

Vinculando una mutación a la supervivencia de ratones silvestres

Rowan D. H. Barrett¹ †, Stefan Laurent² †, Ricardo Mallarino[†], Susanne P. Pfeifer, Charles C. Y. Xu, Matthieu Foll, Kazumasa Wakamatsu, Jonathan S. Duke-Cohan, Jeffrey D. Jensen⁵, Hopi E. Hoekstra

La evolución adaptativa en entornos nuevos o cambiantes puede ser difícil de predecir porque las conexiones funcionales entre genotipo, fenotipo y aptitud son complejas. Aquí, hacemos estas conexiones explícitas combinando experimentos de campo y de laboratorio en ratones silvestres. Primero estimamos directamente la acción de la selección natural en los rasgos de pigmentación y un locus de pigmento subyacente, *Agouti*, mediante el uso de recintos experimentales para ratones en diferentes colores de suelo. A continuación, mostramos cómo una mutación en *Agouti* asociada con la supervivencia, causa un color de pelaje más claro a través de cambios en sus propiedades de unión a proteínas. Nuestros hallazgos demuestran cómo una variante alélica altera el fenotipo y así mismo pone en evidencia las consecuencias ecológicas que provocan cambios en la frecuencia de los alelos de la población, evidenciando así el proceso de evolución por selección natural.

Aunque un número creciente de estudios genómicos han identificado genes que contribuyen a la evolución fenotípica (1-3), a menudo los mecanismos ecológicos que impulsan la evolución de los rasgos permanecen sin ser evidenciados. Por otro lado, los estudios de campo han documentado la acción de la selección natural en rasgos (4–6), pero los mecanismos moleculares subyacentes son normalmente desconocidos. Combinamos un experimento de campo manipulando ciertos parámetros a gran escala con pruebas genéticas y bioquímicas de laboratorio para identificar los mecanismos ecológicos y moleculares que subyacen la adaptación de rasgos en un vertebrado silvestre. Trazar estas conexiones ayudará a comprender las consecuencias evolutivas del cambio ambiental en las poblaciones naturales (7, 8). Utilizamos poblaciones de ratones ciervo (*Peromyscus maniculatus*) en las que ha evolucionado recientemente la

coloración críptica para investigar las consecuencias genéticas de la selección natural divergente.

En Sand Hills en Nebraska, se formaron “Colinas de Arena” a partir de cuarzo de color claro hace 8,000 a 10,000 años atrás (9). Este hábitat de dunas difiere del hábitat circundante en propiedades físicas, más notablemente en el color del suelo (10) (Fig. 1). Debido a que las colinas de arena son jóvenes en tiempos geológicos y ecológicamente distintas, se espera que las poblaciones de ratones ciervo que habitan el área hayan tenido adaptaciones fuertemente seleccionadas a este entorno. Un ejemplo de tal adaptación es la pigmentación. Las capas dorsales de los ratones ciervo están asociadas con el color del sustrato, y los ratones claros ocupan la zona más clara de Sand Hills (11). La hipótesis principal para este cambio fenotípico es lograr la crípsis contra los depredadores aviares (11-13). Las diferencias de pigmentación

