



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA TEMPERATURA  
SOBRE CARACTERES FISIOLÓGICOS Y DE HISTORIA  
DE VIDA EN ESPECIES DE *DROSOPHILA***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área  
de Ciencias Biológicas

**Guillermo Folguera**

Director de Tesis y consejero de estudios: Dr. Esteban Hasson

Lugar de trabajo: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Buenos Aires, 2007

# ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA TEMPERATURA SOBRE CARACTERES FISIOLÓGICOS Y DE HISTORIA DE VIDA EN ESPECIES DE *DROSOPHILA*

## Resumen

En esta Tesis hemos examinado los efectos de la variación ambiental sobre caracteres de historia de vida (tamaño del cuerpo, tiempo de desarrollo y viabilidad) y fisiológicos (tasa metabólica) en poblaciones naturales de *Drosophila*. El objetivo principal fue analizar críticamente las teorías vigentes acerca de: a) los patrones de distribución de la variación de estos caracteres y de sus alometrías en diferentes niveles: interespecífico, interpoblacional e intrapoblacional, b) las respuestas de los diferentes estadios del ciclo de vida a diversos tratamientos térmicos y c) la relación entre la temperatura y el *stress* ambiental. Con ese fin, se recolectaron moscas de diferentes poblaciones de *D. buzzatii*, *D. simulans* y *D. melanogaster*, y se las sometieron a diferentes tratamientos térmicos algunos con temperatura constante y otros con temperaturas alternadas. Nuestros resultados muestran que: 1) los diferentes caracteres y sus relaciones alométricas presentan distintos patrones en los diferentes niveles jerárquicos analizados, 2) los estadios del ciclo de vida responden de modo diverso a los cambios térmicos, 3) los tratamientos alternados actuarían sólo como un factor de *stress* en casos de grandes amplitudes térmicas.

**Palabras claves:** adaptación térmica, tiempo de desarrollo, viabilidad, tasa metabólica, tamaño corporal, ontogenia.

# ANALYSIS OF THE EFFECTS OF TEMPERATURE ON PHYSIOLOGICAL AND LIFE HISTORY TRAITS IN SPECIES OF *DROSOPHILA*

## Abstract

In this thesis, we analyze variation in life history (body size, developmental time and viability) and physiological traits (metabolic rate) in natural populations of species of *Drosophila*. Our main objective was to contrast current hypothesis proposed to explain: a) patterns of traits variation and allometries in different hierarchical levels (species, population and plastic responses), b) responses of the different life cycle stages exposed to different thermal regimes, and c) the relationship between temperature and stress. To this end, natural populations of *D. buzzatii*, *D. simulans* and *D. melanogaster* were sampled along latitudinal and altitudinal gradients. In the laboratory, flies were exposed to thermal regimes of constant and alternating temperatures. Our results suggest that: 1) different patterns of trait variation and differences in allometric relationships for each hierarchical level, 2) each stage of the life cycle present different responses to thermal changes, 3) thermal amplitude may be considered a stress factor only in cases of huge differences between temperatures.

**Key words:** thermal adaptation, developmental time, viability, metabolic rate, body size, ontogeny.

## **Agradecimientos**

En un trabajo de estas características resulta inevitable agradecer el apoyo recibido dentro y fuera del grupo de trabajo, enriquecido por la colaboración generosa de tantos durante el recorrido. Nombro aquí a las personas e instituciones que hicieron posible esta Tesis.

A Esteban Hasson, porque el recorrido realizado me abrazará toda la vida.

Al grupo de trabajo dado por Santiago, Pepe, Luciana y Edu, sin los cuales nada de esto hubiera sido posible.

A Pau, por el apoyo emocional e intelectual que me dio en este recorrido.

A Romi, Marcelo y Julián, por las ideas y los consejos, en una investigación que los tiene incluidos en más de un sentido.

A los chicos del labo que han creído que el modo de trabajo era siempre en equipo: Nico, Julieta, Vale, Edu, Nacho, Julián, Cristian, Muriel, Marcos, Juan, Juanjo.

A Pedro, Gabriela e Ignacio, por la ayuda en los diversos análisis estadísticos.

A JSF Barker, A Fontdevila, y J David por los comentarios y sugerencias realizados a diferentes capítulos de esta tesis.

A Ines Camillioni por proveer desinteresadamente de los datos climatológicos.

A Pancho, por el ingreso al maravilloso mundo de la fisiología.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a la Universidad de Buenos Aires, por la defensa de lo público.

A la Universidad Católica de Santiago de Chile por el apoyo dado al cruzar la cordillera.

## **Dedicatorias**

A Caro, porque estar contigo y no estar contigo es la medida de mi tiempo. Por el tiempo pasado al que dotaste de sentido. Por el tiempo futuro que se sueña belleza a tu lado.

A mamá y a papá, porque supieron cuándo decir y cuándo acariciar.

A los amigos, a esos que me hicieron sentir tan bien: Santi, Debo, Pau, Fede y Caro, Lauri, Juan S., Juan Chebli, Ana y Fer, Rulo y Ale.

A mi familia, que todavía se preguntan qué es exactamente lo que hago pero igual lo apoyan: Ali, Dani, Manu, Fer, Andrés, Marce, Alejo, Susi, Peta, Guille, Glenda, ¿Tomás?, Mirta, Ioia.

Al grupo de Historia y Filosofía de la Ciencia que me ha abrazado y confiado más de lo que merecía, pero tanto como deseaba: Guillermo, Celia, Tito, Alberto, Pau, Ani, Jorge.

A Alicia Massarini, porque nunca hablamos de moscas y siempre de evolución.

A Esteban H., por la confianza, los afectos, el conocimiento y las disputas. Sin algunos de estos cuatro elementos el camino hubiera sido seguramente más pobre.

# Índice

## Capítulo 1. Introducción general

Relevancia de la investigación y estructura de la Tesis.....	9
Objetivos de la investigación.....	11
Modelos biológicos utilizados.....	12
La temperatura como factor selectivo.....	14
El tamaño del cuerpo.....	15
Tamaños y formas.....	16
La asimetría fluctuante y los caracteres morfométricos.....	20
Otros caracteres de historia de vida.....	25
El trabajo interdisciplinario: el caso de la fisiología evolutiva y la ecología evolutiva.....	27
La ontogenia, los caracteres fisiológicos y de historia de vida.....	28
Las relaciones alométricas en fisiología evolutiva y ecología evolutiva.....	30
Las hipótesis acerca de las varianzas: sobre sexos y ambientes térmicos.....	33

## Capítulo 2. Climas latitudinales y altitudinales en caracteres asociados al tamaño en *Drosophila*

Resumen.....	37
Introducción.....	39
Materiales y Métodos.....	44
Resultados.....	49
Conclusiones.....	64

## Capítulo 3. Análisis de la relación entre la asimetría fluctuante y condiciones térmicas de *stress* en poblaciones naturales de *Drosophila*

Resumen.....	68
Introducción.....	70
Materiales y Métodos.....	73
Resultados.....	74

Conclusiones.....	80
-------------------	----

**Capítulo 4. Estudio comparativo de los patrones de variación interpoblacional en el tiempo de desarrollo, la viabilidad y la adaptación térmica en dos especies de *Drosophila***

Resumen.....	82
Introducción.....	84
Materiales y Métodos.....	87
Resultados.....	92
Conclusiones.....	99

**Capítulo 5. Efecto estado-dependiente de la temperatura en caracteres de historia de vida en ontogenia en el ciclo de vida de especies de *Drosophila***

Resumen.....	106
Introducción.....	108
Materiales y Métodos.....	111
Resultados.....	114
Conclusiones.....	124

**Capítulo 6. Fisiología y caracteres de historia de vida: el caso del tamaño del cuerpo**

Resumen.....	127
Introducción.....	128
Dos áreas, dos caracterizaciones.....	130
Los problemas de la polisemia del tamaño del cuerpo.....	131
Conclusiones.....	135

**Capítulo 7. La relación entre caracteres fisiológicos y de historia de vida: un estudio experimental en *Drosophila***

Resumen.....	137
Introducción.....	138
Materiales y Métodos.....	140
Resultados.....	143
Conclusiones.....	150

**Capítulo 8. Alometrías ontogenéticas entre la tasa metabólica, el peso corporal y el tiempo de desarrollo en *Drosophila***

Resumen.....	154
Introducción.....	155
Materiales y Métodos.....	157
Resultados.....	159
Conclusiones.....	165
Anexo.....	170

**Capítulo 9. Conclusiones generales**

Hipótesis sobre los caracteres y las alometrías en diferentes niveles jerárquicos.....	176
El <i>stress</i> y la adaptación térmica.....	182
De los caracteres a las estrategias del desarrollo: primeras notas sobre los estadios del ciclo de vida.....	185
De las alometrías ontogenéticas a las estrategias del desarrollo: segundas notas sobre los estadios del ciclo de vida.....	188
<b>Bibliografía.....</b>	<b>192</b>



# Capítulo 1. Introducción general

## Relevancia de la investigación y estructura de la Tesis

El efecto de los cambios ambientales sobre la diversidad y la abundancia de los organismos es una de las temáticas que ha concitado mayor atención entre los biólogos. En particular, a partir del reconocimiento del fenómeno del calentamiento global, el interés por la capacidad adaptativa de los organismos a la variación ambiental ha tomado un lugar central en la comunidad científica en general y, en particular, en la comunidad de especialistas de varias de las subdisciplinas que forman parte de la biología.

Dentro de este escenario, diferentes autores han propuesto a la temperatura como uno de los factores ambientales que producen efectos mayores sobre los seres vivos. Este interés motivó que el estudio de la adaptación de los organismos a los cambios en la temperatura ambiental se abordara a través de una notable diversidad de líneas de investigación, escalas ambientales y modelos biológicos. Esta Tesis pretende ser un aporte a esta compleja problemática, en la que a través de estudios sobre la adaptación térmica en un organismo modelo se pudieron comprender ciertos efectos que la temperatura tiene sobre los seres vivos.

Esta Tesis está estructurada de modo de poder explicitar las hipótesis que fueron puestas a prueba en cada uno de los capítulos, así como de plantear los marcos teóricos que eran relevantes para cada una de las problemáticas. De este modo, la disposición en que los capítulos están presentados ha buscado reproducir el orden conceptual dado en la literatura específica, y no necesariamente el orden temporal con el que fueron realizados los experimentos correspondientes.

En el Capítulo 1 presentamos una introducción de los marcos teóricos generales pertinentes a esta Tesis, privilegiando los conceptos comunes a los diferentes abordajes experimentales. En los capítulos posteriores (2 al 8) se desarrollan los marcos teóricos particulares a las hipótesis puestas a prueba en cada uno de ellos.

En el Capítulo 2 presentamos un estudio sobre los efectos de la temperatura sobre caracteres relacionados al tamaño y a la forma de las alas. El mismo compara pares de poblaciones naturales de dos especies de *Drosophila* (*D. buzzatii* y *D. melanogaster*), a la vez que indaga acerca de la plasticidad fenotípica como respuesta a la exposición a diferentes tratamientos térmicos durante el desarrollo.

En el Capítulo 3 analizamos la problemática particular del *stress* térmico y su relación con la asimetría fluctuante (AF) como posible indicador de la inestabilidad del desarrollo. También son analizadas las variaciones en el tamaño y en la forma corporal, con un foco de atención en la pregunta de si la amplitud térmica durante el desarrollo ontogenético se expresa en valores incrementados de AF respecto a aquellos individuos sometidos a temperatura constante. Dicho de otro modo, en este capítulo se puso a prueba la hipótesis que sostiene que la amplitud térmica durante el desarrollo es un factor de *stress* para las moscas, y que sus efectos se traducen en una mayor inestabilidad del desarrollo detectable en términos de una mayor AF.

En el Capítulo 4 introducimos el estudio de otros dos caracteres de historia de vida directa e indirectamente asociados al *fitness*<sup>1</sup>: la viabilidad (VB) y el tiempo de desarrollo (TD). Nuevamente, al igual que en el Capítulo 2, se analizan los patrones de distribución de la variación de dichos caracteres en los niveles jerárquicos de especie y población. Asimismo, se investiga la plasticidad fenotípica del TD y la VB de moscas de varias familias (isolíneas<sup>2</sup>) en respuesta a diferentes regímenes térmicos.

En el Capítulo 5 indagamos sobre los efectos de la temperatura sobre el TD y la VB en diferentes estadios del ciclo de vida en las mismas especies de *Drosophila* referidas más arriba. La relevancia de este capítulo radica en que, habitualmente, el estudio de los efectos de la variación en la temperatura se centra en el estadio reproductivo. Sin embargo, el análisis realizado en los diferentes estadios que componen el desarrollo de un insecto holometábolo permite comprender más profundamente la adaptación de un organismo como un todo, permitiendo descubrir la relación y la conformación de las diferentes etapas y las estrategias desarrolladas.

En los Capítulos 6, 7 y 8 estudiamos los efectos de la temperatura sobre la tasa metabólica y, paralelamente, sobre la relación que la misma tiene con otros caracteres de historia de vida. La característica interdisciplinaria de este estudio nos lleva a interrogar sobre algunas de las dificultades existentes en este tipo de análisis. De esta manera, previo a la presentación de los experimentos particulares realizados, el Capítulo 6 se interroga sobre uno de los conceptos comunes entre los estudios ecológicos, evolutivos y fisiológicos. Aquí se trabajará sobre la naturaleza polisémica del concepto de “tamaño corporal”, dada las diferentes caracterizaciones que se hacen del mismo en la ecología, la genética evolutiva y

---

<sup>1</sup> Por tratarse de un término de difícil traducción, hemos decidido tomar prestado el término en inglés. De aquí en más todos los términos escritos en idiomas extranjeros serán marcados en *italica*.

<sup>2</sup> La definición de este término se dará en el capítulo 2.

la fisiología. A nuestro entender, esta polisemia trae aparejada importantes consecuencias conceptuales sobre la problemática de la adaptación con vistas a una verdadera integración disciplinar.

Posteriormente, en el Capítulo 7 estudiamos las relaciones entre la tasa metabólica y el peso del organismo en el estadio adulto, y entre la tasa metabólica y el tiempo de desarrollo total (larva-adulto), en poblaciones experimentales de tres especies derivadas de localidades donde dichas especies coexisten. Complementariamente, el Capítulo 8 indaga sobre las relaciones entre las mismas variables durante el desarrollo de estos organismos.

Por último, en el Capítulo 9 exponemos las conclusiones generales, presentando los conceptos y las preguntas generales desarrolladas a través de toda la Tesis, reservando las conclusiones de mayor grado de particularidad a las secciones finales de cada uno de los capítulos específicos. A los fines de facilitar la lectura de la Tesis, la bibliografía citada en todos los capítulos se presenta en un apartado común al final del recorrido.

## **Objetivos generales de la investigación**

Los objetivos generales de esta Tesis son:

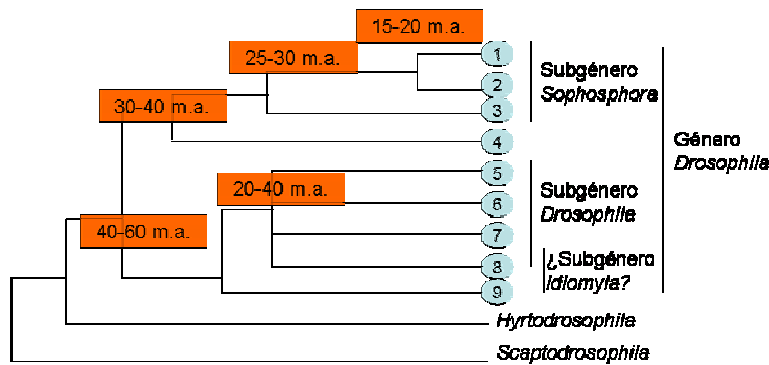
- Caracterizar los efectos de la variación ambiental sobre caracteres de historia de vida (tamaño y forma del cuerpo, tiempo de desarrollo y viabilidad) y fisiológicos (tasa metabólica) en poblaciones naturales de especies de *Drosophila*.
- Determinar los patrones de distribución de la variación de los caracteres mencionados en diferentes niveles jerárquicos (específico, poblacional e intrapoblacional) y la variación existente cuando moscas descendientes de una misma pareja (misma familia) son sometidas a diferentes tratamientos térmicos durante su desarrollo (respuestas plásticas).
- Analizar y comparar diversos tipos de alometrías (estáticas, evolutivas, plásticas y ontogenéticas)<sup>3</sup> entre los diferentes caracteres.
- Analizar críticamente las teorías vigentes acerca de la relación entre la temperatura y el *stress* ambiental, investigando posibles indicadores directa e indirectamente asociados al *fitness* de los organismos.

---

<sup>3</sup> Los diferentes tipos de alometrías son presentados en este mismo capítulo.

## Modelos biológicos utilizados

Los objetivos planteados en la sección anterior requieren el uso de modelos biológicos que posean una serie de requisitos: tiempo generacional corto, fácil manipulación y amplia distribución geográfica. Todas estas propiedades permiten el estudio de los organismos provenientes de poblaciones naturales, investigando simultáneamente las respuestas poblacionales a las condiciones ambientales, a la vez que su comportamiento frente a condiciones térmicas controladas en el laboratorio. Todas estas características las cumplen muchas de las especies del género *Drosophila*. En los Capítulos 2, 3, 4 y 5 los modelos biológicos escogidos fueron *D. melanogaster* y *D. buzzatii*. En los Capítulos 7 y 8 se incluyó además a *D. simulans*. Todas las especies analizadas pertenecen al mismo género aunque forman parte de 2 subgéneros distintos. *D. buzzatii* pertenece al grupo repleta, subgénero *Drosophila* (Figura 1.1). Por su parte, *D. melanogaster* y *D. simulans* pertenecen al subgrupo melanogaster, subgénero *Sophophora* (Figura 1.1). Las relaciones filogenéticas entre ambos subgéneros del Género *Drosophila* son presentadas en la Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Relaciones filogenéticas entre los grupos principales del género *Drosophila*. Los datos están basados en la combinación de datos biogeográficos y/o datos fósiles (Powell 1997). 1: Subgrupo *melanogaster*; 2: otros grupos *melanogaster*; 3: grupo *obscura* 4: grupo *willistoni* 5: *funnebris* 6: *immigrans* 7: *repleta* 8: 9: Hawaianas. En cada nodo se dan los tiempos de divergencia estimados, a partir del registro fósil o por reloj molecular, en millones de años (M.a.). Así, se estima que los subgéneros principales de *Drosophila* (*Sophophora* y *Drosophila*) han divergido hace 50 M.a aproximadamente.

Además, las especies estudiadas poseen diferentes características ecológicas y biogeográficas. *D. melanogaster* es una especie considerada cosmopolita, encontrándose prácticamente en todo el mundo, excepto en las regiones polares (Patterson & Stone 1952). La mayor parte de su área de distribución se encuentra restringida a ambientes urbanos, de campo y otros hábitats modificados por el hombre. Se considera que su área de origen es África, al sur del desierto del Sahara. Posteriormente, se sostiene que colonizó Europa y gran parte de Asia. Por último, las evidencias indican que las nuevas poblaciones fueron transportadas pasivamente por el hombre a América y Oceanía (Lemeunier & Aulard 1992). *D. simulans* es también una especie cosmopolita y su distribución es semejante a la de *D. melanogaster*. La divergencia entre *D. melanogaster* y *D. simulans* ocurrió hace 2 ó 3 millones de años, presumiblemente en el este de África (Lachaise *et al.* 1988). Tanto *D. simulans* como *D. melanogaster* utilizan para su alimentación frutos en descomposición, tales como manzanas, uvas o membrillo. En nuestro país, ambas especies tienen una amplia distribución y son muy abundantes en zonas frutícolas donde alcanzan picos de abundancia estacional (ver Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Plantaciones de vides, recurso utilizado por *D. melanogaster* y *D. simulans* para su oviposición y alimentación.

*D. buzzatii* es la única especie perteneciente al grupo repleta que no es endémica de América del Sur (Piccinali 2004), ya que colonizó Europa en el siglo XVIII (Fontdevila 1989), y Oceanía en el siglo XX acompañando el intercambio de mercancías entre continentes (Barker & Mulley 1976). En nuestro país se encuentra distribuida en las zonas áridas y semiáridas ya que tiene la capacidad de alimentarse y desarrollarse en asociación con los tejidos en descomposición de diferentes especies de cactus, tunas y cardones (Figura 1.3) (Hasson *et al.* 1992).



**Figura 1.3.** Dos de las especies de cactus utilizadas por *D. buzzatii* para su oviposición y alimentación (*Opuntia sulphurea* (der.) y *Trichocereus terchschekii* (izq.).

