, los animales experimentales se sacrificaron con una sobredosis de benzocaína. Se guardaron muestras de tejido fresco para su genotipado.

Se genotiparon todos los microsatélites publicados para la especie, de los cuales 61 amplificaron y resultaron informativos para la elaboración del mapa de ligamiento. También se secuenció el genoma de los 162 descendientes usando la técnica de ADN asociado a lugares de restricción (i.e. secuenciación RAD, de acuerdo con su acrónimo en inglés), basándonos en el protocolo descrito en ELSHIRE *et al.*, (2011). Se construyó una referencia genómica para anotar SNPs (nucleótidos de polimorfismo simple) a partir los fragmentos de secuencia ensamblados

de los dos individuos parentales. Tras un control de calidad, se combinaron los fragmentos para obtener grupos con un 95% de similitud. Las referencias de estos grupos se ensamblaron con los algoritmos implementados en el software Mira Assembler (CHEVREUX *et al.*, 2004) para dar lugar a cóntigos (unión de fragmentos de secuencia consecutiva). Se mantuvieron aquellos cóntigos con >10 y <1000 reads por individuo (i.e. fragmentos). Cada alelo observado debía tener al menos un 15% de presencia para ser tenido en cuenta. Se desecharon los SNPs fijados en ambos parentales y se anotaron los SNPs restantes en los descendientes. Se realizó otro filtrado eliminando los cóntigos con menos de 200 reads y más de 20.000. Se comprobó que los loci siguieran un patrón de segregación mendeliana. Al final del proceso se obtuvo un total de 7077 SNPs que se usaron para elaborar un mapa de ligamiento combinados con los 61 microsatélites. Se construyó un mapa para cada sexo con el programa MSTmap (WU *et al.*, 2008) y se localizaron los QTL (loci ligados a rasgos cuantitativos) con el programa GridQTL v3.3.0 (SEATON *et al.*, 2006).

Escaneados genómicos

Usando la misma metodología en cuanto a secuenciación usada para el mapa de rasgos cuantitativos, se secuenciaron 60 individuos provenientes de 4 poblaciones (i.e. 15 por población). Las poblaciones de *Rana temporaria* eran provenientes de diferentes ambientes térmicos en la Cordillera Cantábrica. De ambientes fríos en altura se usaron la población de Áliva (Parque Nacional de Picos de Europa) y la de Candioches (Parque Natural de las Ubiñas, Asturias/León). Para detectar diferenciación respecto a poblaciones de ambientes más cálidos y altitud baja, las restantes dos poblaciones fueron Bárcena (Parque Natural del Saja-Besaya, Cantabria) y de Nueva de Llanes (220 m; 43°25'11.12" N, 4°55'18.12" O; vecina al Parque Nacional de Picos de Europa, Asturias). Las mues-

tras provienen de tejido fresco de metamorfos capturados en dichas localidades. Entre los fragmentos de secuencias obtenidos se ensambló de *novο* el genoma de un individuo de la población de Nueva de Llanes, usando el programa Bowtie (LANGMEAD et al., 2009), que se usó como genoma de referencia. El resto de los fragmentos se alinearon respecto a esa referencia para anotar polimorfismos nucleótidos simples (SNPs). La alineación se realizó con el programa SAMtools (LI et al., 2000) y la detección con el programa VCFtools (DANECEK et al., 2011). Se comprobó que los SNPs detectados se ajustaran al equilibrio de Hardy-Weinberg y se estimó qué frecuencias alélicas se separaban significativamente de un patrón de variación neutral con el uso del programa LOSITAN (ANTAO et al., 2008).

RESULTADOS

Transcriptoma y expresión génica

A partir del ADN complementario, secuenciando la descendencia de los cruces intra- e interpopulacionales de Viango y Áliva, se obtuvieron 24 genotecas (cDNA). Las genotecas tuvieron 336485 fragmentos (reads) por muestra, con un tamaño medio por fragmento de ~700 pares de bases. De los 284585 fragmentos que pasaron el filtro de calidad se consiguió ensamblar 152731. Tras el ensamblado se identificaron unas 10000 secuencias relacionadas con genes (isogrupos, isotigos y cóntigos). Se cotejaron las secuencias con el genoma de *Xenopus tropicalis* encontrándose co-

rrespondencias con unos 2000 genes. Cotejados (BLASTs) de los fragmentos con bases de datos más diversas taxonómicamente (i.e. SwissProt) permitieron la detección de más genes. En breve, de un conjunto de 141831 secuencias iniciales se anotaron con éxito 27963 secuencias. Mediante el programa GATK (MCKENNA et al., 2010), se detectaron polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). En Áliva se encontraron 35464 variantes de SNPs y 34032 en Viango. El número de SNPs por muestra, la frecuencia de variantes por pares de bases (bp) y heterocigosis fue similar en las dos poblaciones. En conjunto se contaron 47115 SNPs y se observó que, en promedio, se encuentra un SNP cada 928 bp. La diversidad de nucleótidos por cóntigos se usó para detectar aquellas variantes posiblemente afectadas por selección natural (test de la D de Tajima usando el programa VCFtools; DANECEK et al., 2011). No se encontró ningún cóntigo con valor de D menor que -2. En cambio, se encontraron 26 cóntigos con valores de la D mayores que 2, indicando que tienen una diversidad de nucleótidos mucho mayor de la esperada debido a variación neutral o aleatoria. Esos cóntigos con $D > 2$ se pueden ver en la tabla con la ontología genética anotada según la base de datos SwissProtID (Tabla 1). Algunos cóntigos son heterocigotos en todas las muestras, posiblemente derivados de duplicaciones de genes. Resulta muy interesante el que algunos de esos genes con $D > 2$, y por tanto posiblemente bajo selección natural, están relacionados con funciones metabólicas (genes SASB, CP2R1 y SMAD4; en negrita en la Tabla 1) y respuesta inmune (genes MUC5A y PERM; en cursiva en la Tabla 1).

Tabla 1. Contigs con D de Tajima > 2 , putativamente bajo la acción de selección natural divergente. La ontología genética anotada de los contigs de acuerdo con la base de datos SwissProtID. Genes con funciones metabólicas se han marcado en negrita (SASB, CP2R1 y SMAD4) y de respuesta inmune en cursiva (MUC5A y PERM).

Nombre del contig	SwissProtID	Función
comp50680_c1_seq1	ART2_YEAST	Regulador de transporte celular.
comp64003_c0_seq3	CREB1_BOVIN	Factor de transcripción dependiente de fosforilación. Involucrado en diversos procesos celulares como sincronización de ritmos circadianos y diferenciación de células adiposas.