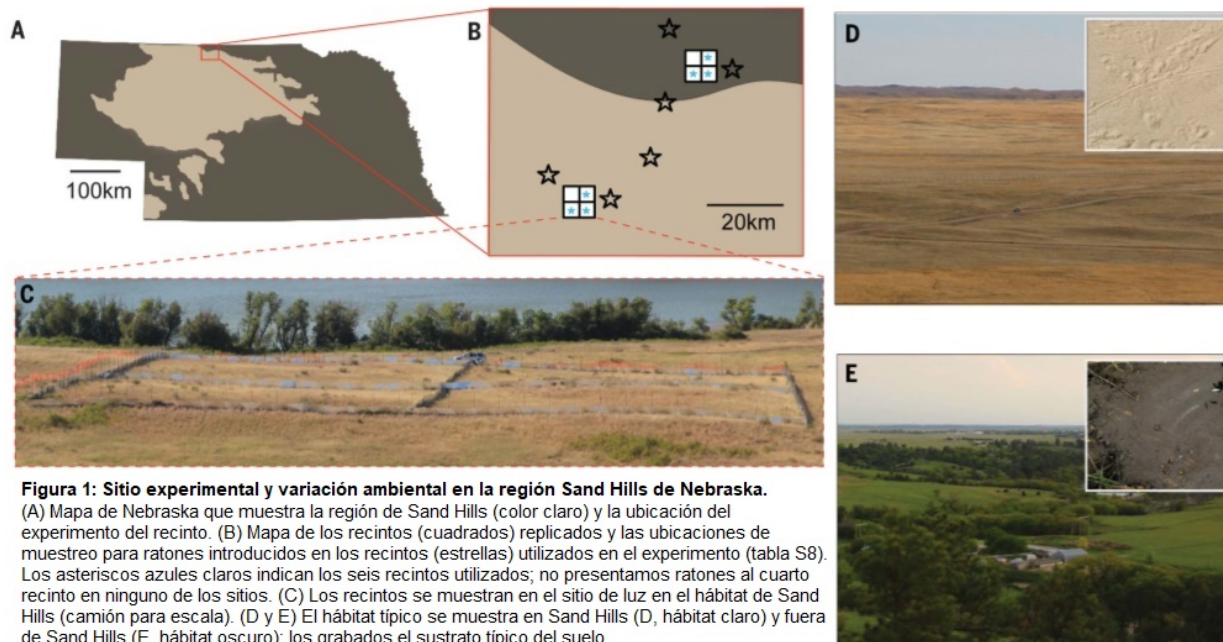


Figura 1: Sitio experimental y variación ambiental en la región Sand Hills de Nebraska.
 (A) Mapa de Nebraska que muestra la región de Sand Hills (color claro) y la ubicación del experimento del recinto. (B) Mapa de los recintos (cuadrados) replicados y las ubicaciones de muestreo para ratones introducidos en los recintos (estrellas) utilizados en el experimento (tabla S8). Los asteriscos azules claros indican los seis recintos utilizados; no presentamos ratones al cuarto recinto en ninguno de los sitios. (C) Los recintos se muestran en el sitio de luz en el hábitat de Sand Hills (camión para escala). (D y E) El hábitat típico se muestra en Sand Hills (D, hábitat claro) y fuera de Sand Hills (E, hábitat oscuro); los grabados el sustrato típico del suelo.

entre los tipos de hábitat están asociadas con múltiples mutaciones en *Agouti* (14, 15), un locus que media la producción de pigmento amarillo (feomelanina) en vertebrados (16, 17) y específicamente en ratones ciervo (13). Por lo tanto, los ratones ciervo de Sand Hills y el locus *Agouti* son un sistema útil para probar directamente los mecanismos ecológicos y moleculares mediante los cuales las variaciones de una misma secuencia específica alteran el fenotipo y, en última instancia, la aptitud.

Selección divergente sobre pigmentación en recintos experimentales

Para evidenciar la selección que favorece los fenotipos de pigmentos que se asocian al hábitat correspondiente, recolectamos 481 ratones silvestres de los sitios ancestrales "oscuros" y los derivados "claros". Luego, introdujimos de 75 a 100 individuos en proporciones iguales en la base del sitio de captura (es decir, en sitios oscuros y en sitios claros)

a cada uno de los seis recintos de campo (tres recintos correspondientes a cada hábitat) que medían 50 m por 50 m y estaban desprovistos de ratones nativos y depredadores terrestres, pero abiertos a depredadores aviares (Fig. 1) (18). Entre estos individuos elegidos y testeados, identificamos diferencias significativas en cinco rasgos de pigmento (brillo dorsal, cromas dorsal, brillo ventral, cromas ventral y patrón de cola) entre ratones capturados en sitios oscuros vs. claros (todas las características: $P < 0.001$) (fig. S1). Los fenotipos de pigmento fueron mayoritariamente independientes, con correlaciones débiles y en su mayoría insignificantes entre los rasgos [coeficiente de determinación (R^2) < 0.06 para todos los rasgos] (tabla S1), lo que sugiere que estos rasgos pueden estar sujetos a una selección independiente. Utilizando el método de marcaje-recaptura, rastreamos la supervivencia de estos individuos colocados durante cinco períodos de muestreo de 2 semanas durante 14

meses, momento en el cual la mortalidad alcanzó el 100% en la mayoría de los recintos (Fig. 2, A y B), similar a las tasas de mortalidad en el bosque (19). Debido a que el error de muestreo es inversamente proporcional al número de sobrevivientes, enfocamos nuestros análisis en una comparación entre las poblaciones colonizadoras (tiempo=0) y los sobrevivientes presentes en el tiempo 1 (~ 3 meses después del inicio del experimento), cuando las tasas de supervivencia promedio fueron del 45%. Independientemente del origen del muestreo o del fenotipo, las tasas de supervivencia fueron dos veces más altas en recintos oscuros en relación con recintos claros (60% vs. 30% en el tiempo 1). Los ratones introducidos en recintos que coincidían con el tipo de hábitat en el que fueron capturados originalmente, tuvieron una mayor supervivencia que los ratones no locales (Fig. 2, A y B, y la tabla S2) (18), lo que sugiere la adaptación local de las poblaciones en cada tipo de entorno.