## La temperatura como factor selectivo

La variación térmica ejerce variados efectos sobre los organismos afectando la *performance* a través de componentes del *fitness*. Más aún, desde diferentes áreas se ha caracterizado a la temperatura como uno de los agentes ambientales centrales que explican una parte importante de los efectos que el ambiente ejerce sobre los organismos. En particular, las tres áreas por las que transita esta Tesis (ecología, fisiología y evolución) reservan un papel central a la temperatura como variable ambiental de relevancia, debido a sus efectos sobre los seres vivos. Sin embargo, debido a las características intrínsecas del factor térmico, los abordajes experimentales que se han realizado para su estudio han

abordado modalidades diferentes. Sin pretender una exhaustividad en su enumeración, algunos de los enfoques que pueden encontrarse en la bibliografía especializada son:

- Estudios de poblaciones a través de gradientes térmicos naturales.
- Estudios de la adaptación a diferentes regímenes térmicos mediante experimentos de selección artificial.
- Estudio de los efectos de diferentes tipos de tratamientos térmicos: agudos *shocks* térmicos (calor o frío) o crónicos sometiendo por intervalos prolongados a organismos en diferentes etapas del ciclo de vida.
- Indagación de los efectos de fluctuaciones térmicas diarias (analogando a la amplitud térmica ambiental) sobre diferentes poblaciones y especies.

Como puede verse, la temperatura ambiental tiene efectos que combinan necesariamente los diferentes abordajes antes detallados, presentando una compleja red que debe ser recuperada en estudios de adaptación térmica. Sin embargo, pese a esta complejidad de los efectos de la variación térmica en los ambientes naturales, una gran parte de las investigaciones detalladas en la bibliografía específica han puesto un excesivo acento en el estudio de los efectos de la media térmica. Esto se refleja en el listado anterior, donde los efectos de las varianzas térmicas son representados sólo a partir de los estudios realizados con la amplitud térmica, se refieran éstas a las variaciones en el año (amplitud térmica estacional) o a la variación diaria (varianza térmica diaria).

## **El tamaño del cuerpo**

El tamaño corporal es considerado uno de los caracteres más importantes de los animales (Schmidt-Nielsen 1977). La notable variación observada en el tamaño de los organismos ha sido descrita en numerosas investigaciones a lo largo del tiempo. De hecho, a través de un recorrido dado por las altas jerarquías que forman parte del mundo de lo vivo, puede verse que el tamaño presenta notables diferencias entre *taxa* (McMahon & Bonner 1986). Paralelamente, el tamaño corporal ha mostrado una importante variabilidad en las escalas menores de la vida, tal como ocurre a nivel poblacional.

Sin embargo, la diferencia entre los organismos no sólo se da entre los tamaños corporales absolutos, sino que a la vez difieren los tamaños relativos entre sus partes

morfológicas. Estas diferencias en los tamaños de sus diferentes partes, genera la dificultad metodológica de cuál parte del cuerpo considerar para su medición. En general, la bibliografía específica no ha encontrado una respuesta única, considerando diferentes caracteres en función del área en la que se han realizado las investigaciones, del *taxa* estudiado y del interrogante en cuestión.

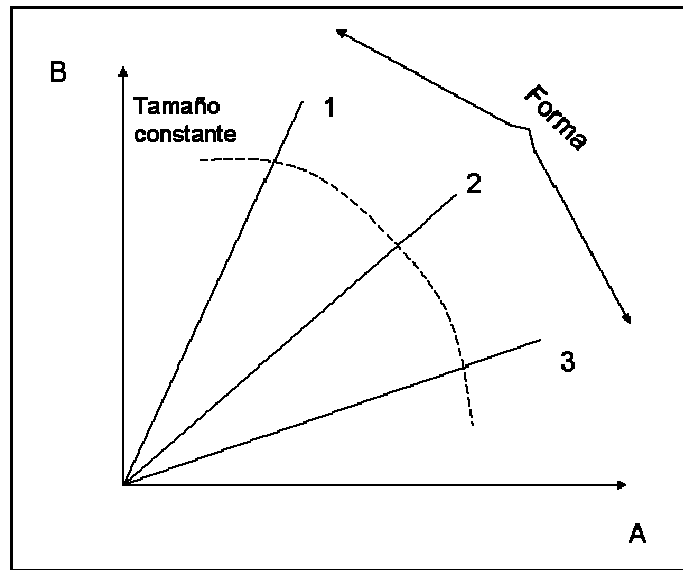
Una de las mediciones más frecuentemente elegidas ha sido la de la masa corporal. Su elección ha sido justificada por la ventaja (al menos aparente) de que se trata de una medida universalmente comparable, a la vez que su medición resulta de una evidente simpleza metodológica. Sin embargo, se han planteado ciertas desventajas acerca del uso de la masa como indicador del tamaño corporal. Los problemas se han centrado en la enorme variabilidad que exhibe la masa corporal entre los *taxa*, entre diferentes fases del desarrollo de un mismo organismo y entre organismos criados en diferentes condiciones nutricionales. Por ello, a los fines de poder dar cuenta de estos problemas de variación intraindividual, se ha propuesto cierta estandarización en el uso de medidas del tamaño, independientes de la estación registrada y/o de las condiciones de cría (Gaston & Blackburn 2000). Este inconveniente, ha encontrado soluciones diferentes para las áreas de investigación que abordan la problemática del tamaño corporal. Mientras que en la mayoría de los trabajos sobre adaptación térmica en ecología evolutiva y genética evolutiva se ha hecho hincapié en la medición de la longitud de ciertas partes del cuerpo como posibles indicadoras de tamaño, en general en fisiología se utiliza la masa corporal como un estimador del tamaño general del cuerpo. Esta diferencia, de gran importancia en el contexto de esta Tesis, aparece como fundamental a la luz de los trabajos interdisciplinarios y será profundizada en el Capítulo 6.

## **Tamaños y formas**

Tal como se ha indicado previamente, los seres vivos no poseen en general un crecimiento de tipo isométrico. Las partes del cuerpo aumentan en magnitudes diferentes a través del desarrollo del organismo. Este fenómeno, da lugar al interrogante acerca de cuáles son las causas y las consecuencias de las diferencias dimensionales. Este campo de investigación –denominado *scaling* por parte de autores de diferentes áreas– posee una notable capacidad heurística en ecología, en ecofisiología y en biología evolutiva



(LaBarbera 1989). A los fines de una mejor comprensión de esta problemática veamos la siguiente representación:

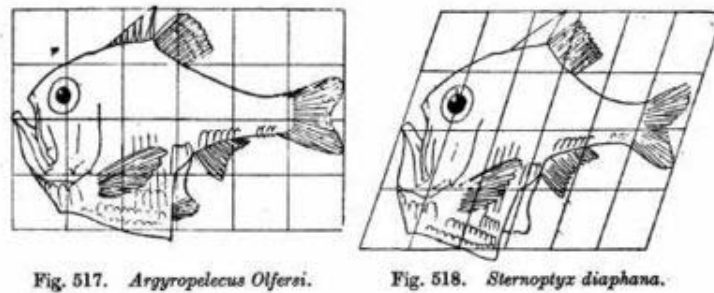


**Figura 1.4.** Relaciones geométricas entre el tamaño y la forma dados por diferentes relaciones entre dos caracteres (A y B). La línea punteada marca un tamaño constante global, generados por diferentes combinaciones de tamaño y forma (Schlichting & Pigliucci 1998).

En la Figura 1.4 se observa cómo diferentes combinaciones de caracteres pueden generar un tamaño corporal determinado. Sin embargo, las diferentes alternativas implican fuertes alteraciones en cuanto a la forma del organismo en cuestión. Esta problemática es central en las discusiones evolutivas, en la medida en que surge el interrogante acerca de cuál es el blanco “verdadero” de los procesos selectivos. Si es en efecto el tamaño del cuerpo –como de hecho ha sido propuesto en gran parte de la bibliografía específica y tal como se detallará en la introducción del Capítulo 2– cabe preguntarse si cualquier combinación alométrica tiene asociado un *fitness* similar, o si las variaciones en la forma tienen implicancias evolutivas que deben ser recuperadas en este tipo de investigaciones.

En consecuencia, el problema de orden metodológico es cómo lograr la separación entre variables indicadoras de tamaño y de forma independientes una de otra, de modo de lograr responder a la pregunta que interroga sobre los roles evolutivos de ambos caracteres. Recurrentemente, durante el siglo XX se ha intentado resolver este problema metodológico. Por ejemplo, en “Sobre el crecimiento y la forma”, libro publicado en 1917 por el biólogo y

matemático D'Arcy Thompson, se sugiere un método para analizar la forma. El principio del procedimiento es relativamente sencillo. Se ubica una denominada “malla cartesiana” sobre el dibujo de un organismo (Figura 1.5). Posteriormente, se realiza la comparación entre el individuo analizado y un segundo ejemplar, marcando los puntos coincidentes. Quedan claramente identificados aquellos puntos en los que la trama se altera, quedando en evidencia las expansiones y las contracciones (Figura 1.5). Sin embargo, este método presenta la desventaja –cara a la luz de la biología moderna– de que dichas modificaciones no pueden ser cuantificadas (McMahon & Bonner 1986).



**Figura 1.5.** Representación del uso de la malla cartesiana en dos especies de peces. Imagen que formó parte del libro “Sobre el crecimiento y la forma” de D’Arcy Thompson.

Posteriormente, Teisser en 1931 y Huxley en 1932 propusieron una metodología alternativa, buscando aportar elementos al estudio del tamaño y de la forma. La nueva metodología se centraba en el análisis en la relación de dos parámetros determinados. La relación entre ambos puede indicarse como:

$$y = bx^a$$

que luego de una transformación logarítmica se convierte en:

$$\log y = \log b + a \log x$$

Ambas expresiones son consideradas parte de la denominada fórmula alométrica. Evidentemente, la isometría se trata de un caso particular, en donde el coeficiente “a” toma

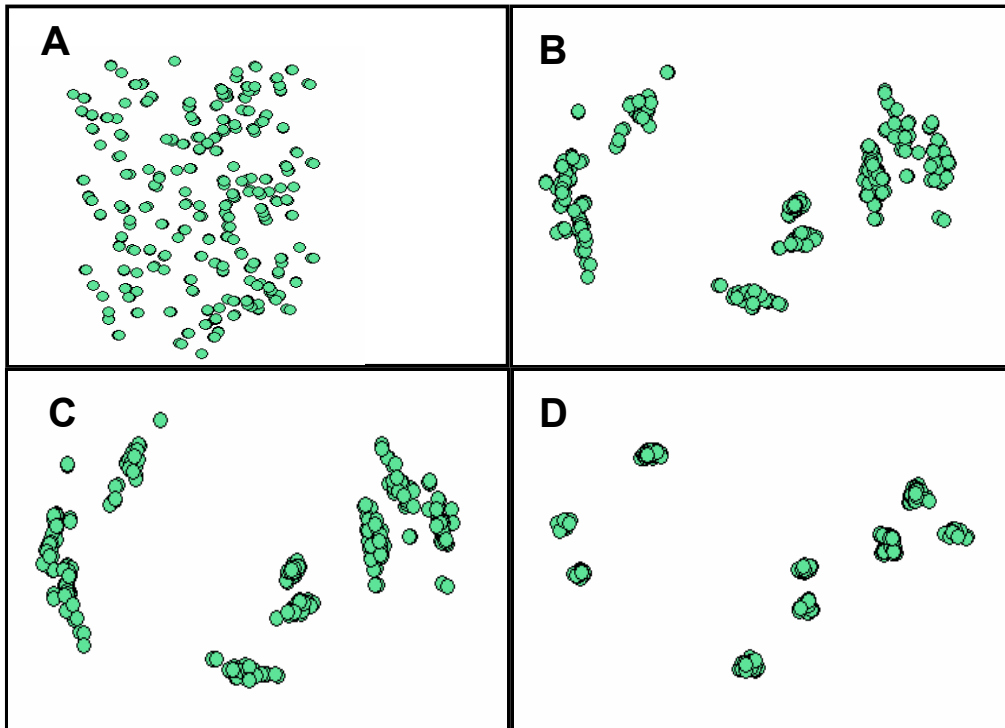
valor 1. Dicho coeficiente puede entenderse biológicamente como un cociente de la tasa exponencial de crecimiento de ambos parámetros. Del mismo modo, el coeficiente “b” indica la diferencia de tamaño entre organismos independientemente de la tasa de crecimiento particular.

Numerosos intentos se realizaron con el fin de cuantificar la forma. El desarrollo de métodos estadísticos tales como el coeficiente de correlación de Pearson (1895), los análisis de componentes principales (Pearson 1901) y los análisis de varianza de Fisher en 1935, abordan la problemática de la forma considerando las magnitudes de caracteres morfológicos de diferentes grupos. En las décadas del 60’ y del 70’, investigadores del área de la biomecánica, acudieron a herramientas estadísticas con el fin de describir los patrones de la variación de la forma dentro y entre grupos. Se denominó a este abordaje “morfometría”, consistiendo en la aplicación de una estadística multivariada a conjuntos de variables morfológicas. Estos estudios analizaron la covariación entre caracteres morfológicos, utilizando métodos estadísticos tales como el análisis de componentes principales o los análisis de funciones discriminantes, entre otros. Según algunos autores (Adams *et al.* 2004), las desventajas de estos abordajes pueden resumirse en las siguientes consideraciones:

- Es preciso la corrección del tamaño corporal para poder analizar únicamente las alteraciones de la forma.
- En general poseen una baja potencia estadística.
- No es posible generar representaciones gráficas de las formas desde las distancias lineales debido a que las relaciones geométricas entre las variables no se preservan. De este modo, algunos aspectos de la forma se pierden.

A fines de la década del 80’ y comienzos de la década del 90’, surge la denominada “morfometría geométrica”, interpretada por algunos autores como parte de una verdadera “revolución” en morfometría (Rohlf & Marcus 1993). La denominada “revolución morfométrica”, implicó el desarrollo de nuevos métodos de análisis para la cuantificación de la forma, entre los que se destacaron el de *data outline* y el de *landmarks*. Kendall y otros colegas que trabajaban en el área de la estadística, propusieron una teoría para el análisis de la forma que hizo posible el uso de métodos multivariados permitiendo además su visualización directa. Los métodos basados en *landmarks*, tal como serán aplicados en el

Capítulo 3 de la presente Tesis, se basan en la ubicación de coordenadas en 2D o 3D en el órgano a analizar. Previo al análisis, se remueve matemáticamente la variación que no esté debida a la forma (posición, orientación y escala) (Figura 1.6). Una vez descartadas, las variables finales pueden considerarse propiamente indicativas de la forma corporal pudiendo ser utilizadas en los análisis estadísticos posteriores.



**Figura 1.6.** Ubicación de los *landmarks* en las alas a través de los diferentes pasos metodológicos realizados para eliminar los efectos de la posición, la orientación y la escala. En el esquema A se presentan los datos crudos. En el esquema B se muestran las coordenadas luego que el efecto de la traslación sea removido. En el C se presentan los *landmarks* luego de eliminado el efecto de la escala. Finalmente, el esquema D muestra la ubicación de las coordenadas al ser realizada la rotación correspondiente.

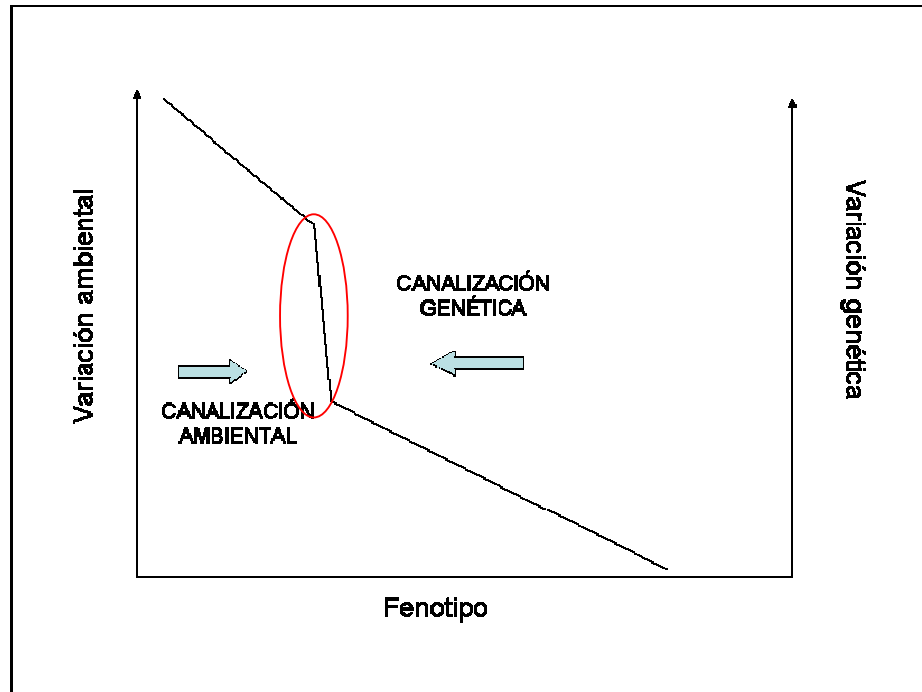
### **La asimetría fluctuante y los caracteres morfométricos**

La simetría conforma uno de los elementos centrales de los planes corporales de los seres vivos. Una gran parte de los animales tienen “simetría bilateral”, en la que o bien un órgano, o bien una parte de él, se encuentra “repetido” en una orientación diferente.

A partir de esta característica, un grupo importante de investigaciones analizaron la denominada asimetría fluctuante, en la que se cuantifican y comparan las diferencias entre los lados derecho e izquierdo de estructuras bilaterales de un individuo. La asimetría fluctuante es interpretada biológicamente como el producto de pequeñas perturbaciones ocurridas al azar durante el desarrollo. Algunos autores consideran la simetría como un estimador de la condición individual (Palmer & Strobeck 1986; Moller 1997). Si bien se han estudiado las relaciones entre la asimetría y los posibles causantes biológicos de la misma, no existe un total acuerdo respecto a qué es lo que indica la asimetría fluctuante desde un punto de vista biológico (esta problemática se tratará de manera ampliada en el Capítulo 3). Más aún, considerando que el tamaño y la forma del cuerpo estarían bajo diferente control genético conforme lo han indicado recientes investigaciones (Matta & Bitner-Mathé 2004), ambos caracteres podrían responder de manera diferente a la acción de la selección natural y/o a las perturbaciones que pudieran tener lugar durante el desarrollo. Esto implicaría que la asimetría fluctuante puede darse no sólo respecto al tamaño sino también a la forma, tal como se analizará más adelante en el Capítulo 3.

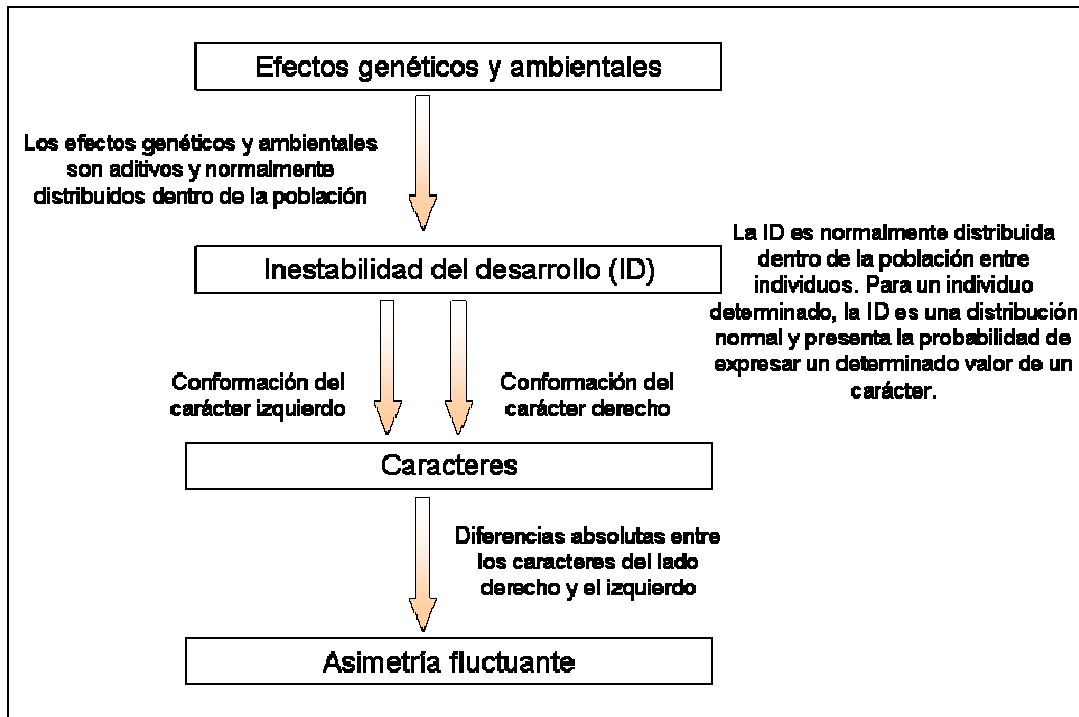
La trayectoria que recorre un determinado organismo durante su desarrollo puede sufrir diferentes tipos de perturbaciones. Sin embargo, debemos previamente precisar algunos conceptos clave. Por un lado, la denominada “canalización” del desarrollo que es definida por algunos autores como la propiedad de un organismo de controlar el desarrollo frente a las perturbaciones genéticas y ambientales a los fines de producir un fenotipo consistente (Willmore *et al.* 2005). También la “canalización” fue entendida como la “similitud de un carácter fenotípico frente a ambientes diferentes” (Zakharov 1992), “el proceso por el cual la variación fenotípica disminuye” (Stearns *et al.* 1995) o bien “el control genético frente a perturbaciones mutacionales o ambientales” (Wilkins 1996). Debido a la diversidad de estas caracterizaciones, resulta preciso diferenciar entre la “canalización genética” y la “canalización ambiental” (Figura 1.7). La “canalización genética” se entiende como el conjunto de procesos que han sido seleccionados evolutivamente en la medida en que han permitido mantener el fenotipo constante frente a la variación genética. Por su parte, la “canalización ambiental” es el conjunto de procesos que proveen una ventaja adaptativa conduciendo al mantenimiento del fenotipo frente a la variación ambiental (Figura 1.7) (Debat & David 2001). La canalización ambiental y la genética se ilustran en la Figura 1.7 y corresponden al rango de ambientes o de variación

genética en el que el genotipo expresa el mismo fenotipo (área marcada en rojo en la Figura 1.7)



**Figura 1.7.** Esquema general de los dos tipos de canalización en un escenario en donde el fenotipo permanece constante. Se aclara que ambas variaciones pueden no ser coincidentes siendo representado de este modo para una mejor comprensión de la Figura.