Nombre del contig	SwissProtID	Función
comp66154_c2_seq2	CP2G1_RABIT	Pertenece al grupo de citocromos P450. Isozima relacionado con olfacción.
comp58521_c0_seq4	SASB_ANAPL	Tioesterasa involucrada en la biosíntesis de ácidos grasos.
comp64067_c3_seq1	CP2R1_HUMAN	Actividad como D-25-hidroxilasa en vitamina D2 y D3.
comp66225_c0_seq1	K2C6A_HUMAN	Heterodímero de queratinas de tipo I y II. Interacciona con TCHP.
comp65297_c0_seq6	SMAD4_RAT	Coactivador y mediador de la transducción de señales del TGF-beta (factor de crecimiento transformante).
comp61675_c0_seq1	CP2G1_RABIT	Pertenece al grupo de citocromos P450. Isozima relacionado con olfacción.
comp61063_c0_seq1	PEX26_MOUSE	Posiblemente participa en la importación de proteínas a peroxisomas.
comp62941_c0_seq2	H4_MYTTR	Histona, componente principal del nucleosoma. Papel crítico en la regulación de transcripción, reparación de ADN, replicación y estabilidad cromosómica.
comp66728_c1_seq2	MUC5A_HUMAN	<i>Glicoproteína que interviene en la formación de geles en los epitelios de los tractos gástricos y respiratorios.</i>
comp21592_c0_seq1	TXN4B_MOUSE	Papel fundamental en splicing de pre-ARNm.
isotig01351	PHS_RAT	Participa en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina. Favorece la actividad transcripcional.
comp62828_c0_seq1	MUC4_RAT	Puede participar en el avance de procesos tumorales. Posiblemente a través de represión de apoptosis.
comp53584_c0_seq1	LAP2A_MOUSE	Involucrada en la organización estructural del núcleo y su ensamblado post mitótico.
comp61440_c0_seq1	HRG1B_XENLA	Hemo transportador que regula la disponibilidad de hemoglobina.
comp58354_c0_seq2	CSGA_MYXXA	Proteína transmisora de señales entre células que se requiere para la formación de esporocarpos. Necesaria para agregación celular, diferenciación de esporas y expresión génica.
comp32794_c0_seq1	GNAI3_CAVPO	Proteína G, interviene como modulador o transductor en sistemas de comunicación entre membranas. Puede tener un papel en la división celular.
comp458387_c0_seq1	PERM_MOUSE	<i>Componente del sistema de defensa de leucocitos polimorfonucleares. Responsable de actividad microbicida frente a gran variedad de organismos.</i>
comp62708_c1_seq1	OLFL3_XENLA	Proteína excretada con un papel fundamental en el desarrollo del patrón dorsoventral en estadios tempranos.
isotig03035	YO84_CAEEL	Desconocida.
comp62904_c4_seq2	DHDDS_HUMAN	Catalizador en procesos de síntesis de glicoproteínas.
comp56996_c1_seq1	GLOD4_RAT	Glioxidasa que interviene en el silenciamiento de genes.
comp64471_c0_seq1	RAB5C_HUMAN	Participa en transporte de proteínas, probablemente en tráfico vesicular.
comp66952_c0_seq2	RAB10_CHICK	Regulador del tipo GTPasa rab que participa en el tráfico intracelular formando y fusionando vesículas de transporte.
comp57235_c0_seq1	SNR40_MOUSE	Componente del complejo de la ribonucleoproteína U5 menor. Cataliza la eliminación de intrones de ARN pre-mensajero.

Combinando los ensamblados de las plataformas 454 Roche e Illumina HiSeq, detectamos 141,831 cóntigos no-redundantes de los cuales, 27,693, se anotaron como genes usando la base de datos Swiss-Prot.

Uno de los aspectos más destacables es que encontramos 16 secuencias con alta homología, correspondientes a péptidos antimicrobiales (AMP en lo sucesivo), ya conocidas en especies de *Ranidae* y relacionadas con la capacidad de defenderse de infecciones. En detalle, las 16 secuencias correspondientes a AMPs comprenden un gen completo: un dominio señalizador altamente conservado y una secuencia no-codificadora (i.e. intrón) ligeramente modificada.

Las secuencias representan los cuatro mayores grupos de AMPs en la rana bermeja (Fig. 1; i.e. temporina, brevinina-2, melittina y ranaciclina-T). Trece de las secuencias han revelado nuevos dominios antimicrobiales (aunque serían necesarias pruebas funcionales para determinar su papel con certeza). La mayoría de estas homología se encontraron en las secuencias obtenidas con la plataforma 454Roche, por ser más largas (200 pares de bases) comparadas con las de Illumina HiSeq (100 pares de bases). En conjunto, nuestro ensamblado genómico (o borrador de genoma) para *Rana temporaria* cubrió un tercio del genoma.

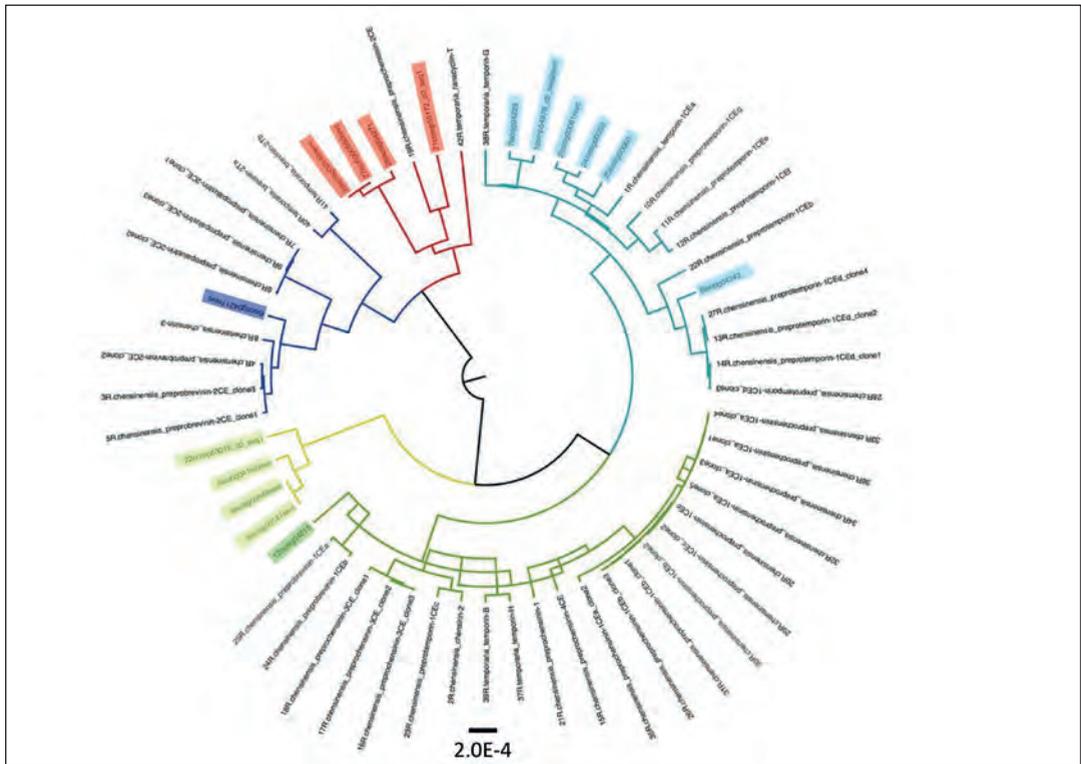


Fig. 1. Árbol filogenético de las secuencias de los transcritos encontradas. Las ramas de los cuatro grupos principales de péptidos antimicrobiales (AMPs) en la rana bermeja se resaltan con fondos de color. En verde: temporinas B, H; en azul claro: emporina-G; en azul oscuro: brevinina-2; en amarillo: péptidos del tipo melittina y en rojo: ranaciclina-T.