Para probar si la pigmentación puede estar contribuyendo a la adaptación local, probamos cambios en la distribución de los rasgos de pigmento a lo largo del tiempo. Documentamos una selección significativa en la pigmentación, que se manifiesta principalmente a través de una mayor supervivencia de ratones con pigmentación dorsal local críptica [95% de intervalos bayesianos creíbles para el efecto de la interacción entre brillos en el dorso y el tratamiento experimental en supervivencia no conteniendo ninguno (18)] (Fig.2, CtoF y tablas S2 y S3). En recintos claros, los ratones supervivientes fueron, en promedio, 1,44 veces más claros en color que el ratón promedio en las poblaciones que se encontraban allí originalmente, mientras que en recintos

oscuros, el ratón promedio fue 1,98 veces más oscuro. Los gradientes de selección lineal para el brillo dorsal fueron positivos en los tres recintos del sitio claro y negativos en los tres recintos de sitios oscuros (prueba de un lado de gradientes de selección lineal en recintos claros vs. oscuros: $t = -6.079$, $df = 2.518$, $P = 0.015$) (tabla S3). Con la excepción del cromatismo ventral en un solo recinto, no se detectó una selección direccional significativa en ningún otro rasgo que no sea el brillo dorsal (tablas S2 y S3). Tampoco hubo evidencia de selección cuadrática o correlacional en los datos (tablas S4 y S5). Por lo tanto, la selección natural divergente probablemente estaba actuando sobre el brillo dorsal entre los dos tipos de entorno. El trabajo previo con ratones modelo de plastilina sugiere que la depredación aviar es alta en esta región [~ 1% tasas de ataque; (14)]. Además, los búhos son depredadores altamente efectivos de ratones y pueden discriminar entre diferentes colores incluso bajo condiciones de luz de luna (12). Durante el experimento en el campo, observamos búhos cazando en los sitios experimentales (ocho observaciones durante 70 noches). Debido a que los recintos excluyen en gran medida a otros depredadores, sugerimos que la asociación entre el brillo dorsal y la supervivencia, probablemente se deba a tasas más altas de depredación aviar en ratones con pigmentación llamativa.

Las consecuencias genéticas de la selección en la pigmentación

Para investigar cómo la selección sobre la pigmentación clara dorsal afecta las frecuencias alélicas en el locus Agouti, generamos datos de polimorfismos con

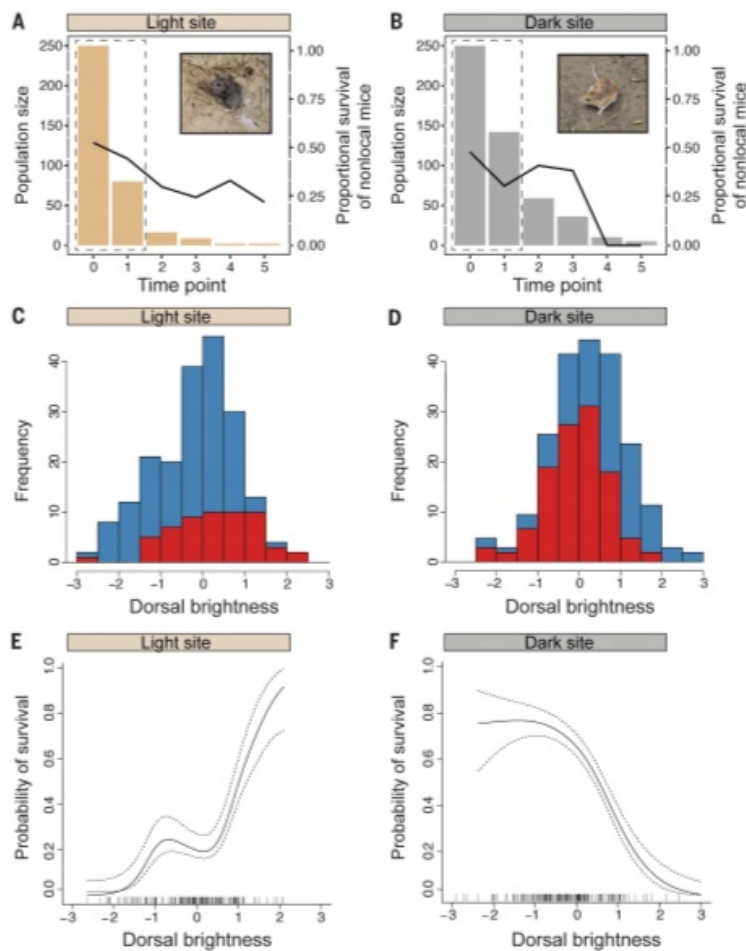


Fig. 2. Mortalidad y cambio fenotípico en las poblaciones experimentales.