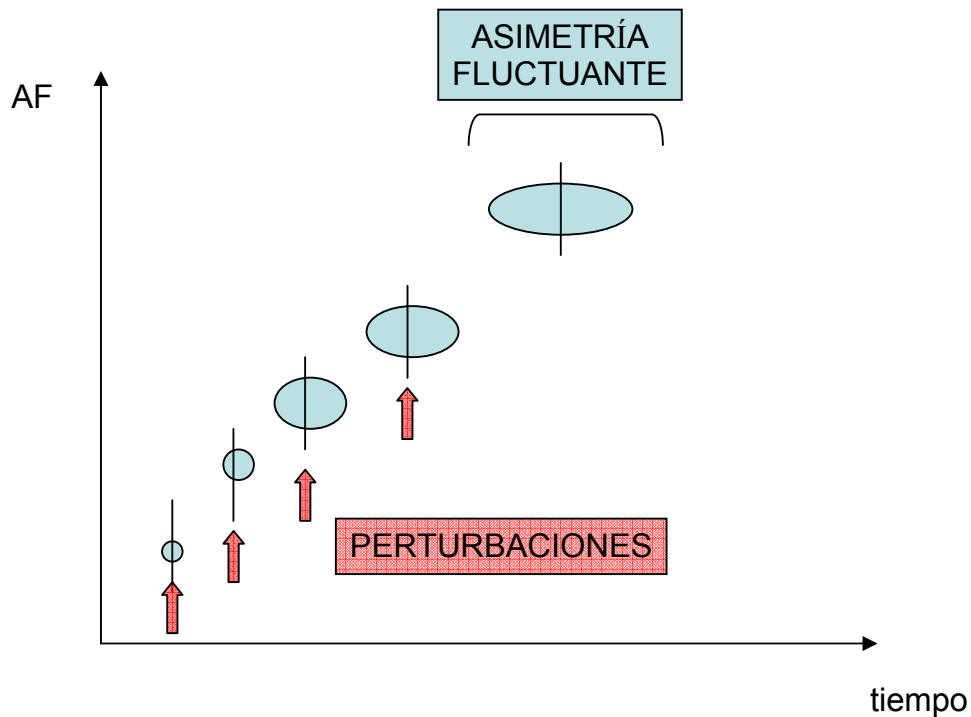
De igual modo, resulta preciso definir el concepto de “estabilidad del desarrollo”. El mismo es entendido como el control del desarrollo frente a los “accidentes” que pudieran ocurrir a lo largo del ciclo de vida bajo condiciones constantes ambientales y genéticas. Pese a esta primera aproximación, existen otras definiciones de la estabilidad del desarrollo. Por ejemplo, en algunos casos la “estabilidad del desarrollo” ha sido presentada como “la capacidad de alcanzar un desarrollo estable” (Zakharov 1992) o bien como un “ideal” bajo determinadas condiciones (Palmer 1994). Otros autores han explicitado que estas perturbaciones –de naturaleza azarosa (Van Dongen & Lens 2000)– son controladas a través de un grupo de mecanismos que han sido históricamente seleccionados dado que permiten alcanzar un fenotipo óptimo bajo un cierto rango de condiciones (Debat & David 2001).



**Figura 1.8.** Esquema que representa la relación entre la inestabilidad del desarrollo y la asimetría fluctuante (Fuller & Houle 2003).

En los últimos años, diferentes trabajos han considerado que la asimetría fluctuante (AF) es un indicador de la inestabilidad del desarrollo, asumiendo que un organismo que se ha desarrollado sin perturbaciones es perfectamente simétrico y que esto le confiere un *fitness* óptimo (Figura 1.8). En cambio, si ocurren perturbaciones durante el desarrollo, pueden producirse desvíos respecto de la simetría bilateral que podrían manifestarse como diferencias que se van acumulando entre ambos lados de los órganos bilaterales. Esta línea de razonamiento se basa en dos suposiciones implícitas: a) que condiciones ambientales que podrían considerarse estresantes durante el desarrollo de un organismo pueden reflejarse en un incremento de la AF (Debat & David 2001) y b) que la AF conlleva a desvíos respecto del *fitness* óptimo. Resulta claro que si bien a) y b) tienen claras relaciones conceptuales entre sí, ambas no están identificadas en la medida en que la presencia de AF puede ser indicador de la inestabilidad de desarrollo cuando el mismo tiene lugar bajo condiciones de *stress* (a), pero no condición suficiente de *stress* (b). Esto es, que no puede garantizarse que un organismo que presente menores valores de asimetría, no posea un *fitness* disminuido. Independientemente de si se cumplen a) y/o b), debe recordarse que las

evidencias empíricas sólo nos informan de la presencia o la ausencia de una correlación entre la AF y el desempeño de diferentes clases de individuos que han crecido bajo determinadas condiciones de cría. Esto no es un problema menor, ya que en la medida en que a) y b) son parte del estado de *stress* de un individuo, nunca abandonan un estado teórico explicativo.

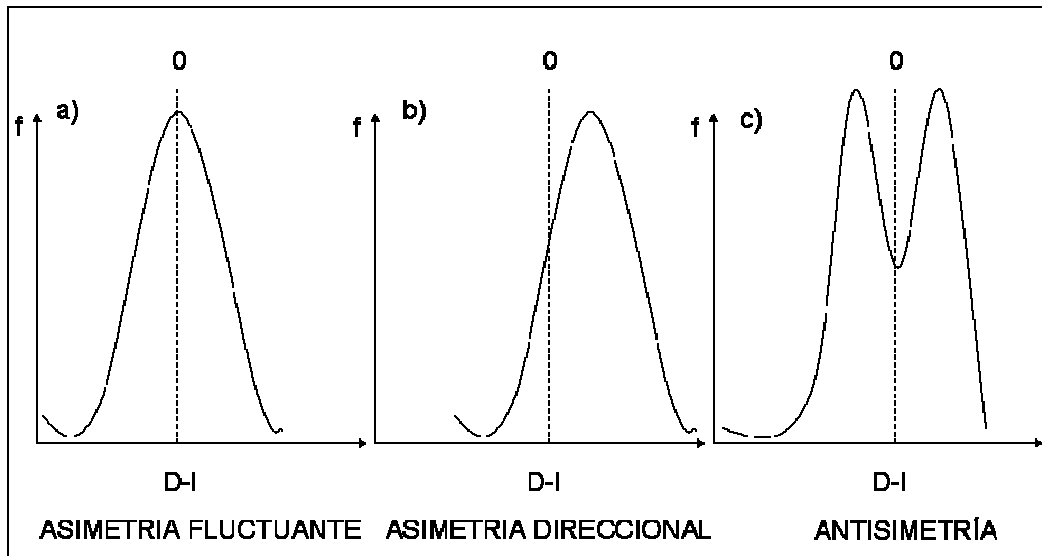


**Figura 1.9.** Representación gráfica de las relaciones entre el desarrollo de un organismo, las perturbaciones y la asimetría fluctuante (AF).

Las sucesivas perturbaciones que va sufriendo un organismo a través de su desarrollo van produciendo alteraciones aleatorias en ambos lados del organismo, lo cual hace que la asimetría fluctuante pueda ser un cuantificador de la diferencia total acumulada (Figura 1.9). Sin embargo, existen diferentes posiciones en la comunidad científica acerca de si estas perturbaciones actúan mediante un efecto azaroso en ambos lados del cuerpo con la resultante teórica de una media 0 (correspondiente a un “ideal” representado por un desarrollo sin perturbaciones) (Figura 1.10 a). Otro tipo de asimetría es la “asimetría direccional” (Figura 1.10 b), en el que un lado del cuerpo es consistentemente más grande que el otro (Palmer 1994). Finalmente, un tercer caso de desvío de la simetría bilateral, es la



denominada “antisimetría” (Figura 1.10 c), que ocurre cuando se registra una diferencia significativa entre ambos lados. Sin embargo, a diferencia de la asimetría direccional en donde el lado mayor es común para todos los individuos, en la antisimetría el lado mayor cambia en función del individuo considerado (Palmer 1994).



**Figura 1.10.** Distribución de las diferencias entre lados del cuerpo (D-I) en organismos bilaterales. El primer caso ilustra la asimetría fluctuante (a), el segundo la asimetría direccional (b) y el tercero la antisimetría (c). f simboliza la magnitud del carácter correspondiente (Palmer 1994).

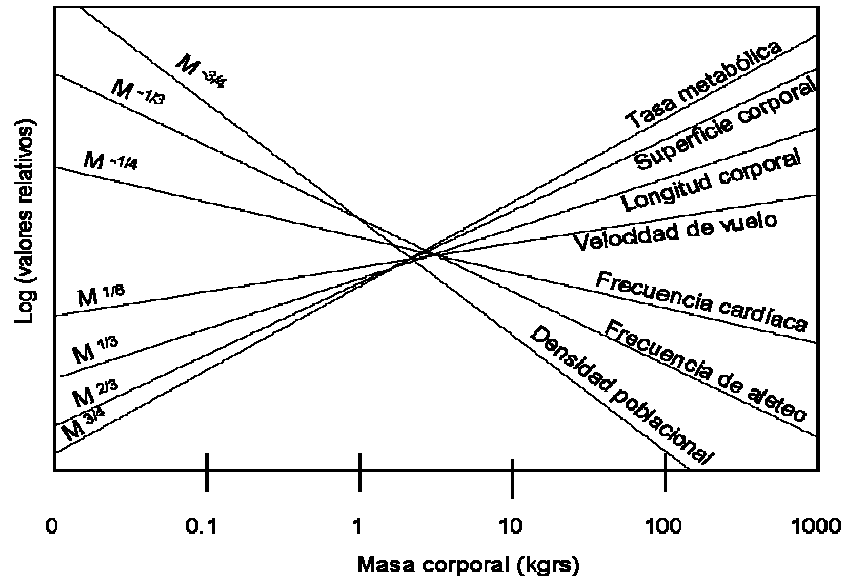
## Otros caracteres de historia de vida

La teoría de la selección natural indica que para una “clase” de organismos que comparten un mismo genotipo y una determinada historia de vida, se le es asignado un determinado valor de *fitness*. Para la consideración de este modelo, resulta preciso introducir brevemente algunas de sus características (Roff 1992):

- Algún indicador del *fitness* se maximiza.
- Existen constreñimientos y restricciones que limitan la posibilidad de formación de ciertas combinaciones de variantes.

- Existe suficiente variabilidad genética como para permitir la formación de combinaciones de mayor *fitness* dentro del marco restrictivo impuesto por el punto anterior.

A partir de los ítems anteriores, los modelos de optimalidad presentan diferentes valores del *fitness* para la combinación de caracteres diferentes. Esto permite conectar conceptual y empíricamente las relaciones que determinados caracteres –tal como el caso del tamaño del cuerpo– pueden tener con otras variables de importancia adaptativa. En ese sentido, es necesario establecer cómo se relaciona el tamaño corporal con otras variables según se ha analizado en las investigaciones presentadas en la bibliografía. En efecto, existen una gran cantidad de trabajos que investigaron las relaciones entre el tamaño del cuerpo y otros caracteres. En la Fig. 1.11 puede verse graficada sólo a modo de ejemplo una de ellas, realizada a partir de investigaciones en mamíferos.



**Figura 1.11.** Algunas relaciones alométricas entre el tamaño del cuerpo y otras variables en mamíferos (Calder III 1984).

Una de las relaciones que frecuentemente han sido estudiadas en la bibliografía es la dada entre el tamaño corporal y el tiempo de desarrollo. A partir de estudios comparativos realizados entre *taxa* lejanamente emparentados se ha planteado una correlación directa

entre ambos. No obstante, cuando los estudios comparativos se realizan a niveles jerárquicos menores (esto es, comparando grupos evolutivamente más cercanos) la relación entre el tamaño corporal y el tiempo de desarrollo no muestra los patrones esperados.

La relación entre este tipo de alometrías y la teoría de la evolución de historias de vida, tiene una complejidad que excede a esta Tesis. Sin embargo, deseamos introducir una breve noción que será de cierta utilidad en los capítulos posteriores. Mientras las alometrías parecen plantear ciertos marcos estructurales básicos y comunes en los organismos, los modelos de optimalidad presentan la distribución de las diferentes variables dentro de las combinaciones posibles. Entre las posibles relaciones, se presenta un caso particular entendido como “compromiso” (*trade-off*). Los *trade-off* surgen en aquellos casos en los que existe cierto balance entre los efectos pleiotrópicos de cada carácter sobre los componentes del *fitness*. Por ejemplo, el mayor tamaño del cuerpo confiere ventaja durante la vida adulta y una desventaja de igual magnitud durante las etapas tempranas del ciclo de vida. La resultante de este balance es un régimen de selección normalizadora en el que se alcanza un óptimo posible (Futuyma 1998).

## **El trabajo interdisciplinario: el caso de la fisiología evolutiva y la ecología evolutiva**

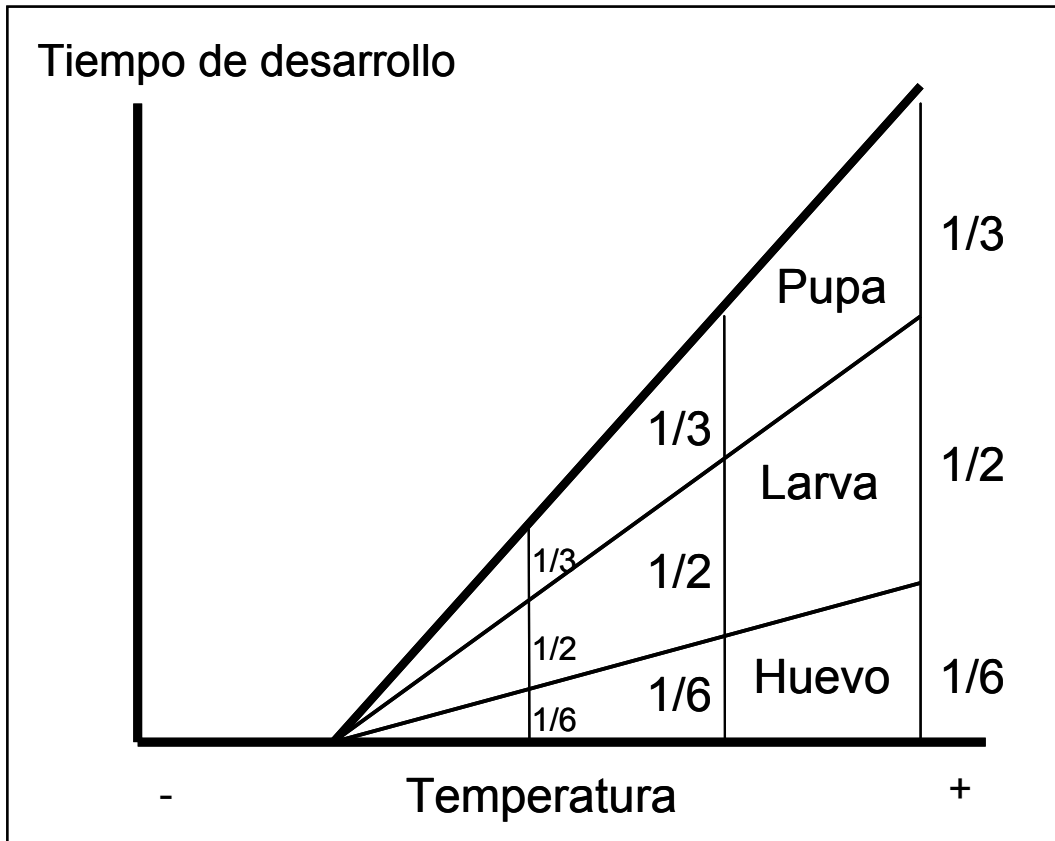
En los últimos años ha surgido un fuerte interés por la integración entre disciplinas y áreas que hasta hace un tiempo estaban distanciadas. Un ejemplo de esto, es la relación entre la ecología, la fisiología y la evolución. Evidentemente, esta propuesta de integración está motivada por virtudes evidentes. Una de las más claras es la búsqueda de un escenario teórico que logre, frente a las explicaciones parciales generadas desde cada una de las áreas sobre un determinado fenómeno (evolutivo en nuestro caso), generar una multiplicidad causal. Paralelamente, el trabajo interdisciplinario conlleva algunos inconvenientes que deben explicitarse y analizarse para su superación, particularmente en lo que concierne a los abordajes específicos. Por ejemplo, una de las dificultades surgidas de la integración entre las tres disciplinas refiere a la escala de análisis. Mientras que una parte importante de las investigaciones en fisiología han abordado muy poco la problemática de la variabilidad intrapoblacional e incluso en ocasiones, interpoblacionales (intraespecíficas), gran parte de los abordajes ecológicos y microevolutivos se han centrado justamente en esos niveles jerárquicos. La ecofisiología evolutiva, disciplina de gran crecimiento en los últimos años,

trata entonces de generar “un puente” para hacer posible el diálogo, incorporando el análisis de la variación a diferentes escalas. Lejos de tratarse de un elemento trivial, este enfoque vuelve a poner el acento en la variación que ha sido central tanto a partir del impacto de Darwin, como desde la década del 30’ con la consolidación de la denominada teoría sintética de la evolución.

### **La ontogenia, los caracteres fisiológicos y de historia de vida.**

El interés por el estudio del ciclo de vida de los organismos, fue reincorporado en los últimos años en el marco de la confluencia entre los estudios de la evolución y del desarrollo, un área que ha dado en llamarse “Evo-devo” (*Evolution of development*). La misma se generó a partir de la integración de disciplinas tales como la genética, la biología molecular y la embriología (Fox Keller 2000). Más allá de las diferentes objeciones que se han realizado respecto al tipo de abordaje que posee el área de “Evo-devo” (Fox Keller 2000), es notable su capacidad heurística, entendida ésta como la capacidad de hacer proliferar líneas fructíferas de investigación. Del mismo modo, sorprende cómo las propuestas que han surgido desde este campo cuestionan, casi sin proponérselo, el predominio que han tenido los estudios realizados sobre el estadio reproductivo de muchas especies como unívocos indicadores de la respuesta de una especie frente al cambio ambiental, sin siquiera hacer mención a lo que ocurre en otras etapas del ciclo de vida.

Actualmente pueden reconocerse algunas “tensiones” en la comunidad científica acerca de cómo interpretar evolutiva y ecológicamente al fenómeno del desarrollo. Y, en este interesante escenario, pueden encontrarse (al menos) dos posiciones antagónicas. Dichas posiciones han quedado claramente expresadas en un reciente “debate” – protagonizado en algunas revistas especializadas– acerca de las variaciones de la tasa de desarrollo a través del ciclo de vida de los organismos. Una de las posiciones ha sostenido que la tasa de crecimiento es similar a través de la ontogenia (Gillooly et al. 2002). En la Figura 1.12 se presenta un esquema del patrón esperado considerando que: a) la velocidad de desarrollo es isomórfica entre diferentes estadios del ciclo de vida y b) para los organismos ectotermos la velocidad de desarrollo guarda una relación inversa con la temperatura de cría.



**Figura 1.12.** Proporciones constantes en la tasa de desarrollo a lo largo de la ontogenia (Jarosik *et al.* 2002).

Frente a la propuesta que sostiene un isomorfismo en los diferentes estadios del desarrollo, se destacaron otras hipótesis que sugieren que los diferentes estadios que componen el ciclo de vida responden diferencialmente a la variación ambiental. Entre estas posiciones, se destaca la hipótesis de una “historia de vida dependiente del estado”, que sostiene que los diferentes estadios de un organismo poseen sensibilidades diferentes a los cambios ocurridos en el ambiente (McNamara & Houston 1996; Rombough 2003). Así, los diferentes “caminos” que el organismo adopte, dependerán directamente del estadio del desarrollo en el que mismo se encuentre. Evidentemente, en estos modelos la propia noción de “ambiente” sufre una ampliación, a partir de la incorporación del estado interno (genético, fisiológico, etc.). Así, la denominada “decisión dependiente del estado” –que será profundizada en el Capítulo 5– es un excelente modelo para reconocer estrategias de crecimiento frente al cambio ambiental.