En lo referente a los análisis de expresión génica no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones de ambiente frío y cálido en respuesta al tratamiento de choque térmico (Fig. 2). Sin embargo, si se observaron diferencias entre poblaciones con respecto a su origen térmico. La variación en expresión génica parece más restringida en la población de montaña y, en menor medida, en híbridos (Fig. 2).

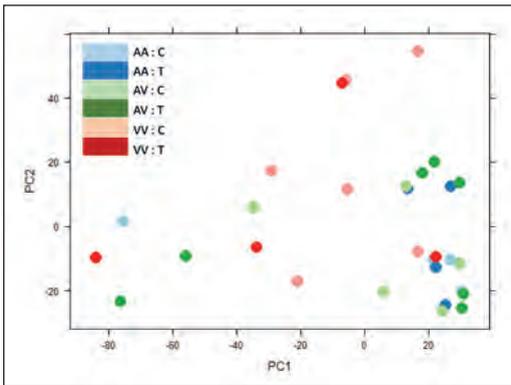


Fig. 2. Gráfico de componentes principales en número de transcripts por individuo a partir de 20000 genes. La variación en expresión génica para todos los genes expresados se resume en 2 componentes principales que capturan ~70% de la variación total. Los códigos para el origen de los individuos son AA, Áliva/Población de Montaña colores azules, color claro temperatura control «C» color oscuro temperatura de choque «T»; AV híbridos de Áliva y Viango en colores verdes; VV, Viango/Población de zona Baja en colores rojos.

Mapa de rasgos cuantitativos

Del total de SNPs informativos, 3593 segregaron para la hembra (que corresponden a la población de Bárcena) y 3129 para el macho (que corresponden a la población de Candioches) y se unieron a los microsatélites para construir el mapa por sexo. Se han obtenido 13 grupos de ligamiento con un total de 3596 marcadores en las hembras y 3105 en los machos. Nues-

tras estimas indican que el mapa de ligamiento para hembras es 1,87 veces mayor que el de machos, siendo el tamaño aproximado de 5708 cM para hembras y 3052 cM para machos. En el mapa para machos se observaron zonas de recombinación nula entre loci en varios grupos de ligamiento (Fig. 4). Por lo tanto, la tasa de recombinación en hembras es aproximadamente el doble que en machos.

Además, el mapa de ligamiento obtenido ha revelado que el grupo de ligamiento que putativamente alberga el sistema de determinación sexual para la especie contiene los mismos microsatélites que están ligados al sexo fenotípico en localidades en Escandinavia y Suiza. Sin embargo, se ha detectado otro cromosoma que puede estar implicado en fenómenos de determinación sexual puesto que presenta una heterocigosis mucho más elevada en machos que en hembras (grupo Rt6 en Fig. 3).

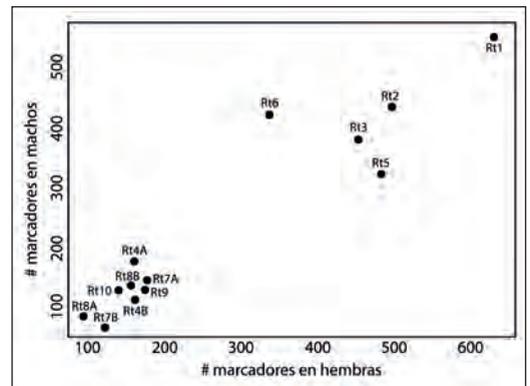


Fig. 3. Número de SNPs de machos frente a hembras para todos los grupos de ligamiento.

Con base en el mapa de ligamiento obtenido en este proyecto se ha elaborado un mapa de rasgos cuantitativos (i.e. QTL) encontrando un total de 12 (tres significativos y nueve potenciales, Tabla 2). Para masa corporal tras la metamorfosis (estadio 46), se ha localizado un QTL significativo en el

grupo de ligamiento Rt7B que explica un 8% de su varianza y dos QTL potenciales en Rt2 y Rt7A. Tanto el análisis del mapa de la hembra como el del macho han identificado un QTL significativo para tasa de crecimiento en Rt6 explicando alrededor de un 8% de la varianza (Tabla 2 y Fig. 4).

Además, el análisis del mapa de la hembra ha encontrado también un QTL potencial para tasa de crecimiento en Rt8A. Para tasa metabólica basal, se han encontrado tres QTL, dos potenciales en Rt6 y Rt10 y uno significativo en Rt4B explicando un 6.5% de su varianza fenotípica.