(A y B) Mortalidad en recintos agrupados en sitios claros (A) y oscuros (B) durante cinco episodios secuenciales de selección (18). Las barras representan el número de individuos sobrevivientes (independientemente del color del pelaje) en cada punto de tiempo. Las líneas negras representan la proporción de individuos que sobrevivió que fueron originalmente atrapadas en el tipo de recinto opuesto al tipo de recinto en el que se colocaron (ratones del hábitat oscuro en recintos claros y ratones del hábitat claro en recintos oscuros). Se muestran ratones de colores conspicuos en sustratos típicos en cada sitio experimental. Los cuadros de puntos indican el período de tiempo utilizado en los análisis de selección. (C y D)

Distribuciones de brillo dorsal en el tiempo 0 (azul) y el tiempo 1 (rojo) en los sitios claros (C) y oscuros (D). (E y F) La selección sobre el brillo dorsal en los sitios claros (E) y oscuros (F) entre el tiempo 0 y 1. Los gráficos de splines cúbicos se generan a partir de los valores pronosticados. Las líneas continuas representan la spline ajustada y las líneas representan ± 1 Bayesian SE.

secuenciación enriquecida de (i) una región de 185 kb que abarca *Agouti* y todos los elementos reguladores conocidos y (ii) ~ 2100 regiones no vinculadas de todo el genoma, cada una con un promedio de 1.5 kb de longitud [siguiente (20)], para controlar los efectos demográficos. En resumen, secuenciamos a todos los 481 individuos y, después del filtrado, identificamos 2442 sitios variables de alta calidad dentro (y cerca) del gen *Agouti* y 53,507 en todo el genoma. A partir de estos datos, observamos cambios más grandes en la frecuencia alélica en *Agouti* a lo largo del tiempo en los recintos con claros que en

los oscuros, de acuerdo con su gran mortalidad (prueba de suma de rango: $W = 3.497.200$, $P < 0.001$) (fig. S2A). Para determinar si los cambios en la frecuencia de los alelos en *Agouti* se explican mejor por selección o neutralidad (es decir, mortalidad aleatoria), calculamos, para cada sitio de variantes de *Agouti* de forma independiente, la probabilidad de que la distribución de frecuencias de cada genotipo observada en los sobrevivientes represente una muestra aleatoria de la población inicial (18). Después de 3 meses, los ratones supervivientes mostraron frecuencias de genotipo no aleatorias siendo 353 y 549 polimorfismos

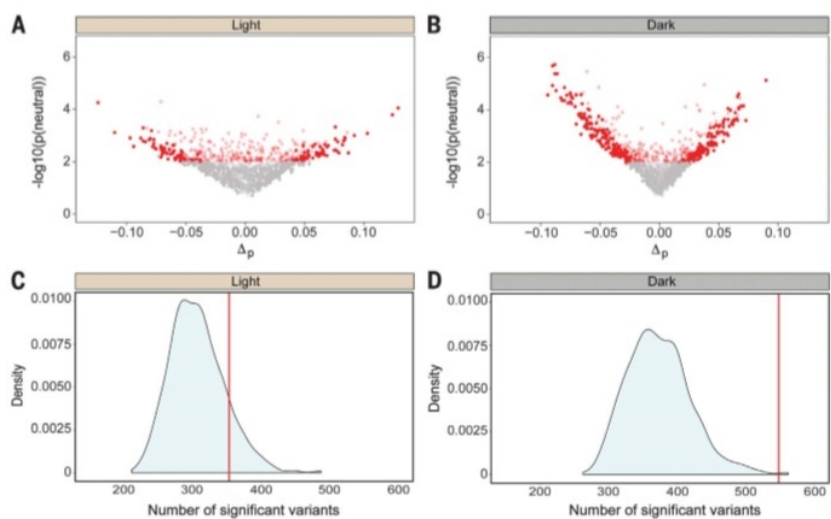


Fig. 3. Cambio de frecuencia de alelos en el locus Agouti.

(A y B) Cambio de frecuencia de alelos respecto a la mortalidad durante el experimento en los recintos con luz (A) y oscuridad (B) agrupados. El eje x representa el cambio en la frecuencia de alelos entre las poblaciones colonizadoras iniciales y los sobrevivientes muestreados después de 3 meses. El eje y representa la probabilidad de la distribución de las frecuencias de genotipo observadas en los sobrevivientes, suponiendo un modelo neutral. Todos los puntos rojos son significativos al 1%; los puntos rojos claros son significativos debido a un sesgo en la proporción observada de heterocigotos, mientras que los puntos rojos oscuros exhiben un sesgo en el número observado de homocigotos. (C y D) Distribuciones nulas del número de sitios que se espera que muestren un cambio de frecuencia de alelos significativo de 1% en los recintos con luz (C) y oscuridad (D) agrupados. Las líneas rojas verticales representan el número de sitios observados con un cambio de frecuencia de alelos significativo.