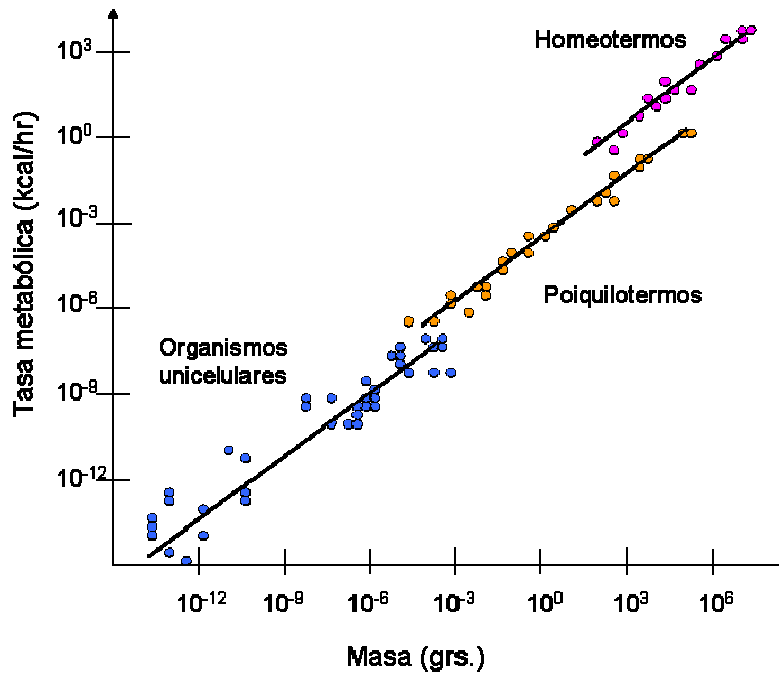
## **Las relaciones alométricas en fisiología evolutiva y ecología evolutiva**

Desde Galileo Galilei y Newton, la ciencia moderna se ha centrado en la búsqueda de leyes generales en el mundo natural. En el caso de la biología, a partir de la consolidación de la Teoría Sintética en la década del 30', la discusión sobre leyes que gobiernan el mundo de la vida, fue una parte central de los programas de investigación de diferentes disciplinas. Incluso, las leyes parecieron actuar para diversos autores como criterio de cientificidad, en los que el concepto de “explicar científicamente” fue restringido a la denominada explicación nomológica, o sea, a la explicación de un determinado fenómeno mediante el uso de leyes (Cleland 2002).

Evidentemente, la búsqueda de leyes también repercutió en las áreas específicas por las que esta Tesis profundiza: la ecología, la fisiología y la evolución. De hecho, en el apartado 1.8 de este capítulo hemos hecho referencia a algunas alometrías entre algunos caracteres y el tamaño corporal. Estas investigaciones dirigidas al descubrimiento de grandes regularidades tuvieron características que permiten entender mejor los objetivos generales (sección 1.4) y particulares (presentados en los Capítulos al 2 al 8) de esta Tesis. La primera es que en general estas alometrías se han propuesto desde disciplinas tales como la macroecología o la ecofisiología (Calder III 1984). Las regularidades fueron observadas al considerar grandes grupos taxonómicos, por lo que su extrapolación a escalas menores (“niveles inferiores” en esta Tesis) deberá ser empíricamente contrastada si se quisiera considerar dichas regularidades como leyes generales. A la vez, una importante cantidad de contraejemplos, obliga a interrogar en qué medida dichas alometrías pueden ubicarse como “leyes” sean tanto universales como probabilísticas.

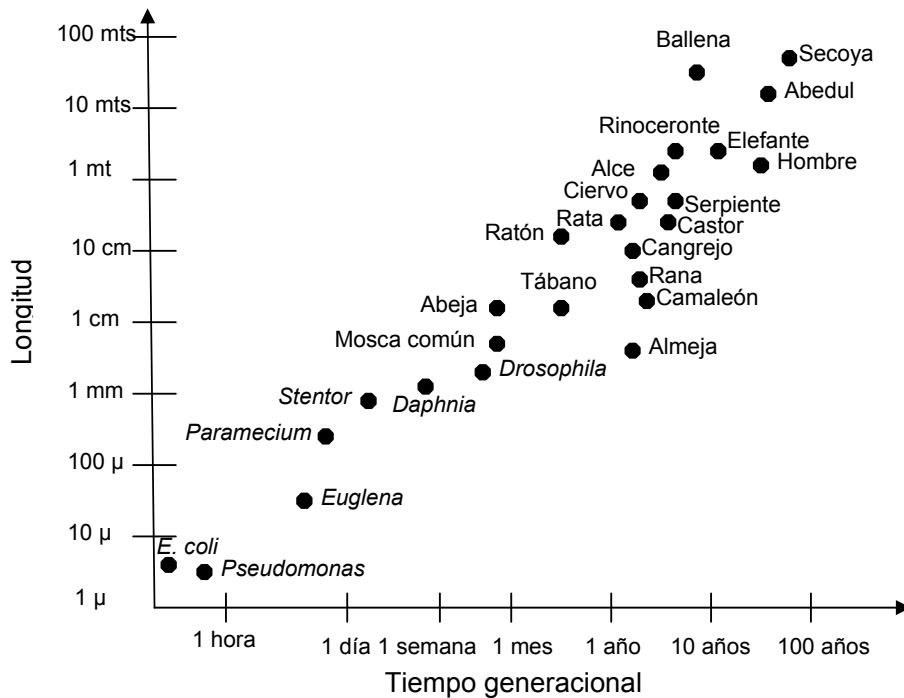
Una de las alometrías conocidas es la propuesta por Kleiber en 1932, que consiste en la relación positiva entre el tamaño corporal y la tasa de metabolismo, con una pendiente de 0.75 (Figura 1.13). La interpretación biológica que se ha hecho de esta “ley” ha sido que la eficiencia en el uso de la energía es aproximadamente equivalente en los animales. Sin embargo, la magnitud de la pendiente de dicha relación (0.75) fue objeto de sorpresa y discusión, en la medida en que se esperaba una relación de  $2/3$  dado que los organismos “ingieren” la energía en dos dimensiones, pero su energía es utilizada para mantener

cuerpos de tres dimensiones. Una de las explicaciones posibles de esta diferencia respecto al valor esperado, es que el factor condicionante es el área de la sección transversal y no la superficie total (McMahon & Bonner 1986).



**Figura 1.13.** Alometría de Kleiber entre tamaño corporal y metabolismo (Ginzburg & Colyvan 2004)

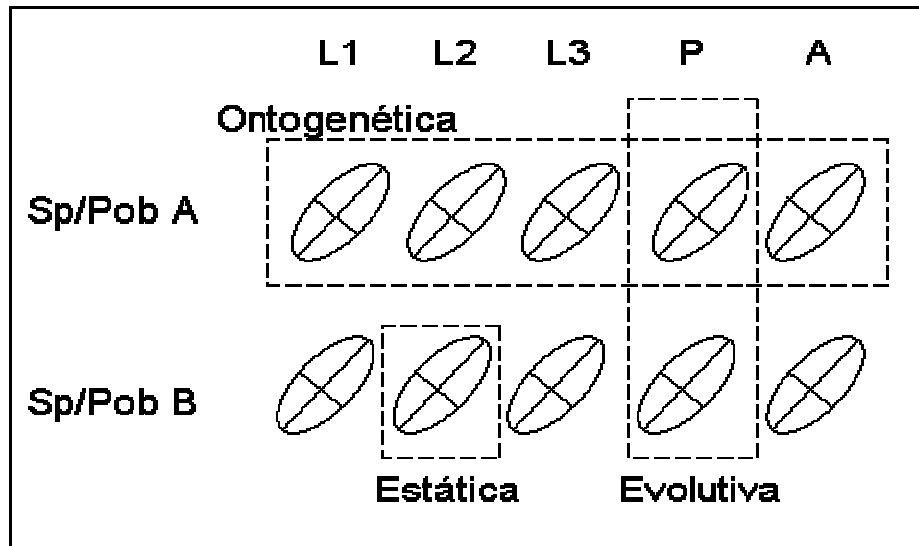
Entre otras alometrías, se destacan dos que involucran al tiempo generacional. Una de ellas fue la observada, entre otros por Bonner en su libro “*Size and cycle*”, en la que se indica que el tiempo de maduración es proporcional a  $1/4$  de la masa de los organismos. La otra alometría vincula al tiempo generacional con la longitud de los organismos (registrada en el período de madurez sexual) (Figura 1.14). Tal como hemos mencionado, ambos estudios se realizaron sobre la base de datos obtenidos en estudios de taxones de nivel superior, es decir a niveles jerárquicos altos (muy diferenciados evolutivamente).



**Figura 1.14.** Alometría entre tiempo generacional y longitud (McMahon & Bonner 1986).

A los fines de profundizar en el análisis de las alometrías, resulta sumamente útil la clasificación dada por Cock en 1966 (Schlichting & Pigliucci 1998). Dicho autor reconoce al menos tres tipos diferentes de alometrías: estáticas, ontogenéticas y evolutivas. Las alometrías estáticas refieren a patrones de covariación entre caracteres medidos en diferentes individuos de un mismo “grupo” (estadio, población, especie) (Figura 1.15). Las alometrías ontogenéticas se refieren a la covariación de caracteres medidos en diferentes momentos de la ontogenia, a través de una trayectoria de crecimiento o entre diferentes estadios del ciclo de vida (Figura 1.15). Por último, las alometrías evolutivas se refieren a la covariación entre caracteres medidos en individuos de un mismo estadio pero provenientes de diferentes poblaciones o especies (Figura 1.15). A su vez, recientes posiciones sostienen la pertinencia de incorporar un cuarto tipo de alometría, entendido como “alometría plástica”, y que se refiere a los casos en que las diferentes alometrías son “gatilladas” por diferentes ambientes en individuos de un mismo grupo (Schlichting & Pigliucci 1998).





**Figura. 1.15.** Diferentes tipos de alometrías ejemplificados para un insecto holometábolo como *Drosophila*. L1 a L3 se corresponden con los 3 estadios larvales, P refiere a la pupa y A al adulto. La alometría estática es medida dentro de un grupo determinado. La alometría ontogenética es medida entre diferentes estadios dentro de una especie o población. La alometría evolutiva es medida entre diferentes especies o poblaciones. Las elipses refieren a relaciones entre dos caracteres diferentes (Schlichting & Pigliucci 1998).

### **Las hipótesis acerca de las varianzas: sobre sexos y ambientes térmicos**

Si bien uno de los quiebres epistémicos que generó la teoría de Darwin fue poner el centro de atención en la variación, una parte importante de las investigaciones actuales continúan centrándose en el análisis de la media estadística reduciendo la varianza a un “ruido de fondo” y despreciando el significado evolutivo que la misma posee. Si bien esta omisión es común a diferentes investigaciones, en el caso de una Tesis del área evolutiva se trata de un olvido grave. En esta Tesis se presentan hipótesis y predicciones acerca de los factores causales de las varianzas de los diferentes caracteres. En particular, deseamos centrarnos en dos: la hipótesis propuesta sobre la base de comparaciones de varianzas entre sexos (hipótesis de Rensch) y la dada entre temperaturas (hipótesis en relación a los efectos de ambientes de *stress*).

#### **Regla de Rensch**

El dimorfismo sexual es muy frecuente en los animales, siendo reconocido en caracteres de naturaleza diferente. En general se ha encontrado una notable variabilidad

tanto en las características de cada uno de los sexos, así como en la magnitud del dimorfismo en comparaciones dentro y entre *taxa*. En 1959, Rensch observó que a través del tiempo evolutivo, los machos presentaban una mayor variación para el tamaño del cuerpo que las hembras, independientemente de cuál sexo mostrara un tamaño mayor. La explicación que se propuso de esta observación era que la selección sexual a favor de un mayor tamaño del macho, podría ser la principal “fuerza” evolutiva asociada al dimorfismo (Fairbairn & Preziosi 1994). Desde entonces, se han presentado algunas evidencias que apoyan esta hipótesis (Abouheif & Fairbairn 1997; Kraushaar & Blanckenhorn 2002; Székely *et al.* 2004). Desde entonces, conocida como “regla de Rensch”, ha establecido una hipótesis acerca de la variación del dimorfismo sexual. La predicción es que los caracteres morfológicos asociados al macho divergirán en una magnitud mayor que en el caso de los caracteres específicos de la hembra. Si bien esto fue verificado en vertebrados (Fairbairn & Preziosi 1994; Abouheif & Fairbairn 1997), la evidencia es aún escasa e inconsistente para los invertebrados (Sivinski & Dodson 1992; Abouheif & Fairbairn 1997; Johansson *et al.* 2005).

### **Hipótesis acerca de la relación entre la varianza y el *stress* térmico**

El estudio de los componentes de la varianza fenotípica en caracteres de distribución continua es fundamental para una caracterización de poblaciones naturales, en la medida que la variación genética es la materia prima del cambio evolutivo (Hartl & Conner 2004). En estas indagaciones, la varianza total es interpretada como fenotípica, pudiendo separarse en diferentes componentes (en los diseños que así lo permitan) que representan las causas genéticas y ambientales de la variación. En este sentido, la ecuación fundamental de la genética cuantitativa nos muestra que la varianza fenotípica se puede expresar de la siguiente manera:

$$V_F = V_G + V_E + V_{G \times E} + 2Cov(G, E)$$

donde  $V_G$  es la varianza genotípica y  $V_E$  la varianza ambiental;  $V_{G \times E}$  es la interacción entre el genotipo y el ambiente; y  $Cov(G, E)$  es la covarianza entre el genotipo y el ambiente (Falconer & Mackay 1996).  $V_E$  puede referirse a dos tipos de situaciones: a la varianza producida por macroambientes distintos –por ejemplo distintos tratamientos térmicos

aplicados en el laboratorio— o puede referirse a diferencias fenotípicas causadas por diferentes microambientes (pequeñas diferencias aleatorias) dentro de un determinado macroambiente.

Cabe mencionar que las estimaciones de la varianza genética son específicas de las poblaciones en los cuales se han medido (Falconer & Mackay 1996). De hecho, distintas condiciones ambientales (macroambientes) no sólo afectan la variabilidad microambiental (no genética), sino que pueden afectar simultáneamente la variabilidad genética (un tipo de interacción genotipo x ambiente). En particular, en los casos en que se tratan de condiciones ambientales desfavorables (tal como pueden ser las condiciones de *stress*), se espera un aumento de la varianza aditiva. Algunas interpretaciones que se han dado al respecto plantean que esto permitiría una aceleración en la adaptación de los organismos. Por el contrario, una menor cantidad de varianza aditiva impondría un aumento en los constreñimientos evolutivos. Respecto a las posibles causas eficientes de este fenómeno, se han planteado diversos mecanismos genéticos que podrían explicar el aumento de la varianza aditiva frente a condiciones ambientales estresantes (Hoffmann & Merilä 1999):

- a) Un efecto directo del *stress* sobre las tasas de recombinación y mutación.
- b) Una historia de selección para la canalización disminuyendo las diferencias fenotípicas en condiciones comunes favorables.
- c) Un incremento de las diferencias fenotípicas entre genotipos debido a condiciones de *stress*.

Paralelamente, algunos autores han hecho hincapié, no en el aumento de la varianza aditiva, sino en el incremento de la varianza ambiental frente a la presencia de condiciones macroambientales estresantes (Hallas *et al.* 2002; Pétavy *et al.* 2004). En estos casos, se señala que el incremento podría deberse a una mayor inestabilidad del desarrollo.

Respecto al caso particular de la adaptación térmica, se han presentado resultados en los que condiciones térmicas consideradas no favorables (Ej.: temperaturas extremas superiores e inferiores) en efecto han correlacionado con un aumento de la variabilidad total en los caracteres analizados (David *et al.* 1994; Barker & Krebs 1995; De Moed *et al.* 1997; Imasheva 1998). En el marco específico de las investigaciones que se realizaron para esta Tesis, nuestro interés ha sido analizar los efectos de diferentes tratamientos térmicos

considerados como estresantes en la bibliografía, tanto en aquellos casos de temperaturas extremas máximas así como aquellos otros de temperaturas fluctuantes.

## Capítulo 2. Clinas latitudinales y altitudinales en caracteres asociados al tamaño en *Drosophila*

### Resumen

**Preguntas:** En general, se considera que el tamaño del cuerpo de los organismos está inversamente relacionado con la temperatura de cría, tanto al analizar la variación interpoblacional como en la respuesta plástica. En este contexto nos hemos formulado las siguientes preguntas:

- i) ¿Diferentes caracteres asociados al tamaño muestran patrones clinales coincidentes a gradientes latitudinales y altitudinales?
- ii) ¿Son similares los patrones del tamaño corporal frente a gradientes térmicos entre los escenarios interpoblacionales y los de plasticidad?
- iii) ¿Los efectos de la amplitud térmica son equivalentes entre poblaciones ubicadas a latitudes y/o altitudes diferentes?
- iv) ¿Cómo responde el *wing loading* –una variable combinada de reconocido valor adaptativo– frente a diferentes tratamientos térmicos?

**Métodos:** Se recolectaron en localidades de la Argentina individuos de las especies *D. buzzatii* y *D. melanogaster*, y se midieron caracteres asociados al tamaño del fémur y del ala. Posteriormente, se analizaron las respuestas de caracteres relacionados con el tamaño frente a diferentes tratamientos térmicos en individuos provenientes de poblaciones de altura y llanura.

**Resultados:** El análisis de los patrones de variación mostró que en general los caracteres relacionados con el tamaño respondieron de modo clinal. No obstante, los patrones alométricos exhibieron discordancias en las comparaciones interpoblacionales y entre tratamientos (respuestas plásticas). Respecto de los efectos de la amplitud térmica, se observó una disminución del tamaño corporal en tratamientos de mayor *stress* térmico. Por último, la respuesta del *wing loading* parece concordar en términos generales con las predicciones esperadas para las diferentes temperaturas de cría.

**Conclusiones:** Nuestros resultados muestran patrones cercanos a los esperados en escenarios selectivos explicados por la variación térmica. Sin embargo, las diferentes respuestas observadas en escenarios interpoblacionales frente a los de plasticidad, obligan a la consideración crítica de las hipótesis planteadas para los diferentes niveles jerárquicos.

## Introducción

El tamaño del cuerpo es un carácter que ha ocupado un rol central dentro del campo teórico de la biología. De hecho, en disciplinas tales como la fisiología, la ecología y la evolución, ha sido presentada como una variable a partir de la cual logran establecerse hipótesis y/o predicciones para los patrones de variación de otros caracteres relacionados. Este rol se ha conservado incluso en la denominada teoría de las historias de vida (Roff 1992; Roff 2001). Del mismo modo, no sólo posee un papel central dentro del marco teórico, sino que también se ha registrado abundantemente en la literatura específica una correlación entre el tamaño del cuerpo y otros caracteres (Peters 1983; Calder III 1984; Gaston & Blackburn 2000). Por todo lo mencionado, es que se ha elegido el estudio del tamaño corporal como el punto de inicio del recorrido de esta Tesis.

La comprensión de los efectos de la variación en las condiciones ambientales sobre los organismos se trata de uno de los retos de la biología moderna. En este sentido, la posibilidad de dar cuenta de la variación del tamaño del cuerpo en los diferentes ambientes a los cuales se ve expuesta una población, ha sido una de las vías de indagación centrales en el marco de la teoría de la evolución de los caracteres de historia de vida. En particular, uno de los patrones empíricos que ha intrigado a los biólogos son las clinas latitudinales para el tamaño del cuerpo. Esta correlación conocida como la “Regla de Bergmann” –consistente en el incremento del tamaño corporal a medida que nos movemos del ecuador hacia los polos– se ha verificado frecuentemente y se la ha asociado causalmente con la disminución de la temperatura ambiente (Gilchrist & Partridge 1999; Blackburn *et al.* 1999; De Jong & Bochdanovits 2003; Ochocinska & Taylor 2003; Gibert *et al.* 2004). Considerando que, en general, la temperatura ambiente disminuye a medida que nos movemos a latitudes y altitudes mayores, se ha analizado la variación de caracteres asociados al tamaño en diversos organismos (en particular en *Drosophila*) en diferentes escalas ambientales.