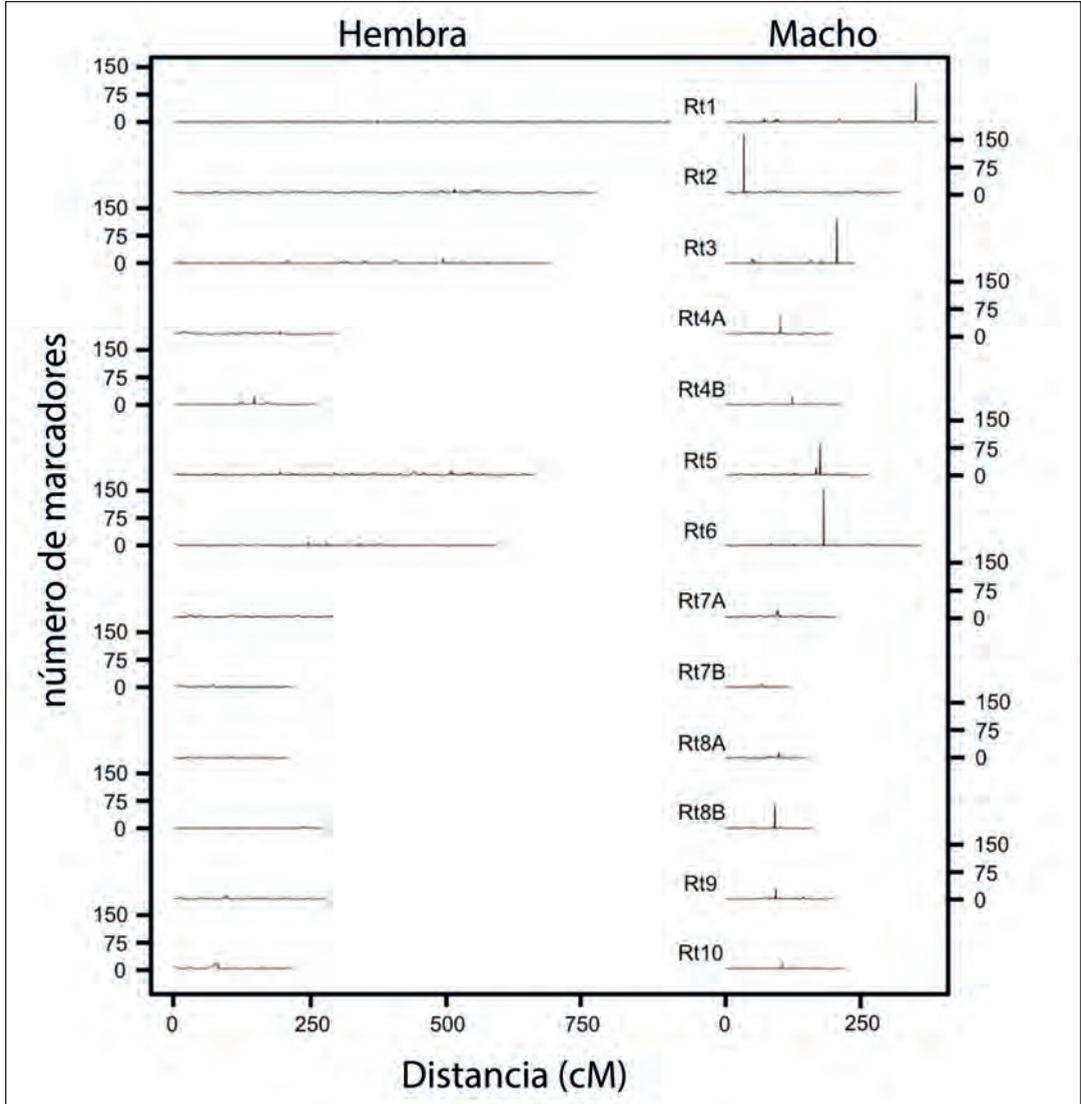


Fig. 4. Recombinação em los dos sexos. A la derecha, el mapa para los grupos de ligamiento (GLs) del macho muestra regiones sin recombinação (i.e. picos con alta densidad de marcadores). A la izquierda la hembra muestra una recombinação uniforme en todos los GLs.

Tabla 2. Lista de QTL encontrados en este trabajo. Se presenta el grupo de ligamiento, el rasgo medido (peso al completar la metamorfosis, stg46; peso al final del periodo larvario, stg42; tiempo de desarrollo, DT; tasa metabólica basal, SMR; tasa de crecimiento, GR), posición dentro del grupo de ligamiento, valor F del QTL y de los niveles de significación 0.05 y 0.01 entre paréntesis, análisis en el que fue identificado, tamaño del efecto y porcentaje de varianza explicada (PVE).

Grupo ligamiento	Rasgo	Posición (cM)	Valor F (0.05-0.01 nivel cromosómico)	Análisis	Efecto	PVE	
Rt2	stg46	651	F=12.62*(10.76-14.35)	hembra	218.3198	180.8728	0.0677
Rt7A	stg46	9	F=7.88*(7.75-11.37)	macho	184.4077	214.7849	0.0413
Rt7B	stg46	127	F=14.88*(8.49-11.92)	hembra	178.7235	220.4691	0.0798
Rt7A	stg42	33	F=10.57*(9.05-12.43)	hembra	332.0811	391.3387	0.0561
Rt3	DT	210	F=10.49*(10.37-13.6)	hembra	79.0043	85.7535	0.0560
Rt7A	DT	33	F=9.77*(8.84-12.23)	hembra	85.9407	78.8171	0.0530
Rt7A	DT	238	F=8.89*(8.79-11.85)a	hembra	85.4629	79.2949	0.0472
Rt4B	SMR	132	F=12.08*(8.26-11.88)	hembra	0.0091	-0.0091	0.0648
Rt6	SMR	387	F=11.36*(10.38-13.33)	hembra	0.0089	-0.0089	0.0608
Rt10	SMR	27	F=8.23*(8.17-11.44)	macho	0.0077	-0.0077	0.0432
Rt6	GR	260	F=17.26*(8.25-11.83)	macho	12.5940	17.4078	0.0917
Rt6	GR	416	F=14.29*(10.12-13.97)	hembra	17.1615	12.8403	0.0763
Rt8A	GR	186	F=8.56*(8.52-12.24)	hembra	16.7379	13.2639	0.0448

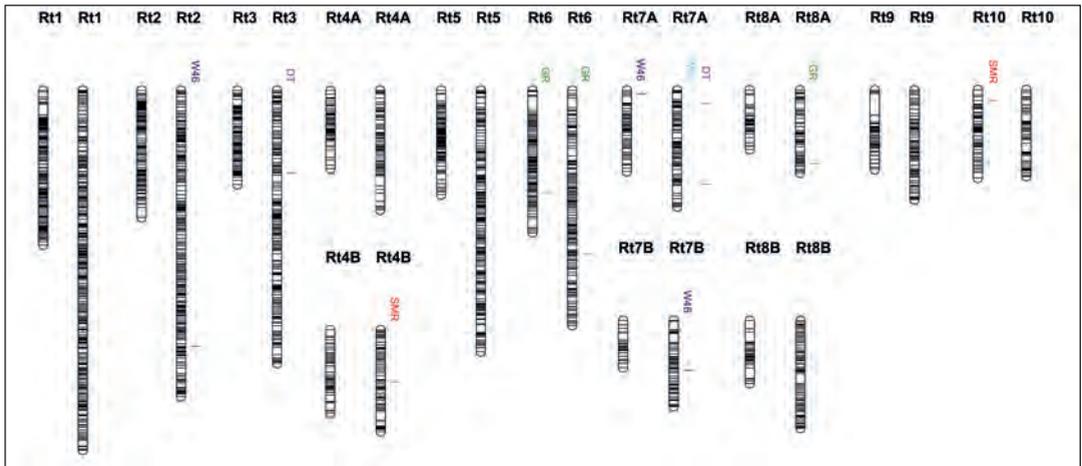


Fig. 5. Mapa de ligamiento, promedio entre sexos, con las posiciones de los QTL detectados. Peso al completar la metamorfosis, stg46; tasa metabólica basal, SMR; tiempo de desarrollo DT.

Un resultado interesante ha sido la identificación de un QTL pleiotrópico que parece con-

trolar peso al final del periodo larvario (estadio 42) y tiempo de desarrollo. Ambos rasgos pre-

tudios experimentales y de campo demuestran que indicadores de divergencia genética neutral (e.g. F_{ST}) no se corresponden con la divergencia adaptativa (LEINONEN *et al.*, 2008), todavía no se han adoptado los nuevos métodos moleculares con vistas a resolver problemas de conservación. Este trabajo demuestra que, con los recursos de un proyecto de investigación medio, se pueden detectar polimorfismos genéticos para caracterización de diversidad adaptativa a gran escala.

Uno de los retos que ha enfrentado este proyecto, y que afecta cualquier estudio semejante con especies silvestres, es la falta de un genoma de referencia. Un genoma de referencia es la secuencia completa, o casi, del genoma de la especie de estudio. Esa referencia es crítica para el ensamblado e identificación (i.e. anotación de genes) de los fragmentos de secuencias generados. En otras palabras, es el molde sobre el que se sitúan los fragmentos obtenidos para unirlos e intentar identificar la función de los genes hallados. Es por eso que gran parte de éste proyecto se ha dedicado a la elaboración de un transcriptoma (secuencia de ARN a partir de secuencias de ADN complementario; es decir, únicamente la fracción del genoma que se traduce en proteínas) y de un genoma (secuencia de ADN a partir de secuencias de ADN genómico; es decir, la secuencia completa se transcriba o no) para la especie de estudio *Rana temporaria*.