de un solo nucleótido (SNP) en los recintos claros y oscuros, respectivamente (Fig. 3, A y B). Para dar cuenta de la gran cantidad de pruebas involucradas, utilizamos un procedimiento de remuestreo para determinar cuántos SNP se esperan que muestren cambios significativos por azar. En los recintos claros, el cambio de frecuencia de patrones en los SNP de Agouti no se pudieron distinguir de la neutralidad (Fig. 3C), probablemente debido a la reducción del poder estadístico causado por el bajo número de sobrevivientes. Por el contrario, en los recintos oscuros, nuestros resultados rechazan la hipótesis nula, lo que sugiere que el número de cambios significativos en la frecuencia de los alelos es incompatible con un modelo estrictamente neutral (Fig. 3D). Por lo tanto, en los recintos oscuros, encontramos cambios de frecuencia de alelos en el locus Agouti consistentes con la selección, y por lo tanto, los patrones

en el nivel genético son paralelos al cambio observado en el nivel fenotípico. Debido a que no hay recombinación entre loci en una sola generación, probamos además si el gran número de sitios con cambios significativos en la frecuencia de alelos en los recintos oscuros podría explicarse por respuestas correlacionadas en loci vinculados a un número limitado de SNP bajo selección (18). A partir de nuestros resultados de selección fenotípica, a priori planteamos la hipótesis de que los SNP asociados con el brillo dorsal deberían experimentar una selección directa. Por lo tanto, para cada uno de los 31 SNP de Agouti asociados con el brillo dorsal (15), comparamos las frecuencias del genotipo bajo un modelo con y sin selección (18). De estos, siete SNP, incluidos seis SNP dentro o cerca de las regiones reguladoras de Agouti y una delección de una serina en un solo aminoácido en la posición de aminoácido 48 en el exón 2 (DSer), tuvieron un cambio de frecuencia de alelo que no

pudo explicarse únicamente por muestreo aleatorio (Fig. 4A y tabla S6). Cuatro de estos siete SNP también exhibieron altos niveles de diferenciación entre ratones capturados originalmente de hábitats claros y oscuros (Fig. 4B y tabla S6). Además, un SNP regulador y el Δ Ser se han asociado con señales históricas de selección positiva en las poblaciones de Sand Hills (14, 15). Para probar si la selección en cada una de estas variantes candidatas podría explicar el número observado de SNP con frecuencias de genotipo sesgadas en los sobrevivientes, re calculamos las distribuciones nulas

determinando a cada candidato individualmente como nuestro único objetivo seleccionado. Después de la corrección de múltiples pruebas, cada uno de los siete podría explicar el cambio observado en las frecuencias de genotipo en los sobrevivientes (Fig. 4C). Por el contrario, un modelo que utiliza el SNP del conjunto de datos de control de todo el genoma con el cambio de frecuencia de alelo más significativo no puede explicar los patrones observados (fig. S2B). Los análisis de desequilibrio de ligamiento (LD) de las siete variantes candidatas identificaron tres bloques de