Las clinas latitudinales para el tamaño corporal en *Drosophila* se han confirmado en diferentes continentes: Australia, América del Norte, Europa, África y Asia (Capy *et al.* 1993; Imasheva *et al.* 1994; James *et al.* 1995; Huey *et al.* 2000; Hallas *et al.* 2002; De Jong & Bochdanovits 2003). Sin embargo existen algunos inconvenientes para considerar a la regla de Bergmann como una verdadera ley<sup>4</sup>. Veamos brevemente cuatro dificultades que deben ser cuidadosamente contempladas a los fines de su consideración nomológica:

---

<sup>4</sup> Evidentemente se está haciendo un uso amplio de la noción de ley. Parte de esta problemática será presentada en el Capítulo 6.

1. La búsqueda de mecanismos que logren explicar una cantidad importante de fenómenos, es por excelencia el campo heurístico elegido en la biología moderna. En el caso de los endotermos, la explicación causal de las clinas latitudinales para el tamaño del cuerpo se basa en la relación entre la superficie y el volumen de los organismos. En este marco, se postula que los individuos más grandes tienen una relación superficie/volumen menor que los más pequeños. Así, los individuos de mayor tamaño se verían favorecidos a mayores latitudes debido a que la menor relación superficie/volumen optimizaría la conservación del calor. Del mismo modo, en ectotermos también existen numerosos casos que obedecen a la “regla de Bergmann”. Sin embargo, una explicación basada en la conservación del calor no parece plausible en organismos ectotermos como los insectos. Todo esto lleva a preguntarnos acerca de las causas proximales de las clinas para el tamaño corporal en ectotermos, a los fines de reconocer el/los procesos evolutivos implicados.

Algunos autores han planteado, pese a la falta de explicaciones mecanicísticas en estos casos, que la temperatura continúa siendo el principal factor selectivo (Partridge et al. 1994). Por ejemplo, cabe mencionar la siguiente afirmación acerca de los patrones clinales: “The repeatability of this finding in different species, and in the same species in different continents, suggests that natural selection is responsible. Although many ecological variables change with latitude and could therefore be implicated as selective agents for size clines, several lines of evidence suggest temperature may be of particular importance” (James & Partridge 1998).

Contrariamente, otros autores han sugerido que las clinas podrían no ser consecuencia de la temperatura, y que otros factores podrían estar implicados. Este es el caso de las moscas de la fruta del género *Drosophila* en las cuales las clinas para el tamaño del cuerpo no parecen tener una causa única. Por ejemplo, mientras la temperatura ha sido sugerida como el principal determinante causal de las clinas en *D. melanogaster*, no parece existir asociación entre el tamaño y la variación térmica en *D. serrata* (Hallas et al. 2002).

2. Pese al rol central que ocupa el tamaño corporal dentro de los escenarios teóricos, resulta claro que la elección de variables que funcionen como indicadoras unívocas del mismo resulta una tarea de por sí difícil. Esta dificultad parece encontrar su principal motivo en que el crecimiento de los organismos en general no es isométrico, por lo que la elección de cualquier carácter significaría el desconocimiento de las propias relaciones complejas que se esconden en las relaciones métricas entre caracteres. Estas relaciones entre caracteres han sido indagadas tanto en cuanto a las alometrías en el tamaño de



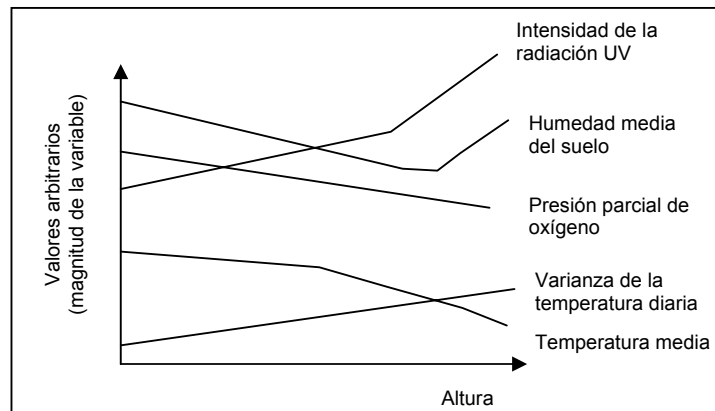
diferentes partes del cuerpo (tal como el caso del *wing loading* siendo una variable compuesta que consiste en el cociente entre el tamaño del ala y del tórax), así como entre longitudes de diferentes partes de un mismo órgano, tal como el caso del ala de los insectos en general y en *Drosophila* en particular (Weber 1990; Loeschcke *et al.* 1999; Klingenberg & Zaklan 2000; Gilchrist & Partridge 2001; Bublly & Loeschcke 2005). Particularmente, un caso interesante lo constituye el cambio de las relaciones alométricas entre porciones del ala de *D. subobscura*, que han sido detectados a través del análisis comparativo de las clinas latitudinales convergentes descritas en las poblaciones colonizadoras de América del Norte y las del área ancestral de Europa y norte de África (Huey *et al.* 2000). En estos casos, pese a que se ha observado que la correlación entre la longitud del ala y la latitud es predecible y probablemente adaptativa, las clinas en Norteamérica y en Europa han mostrado diferencias en cuanto a qué parte del ala explica las variaciones (Huey *et al.* 2000).

3. En la búsqueda de las causas eficientes, una característica de una gran parte de los trabajos ha sido el de indagar patrones clinales a través de la comparación de localidades entre las cuales existe un gran contraste ambiental. Esto obliga a la explicitación del supuesto que los caracteres que muestran variación clinal responden de modo lineal a lo registrado entre los extremos de un gradiente. Esto es, la existencia de una respuesta cuantitativa (y no cualitativa) a las variaciones ambientales. Así, pueden esperarse valores “intermedios” de los caracteres asociados al tamaño del cuerpo respecto a aquellos registrados en los extremos de la clina analizada. Sin embargo, este aspecto parece no ser un supuesto menor en la medida en que el análisis de patrones ambientales a menores escalas resulta de suma importancia a los fines de la detección de los mecanismos.

4. Por último, y fuertemente asociado a los tres ítems anteriores, se presentan en la bibliografía especializada una importante cantidad de excepciones para la predicción de organismos más grandes a temperaturas más frías. De hecho, en diferentes estudios se han observado efectos contradictorios de la temperatura sobre el tamaño corporal (Angilletta & Dunham 2003). Esta falta de consistencia ha llevado a algunos autores a sugerir que podría no haber explicaciones generales para todos los patrones clinales (David *et al.* 2006).

Tal como se ha adelantado, en general la temperatura ha sido la variable elegida como “fuerza selectiva” para explicar las clinas latitudinales. En particular, la mayoría de las investigaciones centraron su análisis en el estudio de los efectos de la temperatura media, tanto a través de estudios experimentales así como también en la interpretación de

los patrones en poblaciones naturales registrados directamente en los ambientes de origen (Santos et al. 2005). Sin embargo, la temperatura media es sólo una entre todas las variables que deberían ser consideradas. Este reconocimiento de los otros factores ambientales permite reconocer importantes diferencias entre los gradientes latitudinales y altitudinales. En efecto, si bien se observa en general, una relación inversa entre la temperatura media y la latitud o la altitud, la simetría entre ambos gradientes sólo puede sostenerse en una primera aproximación. Por ejemplo, una diferencia vinculada a la variación en la temperatura entre ambos tipos de gradientes se refiere a la magnitud de la amplitud térmica diaria (la diferencia entre las temperaturas diurnas y nocturnas) que, en general es mayor a mayores altitudes (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Patrones generales de caracteres ambientales que pueden observarse en gradientes altitudinales (Navas 2003).

La importancia de la amplitud térmica como un factor selectivo fue planteada en estudios que analizaron las respuestas de ciertos caracteres de historia de vida a los cambios ambientales (Loeschcke *et al.* 1997; Pétavy *et al.* 2001a). En ellos se ha registrado una fuerte consistencia en los efectos de la amplitud térmica sobre el tamaño corporal. En ese sentido, se ha observado una marcada disminución del tamaño en individuos sometidos a tratamientos de amplitud térmica respecto a otros con tratamientos de similar temperatura media pero sin variación diaria (Pétavy *et al.* 2001a).

Tal como se adelantó en el Capítulo 1, las alometrías entre diferentes partes del cuerpo producen una complejización para este tipo de estudio, necesaria a los fines de lograr una mejor comprensión de los efectos del ambiente sobre el tamaño y la forma de los

organismos. Una de las alometrías que ha sido abundantemente analizada es la denominada *wing loading* –objeto de una polisemia que será analizada en el Capítulo 6–considerada además por diferentes autores como un indicador de la capacidad de vuelo. El *wing loading* se define como el cociente entre un indicador del tamaño del ala y un indicador del tamaño del cuerpo (Loeschcke *et al.* 1999; Bublly & Loeschcke 2005; David *et al.* 2006). Si bien resulta claro que su caracterización como indicador unívoco de la capacidad de vuelo de un organismo resulta una evidente sobresimplificación a la luz de diferentes trabajos realizados en el área de la biología mecánica, su estudio tiene la importante virtud de poner a prueba hipótesis claramente establecidas. Si se considera que temperaturas más frías correlacionan con una menor densidad del aire puede indicarse que:

- Ante escenarios de diferente altitud, se espera que las poblaciones de altura presenten mayores magnitudes de *wing loading* de modo de poder contrarrestar un ambiente con menor densidad del aire, ya que mayores tamaños del ala respecto del cuerpo permiten una mejor sustentación durante el vuelo.
- En el caso de individuos que se han desarrollado en ambientes térmicos diferentes, se espera que los organismos criados a menor temperatura presenten valores mayores de *wing loading* de modo de poder contrarrestar la menor densidad del aire.
- Por último, se espera que organismos sometidos a factores térmicos de *stress* presenten valores menores de *wing loading*, viendo afectada así su capacidad de vuelo respecto a aquellos que han sido criados en condiciones ambientales ausentes de efectos de *stress*.

No obstante, los patrones del *wing loading* han tenido otras interpretaciones. Asumiendo una forma del ala constante, la capacidad de vuelo dependerá de la frecuencia del aleteo. Sin embargo, diferentes estudios han mostrado que en organismos pequeños –tales como la mayoría de las especies de *Drosophila*– esta frecuencia disminuye con la temperatura. De este modo, una forma de compensar esto podría ser el incremento en el tamaño relativo de las alas (Gilchrist & Huey 2004).

Por todo lo indicado respecto al tamaño corporal y las variables asociadas, un estudio que busque comparar la respuesta diferencial de poblaciones naturales sometidas a diferentes regímenes térmicos debe ser realizado en una especie que permita, además,

analizar variables asociadas al tamaño en gradientes ambientales, a la vez que permita potentes aproximaciones experimentales. Por ello, *Drosophila* parece tratarse de un modelo adecuado para una indagación de estas características.

El primer objetivo del presente trabajo fue analizar la variación de caracteres asociados al tamaño corporal a lo largo de gradientes latitudinales y altitudinales en poblaciones de *D. buzzatii* y *D. melanogaster*. El segundo objetivo de esta sección de la Tesis fue estudiar los efectos de diferentes regímenes térmicos (constantes y alternados) sobre caracteres asociados al tamaño del cuerpo en individuos de ambas especies derivados de colectas realizadas en localidades ubicadas a altitudes contrastantes. De este modo nos propusimos analizar los patrones de variación en escenarios interespecíficos, interpoblacionales (intraespecíficos) y de plasticidad. Las preguntas específicas que buscamos responder son:

- i) ¿Los caracteres asociados al tamaño del cuerpo varían clinalmente a lo largo de gradientes latitudinales y altitudinales? ¿Responden isomórficamente las diferentes partes del cuerpo (distintos órganos) y las diferentes partes de un mismo órgano a la variación ambiental interpoblacional? ¿Responden de modo similar diferentes partes del cuerpo de un organismo frente a diferentes regímenes térmicos?
- ii) ¿La amplitud térmica produce efectos similares sobre poblaciones ubicadas en localidades de altitudes diferentes? ¿Son similares las alometrías entre las diferentes relaciones del ala en temperaturas de cría diferentes (constantes y alternadas)?
- iii) ¿Cuál es la respuesta del *wing loading* en organismos de diferentes poblaciones y especies frente a diferentes tratamientos térmicos?

## **Materiales y métodos**

### **Cepas y especies**

Las muestras poblacionales de *D. buzzatii* se obtuvieron en 6 localidades en el noroeste argentino en Febrero del 2003, y *D. melanogaster* en 6 localidades del oeste de Argentina en Febrero del 2004 (Figura 2.2). En cada localidad los individuos se recolectaron utilizando redes entomológicas sobre trampas que contenían un cebo

preparado con banana fermentada. Luego del muestreo, las moscas se separaron por sexo y especie. Las hembras de cada localidad se utilizaron para la fundación de isolíneas. Esto se realizó criando individualmente la descendencia de hembras “salvajes” inseminadas en la naturaleza en tubos con medio de cultivo instantáneo para *Drosophila*. Dado que en algunas localidades *D. melanogaster* y *D. buzzatii* coexisten con especies morfológicamente indistinguibles (*D. simulans* y *D. koepferae*, respectivamente), cada una de las líneas fue identificada a través de la inspección de la genitalia de al menos un macho de la progenie. La descendencia se mantuvo durante cinco generaciones a baja densidad y en condiciones *standard* de temperatura y luz (25°C, 12 hs. luz y 12 hs. oscuridad) a los fines de asegurar que las diferencias observadas entre las poblaciones tuvieran base genética.



**Figura 2.2.** Ubicación de las localidades muestreadas. Los círculos oscuros son los sitios de colección de *D. melanogaster* y los círculos claros las localidades de captura de *D. buzzatii*.

### **Experimentos de laboratorio**

Los experimentos realizados en el laboratorio siguieron un diseño de hermanos completos (*full sib design*) en los cuales se analizaron individuos de 6 o 12 isolíneas para

cada combinación especie x población. Las líneas fueron elegidas aleatoriamente del *pool* original de aislamientos de cada especie y utilizadas para investigar los patrones de variación de caracteres asociados al tamaño entre poblaciones.

A los fines de obtener las moscas para estos experimentos se armaron dos cajas de recolección de huevos para cada línea (ver Figura 2.3). En las cajas se liberaron 200 parejas de moscas sexualmente maduras. En cada caja se colocó una placa de petri con medio de puesta de huevos (agar 2% + 5 ml de 3 partes de etanol y 1 parte de 60% ácido acético en 175 ml de agua destilada). Las placas de petri se retiraron luego de 12 hs. de iniciado el experimento y se incubaron hasta la eclosión de los huevos (24 hs. y 36 hs. para *D. melanogaster* y para *D. buzzatii*, respectivamente) a 25°C. Grupos de 30 (en *D. melanogaster*) y de 40 (en *D. buzzatii*) larvas de primer estadio se transfirieron de las placas de petri a tubos con medio de cultivo instantáneo. Para cada combinación línea x población x especie se iniciaron cuatro tubos (réplicas).



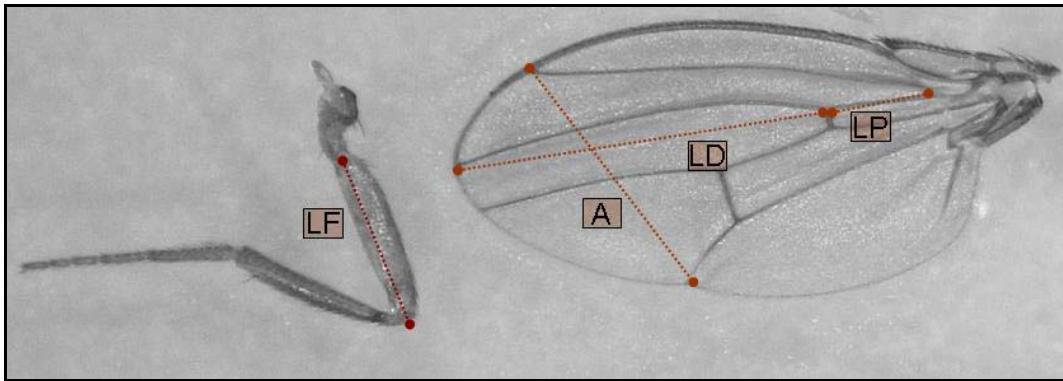
**Figura 2.3.** Caja de puesta utilizada para obtener las larvas de primer estadio.

Con el fin de investigar los patrones de plasticidad fenotípica de caracteres asociados al tamaño del cuerpo en respuesta a la variación en la temperatura se asignaron cuatro tubos (réplicas) de cada línea a 7 tratamientos térmicos diferentes. En tres de ellos, la temperatura se mantuvo constante a 17°C, 25°C ó 30°C. Los otros cuatro consistieron en regímenes de temperatura alternada: 30-25°C, 25-17°C, 30-9°C y 25-9°C (en todos los casos

se indica la temperatura diurna en primer lugar). Los tubos se expusieron a los tratamientos térmicos desde el primer estadio larval hasta la emergencia de las moscas adultas.

### **Caracteres de historia de vida medidos**

Los adultos emergidos fueron separados y mantenidos durante 24 hs. en diferentes tubos para garantizar el despliegue de sus alas. De cada réplica se eligieron aleatoriamente 3 individuos de cada sexo. A cada individuo emergido se le midió: el largo proximal, el largo distal y el ancho del ala, y la longitud del fémur del tercer par de patas (Figura 2.4). En todos los casos, los apéndices medidos corresponden al izquierdo de cada par.



**Figura 2.4.** Caracteres morfológicos medidos. LF: largo del fémur; LP: largo proximal; LD: largo distal; A: ancho (ver texto para más detalles)

### **Análisis de datos**

El análisis de los datos fue realizado utilizando métodos estadísticos de uso corriente para este tipo de diseño experimental (Sokal & Rohlf 1997). En primer lugar, dado que los diferentes caracteres del ala se encuentran altamente correlacionados, se analizaron las relaciones internas entre las diferentes variables medidas sobre el ala a través de un análisis de componentes principales (ACP). Este análisis permitió generar un nuevo grupo de variables independientes, los componentes principales (CPs), obtenidos a partir de las variables iniciales. Estas nuevas variables fueron empleadas, al igual que las variables originales, en los análisis posteriores.

Para estudiar la variación clinal de los caracteres morfológicos, se realizaron análisis de regresión entre las variables originales registradas sobre el ala, el fémur, y los CPs, en función de las dos variables independientes (latitud y altitud de las localidades en las que se realizaron los muestreos). En todos estos estudios la línea se consideró como la unidad experimental (promediando las diferentes réplicas de cada carácter).

En el segundo grupo de experimentos nos propusimos investigar el grado de asociación entre la variación de las diferentes variables dependientes con la altitud. En este caso se realizaron ANOVAs considerando a la población como el único factor para cada combinación especie x sexo. El objetivo de estos ANOVAs fue comparar entre pares de poblaciones muestreadas a altitudes contrastantes y latitudes similares. Esto se realizó con el fin de integrar los resultados obtenidos en el análisis de las alometrías observadas en los estudios clinales y los estudios de plasticidad de la segunda parte del presente capítulo (ver más abajo). Los pares de poblaciones de altura y llanura elegidos para esta parte del estudio fueron: Quilmes/Vipos en *D. buzzatii* y Uspallata/Lavalle en *D. melanogaster* (ver en la Figura 2.2 la ubicación geográfica de las localidades analizadas).

El tercer grupo de análisis se realizó a los fines de investigar las respuestas de los caracteres asociados al tamaño de los individuos derivados de poblaciones de altura y llanura a diferentes tratamientos térmicos. Los resultados de estos experimentos se analizaron mediante ANOVAs de dos factores, considerando a los tratamientos y a las poblaciones como factores fijos. Debido a la gran mortalidad que se observó en los tubos sometidos a los tratamientos de 30-30°C y de 30-25°C en *D. melanogaster*, estos debieron ser excluidos de los análisis.

El cuarto conjunto de ANOVAs consistió en pruebas individuales para cada combinación población x sexo x tratamiento. Estos ANOVAs se realizaron con el fin de investigar la contribución relativa del factor línea a la varianza fenotípica total. De acuerdo a nuestro diseño experimental, el factor línea podría ser un buen estimador de la contribución del componente genético a la varianza fenotípica total (ver David *et al.*, 2005 para una descripción de la aplicación de la técnica basada en el análisis de líneas generadas a partir de la descendencia de hembras individuales). En estos ANOVAs la réplica fue considerada como la unidad experimental y un efecto “línea” significativo se interpretó como diferencias genéticas existentes entre líneas (familias) para los caracteres analizados.

Finalmente, se analizaron de manera conjunta los datos obtenidos para diferentes partes del cuerpo con el fin de indagar acerca de los patrones de variación en las relaciones



entre caracteres del ala y de la pata. Dado que los análisis de componentes principales para el estudio de plasticidad presentaron un CP1 que explicó porcentajes de varianza importantes y que las tres variables contribuían al mismo en la misma dirección (el mismo signo), el CP1 pudo considerarse como un indicador confiable del tamaño corporal. Las alometrías entre partes del cuerpo se analizaron a través del cociente entre los valores de dicho componente principal y los valores de largo del fémur. Se usaron en este caso los valores medios para cada línea (promediando las réplicas dentro de cada línea) de modo de poder analizar los efectos principales de las poblaciones y de los tratamientos térmicos.