Aunque la elaboración del transcriptoma y borrador genómico se plantearon *a priori* como una mera herramienta para ayudar al ensamblado de fragmentos de secuencias de nucleótidos, en la práctica condujo a la identificación de genes importantes relacionados con rasgos de historia de vida. La comparación de los genomas de dos poblaciones geográficamente cercanas (Áliva y Viango, separadas por unos 22 Km) reveló la existencia de más de 40000 polimorfismos nucleótidos únicos. Entre los que se pudo asignar a algún gen conocido, al menos 26

mostraron indicación de haberse diferenciado por la acción de la selección natural divergente. Es especialmente relevante el hecho de que haya genes relacionados con funciones metabólicas y de respuesta inmune (ver Tabla 1). Está bien establecido que *Rana temporaria* es capaz de modificar sus tasas de crecimiento y desarrollo larvarios de acuerdo con las oportunidades de crecimiento en el medio (temperatura y disponibilidad de agua y alimento) (CANO *et al.*, 2004) que a su vez pueden estar ligadas a diferencias en tasas metabólicas (PRIEDE 1985; METCALFE *et al.*, 1995; METCALFE 1998).

Las diferencias altitudinales dentro del Parque Nacional de Picos de Europa bien pueden generar este tipo de procesos adaptativos y de ahí la relevancia de disponer de marcadores que identifiquen divergencia en esos rasgos. Otro tanto puede decirse de los genes involucrados en respuesta inmune, no sólo por la susceptibilidad de los anfibios a patógenos emergentes que están decimando sus poblaciones (SCHLOEGEL *et al.*, 2006; SKERRATT *et al.*, 2007), sino porque también parece haber una relación negativa entre tasas de desarrollo y capacidad inmunológica (GERVASI & FOUFOPOULOS 2008).

El estudio del transcriptoma permitió la anotación de más de 27000 genes entre los cuales destacan 16 genes con función antimicrobial (i.e. para defenderse de las infecciones). Estos genes representan los cuatro mayores grupos de péptidos antimicrobianos en *Rana temporaria* y revelaron 13 dominios antimicrobiales nuevos. En conjunto, dada la longitud de las secuencias obtenidas con la plataforma Roche 454 (i.e. alrededor de 200 pares de bases), el genoma y transcriptoma desarrollados en este proyecto permitirían el desarrollo de marcadores universales para estos genes para *Rana temporaria* y otras especies estrechamente emparentadas. Estos marcadores se encuentran en regiones que muestran divergencia entre poblaciones de altitudes contrastadas, incluso a la escala espa-

cial que afecta al Parque Nacional de Picos de Europa y su entorno inmediato.

Sin embargo, no solo las secuencias genómicas están involucradas en la diferenciación en rasgos fenotípicos. Genes con una secuencia idéntica pueden expresarse en cantidades contrastadas dependiendo de las condiciones ambientales. En el presente trabajo se expuso a un choque térmico a larvas de Viango y Áliva pero no se detectaron diferencias claras en expresión génica debidas a dicho tratamiento. Esta falta de diferencia puede deberse a varias causas. Por una parte, puede que no haya una diferencia real entre las poblaciones en cuanto a expresión génica frente a episodios de calentamiento brusco. Por otra parte, puede que no hayamos sido capaces de detectarla. Esta falta de detección podría ser debida a no haber escogido la etapa en el desarrollo en el que se manifesten diferencias en expresión génica como respuesta a cambios de temperatura. También puede que la respuesta esté presente pero no la hayamos identificado debido a estar enmascarada por la falta de diferencias en expresión en otros genes no involucrados en tolerancia térmica. Hay que tener en cuenta que, debido a la cantidad de tejido necesaria para una secuenciación exitosa, se usó una mezcla de tejido de todo el individuo. Eso implica que la mayoría de genes expresados tienen que ver con funciones metabólicas de mantenimiento y pueden enmascarar diferencias en genes relevantes. Estudios de expresión génica con base en tejidos escogidos (e.g. hígado) serían menos susceptible a ese problema.

No obstante, en los patrones generales de expresión génica se observaron diferencias significativas en cuanto al origen de las larvas independientemente del tratamiento. Las larvas de la población de mayor altitud (Áliva) presentaron unos niveles de expresión génica menores que las larvas de altitud baja (Viango). Las larvas obtenidas al cruzar parentales de Áliva y Viango

presentaron un patrón de expresión génica bajo, similar al de la población de altura. Así, a falta de comprobar la generalidad de este patrón con más poblaciones de altitudes contrastadas, nuestro trabajo indica que puede haber diferenciación en niveles de expresión ligada a adaptación a altura. Es más, el genotipo de las poblaciones altas parece dominar el patrón de expresión génica cuando hibridan con poblaciones bajas. Aunque estos patrones de expresión génica aportan evidencia a la expectación de divergencia genética entre poblaciones de ambientes térmicos contrastados, la complejidad de su interpretación dificulta su aplicación en programas de conservación a corto plazo.

Una forma más directa para medir qué regiones genómicas están ligadas con la variación de rasgos involucrados en procesos de adaptación local es la realización de mapas de rasgos cuantitativos, más conocidos como mapas de QTL por sus siglas en inglés (i.e. quantitative trait loci). Calculando los patrones de segregación de alelos heterocigotos en los padres, podemos establecer las tasas de recombinación en los descendientes. De esta forma se pueden establecer las distancias entre loci y qué loci pertenecen a un mismo cromosoma o grupo de ligamiento. Este proyecto ha obtenido el mapa de ligamiento más completo hasta la fecha para *Rana temporaria*. El mapa se basa en las tasas de recombinación de 7138 marcadores y ha resultado en 13 grupos de ligamiento, que se ajusta a los 13 cromosomas descritos para la especie (SPASIĆ-BOŠKOVIĆ *et al.*, 1997). En lo referente a los aspectos funcionales más relevantes, cabe destacar el grupo de ligamiento Rt1 (Fig. 4). En ese grupo de ligamiento aparecen una serie de marcadores previamente ligados al sexo fenotípico en otras poblaciones europeas (MATSUBA *et al.*, 2008; ALHO *et al.*, 2010; CANO *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013), resultado que indica que es muy probable que el sistema de determinación genética sexual esté muy conservado en toda el área de distribución de la especie.

Como en previos mapas para *Rana temporaria* (CANO *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013; BRELSFORD *et al.*, 2016), la tasa de recombinación en hembras fue mayor que en machos y resultó en un mapa de ligamiento unas dos veces más largo en hembras que en machos. Es de notar que el grupo de ligamiento Rt1, putativamente relacionado con determinación sexual, no muestra una reducción de recombinación en machos mucho más marcada que el resto de los grupos. Este fenómeno va en contra de los modelos clásicos de evolución de cromosoma sexuales heteromórficos (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 2000; CHARLESWORTH *et al.*, 2005) que predicen un colapso de recombinación en el mismo (i.e. el cromosoma Y en el caso de *Rana temporaria*) e indica que en la familia estudiada existe una recombinación significativa en machos incluso en el cromosoma sexual. Este patrón no es único en nuestro estudio ya que también se ha detectado en una población suiza (BRELSFORD *et al.*, 2016). Otro criterio diagnóstico propuesto para la detección de cromosomas sexuales es un marcado exceso de heterocigosis en machos (BRELSFORD *et al.*, 2015). Nosotros lo hemos detectado en el grupo de ligamiento Rt6 (Fig. 3). A falta de comprobaciones más exhaustivas (e.g. correlación de alelos con sexo fenotípico), nuestros resultados apuntan a este cromosoma como candidato a intervenir en los procesos de determinación sexual.