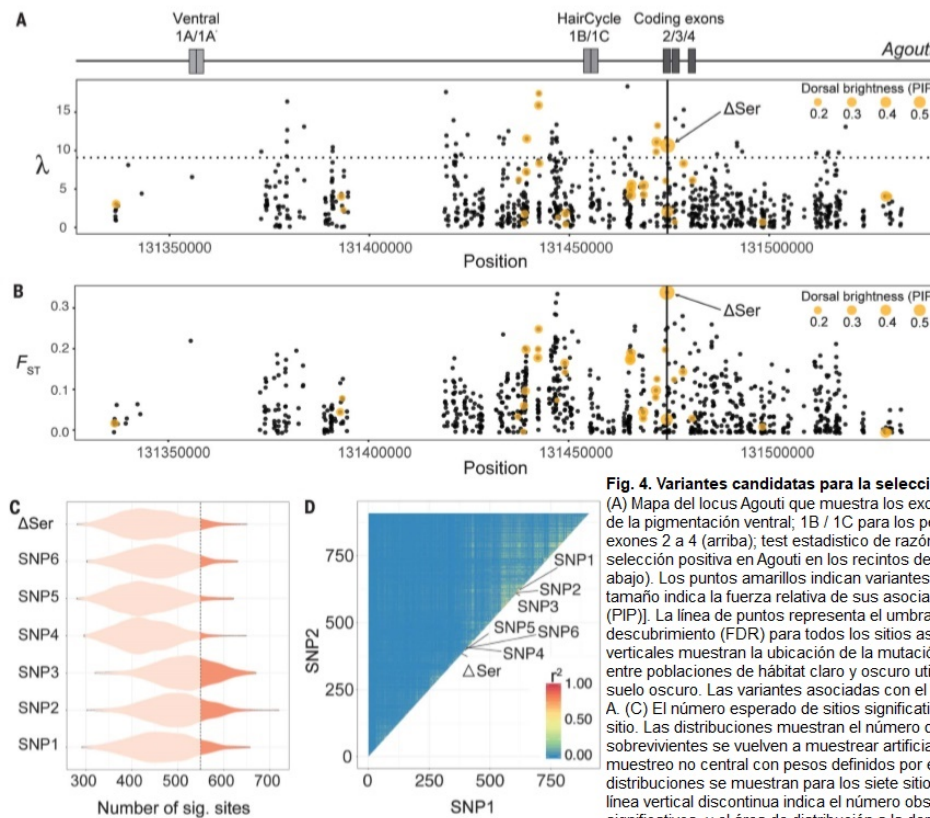


Fig. 4. Variantes candidatas para la selección en Agouti.
 (A) Mapa del locus Agouti que muestra los exones no codificantes (1A / 1A' responsable de la pigmentación ventral; 1B / 1C para los pelos dorsales con bandas) y codifica los exones 2 a 4 (arriba); test estadístico de razón de probabilidad para identificar la selección positiva en Agouti en los recintos de oscuros oscuro (datos agrupados, abajo). Los puntos amarillos indican variantes asociadas con el brillo dorsal, y su tamaño indica la fuerza relativa de sus asociaciones [probabilidad de inclusión posterior (PIP)]. La línea de puntos representa el umbral corregido de la tasa de falso descubrimiento (FDR) para todos los sitios asociados con el brillo dorsal. Las líneas verticales muestran la ubicación de la mutación Δ Ser. (B) F_{ST} específico de variante entre poblaciones de hábitat claro y oscuro utilizado para colonizar los recintos de suelo oscuro. Las variantes asociadas con el brillo dorsal se indican como en el panel A. (C) El número esperado de sitios significativos (sig.) cuando se selecciona un solo sitio. Las distribuciones muestran el número de sitios con un valor $P \leq 0.01$ cuando los sobrevivientes se vuelven a muestrear artificialmente asumiendo una distribución de muestreo no central con pesos definidos por el genotipo en el sitio objetivo. Las distribuciones se muestran para los siete sitios candidatos en los recintos oscuros. La línea vertical discontinua indica el número observado de sitios con cambios significativos, y el área de distribución a la derecha de la línea discontinua indica la proporción de conjuntos de datos remuestreados con al menos muchos sitios significativos como en los datos observados (el valor P). Ninguno de los siete valores de P es significativo después de corregir para pruebas múltiples (FDR). (D) Mapa de calor LD para todos los sitios Agouti en recintos agrupados en el recinto oscuro. Los sitios con una menor frecuencia de alelos $\leq 10\%$ fueron descartados

ligamiento (fig. S2C): dos conjuntos de tres SNP reguladores físicamente próximos y el D_{Ser}, el último con LD baja con todos los otros SNP candidatos (Fig. 4D). Estos datos sugieren que estos tres bloques de enlace albergan variantes que responden directamente a la selección del brillo dorsal. Por lo tanto, la selección en un número limitado de objetivos genéticos en el locus Agouti es suficiente para impulsar cambios en la frecuencia de alelos y un cambio rápido en el fenotipo.

Los efectos funcionales y ecológicos de una mutación por delección en Agouti

Para probar el vínculo funcional entre una de las variantes en Agouti asociada con la supervivencia y la pigmentación, así como descubrir el mecanismo molecular causal, nos centramos en la mutación de aminoácidos D_{Ser} en Agouti. Elegimos esta variante porque el D_{Ser} está fuertemente asociado con el brillo dorsal ($R^2 = 0.11$, $P < 0.001$) (Fig. 5A), mostró que hubo selección en las poblaciones del recinto (Fig. 4A), así como en una población natural mezclada (15), y mostró el mayor nivel de diferenciación genética en el locus Agouti entre ratones que fueron capturados originalmente de hábitat claro y oscuro ($F_{ST} = 0.34$) (Fig. 4B y tabla S6). Para determinar si el D_{Ser} mutado tiene un efecto en el color del cabello in vivo, generamos líneas iguales de ratones de laboratorio transgénicos (C57BL / 6 ratones, una cepa sin expresión de Agouti endógena) que llevan el ADNc de tipo silvestre (WT) o D_{Ser} Peromyscus Agouti, constitutivamente conducido por el promotor Hsp68 (Fig. 5B). Utilizamos el sistema de integrasa fC31, que produce secuencias de una