En los casos en los que fue necesario se realizaron comparaciones *a posteriori* mediante el método de Tukey. Previo a los análisis estadísticos las variables fueron transformadas logarítmicamente con el fin de normalizar los datos. La homogeneidad de varianza fue verificada a través del análisis de Levene. Para todos los análisis se utilizó el paquete estadístico Statistica para Windows (6.0).

## **Resultados**

### **Variación latitudinal y altitudinal en caracteres relacionados con el tamaño del cuerpo**

Antes de proceder con el análisis de los patrones de variación de caracteres relacionados con el tamaño del cuerpo se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de generar un nuevo conjunto de variables independientes a partir de los caracteres medidos del ala. Se decidió adoptar este procedimiento debido a que las variables de ala normalmente se encuentran altamente correlacionadas. Los resultados del análisis de componentes principales se presentan en la Tabla 2.1.

Del análisis de esta tabla surgen dos cuestiones dignas de mención en *D. buzzatii*: la primera es que el primer componente principal (CP1) –que explica el 76% de la varianza total– muestra una contribución del mismo signo para cada una de las variables originales en las hembras. Es así que CP1, en este caso, podría considerarse como un indicador directo del tamaño corporal. La segunda observación consistió en un importante dimorfismo sexual en relación al patrón de correlación de las variables del ala con los componentes principales. En efecto, puede verse en la Tabla 2.1 que en los machos, las variables de ala contribuyen en la misma dirección (mismo signo) aunque con diferente magnitud al CP2, que explica un 35% de la varianza. Por su parte, en *D. melanogaster* la proporción de

varianza explicada por cada CP fue casi idéntica entre sexos al igual que los patrones de correlación de las variables originales para cada CP (Tabla 2.1).

<b>Especie</b>	<b><i>D. buzzatii</i></b>					
<b>Sexos</b>	<b>Hembra</b>			<b>Macho</b>		
<b>Factores</b>	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
<b>LP</b>	-0,807	0,590	0,0354	0,365	0,874	-0,321
<b>LD</b>	-0,896	-0,305	0,323	-0,709	0,525	0,470
<b>A</b>	-0,910	-0,222	-0,349	0,842	0,063	0,535
<b>Varianza explicada (%)</b>	76,095	16,334	7,570	44,878	34,769	20,352
<b>Especie</b>	<b><i>D. melanogaster</i></b>					
<b>Sexos</b>	<b>Hembra</b>			<b>Macho</b>		
<b>Factores</b>	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
<b>LP</b>	0,094	0,995	-0,018	-0,132	0,991	-0,021
<b>LD</b>	-0,982	-3.4.10 <sup>-4</sup>	-0,187	0,984	0,009	-0,178
<b>A</b>	-0,978	0,096	0,186	0,976	0,126	0,176
<b>Varianza explicada (%)</b>	64,330	33,335	2,334	64,629	33,264	2,107

**Tabla 2.1.** Resultados de los análisis de componentes principales (ACP) realizado con los caracteres de ala medidos, para cada sexo y especie (*D. buzzatii* y *D. melanogaster*). LP: largo proximal; LD: largo distal; A: ancho

Frente a estos resultados, los análisis de regresión se realizaron utilizando los tres primeros CPs del ACP y cada uno de los caracteres morfológicos originales como variables dependientes, y la latitud y la altitud como variables predictoras (Tabla 2.2). Los resultados de los análisis de regresión mostraron diferencias tanto entre especies como entre sexos. En *D. buzzatii* sólo el ancho del ala de las hembras mostró una relación significativa y positiva con la latitud, en tanto que las restantes variables dependientes mostraron asociaciones significativas y positivas con la altitud. En cambio, en los machos se registró una relación positiva y significativa del largo de la vena distal del ala con la latitud, mientras que las correlaciones del largo distal (LD) y del ancho (A) con la altitud fueron significativas (negativa en el caso de la primera y positiva en el de la segunda). Finalmente, las pendientes de las regresiones del largo del fémur en función de la latitud y la altitud solo fueron significativas en este último caso, tanto en machos como en hembras. En ambos

sexos la tendencia observada sugiere que las moscas de llanura tendrían patas más cortas que las de altura (Tabla 2).

En *D. melanogaster*, todos los análisis de regresión de las variables originales en función de la latitud fueron significativas tanto en machos como en hembras, negativas en los casos de LD, A y longitud del fémur (LF) y positiva en el de largo proximal (LP) (Tabla 2.2).

Hembras	<i>D. buzzatii</i>				<i>D. melanogaster</i>			
	Latitud		Altitud		Latitud		Altitud	
Caracteres	b ± S. E.	P	b ± S. E.	p	b ± S. E.	p	b ± S. E.	p
LP	0.063±0.068	0,36	0.354±0.064	1.1.10 <sup>-7</sup>	0.395±0.032	3.2.10 <sup>-7</sup>	-0.265±0.034	9.6.10 <sup>-15</sup>
LD	0.108±0.068	0.12	0.508±0.060	2.2.10 <sup>-15</sup>	-0.169±0.034	9.6.10 <sup>-7</sup>	-0.633±0.026	6.5.10 <sup>-3</sup>
A	0.224±0.067	1.10 <sup>-3</sup>	0.392±0.063	3.2.10 <sup>-9</sup>	-0.063±0.035	6.8.10 <sup>-2</sup>	-0.492±0.030	3.1.10 <sup>-3</sup>
CP1	-0.145±0.068	0.03	-0.496±0.060	1.3.10 <sup>-14</sup>	0.062±0.035	7.6.10 <sup>-2</sup>	0.658±0.026	8.3.10 <sup>-3</sup>
CP2	-0.097±0.068	0.16	-0.68±0.68	0.32	0.373±0.032	2.1.10 <sup>-3</sup>	-0.330±0.032	1.1.10 <sup>-3</sup>
CP3	-0.181±0.067	8.10 <sup>-3</sup>	0.170±0.067	0.01	0.089±0.035	1.0.10 <sup>-2</sup>	0.237±0.034	5.2.10 <sup>-12</sup>
LF	0.053±0.069	0.44	0.535±0.058	4.3.10 <sup>-8</sup>	-0.324±0.034	5.4.10 <sup>-3</sup>	0.169±0.035	1.7.10 <sup>-6</sup>
Machos								
	b ± S. E.	P	b ± S. E.	p	b ± S. E.	p	b ± S. E.	p
LP	-0.002±0.069	0.97	0.087±0.069	0.21	0.385±0.032	3.2.10 <sup>-7</sup>	-0.232±0.034	3.10 <sup>-11</sup>
LD	0.247±0.069	2.74.10 <sup>-4</sup>	-0.758±0.045	6.2.10 <sup>-9</sup>	-0.164±0.035	2.9.10 <sup>-6</sup>	-0.679±0.026	3.2.10 <sup>-2</sup>
A	0.019±0.069	0.78	0.225±0.067	9.6.10 <sup>-4</sup>	-0.027±0.035	0.44	-0.711±0.025	6.2.10 <sup>-3</sup>
CP1	-0.123±0.068	0.07	0.551±0.057	3.8.10 <sup>-7</sup>	-0.039±0.035	0.27	-0.710±0.025	5.2.10 <sup>-3</sup>
CP2	0.130±0.068	0.06	-0.337±0.064	4.9.10 <sup>-7</sup>	0.351±0.033	6.3.10 <sup>-3</sup>	-0.324±0.033	9.1.10 <sup>-3</sup>
CP3	0.208±0.067	2.3.10 <sup>3</sup>	-0.422±0.062	1.5.10 <sup>-10</sup>	0.136±0.035	1.1.10 <sup>-4</sup>	0.156±0.035	9.1.10 <sup>-6</sup>
LF	-0.091±0.069	0.19	0.458±0.061	2.3.10 <sup>-12</sup>	-0.330±0.036	6.1.10 <sup>-3</sup>	0.197±0.037	1.7.10 <sup>-7</sup>

**Tabla 2.2.** Análisis de regresión de las variables originales y de los 3 primeros CPs del ACP en función de la latitud y la altitud. En cada caso se presentan los valores de los coeficientes de regresión (b) y su significación (p). LP: largo proximal del ala; LD: largo distal del ala; A: ancho del ala y LF: largo del fémur.

**Estudio de la plasticidad de caracteres relacionados con el tamaño del cuerpo en poblaciones derivadas de localidades ubicadas a altitudes contrastantes**

En los experimentos de plasticidad fenotípica se analizaron las respuestas de dos pares de poblaciones (uno por especie) criadas a 25°C (Tabla 2.3) así como las respuestas de las moscas sometidas a diferentes tratamientos térmicos (Tabla 2.4).

Se observaron notables semejanzas entre los resultados obtenidos en los experimentos entre ambas especies. En el caso de las hembras de *D. buzzatii* y de ambos sexos en *D. melanogaster*, el primer componente principal (CP1) explicó más del 80% de la varianza (en *D. melanogaster* en particular este porcentaje fue incluso mayor del 98%). Asimismo la contribución de cada una de las variables, tanto en magnitud como en signo, fue muy similar. Sin embargo, en los machos de *D. buzzatii* la contribución del CP1 a la varianza total fue mucho menor (menos del 63%) con una contribución positiva y mayor de LP (87%) y A (88%), y negativa y menor de LD (58%) en los experimentos en los que individuos derivados de Quilmes/Vipos, Uspallata/Lavalle se criaron a 25°C (Tabla 2.3). Esta comparación entre las respuestas observadas en cada especie sugiere marcadas diferencias entre las alometrías observadas para escenarios interpoblacionales y de plasticidad.

Especie	<i>D. buzzatii</i>					
Sexos	Hembra			Macho		
Factores	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
LP	-0,833	0,551	0,0161	0,874	0,289	0,391
LD	-0,927	-0,269	0,259	-0,582	0,813	-0,017
A	-0,935	-0,224	-0,271	0,883	0,249	-0,398
Varianza explicada (%)	81,061	14,241	4,696	62,711	26,903	10,386
Especie	<i>D. melanogaster</i>					
Sexos	Hembra			Macho		
Factores	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
LP	0,991	0,140	-0,012	0,986	0,164	-0,013
LD	-0,999	0,035	-0,041	-0,998	0,0368	-0,041
A	-0,994	0,104	0,029	-0,992	0,126	0,028
Varianza explicada (%)	98,850	1,058	0,091	98,434	1,477	0,088

**Tabla 2.3.** Resultados de los análisis de componentes principales realizados con las variables de ala en *D. buzzatii* y *D. melanogaster* para cada sexo por separado. En cada ACP se incluye un par de poblaciones de altura/llanura de cada especie criados a 25°C LP: largo proximal; LD: largo distal; A: ancho

Considerando los resultados del ACP que se presentan en la Tabla 2.4, el CP1 puede ser concebido como un indicador confiable del tamaño corporal en los experimentos de

plasticidad fenotípica. También analizamos las respuestas en términos de las variables originales y de los restantes CPs que explican un porcentaje significativo de la varianza, a los fines de comparar estos resultados con los obtenidos en el estudio de la variación a lo largo de gradientes ambientales (latitudinal y altitudinal). Lo más llamativo de los resultados de los ACPs es que en machos y en hembras de las dos especies, el CP1 explica un porcentaje importante de la variación (alrededor del 85% en *D. buzzatii* y cerca del 90% en *D. melanogaster*). A su vez el CP2 permite explicar cerca del 10% de la variación y en todos los casos la contribución de las variables originales a éste coincide en ambos sexos y especies. La longitud de la vena distal (LD) y el ancho del ala (A), por un lado, y el largo de la vena proximal (LP), por otro, están correlacionados con CP2 de manera negativa y positiva, respectivamente.

En la Tabla 2.5 se presentan los resultados de los ANOVAs realizados con las variables de tamaño medidas en dos poblaciones de cada especie, y sometidas a 7 tratamientos térmicos. En primer lugar, puede observarse que el factor “tratamiento”, es decir las diferencias a nivel de caracteres asociados al tamaño del cuerpo entre moscas sometidas a diferentes tratamientos térmicos, fue altamente significativo en ambas especies. Los patrones de variación entre tratamientos se presentan en la Figuras 2.5 a 2.8. En general para todas las variables analizadas hay dos tendencias comunes. En primer término, coincidiendo con investigaciones previas, las moscas sometidas a temperaturas de cría mayores fueron más pequeñas que las sometidas a tratamientos térmicos de menor temperatura media. En segundo término, las moscas sometidas a regímenes térmicos de mayor amplitud térmica fueron en promedio de menor tamaño que las sometidas a tratamientos de temperatura constante.

Especie	<i>D. buzzatii</i>					
Sexos	Hembras			Machos		
Factores	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
LP	-0,877	0,474	0,084	-0,883	0,470	3.9.10 <sup>-3</sup>
LD	-0,918	-0,341	0,202	-0,945	-0,225	0,239
A	-0,957	-0,107	-0,271	-0,946	-0,214	-0,242
Varianza explicada (%)	84,221	11,728	4,051	85,584	10,560	3,856
Especie	<i>D. melanogaster</i>					
Sexos	Hembras			Machos		
Factores	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
LP	-0,909	0,417	0,004	-0,888	0,460	0,019
LD	-0,973	-0,205	0,107	-0,959	-0,262	0,109
A	-0,977	-0,184	-0,111	-0,979	-0,161	-0,123
Varianza explicada (%)	90,869	8,341	0,791	88,900	10,182	0,917

**Tabla 2.4.** Resultados de los ACPs realizados con las variables de ala en *D. buzzatii* y *D. melanogaster* para cada especie y sexo por separado. En cada ACP se incluyeron los datos obtenidos de dos poblaciones (altura/llanura) por especies sometidas a 7 tratamientos térmicos. LP: largo proximal; LD: largo distal; A: ancho

En *D. buzzatii* se observó que las interacciones “población x tratamientos térmicos” fueron significativas en la mayoría de los casos. Sin embargo, en dicha especie se registraron en términos generales mayores tamaños de las alas en los individuos provenientes de la población de altura respecto a los individuos provenientes de la población de llanura (Figuras 2.5 y 2.6). No obstante, los resultados no fueron equivalentes para todas las variables analizadas. Por ejemplo, en las hembras de *D. buzzatii* puede observarse que la longitud de la vena proximal (LP), el ancho del ala (A) y el CP1 fueron mayores en moscas de altura que llanura (Figuras 2.5 B y 2.5 D). En cambio, no se observaron diferencias poblacionales para el LD en los organismos de *D. buzzatii* (Figura 2.5 C).

En contraposición, en una primera aproximación en el caso de *D. melanogaster* se registró el patrón opuesto: las medias del tamaño del ala en los individuos provenientes de la población de llanura fueron mayores que la correspondiente de los de altura (Figuras 2.7 y 2.8). Sin embargo, nuevamente se registró en una importante cantidad de casos una interacción “población x tratamiento térmico” significativa. Por ejemplo, las hembras criadas a 30-09°C tuvieron alas con una mayor longitud de la vena distal y más anchas que las de llanura (Figura 2.7 C y 2.7 D). A su vez las diferencias entre poblaciones para LP no fueron significativas en los tratamientos 25-17°C y 17-17°C (Fig. 2.7 B). Este grupo de

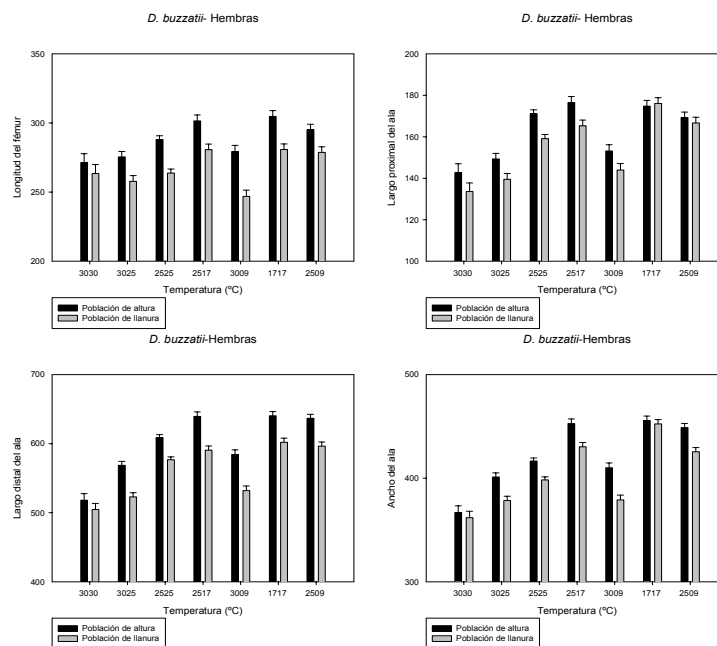
resultados concuerdan en términos generales con las predicciones acerca de las respuestas poblacionales originarias de diferentes altitudes, en la medida en que se observa una respuesta diferencial entre las temperaturas constantes y las alternadas.

Carácter	<i>D. buzzatii</i>				<i>D. melanogaster</i>			
	T (g.l.=6)	P (1)	P x T (6)	Error (235)	T (4)	P (1)	P x T (4)	Error (206)
<b>Hembras</b>								
<b>LP</b>	4.5.10 <sup>-2***</sup>	2.3.10 <sup>-2***</sup>	2.0.10 <sup>-3</sup>	1.1.10 <sup>-3</sup>	8.2.10 <sup>-2***</sup>	3,5.10 <sup>-3*</sup>	1,6.10 <sup>-3*</sup>	5,5.10 <sup>-4</sup>
<b>LD</b>	2.5.10 <sup>-2***</sup>	4.3.10 <sup>-2***</sup>	5,5.10 <sup>-4</sup>	3,5.10 <sup>-4</sup>	6.3.10 <sup>-2***</sup>	1,7.10 <sup>-3***</sup>	7,9.10 <sup>-4***</sup>	1,5.10 <sup>-4</sup>
<b>A</b>	3.0.10 <sup>-2***</sup>	2.0.10 <sup>-2***</sup>	8,7.10 <sup>-4*</sup>	3,4.10 <sup>-4</sup>	5.4.10 <sup>-2***</sup>	1,7.10 <sup>-3**</sup>	9,1.10 <sup>-4***</sup>	1,6.10 <sup>-4</sup>
<b>CP1</b>	25,95***	23,60***	0,44	0,259	45,648***	2,08***	0,515**	0,117
<b>CP2</b>	1,948	8,442**	1,948	0,916	22,794***	0,031	2,339**	0,544
<b>CP3</b>	15,631***	12,842***	1,162	0,561	8,043***	0,057	1,178	0,863
<b>fémur</b>	1.7.10 <sup>-2***</sup>	5.6.10 <sup>-2***</sup>	1.10 <sup>-3</sup>	7,8.10 <sup>-4</sup>	2.3.10 <sup>-2***</sup>	1,3.10 <sup>-4</sup>	3,2.10 <sup>-4</sup>	2,2.10 <sup>-4</sup>
<b>Machos</b>	<b>(6)</b>	<b>(1)</b>	<b>(6)</b>	<b>(232)</b>	<b>(4)</b>	<b>(1)</b>	<b>(4)</b>	<b>(196)</b>
<b>LP</b>	3.1.10 <sup>-2***</sup>	6,1.10 <sup>-3**</sup>	2,7.10 <sup>-3**</sup>	7,2.10 <sup>-4</sup>	7.5.10 <sup>-2***</sup>	3.8.10 <sup>-3</sup>	3.1.10 <sup>-3*</sup>	1.1.10 <sup>-3</sup>
<b>LD</b>	2.6.10 <sup>-2***</sup>	0,02***	1,1.10 <sup>-3**</sup>	2,9.10 <sup>-4</sup>	5.1.10 <sup>-2***</sup>	5,7.10 <sup>-3***</sup>	5,5.10 <sup>-5</sup>	1,7.10 <sup>-4</sup>
<b>A</b>	3.2.10 <sup>-2***</sup>	7,6.10 <sup>-3***</sup>	1,1.10 <sup>-3***</sup>	2,6.10 <sup>-4</sup>	4.3.10 <sup>-2***</sup>	5,5.10 <sup>-3***</sup>	2,6.10 <sup>-4</sup>	1,8.10 <sup>-4</sup>
<b>CP1</b>	26,10***	12,26***	1,23***	0,273	41,943***	4,988***	0,244	0,140
<b>CP2</b>	6,26***	7,287**	1,745	0,824	11,274***	0,180	1,544	0,779
<b>CP3</b>	14,31***	17,84***	1,01	0,57	7,3492***	9,9.10 <sup>-4</sup>	0,943	0,876
<b>fémur</b>	4.0.10 <sup>-2***</sup>	8,3.10 <sup>-3</sup>	8,7.10 <sup>-3</sup>	4,6.10 <sup>-3</sup>	1.1.10 <sup>-2***</sup>	2,9.10 <sup>-3**</sup>	7,2.10 <sup>-4</sup>	3,4.10 <sup>-4</sup>

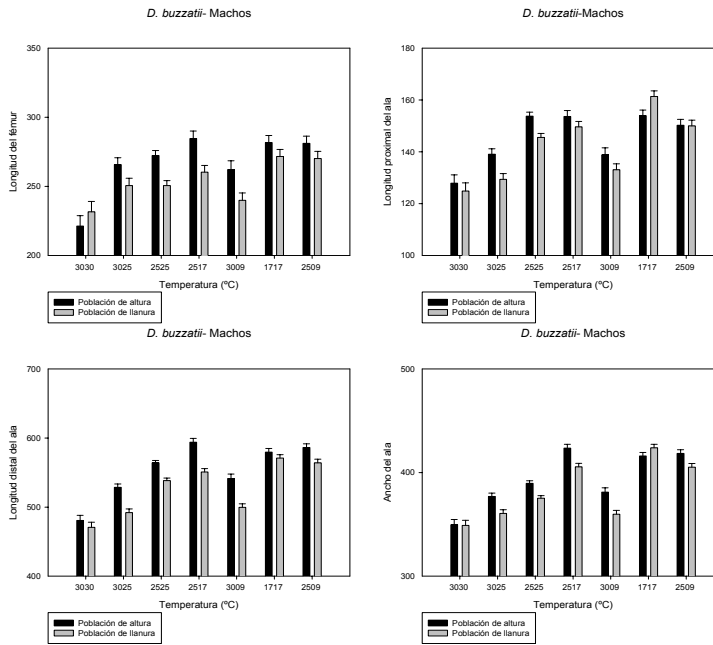
**Tabla 2.5.** Resultados de los ANOVAs realizados con los caracteres asociados al tamaño corporal en *D. melanogaster* y *D. buzzatii*, usando tanto las variables originales (LP, LD y AA) como los CPs obtenidos en los ACPs (CP1 y CP2). \*p< 0.05; \*\*p< 0.01; \*\*\*p< 0.001. g.l.: grados de libertad. T: temperatura. P: población. LP: largo proximal. LD: largo distal. A: ancho. Se indican entre paréntesis los grados de libertad.