Mientras las tasas de recombinación en hembras son bastante homogéneas en todos los grupos de ligamiento, no ocurre lo mismo en machos ya que presentan zonas sin recombinación en muchos de los grupos de ligamiento (Fig. 4). Los loci localizados en esas zonas sin recombinación tienen un especial interés ya que pueden albergar genes de gran importancia funcional (YEAMAN 2013).

Con base en el mapa obtenido, se estimó la asociación entre variación en rasgos ligados a histo-

ria de vida y frecuencias alélicas. Nuestro mapa ha encontrado al menos 12 regiones genómicas claramente asociadas a los rasgos medidos (QTL). Para todos los rasgos, excepto peso corporal al final del periodo larvario (estadio 42), se ha localizado más de un QTL. El QTL pleiotrópico encontrado entre peso corporal al final de la fase larvaria y tiempo de desarrollo podría explicar la correlación genética y fenotípica a menudo encontrada entre estos dos rasgos (BERVEN & GILL 1983; LAURILA *et al.*, 2002). Hay que notar que, aunque el mapa presentado identifica las zonas genómicas relacionadas con los rasgos de interés, los loci QTL detectados en el mapa no pueden usarse directamente en programas para monitorizar polimorfismos funcionales. Al disponer de una cobertura parcial del genoma con nuestro mapa, no podemos estar seguros de la distancia entre el QTL hallado y el gen que está directamente asociado al rasgo (CANO *et al.*, 2006). El paso siguiente sería el secuenciar las zonas donde se han hallado los QTL y realizar un estudio de desequilibrio de ligamiento a escala fina (MÄKINEN *et al.*, 2008). De esta forma se podría localizar de forma muy precisa que gen, o grupo de genes, está directamente ligado a cada rasgo. En cualquier caso, la presencia de QTL significativos denota que existe una segregación fenotípica con una fuerte base genética en todos los rasgos considerados y que las poblaciones parentales pueden considerarse como unidades evolutivas bien diferenciadas.

La última tarea de este proyecto consistió en un escaneado genómico comparando la variación alélica entre un par de poblaciones de baja altitud y un par de alta montaña en la cordillera cantábrica. El método se basa en comparar los niveles de variación alélica basados en una gran cantidad de polimorfismos de nucleótido simples (SNPs; 1542 en este proyecto) y detectar aquellos que se desvíen significativamente de un patrón de variación neutral. Aquellos SNPs que presenten un grado de divergencia claramente superior

a la neutral son loci que se considera que han divergido por efecto de la selección direccional (BEAUMONT et al., 2005). Esos loci con divergencia extrema pueden usarse directamente para monitorizar el grado de diferenciación adaptativa entre poblaciones de *Rana temporaria* en una escala espacial como la del Parque Nacional de Picos de Europa. Nuestra comparación de poblaciones altas y bajas reveló un total de 112 SNPs posiblemente afectados por selección divergente frente a ninguno cuando se compararon las poblaciones altas entre sí o 14 cuando se compararon solo las bajas. Este patrón indica de manera clara que los ambientes de origen ejercen un fuerte efecto selectivo, generando una divergencia genética significativa entre poblaciones de *Rana temporaria* de altitudes contrastadas. Debido a la corta longitud de los cóntigos con los SNPs divergentes (un promedio de 100 pares de bases) no se pudieron asignar inequívocamente a ningún gen incluido en las bases de datos genómicas actuales. A medida que se vaya completando el borrador del genoma de *Rana temporaria* se podrán ir identificando.

Queremos resaltar el hecho que el descriptor habitual usado para determinar el grado de diferenciación genética entre poblaciones fue muy bajo ($F_{ST} < 0.005$). Un valor tan reducido de divergencia neutral se consideraría tradicionalmente como evidencia de panmixia entre poblaciones y podría dar lugar a recomendaciones de manejo como si se tratase de una población única (FRANKHAM et al., 2002). Nuestra aproximación demuestra que, a pesar de no haber divergencia neutral aparente, las poblaciones sí están diferenciadas de forma significativa en loci relacionados con procesos de adaptación local.

Consideraciones finales

En este proyecto hemos demostrado que poblaciones geográficamente cercanas en el Parque

Nacional de Picos de Europa y zonas limítrofes, presentan un grado de divergencia genética adaptativa importante en función de su origen altitudinal. Por lo tanto, recomendamos que las poblaciones de altura de *Rana temporaria* se consideren como unidades evolutivas significativas objeto de conservación. El éxito de la técnica de secuenciación de ADN asociado a lugares de restricción (i.e. secuenciación RAD) para detectar polimorfismos adaptativos la convierte en una buena herramienta para la monitorización de diversidad intraspecífica. Ya que el método no precisa de marcadores desarrollados para cada especie concreta, y en muchos casos se puede obtener ADN con métodos poco intrusivos, se propone la realización de escaneados genómicos a escalas de paisaje relevantes. Por ejemplo, la distribución de una especie dentro de la red de parques nacionales.