sola copia en el locus H11P3 en el cromosoma 11 del ratón para medir directamente el efecto del Agouti D_{Ser} mientras se evita la variación causada por el número de copias, el sitio de inserción o la orientación de la construcción (21) (fig. S3, A y B). Usando un espectrofotómetro para cuantificar las diferencias en el color del pelaje, encontramos que los ratones D_{Ser} tenían capas significativamente más claras que los ratones que portaban el ADNc WT Peromyscus Agouti (D_{Ser} versus WT, prueba de dos colas; $n = 5$, $P = 0.001$) (Fig. 5C). Por lo tanto, la mutación Agouti D_{Ser} sola tiene un efecto medible en la pigmentación y en la dirección esperada sobre la base de los datos de asociación genotipo-fenotipo en poblaciones naturales de Peromyscus.

Para caracterizar aún más los efectos fenotípicos de la variante D_{Ser}, examinamos y luego cuantificamos el pigmento en el cabello dorsal. El examen microscópico de los pelos individuales reveló que el pelo de los ratones D_{Ser} contenía un pigmento cualitativamente más claro que el de los ratones WT (Fig. 5B). Luego analizamos el contenido de feomelanina en el cabello mediante el uso de productos de degradación química seguidos de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (22-25). Los ratones D_{Ser} tenían cantidades significativamente menores de feomelanina (ambos tipos de benzotiazina y benzotiazol) que el pelo de WT mice (D_{Ser} versus WT, dos- prueba t de cola; $n = 5$, $P = 0.002$) (Fig. 5C and fig. S3C). Estos resultados indican que el Peromyscus D_{Ser} causa una disminución en la producción de feomelanina, que a su vez hace que el cabello parezca más brillante en general. La mutación D_{Ser} se encuentra en una región altamente conservada del dominio

N-terminal de la proteína agouti, una región que se une directamente a la atractina, un receptor transmembrana expresado en membranas de melanocitos y requerido para la función agouti (26). Para comprender el mecanismo por el cual DSer disminuye la producción de feomelanina, medimos las interacciones de unión en tiempo real entre las proteínas agouti y atractina utilizando resonancia de plasmón superficial (SPR). En SPR, una molécula (ligando) se inmoviliza en la superficie del sensor mientras se inyecta un posible compañero de interacción (analito); El ángulo de reflexión de la luz polarizada del sensor sirve entonces como proxy de la fuerza de la interacción entre las moléculas. Para un ligando, utilizamos la isoforma secretada de la atractina humana natural (ATRNEc), y para el analito, utilizamos una versión sintética del dominio N-terminal de *Peromyscus agouti* WT o DSer, una región que se sabe que retiene la actividad bioquímica completa y se une a la atractina (26) La aplicación del dominio N-terminal agouti WT o DSer a un chip recubierto con atrayente produjo sensogramas característicos de una interacción biológica, acercándose al equilibrio durante varios minutos y disminuyendo durante los niveles de lavado por encima de la línea de base (Fig. 5D). Sin embargo, encontramos que el dominio WT N-terminal mostró una interacción más fuerte con la atractina en relación con el alelo DSer (Fig. 5D). A continuación, estimamos las constantes de disociación (K_d) mediante el uso del análisis Scatchard de los niveles de equilibrio de unión a diferentes concentraciones y mostramos que el dominio WT tiene un K_d casi dos veces más pequeño que el dominio DSer (4.25×10^{-7} versus 6.94×10^{-7} ,

respectivamente), consistente con el alelo WT que tiene una mayor afinidad de unión a la atracción (fig. S3D). Juntos, nuestros experimentos genéticos y bioquímicos indican que DSer causa un cabello pigmentado más claro al disminuir la fuerza de las interacciones con la atractina, reduciendo la producción de feomelanina y, en última instancia, aumentando el brillo del pelaje dorsal de un ratón.

Cambios en el alelo Agouti DSer a través del espacio y el tiempo

Después de verificar su papel funcional en la variación del pigmento, medimos la frecuencia del alelo Agouti DSer en los diferentes recintos y a través del tiempo. Para confirmar el genotipo Agouti DSer e incluir individuos con datos faltantes, genotipamos a todos los individuos mediante el uso de un ensayo Taqman. La frecuencia inicial del alelo DSer varió entre los seis recintos, pero en promedio fue similar entre recintos oscuros y claros (promedio de recintos claros = $29.85 \pm 1.80\%$ SE, recintos oscuros significan = $25.79 \pm 0.68\%$ SE). Observamos cambios idiosincrásicos en la frecuencia de alelos en los recintos con luz, con dos de los tres recintos que muestran los aumentos esperados en el nivel de DS, pero el grado de cambio fue menor en todos los casos (cambio promedio de frecuencia de alelos = $0.43 \pm 0.81\%$ SE). Por el contrario, observamos disminuciones significativas en el alelo DSer en los tres recintos oscuros replicados (cambio promedio de la frecuencia del alelo = $6.87 \pm 2.58\%$ SE) (Fig. 5E). Este cambio en la frecuencia alélica equivale a un coeficiente de selección medio de $0.32 (\pm 0.11$ SE; prueba t unilateral de coeficientes de selección en recintos claros versus oscuros: $t = 2.990$, $df =$