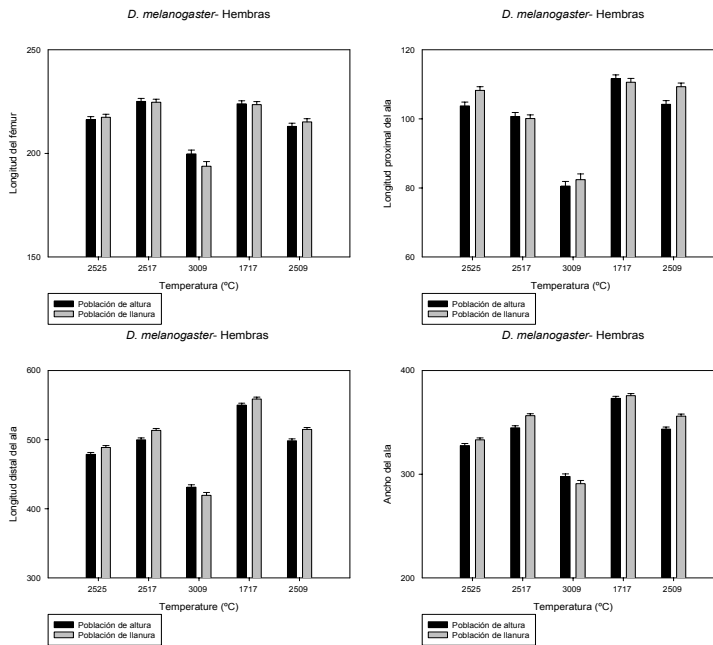
Los resultados de los ANOVAs realizados para cada combinación sexo x población x tratamiento térmico se presentan en la Tabla 2.6 (*D. melanogaster* 2.6 A) y *D. buzzatii* 2.6 B). En general, el porcentaje de varianza explicado por el factor “línea” fue mayor en los tratamientos que *a priori* podrían considerarse como menos estresantes. Otro resultado de interés en este marco, es que en las poblaciones de altura la proporción de varianza explicada por las diferencias entre líneas fue mayor que en las de llanura. Considerando que la bibliografía especializada indica que la cantidad de varianza aditiva en las poblaciones marginales es menor, se espera que las poblaciones inestables temporalmente presenten menores diferencias entre las líneas. Este resultado, resulta sorprendente en la medida en que se trata de poblaciones marginales (Uspallata y Quilmes) cuya dinámica temporal es seguramente más inestable que las de llanura (Lavalle y Vipos).



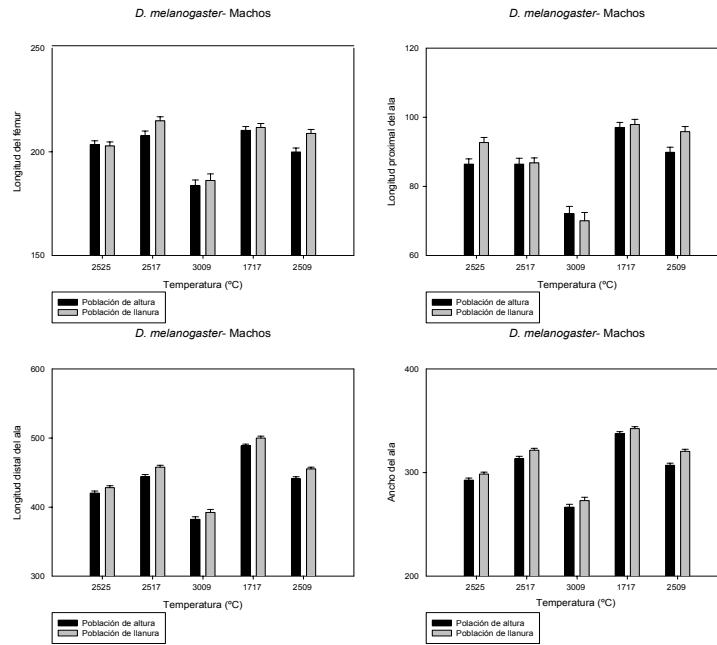
**Figura 2.5.** Valores medios y desvíos *standard* de las cuatro variables morfométricas medidas en las hembras de *D. buzzatii* derivadas de poblaciones que viven en altitudes contrastantes sometidas a siete tratamientos térmicos.



**Figura 2.6.** Valores medios y desvíos *standard* de las cuatro variables morfométricas medidas en los machos de *D. buzzatii* derivados de poblaciones que viven en altitudes contrastantes sometidos a siete tratamientos térmicos.



**Figura 2.7.** Medias y desvíos *standard* de las cuatro variables morfométricas medidas en las hembras de *D. melanogaster* derivadas de poblaciones que viven en altitudes contrastantes sometidas a siete tratamientos térmicos.



**Figura 2.8.** Medias y desvíos *standard* de las cuatro variables morfométricas medidas en los machos de *D. melanogaster* derivados de poblaciones que viven en altitudes contrastantes sometidos a siete tratamientos térmicos.

A		Fémur				CP1			
		machos		hembras		machos		hembras	
T°C	Media	P.L.	P.A.	P.L.	P.A.	P.L.	P.A.	P.L.	P.A.
30-30	30	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)
30-25	27.5	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)
25-25	25	ns	53.80**	ns	ns	ns	35.6*	ns	ns
25-17	21	ns	ns	55.1**	ns	46.90**	82.9***	ns	40.9*
30-09	19.5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
25-09	17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
17-17	17	ns	50.60**	ns	61,90***	53.50**	66.3***	39.6*	53.60**
B		Fémur				CP1			
		machos		hembras		machos		hembras	
T°C	Mean	P.L.	P.A.	P.L.	P.A.	P.L.	P.A.	P.L.	P.A.
30-30	30	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)
30-25	27.5	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)
25-25	25	ns	66.0***	ns	86.3***	30.8*	51.2**	ns	75.3***
25-17	21	17.1*	38.8**	ns	20.0*	40.9***	ns	ns	16.3*
30-09	19.5	ns	53.3**	ns	ns	ns	61.7***	ns	ns
25-09	17	26.1*	ns	ns	ns	20.6*	31.0**	ns	ns
17-17	17	ns	39.3***	ns	38.4***	30.3**	85.4***	ns	82.0***

**Tabla 2.6.** Análisis de los componentes de varianza para cada combinación población x tratamiento x sexo en cada especie, considerando el factor línea como efecto aleatorio y como indicador de la contribución relativa de la variabilidad genética a la varianza total. En este caso son incluidos únicamente los resultados de los ANOVAs para la longitud del fémur y el CP1 que es un indicador general del tamaño del ala, para *D. melanogaster* (A) y *D. buzzatii* (B). En los casos significativos se expresa el porcentaje de varianza explicada por el factor línea y su significación. \*p<0.05. \*\*p<0.01. \*\*\*p<0.001. Referencias: ns: no significativo, P.A: población de altura, P.L.: población de llanura.

### Relaciones alométricas entre partes del ala en moscas sometidas a diferentes regímenes térmicos

Los resultados de los análisis de las alometrías plásticas entre diferentes partes de un mismo órgano se presentan en la Tabla 2.7. Tal como puede observarse, en

general se detectaron correlaciones positivas entre las partes del ala. Sin embargo, en algunos tratamientos se observó una cantidad considerable de excepciones. Si bien las predicciones originales apuntaban a que en tratamientos de mayor *stress* los patrones de correlación variarían sustancialmente tanto en signo como en magnitud, esto fue corroborado sólo parcialmente. En *D. buzzatii* las moscas sometidas a 30°C de manera continua sólo mostraron resultados significativos en un 25% de las correlaciones realizadas y en el de 25-09°C en un 50% (Tabla 2.7). Sorpresivamente, las correlaciones entre caracteres mostraron magnitudes superiores en los individuos criados a 30-09°C al 90% de los casos analizados en ambos sexos (Tabla 2.7). Estos resultados no fueron exclusivos de *D. buzzatii*, observándose resultados similares en *D. melanogaster*. En esta especie, nuevamente los organismos sometidos a tratamientos con mayor amplitud térmica mostraron una mayor cantidad de correlaciones entre las diferentes porciones del ala (Tabla 2.7). Del mismo modo, la comparación entre individuos expuestos a tratamientos con similar media y diferente amplitud térmica (por ejemplo 17°C y 25-09°C) mostraron una cantidad similar de correlaciones en ambos sexos (75%). En síntesis, nuestros resultados sugieren que los patrones de correlación entre caracteres no parecen responder diferencialmente a temperaturas de cría consideradas *a priori* de *stress* en ambas especies.

<b>D. buzzatii 2525°C</b>	<b>Fémur</b>	<b>Proximal</b>	<b>Distal</b>	<b>Ancho</b>	<b>Hembras</b>
<b>Fémur</b>	*	0.664***	0.857**	0.757***	
<b>Proximal</b>	0.608***	*	0.646***	0.646***	
<b>Distal</b>	0.812***	0.667***	*	0.874***	
<b>Ancho</b>	0.707***	0.682***	0.756***	*	
<b>Machos</b>					

<b>D. buzzatii 3025°C</b>	<b>Femur</b>	<b>Proximal</b>	<b>Distal</b>	<b>Ancho</b>	<b>Hembras</b>
<b>Fémur</b>	*	0.499**	0.604***	0.643***	
<b>Proximal</b>	0.479**	*	0.452**	0.622***	
<b>Distal</b>	0.739***	0.579***	*	0.890***	
<b>Ancho</b>	0.644***	0.487**	0.774***	*	
<b>Machos</b>					

<b>D. buzzatii 3030°C</b>	<b>Fémur</b>	<b>Proximal</b>	<b>Distal</b>	<b>Ancho</b>	<b>Hembras</b>
<b>Fémur</b>	*	0.277	0.856	0.367	
<b>Proximal</b>	0.226	*	0.502	0.523*	
<b>Distal</b>	0.260	0.783	*	0.872**	
<b>Ancho</b>	0.177	0.518*	0.258	*	
<b>Machos</b>					

<b>D. buzzatii</b> <b>2517°C</b>	<b>Fémur</b>	<b>Proximal</b>	<b>Distal</b>	<b>Ancho</b>	<b>Hembras</b>
<b>Fémur</b>	*	0.313	0.855***	0.746***	
<b>Proximal</b>	0.420*	*	0.357*	0.524**	
<b>Distal</b>	0.802***	0.270	*	0.850***	
<b>Ancho</b>	0.632***	0.535*	0.794***	*	
<b>Machos</b>					

<b>D. buzzatii</b> <b>1717°C</b>	<b>Fémur</b>	<b>Proximal</b>	<b>Distal</b>	<b>Ancho</b>	<b>Hembras</b>
<b>Fémur</b>	*	-0.100	0.785***	0.186	
<b>Proximal</b>	0.296	*	0.134	0.745***	
<b>Distal</b>	0.455**	0.593***	*	0.482**	
<b>Ancho</b>	0.372*	0.740***	0.917***	*	
<b>Machos</b>					

<b>D. buzzatii</b> <b>2509°C</b>	<b>Fémur</b>	<b>Proximal</b>	<b>Distal</b>	<b>Ancho</b>	<b>Hembras</b>
<b>Fémur</b>	*	0.146	0.312	0.249	
<b>Proximal</b>	0.350*	*	0.167	0.353*	
<b>Distal</b>	0.618***	0.159	*	0.893***	
<b>Ancho</b>	0.580**	0.213	0.779***	*	
<b>Machos</b>					

<b>D. buzzatii</b> <b>3009°C</b>	<b>Fémur</b>	<b>Proximal</b>	<b>Distal</b>	<b>Ancho</b>	<b>Hembras</b>
<b>Fémur</b>	*	0.245	0.878***	0.733***	
<b>Proximal</b>	0.401*	*	0.400*	0.597**	
<b>Distal</b>	0.765***	0.447**	*	0.860***	
<b>Ancho</b>	0.677***	0.529***	0.815**	*	
<b>Machos</b>					

<b>D.</b> <b>melanogaster</b> <b>2525°C</b>	<b>Fémur</b>	<b>Proximal</b>	<b>Distal</b>	<b>Ancho</b>	<b>Hembras</b>
<b>Fémur</b>	*	0.300*	0.558***	0.392**	
<b>Proximal</b>	0.214	*	0.492***	0.489***	
<b>Distal</b>	0.486**	0.396**	*	0.646***	
<b>Ancho</b>	0.470**	0.632**	0.588***	*	
<b>Machos</b>					

<b>D.</b> <b>melanogaster</b> <b>2517°C</b>	<b>Fémur</b>	<b>Proximal</b>	<b>Distal</b>	<b>Ancho</b>	<b>Hembras</b>
<b>Fémur</b>	*	-0.082	0.560***	0.253	
<b>Proximal</b>	0.164	*	-0.025	0.166	
<b>Distal</b>	0.549***	0.076	*	0.757***	
<b>Ancho</b>	0.330*	0.212	0.752***	*	
<b>Machos</b>					

D. melanogaster 1717°C	Fémur	Proximal	Distal	Ancho	Hembras
Fémur	*	0.07	0.413**	0.596***	
Proximal	0.454**	*	-0.199	0.216	
Distal	0.554***	0.282	*	0.767***	
Ancho	0.675***	0.524***	0.642***	*	
Machos					

D. melanogaster 2509°C	Fémur	Proximal	Distal	Ancho	Hembras
Fémur	*	0.061	0.285*	0.104	
Proximal	0.821***	*	0.583***	0.544***	
Distal	-0.391**	-0.385**	*	0.794***	
Ancho	0.040	0.056	0.751***	*	
Machos					

D. melanogaster 3009°C	Fémur	Proximal	Distal	Ancho	Hembras
Fémur	*	0.664***	0.857**	0.757***	
Proximal	0.608***	*	0.646***	0.646***	
Distal	0.812***	0.667***	*	0.874***	
Ancho	0.707***	0.682***	0.756***	*	
Machos					

**Tabla 2.7.** Coeficientes de correlación entre variables morfométricas a diferentes temperaturas para los dos sexos en *D. melanogaster* y *D. buzzatii*. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### Alometrías plásticas en diversos regímenes térmicos entre caracteres de diferentes órganos: ala y fémur

Hasta aquí fueron estudiadas las relaciones entre caracteres morfológicos asociados al tamaño medidos en un mismo órgano. Sin embargo, el tipo de abordaje realizado permite también, analizar las alometrías entre caracteres medidos en diferentes partes del cuerpo. En particular, se han medido variables indicativas del tamaño del ala y del fémur. En el caso de que éste último sea un buen indicador del tamaño corporal, puede calcularse un índice entre ambos que es conocido como *wing loading* y cuyo significado biológico ya fue adelantado en la Introducción. En la Tabla 2.8 se presentan los resultados de los ANOVAs comparando el *wing loading* entre poblaciones de diferente altitud en todos los tratamientos térmicos para ambas especies. En todos los casos se observaron efectos significativos del tratamiento y la población. En resumen, los resultados de estos ANOVAs para el *wing loading* parecen mostrar:

- El *wing loading* presenta menores magnitudes a tratamientos con temperatura media mayores. Sin embargo, pueden registrarse algunas importantes excepciones, principalmente en los organismos criados a 25°C, 25-17°C y 25-09°C)
- Los valores de *wing loading* son menores cuando la amplitud térmica es mayor. Sin embargo, aunque estos resultados son consistentes para 30-09°C, se encontraron importantes excepciones para los otros dos tratamientos de temperatura alternada.

Respecto a la comparación entre poblaciones puede verse que sólo en las hembras de *D. melanogaster* se observaron efectos diferenciales según la temperatura de cría. Asimismo, ambas especies mostraron patrones opuestos. En *D. buzzatii* se observó que el *wing loading* fue mayor en la población de altura, observación que fue consistente en los diferentes tratamientos y en ambos sexos. En tanto que en *D. melanogaster*, Lavalle mostró mayores valores del *wing loading* en todos los casos excepto para los individuos criados a 30-09°C.

<i>Wing loading</i>	<i>D. buzzatii</i>				<i>D. melanogaster</i>			
	T (g.l.=6)	P (1)	P x T (6)	Error (75/74)	T (4)	P (1)	P x T (4)	Error (52/51)
<b>Hembra</b>	1,316***	1,164***	0,045	0,031	2,439***	0,069**	0,039**	0,012
<b>Macho</b>	1,497***	0,546***	0,0595	0,032	2,336***	0,288***	0,009	0,019

**Tabla 2.8.** Cuadrados medios de los ANOVAs para *wing loading* para *D. melanogaster* y para *D. buzzatii*. \*p<0.05; \*\*p< 0.01; \*\*\*p< 0.001

## Conclusiones

En una primera aproximación, en este capítulo se han abordado dos vías de indagación de la adaptación térmica de los organismos. Por un lado, estudiamos las alteraciones en las magnitudes de las variables asociadas al tamaño del cuerpo en relación a los ambientes de las localidades de origen, así como en cuanto a los efectos de tratamientos térmicos experimentales durante su desarrollo. Por otro lado, analizamos las diferentes relaciones entre caracteres morfométricos en comparaciones



interpoblacionales, interespecíficas y de plasticidad dentro de una misma estructura morfológica (el ala) así como entre diferentes partes del cuerpo (ala y fémur).

En general, las regresiones sobre la latitud y la altitud para los diferentes caracteres asociados al tamaño del cuerpo mostraron patrones complejos. Estos resultados concuerdan con diferentes estudios que habían sugerido que, si bien a una gran escala ambiental pueden observarse algunas tendencias que siguen la denominada “regla de Bergmann”, estas predicciones no son triviales pudiendo admitir importantes excepciones, más aún en estudios realizados a escalas geográficas menores. Si bien en términos generales los patrones acordaron con las predicciones, puede verse que las clinas mostraron importantes discrepancias entre caracteres medidos en diferentes órganos, así como a lo largo de los gradientes latitudinales y altitudinales.

Del mismo modo, los experimentos de plasticidad fenotípica revelaron respuestas coherentes con las predicciones. Por un lado, a temperaturas mayores de cría, se observaron menores tamaños corporales. A la vez, las respuestas plásticas de las moscas, mostraron importantes desvíos en los tratamientos de amplitud térmica respecto de los de temperatura constante. En general, los resultados concuerdan con investigaciones previas que indicaban menores magnitudes de los caracteres asociados al tamaño del cuerpo como consecuencia de la exposición a tratamientos de mayor amplitud térmica, lo cual puede ser interpretado como una respuesta a un ambiente que parece imponer condiciones de *stress*. Sin embargo, la noción de que cualquier ambiente fluctuante implica (necesariamente) condiciones de *stress* respecto a condiciones constantes, es una temática que se retomará más adelante y que será profundizada en los dos capítulos siguientes.

Las estimaciones de la contribución relativa de la variación genética a la varianza fenotípica sugieren dos tipos de resultados sorprendentes. Por un lado, se observó que en tratamientos con mayor amplitud térmica la proporción de varianza explicada por diferencias entre líneas fue menor que en tratamientos de temperatura constante, lo cual es exactamente opuesto a las predicciones originales. El otro resultado no esperado es que las poblaciones de altura mostraron en general una contribución relativa del componente genético de mayor magnitud, lo cual no era previsto debido a que posiblemente se traten de poblaciones marginales sujetas a extinciones y recolonizaciones periódicas. Una explicación posible de este patrón está dada en la dinámica de transporte de frutas. En efecto, si estas poblaciones se recolonizan a partir de moscas provenientes de diferentes localidades como resultado del transporte pasivo

de productos agrícolas, es esperable que sea mayor una variación genética en las poblaciones que viven en ambientes con marcada estacionalidad. De todos modos, estos resultados indican que las hipótesis para ambas variables deben ser debidamente analizadas en el marco de estos escenarios de alta complejidad, a la vez que ponen una señal de alarma en la consideración de los factores de *stress* y en sus efectos.