La elevada sintenia (i.e. grado de homología y organización estructural genómica) entre especies de anfibios con tiempos de divergencia elevados (BRELSFORD et al., 2015; BERLSFORD et al., 2016; PALOMAR et al., 2017) indican que los polimorfismos adaptativos encontrados en la anotación del genoma y transcriptoma posiblemente pueden usarse en especies estrechamente emparentadas. En el caso de la red de parques nacionales *Rana iberica* y *Rana pyrenaica* serían buenas candidatas.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Organismo Autónomo de Parques Nacionales por la financiación de este proyecto (Referencia MARM-12-428/2011) y la cooperación y flexibilidad mostradas durante todo el proceso. Queremos también agradecer a Antonio Sánchez Palacio y Cristina García Fernández su ayuda en el trabajo de campo y recogida de datos. También agradecer a Erica Leder y Tiina Sävilammi su ayuda en los análisis de expresión génica y escaneado genómico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHO, J. S.; MATSUBA, C. y MERILÄ, J. (2010): Sex reversal and primary sex ratios in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology* 19: 1763-1773.
- ÁLVAREZ, D. y NICIEZA, A. G. (2005): Is metabolic rate a reliable predictor of growth and survival of brown trout (*Salmo trutta*) in the wild? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62: 643-649.
- ANTAO, T.; LOPES, A.; LOPES, R. J.; BEJA-PEREIRA, A. y LUIKART, G. (2008): LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a Fst -outlier method. *BMC Bioinformatics* 9: 323.
- AYLLÓN, E.; BOSCH, J. y SEVILLA, L. (2010): *Anfibios y reptiles del Parque Nacional de Picos de Europa*. En: Diego, F.J.; Bosch, J.; Ayllón, E.; Hernández, P.L.; Sevilla, L. & Mora, A. (eds.) Serie Técnica. pp189-202. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.
- BARTON, N. H. (2000): Genetic hitchhiking. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355: 1553-1562.
- BEAUMONT, M.A. y BALDING, D. J. (2004): Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology* 13: 969-80.
- BELL, M. A.; AGUIRRE, W. E. y BUCK, N. J. (2004): Twelve years of contemporary armor evolution in a threespine stickleback population. *Evolution* 58: 814-824.
- BERNARDO, J. y SPOTILA, J. R. (2006): Physiological constraints on organismal response to global warming. *Biology Letters* 2: 135-139.
- BERVEN, K.A. y GILL, D. E. (1983): Interpreting geographic variation in life-history traits. *Am Zool* 23(1): 85-97.
- BONIN, A.; NICOLE, F.; POMPANON, F.; MIAUD, C. y TABERLET, P. (2007): Population Adaptive Index: a New Method to Help Measure Intraspecific Genetic Diversity and Prioritize Populations for Conservation. *Conservation Biology* 21: 697-708.
- BRELSFORD, A.; DUFRESNES, C. y PERRIN, N. (2015): High-density sex-specific linkage maps of a European tree frog (*Hyla arborea*) identify the sex chromosome without information on offspring sex. *Heredity* 116: 177-181.
- BRELSFORD, A.; RODRIGUES, N. y PERRIN, N. (2016): High-density linkage maps fail to detect any genetic component to sex determination in a *Rana temporaria* family. *Journal of Evolutionary Biology* 29: 220-225.
- BROOK, B.W.; SODHI, N. S. y BRADSHAW, C. J. (2008): Synergies among extinction drivers under global change. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 453-460.
- CANO, J. M.; LAURILA, A.; PAŁO, J. y MERILÄ, J. (2004): Population differentiation in G matrix structure due to natural selection in *Rana temporaria*. *Evolution* 58: 2013-2020.
- CANO, J. M., MATSUBA, C.; MÄKINEN, H. S. y MERILÄ, J. (2006): The utility of QTL-linked markers to detect selective sweeps in natural populations - a case study of the Eda gene and a linked marker in threespine stickleback. *Molecular Ecology* 15: 4613-4621.
- CANO, J. M.; MÄKINEN, H. S.; LEINONEN, T.; FREYHOF, J. y MERILÄ, J. (2008): Extreme neutral genetic and morphological divergence supports classification of Adriatic threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations as distinct conservation units. *Biological Conservation* 141: 1055-1066.
- CANO, J. M.; LI, M. H.; LAURILA, A.; VILKKI, J. y MERILÄ, J. (2011): First-generation linkage map for the common frog *Rana temporaria* reveals sex-linked group. *Heredity* 107: 530-536.
- CHARLESWORTH, B. y CHARLESWORTH, D. (2000): The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355: 1563-1572.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. y MARAIS, G. (2005): Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95: 118-128.
- CHEVIN, L-M.; LANDE, R. y MACE, G. M. (2010): Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory. *PLoS biology* 8: e1000357
- CHEVREUX, B.; PFISTERER, T.; DRESCHER, B.; DRIESEL, A. J.; MÜLLER, W. E.; WETTER, T. y SUHAI, S. (2004): Using the miraEST Assembler for Reliable and Automated mRNA Transcript Assembly and SNP Detection in Sequenced ESTs. *Genome Research* 14: 1147-1159.

- CRANDALL, K. A.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; MACE, G. M. y WAYNE, R. K. (2000): Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 390-395.
- DANECEK, P.; AUTON, A.; ABECASIS, G.; ALBERS, C. A.; BANKS, E.; DEPRISTO, M. A.; HANDSAKER, R. E.; LUNTER, G.; MARTH, G. T.; SHERRY, S. T.; MCVEAN, G. y DURBIN, R. (2011): 1000 Genomes Project Analysis Group. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27: 2156-2158.
- ELLEGREN, H. (2008): Sequencing goes 454 and takes large-scale genomics into the wild. *Molecular Ecology* 17: 1629-1635.
- ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; POLAND, J. A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E. S. y MITCHELL, S. E. (2011): A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS one* 6: e19379.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D. y BRISCOE, D. A. (2002): Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- GENTLEMAN, R. C.; CAREY, V. J.; BATES, D. M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, LAURENT, GE, Y. C.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRRIZARY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A. J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J. Y. H. y ZHANG, J. H. (2004): Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 5: R80.
- GERVASI, S. S. y FOUFOPOULOS, J. (2008): Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology* 22: 100-108.
- GIENAPP, P.; TEPLITSKY, C.; ALHO, J. S.; MILLS, J. A. y MERILÄ, J. (2008): Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology* 17: 167-178.
- GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N. y REGEV, A. V. (2011): Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29: 644-652.
- GOSNER, K. L. (1960): A simplified table for staging anuran embryos and larvae. *Herpetologica* 6: 183-190.
- HENDRY, A. P. y KINNISON, M. T. (2001): An introduction to microevolution: rate, pattern, process *Genetica* 112: 1-8.
- HOFFMANN, A. A. y PARSONS, P. A. (1997): Extreme Environmental Change and Evolution. Cambridge University Press.
- KAWECKI, T. J. y EBERT, D. (2004): Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7: 1225-1241.
- LANDE, R. (1982): A quantitative genetic theory of life-history evolution. *Ecology* 63: 607-615.
- LANDE, R. (1988): Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241: 1455-1460.
- LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M. y SALZBERG, S. L.: Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10: R25.
- LAUGEN, A. T.; LAURILA, A.; RÄSÄNEN, K. y MERILÄ, J. (2003): Latitudinal countergradient variation in the common frog (*Rana temporaria*) development rates – evidence for local adaptation. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 996-1005.
- LAURILA, A.; KARTTUNEN, S. y MERILÄ, J. (2002): Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution* 56(3): 617-627.
- LEINONEN, T.; O'HARA, R. B.; CANO, J. M. y MERILÄ, J. (2008): Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: A meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1-17.
- LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNEL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R. y 1000 GENOME PROJECT DATA PROCESSING SUBGROUP. (2009): The Sequence Alignment/Map (SAM) Format and samtools. *Bioinformatics* 25: 2078-9.
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L.; JARVIE, T. P.; JRAGE, K. B.; KIM, J. B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHJANI, V. B.; McDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F. y ROTHBERG, J. M. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
- MATSUBA, C.; MIURA, I. y MERILÄ, J. (2008): Disentangling genetic vs. environmental causes of sex determination in the common frog, *Rana temporaria*. *BMC Genetics* 9: 3.