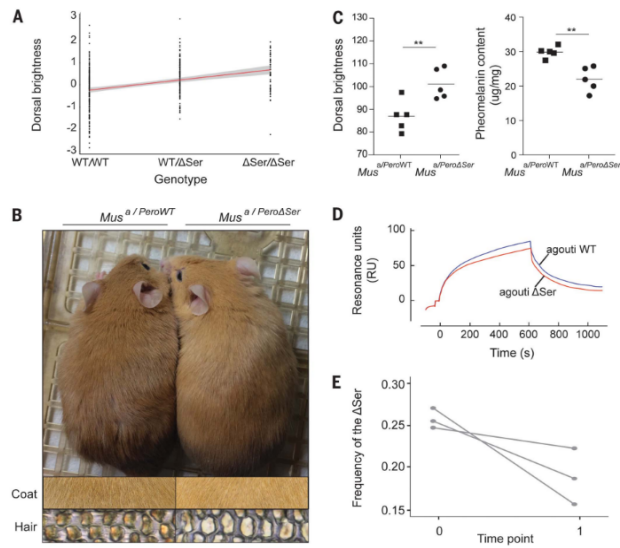


Fig. 5. Efectos fenotípicos, moleculares y en el fitness de la delección de serina. (A) Regresión lineal de genotipos DSer y brillo dorsal; datos agrupados en los seis recintos. (B) Líneas coincidentes de *Mus* transgénico (en C57BL/6, una cepa de *Agouti* knockout) que expresa el alelo WT (oscuro) o el DSer (claro) *Peromyscus Agouti*. Las imágenes de primer plano muestran la intensidad de la feomelanina en las capas dorsales y los pelos dorsales individuales de ratones transgénicos. (C) Brillo dorsal (izquierda) y productos de degradación de feomelanina de tipo benzotiazina (derecha) en ratones transgénicos, medidos con métodos de espectrofotometría y HPLC, respectivamente. (D) Interacción bioquímica de la atracción y el dominio N-terminal de la proteína *agouti* *Peromyscus* WT (azul) o DSer (rojo). Los valores que se muestran en unidades de respuesta arbitrarias se han corregido para la unión no específica. (E) Cambios en la frecuencia de alelos *ΔSer* en las tres poblaciones de recintos oscuros replicados. ** $P < 0.01$.

2.496, $P = 0.037$) (tabla S7). Como era de esperar, dada la selección fenotípica negativa observada en la pigmentación clara en recintos oscuros, estos resultados genéticos proporcionan evidencia de selección negativa en el alelo DSer asociado con la pigmentación clara en recintos oscuros. Así, al documentar el cambio de frecuencia de los alelos a lo largo del tiempo, demostramos una fuerte selección a nivel genético consistente con las predicciones basadas en los efectos funcionales de la variante DSer.

Discusión

Conocer la fuerza de la selección en la naturaleza es esencial para predecir las tasas de cambio adaptativo (4, 27-31). Ahora tenemos datos extensos sobre la fuerza de la selección que actúa sobre los fenotipos (32-34) y firmas estadísticas de selección histórica en el genoma (35-38). Sin embargo, persiste la incertidumbre

sobre la magnitud y las causas de los cambios genéticos que ocurren a medida que las poblaciones evolucionan bajo nuevas condiciones ecológicas (39-42). Nuestro diseño experimental imita la colonización replicada y recíproca de hábitats divergentes por poblaciones que llevan variantes de secuencia que causan cambios funcionales en un fenotipo adaptado localmente. Demostramos que cuando hay disponible una variación genética permanente adecuada, la selección natural puede resultar en un cambio evolutivo en escalas de tiempo ecológicas (43). Los cambios tanto en nuestro rasgo focal (brillo dorsal) como en los componentes de su arquitectura genética subyacente (la mutación DSer) fueron predecibles a partir de ensayos transgénicos y bioquímicos, así como los patrones de variación fenotípica y genotípica existente entre los tipos de hábitat. Juntos, estos resultados sugieren que el conocimiento sobre las conexiones funcionales entre el genotipo, el fenotipo y la aptitud física podría ayudar a predecir la evolución futura en condiciones ecológicas definidas.