- METCALFE, N. B. (1998): The interaction between behaviour and physiology in determining life history patterns in Atlantic salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 93-103.
- MÄKINEN, H. S.; SHIKANO, T.; CANO, J. M. y MERILÄ, J. (2008): Hitchhiking mapping reveals a candidate genomic region for natural selection in three-spined stickleback chromosome VIII. *Genetics* 178: 453-465.
- METCALFE, N. B.; TAYLOR, A. C. y THORPE, J. E. (1995): Metabolic rate, social status and life-history strategies in Atlantic salmon. *Animal Behaviour* 49: 431-436.
- NIKINMAA, M. y WASER, W. (2007): Molecular and cellular studies in evolutionary physiology of natural vertebrate populations. *Journal of Experimental Biology* 210: 1847-1857.
- MCKENNA, A.; HANNA, M.; BANKS, E.; SIVACHENKO, A.; CIBULSKIS, K.; KERNYTSKY, A.; GARIMELLA, K.; ALTSHULER, D.; GABRIEL, S.; DALY, M. y DEPRISTO, M. A. (2010): The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* 20: 1297-303.
- PALOMAR, G.; AHMAD, F.; VASEMÄGI, A. y CANO, J. M. (2017): Comparative High-Density Linkage Mapping Reveals Conserved Genome Structure but Variation in Levels of Heterochiasmy and Location of Recombination Cold Spots in the Common Frog. *G3-Genes Genomes Genetics* 7(2) DOI: 10.1534/g3.116.036459.
- PRIEDE, I. G. (1985): Metabolic scope in fishes. *Fish Energetics: New Perspectives* (eds) P. Tytler & P. Calow, pp. 33-63. Croom-Helm, London.
- REUSCH, T. B. y WOOD, T. E. (2007): Molecular ecology of global change. *Molecular Ecology* 16: 3973-3992.
- RODRIGUES, N.; BETTO-COLIARD, C.; JOURDAN-PINEAU, H. y PERRIN, N. (2013): Within-population polymorphism of sex-determination systems in the common frog (*Rana temporaria*). *Journal of Evolutionary Biology* 26: 1569-1577.
- ROHR, J. R. y RAFFEL, T. R. (2010): Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 8269-8274.
- SCHLOEGEL, L. M.; HERO, J.-M.; BERGER, L.; SPEARE, R.; McDONALD, K. y DASZAK, P. (2006): The decline of the sharp-snouted day frog (*Taudactylus acutirostris*): the first documented case of extinction by infection in a free-ranging wildlife species? *EcoHealth* 3: 35-40.
- SEATON, G.; HERNANDEZ, J.; GRUNCHEC, J.-A.; WHITE, I.; ALLEN, J.; DE KONING, D. J. *Et al.* (2006): Proceedings of the 8th world congress on genetics applied to livestock production. Belo Horizonte, Brazil, 13-18.
- SKERRATT, L. F.; BERGER, L.; SPEARE, R.; CASHINS, S.; McDONALD, K. R.; PHILLIOTT, A. D.; HINES, H. B. y KENYON, N. (2007): Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4: 125-134.
- STORZ, J. B. y WHEAT, C. B. (2010): Integrating evolutionary and functional approaches to infer adaptation at specific loci. *Evolution* 64: 2489-2509.
- STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S.; FISCHMAN, D. L. y WALLER, R. W. (2004): Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 306: 1783-1786.
- SØRENSEN, J. G.; PEKKONEN, M.; LINDGREN, B.; LOESCHCKE, V.; LAURILA, A. y MERILÄ, J. (2009): Complex patterns of geographic variation in heat tolerance and Hsp70 expression levels in the common frog *Rana temporaria*. *Journal of Thermal Biology* 34: 49-54.
- SPASIĆ-BOŠKOVIĆ, O.; TANIĆ, N.; BLAGOJEVIĆ, J. y VUJOŠEVIĆ, M. (1997): Comparative cytogenetic analysis of European brown frogs: *Rana temporaria*, *R. dalmatina* and *R. graeca*. *Caryologia* 50: 139-149.
- TEACHER, A. G. F.; CUNNINGHAM, A. A. y GARNER, T. W. (2010): Assessing the long-term impact of Ranavirus infection in wild common frog populations. *Animal Conservation* 13: 514-522.
- WAKE, D. B. y VREDENBURG, V. T. (2008): Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 11466-11473.
- WALTHER, G. R.; POST, E.; CONVEY, P.; MENZEL, A.; PARMESAN, C.; BEEBEE, T. V. C.; FROMENTIN, F.-M.; HOEGH-GULDBERG, O. y BAIRLEIN, F. (2002): Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416: 389-395.
- WHEAT, C. B. (2010): Rapidly developing functional genomics in ecological model systems via 454 transcriptome sequencing. *Genetica* 138: 433-451.
- WU, Y.; BHAT, P. R.; CLOSE, T. J. y LONARDI, S. (2008): Efficient and accurate construction of genetic linkage maps from the minimum spanning tree of a graph. *PLoS Genetics* 4: e1000212.
- YEAMAN, S. (2013): Genomic rearrangements and the evolution of clusters of locally adaptive loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: E1743-E1751.

EL EFECTO DEL CLIMA EN LA BIOGEOGRAFÍA MICROBIANA DEL SUELO ASOCIADO A PLANTAS EN SIERRA NEVADA

FRANCISCO JAVIER PASCUAL MARTÍNEZ¹, SILVIA MARINA BLANCO MOYA²,
JUAN LUIS RAMOS MARTÍN³, PIETER VAN DILLEWIJN⁴,

RESUMEN

Teniendo en cuenta que los microorganismos presentes en el suelo y especialmente en el suelo rizosférico ejercen un papel clave en la dinámica y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres, es necesario conocer como las comunidades microbianas se ven influenciadas por los cambios climáticos que se producen en el medio ambiente. Por consiguiente, el objetivo principal del presente estudio ha sido evaluar el efecto del clima en las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera de la planta cosmopolita tomillo salsero (*Thymus zygis* L) y en suelo suelto. Para ello se han estudiado tanto a nivel taxonómico como funcional las comunidades microbianas presentes en ambos tipos de suelo siguiendo un transecto altitudinal en dos regiones del Parque Nacional Sierra Nevada, Capileira y Puerto de la Ragua, durante dos años consecutivos. Los resultados obtenidos con la secuenciación masiva de amplicones de marcadores taxonómicos de bacterias y hongos en combinación con microchips funcionales (GeoChip) ha demostrado que las diferencias más significativas de comunidades microbianas se observan entre los distintos tipos de suelos (suelo suelto vs. suelo rizosférico) y en las distintas altitudes. También, el estudio ha permitido la identificación de los taxones bacterianos y fúngicos que componen los microbiomas centrales característicos de cada altitud. Este trabajo es el primer estudio sistemático de la diversidad taxonomía y funcional microbiana presente en diferentes regiones, tipos de suelos y altitudes en el Parque Nacional Sierra Nevada.

Palabras clave: Rizosfera, transecto altitudinal; diversidad microbiana, ADN metagenómico; *Thymus zygis*, cambio climático, suelo

¹ Grupo Microbiología Ambiental y Biodegradación, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda 1, 18008 Granada; Tel. +34 181600, Fax +34 958 181609. Dirección actual: Department of Microbial Ecology and Diversity Research, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania. Tel. +49 531-2616-36, Fax +49 531-2616-418; Correo electrónico: javier.pascual@dsMZ.de

² I Grupo Microbiología Ambiental y Biodegradación, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda 1, 18008 Granada; Tel. +34 181600, Fax +34 958 181609. Correo electrónico: silvia.blanco@eez.csic.es

³ I Grupo Microbiología Ambiental y Biodegradación, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda 1, 18008 Granada; Tel. +34 181600, Fax +34 958 181609. Correo electrónico: juanluis.ramos@eez.csic.es

⁴ I Grupo Microbiología Ambiental y Biodegradación, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda 1, 18008 Granada; Tel. +34 181600, Fax +34 958 181609. Autor para correspondencia. Grupo Microbiología Ambiental y Biodegradación, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda 1, 18008 Granada; Tel. +34 181600 ext 115, Fax +34 958 181609, Correo electrónico: pieter.vandillewijn@eez.csic.es