El ACP mostró relaciones diferentes entre los caracteres entre los organismos desarrollados en diferentes tratamientos y los observados en las comparaciones interpoblacionales. En el caso de la plasticidad, el porcentaje explicado por el primer componente principal (obtenido de relaciones positivas entre las tres magnitudes del ala) explicó porcentajes de varianza muy elevados. Estos patrones no fueron observados en los estudios interpoblacionales (salvo para las hembras de *D. buzzatii*) sugiriendo que las relaciones dadas entre las variables podrían no ser equivalentes entre tratamientos y entre poblaciones. Asimismo, el estudio de los patrones alométricos también ha revelado importantes diferencias entre las especies estudiadas. Una de las más interesantes está dada por el dimorfismo sexual que se observó en *D. buzzatii* y no en *D. melanogaster*.

Los estudios de las correlaciones entre las variables a diferentes temperaturas permiten analizar las denominadas alometrías de plasticidad. Como ha sido presentado, las relaciones alométricas difieren entre tratamientos en los que las temperaturas de crías fueron diferentes. Sin embargo, más allá de las diferencias propiamente dichas, algunas predicciones eran esperadas respecto a las relaciones entre las diferentes longitudes del ala en los organismos criados a distintas temperaturas de cría. Una de ellas, era la que proponía una menor cohesión entre porciones del ala, traducido esto en un menor número de correlaciones entre pares de caracteres en moscas criadas bajo condiciones térmicas de *stress*. Sin embargo, los resultados distan de haber corroborado esta predicción. De hecho, los organismos sometidos a tratamientos de mayor amplitud (30-09°C) mostraron correlaciones altamente significativos, lo cual sugiere la necesidad de profundizar en las relaciones existentes entre las alometrías morfométricas dentro de una misma estructura funcional (tal como fue realizado aquí con el ala) y el *stress*.

Por último, analizamos las alometrías entre diferentes estructuras morfológicas. En nuestro caso se realizó mediante el estudio de la relación entre la longitud del ala y del fémur. Tal como fue discutido en la sección de los resultados, si aceptamos que la longitud del fémur es un buen indicador del tamaño corporal, entonces el cociente longitud de ala/longitud del fémur puede ser considerado un buen estimador del

denominado *wing loading*. Tal como hemos señalado, el *wing loading* se interpreta frecuentemente como un indicador de la capacidad de vuelo. Debido o bien a una menor densidad del aire, o bien a una menor frecuencia de aleteo a temperaturas menores, se esperan mayores valores del *wing loading* en moscas criadas a menores temperatura media y sometidas a tratamientos con mayor amplitud térmica (supuesta aquí como factor de *stress*). En general, los resultados obtenidos en ambas especies se ajustan a las predicciones. Sin embargo, cuando dirigimos nuestra atención a las comparaciones entre poblaciones de llanura/altura las respuestas esperadas solo pudieron observarse en *D. buzzatii*.

La concepción jerárquica de la vida establece la existencia de propiedades no necesariamente semejantes en los diferentes niveles. En este capítulo, hemos podido profundizar en la relación dada entre los escenarios de plasticidad (*pooles* génicos similares sometidos a diferentes ambientes de desarrollo), y los escenarios interpopulacionales, es decir, comparaciones entre individuos procedentes de diferentes poblaciones analizados bajo condiciones de jardín común. Mientras en la bibliografía las hipótesis planteadas en ambos escenarios son similares, nuestros resultados muestran sólo una coincidencia parcial en los patrones clinales de tamaño y forma del ala. Estas diferencias nos llevan a la necesidad de realizar una revisión crítica acerca de la pretendida extrapolación de hipótesis generadas en un nivel a los otros niveles, tanto ascendentes como descendentes. Otro ejemplo claro de esta extrapolación será analizado en el Capítulo 4.

Por último, nuestros resultados arrojan un interrogante respecto a la problemática del *stress* térmico. Tanto en cuanto a la consideración de cuáles condiciones ambientales pueden ser caracterizadas como estresantes, así como respecto a sus efectos e indicadores, la problemática del *stress* dista de presentarse como lineal en cuanto a su relación con la teoría de los caracteres de historia de vida. Por ello, el siguiente capítulo se enfoca en ella, analizando el caso de la asimetría fluctuante, un carácter de los organismos que ha sido presentado en la bibliografía específica como un indicador confiable de la presencia de condiciones estresantes durante su desarrollo.

# Capítulo 3. Análisis de la relación entre la asimetría fluctuante y condiciones térmicas de *stress* en poblaciones naturales de *Drosophila*

## Resumen

### Preguntas

Diferentes autores han propuesto que la asimetría fluctuante sería un indicador de los efectos de ambientes adversos que sufre un organismo durante su desarrollo. Dado que valores elevados de la amplitud térmica son considerados factores de *stress* durante el desarrollo de un organismo, nos preguntamos:

- i) ¿Se observan valores más elevados de asimetría fluctuante en los organismos sometidos a tratamientos de amplitud térmica durante su desarrollo?
- ii) ¿Poblaciones que experimentan diferentes regímenes térmicos en la naturaleza responden diferencialmente a tratamientos de temperaturas constantes y alternadas?

### Métodos

Se analizaron descendientes de individuos derivados de colectas de *Drosophila* realizadas en sitios ubicados a diferente altitud. Se ubicaron *landmarks* en las alas de hembras sometidas a cuatro tratamientos térmicos (25°C, 17°C, 25-17°C y 25-09°C). Mediante técnicas de morfometría geométrica se registraron las diferencias de tamaño y forma entre las alas derecha e izquierda de cada ejemplar emergido en los tubos sometidos a los tratamientos.

### Resultados

Los resultados indican que, en general, el grado de asimetría fluctuante para el tamaño y la forma del ala fue mayor en las moscas sometidas al tratamiento de 25°C en *D. buzzatii*. En *D. melanogaster* los valores mayores de asimetría fluctuante se observaron

en los organismos desarrollados a 17°C y a 25°C. Por otro lado, no se registraron mayores diferencias entre individuos derivados de poblaciones de altura y llanura.

### **Conclusiones**

Los resultados sugieren que la asimetría fluctuante no es un buen indicador de los efectos de la amplitud térmica durante el desarrollo, al menos dentro de los rangos térmicos analizados.

## Introducción

En los últimos años las variaciones térmicas ambientales han pasado a ocupar un lugar de especial atención ante la problemática del calentamiento global. De este modo, la tolerancia de las especies al *stress* ocasionado por las condiciones extremas impuestas por el cambio climático global ha pasado a ser un tópico de creciente interés para toda la comunidad científica internacional y en particular para los investigadores de disciplinas biológicas tales como la biología de la conservación, la biogeografía, la ecología y la biología evolutiva (Hoffman & Parson 1991).

Ahora bien, debido a las complejidades propias de la temperatura como factor ambiental se han utilizado diferentes vías metodológicas en el estudio de los efectos estresantes sobre los organismos. Uno de los abordajes que ha cobrado mayor atención en los últimos años fue el análisis de los efectos de temperaturas extremas mediante experimentos de laboratorio. Dentro de la línea de estudio de los efectos de temperaturas extremas sobre los seres vivos se registran una gran diversidad de abordajes, que difieren tanto respecto al intervalo temporal en que un régimen térmico se le aplica a un individuo, así como a las medias térmicas utilizadas. Por ejemplo, un tipo de experimento frecuente ha sido el de someter organismos a “pulsos” de temperaturas máximas (Krebs & Loeschcke 1994; Dahlgaard & Loeschcke 1997; Imasheva *et al.* 1997; Krebs & Loeschcke 1999; Silbermann & Tatar 2000; Bublly & Loeschcke 2001; Hoffmann *et al.* 2002; Jorgensen *et al.* 2006). Del mismo modo, también se han realizado ensayos experimentales con temperaturas extremas pero aplicadas por intervalos temporales mayores (Lansing *et al.* 2000; Pétavy *et al.* 2001b).

Por otro lado, se han estudiado, también los efectos de temperaturas bajas sobre imagos aplicados por pequeños intervalos temporales. Denominado “*chill comma*”, este abordaje es considerado de gran interés para analizar las poblaciones que enfrentan ambientes extremos (poblaciones que viven en sitios localizados a mayores latitudes). Por ejemplo, trabajos que han investigado los efectos del *chille comma* en *D. serrata* (Hallas *et al.* 2002) mostraron que las bajas temperaturas imponen condiciones muy restrictivas. Del mismo modo, numerosos trabajos han analizado los efectos causados por temperaturas inferiores consideradas estresantes sobre diferentes rasgos de los seres vivos (Hallas *et al.* 2002; David *et al.* 2003; Sinclair *et al.* 2003; Castañeda *et al.* 2005).

Tal como se indicó en el capítulo anterior, el estudio de los efectos de la amplitud térmica no ha sido abordado frecuentemente en la literatura. La amplitud

térmica diaria podría imponer presiones selectivas diferentes a lo largo del día, en comparación a la respuesta de los organismos a regímenes en los cuales la temperatura no muestra tales fluctuaciones (Trotta et al. 2005). Este tipo de estudio ha sido realizado a través de experimentos en los que la media térmica no permanece constante durante el desarrollo del organismo (Pétavy et al. 2001b; Pétavy et al. 2004; Podrabsky & Somero 2004) intentando reproducir lo que ocurre con las variaciones de la temperatura en la naturaleza.

En principio, un abordaje teórico del concepto de *stress* ambiental parece partir de la noción de que los organismos regulan su sistema interior frente a los cambios ambientales, logrando máxima eficiencia fisiológica dentro de determinados rangos. Por tal motivo, cualquier factor ambiental que desplace al organismo de este equilibrio “ideal”, opera como un factor de *stress*. Así, todos los factores ambientales son potencialmente estresantes en la medida en que pueden actuar tanto en “exceso” como en “defecto”, produciendo alteraciones sobre el estadio fisiológico de un organismo.

Sin embargo, el reconocimiento de condiciones ambientales estresantes es de por sí un aspecto problemático. En general, se usan indicadores tanto directos como indirectos del *fitness*, que permiten a través de un estudio comparativo reconocer a los factores ambientales de *stress*. En particular, dentro de los indicadores propuestos en la bibliografía, se han planteado frecuentemente caracteres asociados al tamaño del cuerpo en el estadio reproductivo. En general, los estudios realizados con temperaturas extremas (superiores e inferiores) sobre las longitudes del ala y del tórax han observado un incremento de la heredabilidad de los caracteres analizados en tales condiciones ambientales (David et al. 1994; Barker & Krebs 1995; De Moed et al. 1997; Imasheva 1998). Asimismo, se ha registrado una disminución consistente del tamaño corporal en aquellos organismos que se desarrollaron en ambientes con temperatura fluctuante (Pétavy et al. 2004).

Uno de los indicadores propuestos de *stress* en organismos que tienen simetría bilateral es la asimetría fluctuante (AF). La AF se define teóricamente como el alejamiento existente respecto de la simetría “perfecta” entre ambos lados del cuerpo en el caso de las estructuras bilaterales. Debido a que ambos lados de un individuo comparten el mismo genoma y en forma aproximada el mismo ambiente, la AF parece resultar directamente de pequeñas perturbaciones al azar que ocurren durante el desarrollo. Por ello, la AF refiere al patrón de variación bilateral en una muestra de

individuos, en donde la diferencia entre los valores medios de un carácter medido en estructuras bilaterales está normalmente distribuida.

Tal como se ha mencionado, las recientes innovaciones en las técnicas de morfometría geométrica han permitido distinguir entre el tamaño y la forma de los organismos. Una de las técnicas más utilizadas es la consideración de la configuración geométrica de los *landmarks* morfológicos. Éstos son un grupo de puntos que se fijan en una estructura morfológica determinada. En este tipo de análisis se utiliza una definición matemática de la forma, establecida como todos los caracteres de las configuraciones de los *landmarks* que no estén dadas por el tamaño total, por la posición y por la orientación (ver materiales y métodos de este mismo capítulo). Estos factores ajenos a la forma son eliminados a través de la “metodología de procrustes”, la cual escala todas las configuraciones en la unidad del tamaño y los rota a una orientación que minimiza su posición respecto a una configuración consenso. Estas innovaciones son las que permitieron estudiar la asimetría fluctuante para el tamaño y la forma del ala.

Conceptualmente, la AF puede ser un indicador de la inestabilidad del desarrollo (Klingenberg & Nijhout 1999), entendida como el efecto de un proceso que ha producido alteraciones en el desarrollo de un organismo criado en un ambiente determinado (Nijhout & Davidowitz 2003). Esto permite, en principio, reconocer las variaciones de estos caracteres en diferentes ambientes de cría. De este modo, diversos estudios analizaron los factores considerados de *stress* y su influencia sobre la AF. Mientras que algunos estudios han mostrado patrones que parecen confirmar la relación directa entre la AF y el *stress* (Klingenberg 2003), otros encontraron que en sólo un tercio de los estudios se observa una relación directa entre ambos, es decir una mayor AF a mayor *stress* (Bjorksten *et al.* 2000a; Bjorksten *et al.* 2000b). Si el efecto de *stress* fue cuestionado, su intensidad no lo fue menos. Por ejemplo, algunos estudios señalan que no parece existir una relación lineal entre la AF y el *stress* (Clarke 1995; Leung & Forbes 1997). En particular, en estudios realizados en *Drosophila*, los resultados muestran diferentes relaciones establecidas entre la AF y el *stress* (Woods *et al.* 1999).

Estos resultados, analizados en su conjunto, sugieren que podría no existir una asociación entre la AF y el *stress* ambiental al que un organismo es sometido durante su desarrollo, por lo que la AF podría ser un indicador pobre de la inestabilidad del desarrollo (Gangestad & Thornhill 2003). En este trabajo se ha investigado la relación entre la AF y la temperatura ambiente, estudiando individuos derivados de poblaciones



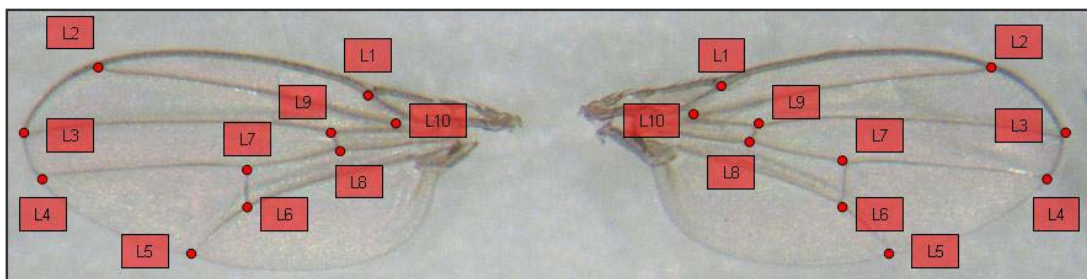
de altitudes contrastantes sometidos a los mismos tratamientos térmicos presentados en el Capítulo 2. Las dos preguntas centrales que se busca responder en este capítulo son:

- i) ¿Los individuos expuestos a tratamientos de temperaturas alternadas muestran una mayor AF respecto a los que fueron expuestos a tratamientos basados en temperaturas constantes?
- ii) ¿Son similares los patrones de asimetría fluctuante en poblaciones ubicadas a altitudes contrastantes frente a los diferentes regímenes térmicos?

## Materiales y Métodos

### Cepas, registro de los caracteres y análisis estadístico

Se analizaron las mismas líneas y poblaciones de *D. buzzatii* y de *D. melanogaster* detalladas en el Capítulo 2. Se eligieron de manera aleatoria a tres hembras emergidas de cada uno de los tubos (réplicas) y se las usaron para los estudios morfométricos. Las dos alas de cada mosca fueron separadas y colocadas sobre un cubreobjetos. Se tomaron imágenes de ambas alas utilizando una cámara digital conectada a una computadora. Posteriormente, se definieron y midieron 10 *landmarks* morfológicos sobre la cara dorsal de cada una de las alas (Figura 3.1). Los *landmarks* fueron digitalizados dos veces para cada una de las alas a los fines de conseguir una medición del error del proceso de medición.



**Figura 3.1.** Ubicación de los 10 *landmarks* utilizados en el estudio morfométrico en las alas izquierda y derecha.

Luego de registrar las coordenadas de los *landmarks*, las configuraciones fueron superpuestas en una configuración consenso (la media de todas las configuraciones analizadas) usando el procedimiento de *Procrustes generalized least squares* para

caracterizar la variación de la forma y el tamaño de las alas en moscas criadas bajo diferentes condiciones térmicas. La superposición de alas en los procrustes extrae la información total de las coordenadas originales, por lo que luego se eliminan las variaciones dadas por la escala, la posición y la orientación (ver Capítulo 1). Todas las mediciones realizadas fueron superpuestas simultáneamente para el ajuste por mínimos cuadrados. Finalmente, la forma de cada ala fue estimada como el promedio de las coordenadas de procrustes. De este modo, lograron generarse nuevas variables denominadas “coordenadas de procrustes” que se utilizaron en los análisis estadísticos posteriores (Debat et al. 2003).

### **Análisis estadístico**

La asimetría se estudió mediante ANOVAs en los que se consideraron las siguientes fuentes de variación principales: “lado” como factor fijo, e “individuo” como factor aleatorio (Palmer 1994). En este diseño la interacción “lado x individuo” puede considerarse como un indicador de la asimetría fluctuante y al factor “lado” como un indicador de la asimetría direccional. Se realizaron ANOVAs para cada una de las posibles combinaciones de tratamiento térmico (25°C, 25-17°C, 25-09°C y 17°C) x población (altura y llanura) x especie (*D. buzzatii* y *D. melanogaster*).

Se analizaron caracteres indicativos del tamaño y de la forma del ala. Para los ANOVAs de tamaño corporal se utilizaron como variables el valor medio del tamaño del centroide. Para los análisis de asimetría de forma del ala, se utilizaron como variables los denominados *partial warps* obtenidos a partir de la aplicación de la técnica de morfometría geométrica descrita previamente.

Las comparaciones entre los tratamientos térmicos se realizaron a través de cocientes entre los cuadrados medios con un *test* de F. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico *Statistica*.

## **Resultados**

### **Análisis de asimetría en el tamaño de las alas**

Los resultados del estudio del tamaño de centroide del ala (TCA) en *D. buzzatii* se presentan en las Tablas 3.1 y 3.2, para las poblaciones de altura y llanura, respectivamente. En los ANOVA realizados para ambas poblaciones la interacción

“lado x individuo” fue significativa en todos los tratamientos (Tablas 3.1 y 3.2). También en ambas poblaciones, las comparaciones entre tratamientos térmicos mostraron que, en promedio, las moscas criadas a 25°C fueron las que presentaron los mayores valores de AF para el TCA que las que fueron sometidas a los otros tratamientos térmicos ( $p < 0.0001$ ). Asimismo, en ambas poblaciones el factor “lado” fue significativo en todos los tratamientos (Tablas 3.1 y 3.2), si bien las diferencias entre tratamientos no fueron significativas. Esto último sugiere que las diferencias observadas entre los lados, una medida de la asimetría direccional, fueron independientes del régimen térmico al cual fueron criadas las moscas. Es decir, siempre que un lado fue diferente del otro, las diferencias entre ambos eran del mismo signo y magnitud entre los tratamientos.

CM de tamaño Población de altura <i>D. buzzatii</i> Temperatura	Lado (L)	Individuo (I)	L x I	Error
25	1867.794*** (1)	7896.819*** (47)	198.215*** (47)	12.491 (96)
25-09	9904.972*** (1)	93636.491*** (46)	42.579*** (46)	10.023 (94)
17	13096.465*** (1)	4593.906*** (51)	49.093*** (51)	10.206 (104)
25-17	10364.451*** (1)	110988.441*** (53)	63.036*** (53)	11.720 (108)

**Tabla 3.1.** Resultados de los ANOVAs para asimetría para hembras provenientes de la población de altura de *D. buzzatii*. Entre paréntesis figuran los grados de libertad de dicho factor. Referencia: indiv: individuo. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

CM de tamaño Población de llanura <i>D. buzzatii</i> Temperatura	Lado (L)	Individuo (I)	L x I	Error
25	2780.554*** (1)	2500.102*** (52)	174.226*** (52)	12.469 (106)
25-09	605.368*** (1)	2776.269*** (43)	58.481*** (43)	13.649 (88)
17	10999.012*** (1)	2277.013*** (48)	37.389*** (48)	7.462 (98)
25-17	5188.805*** (1)	3525.96*** (46)	60.801*** (46)	9.698 (94)

**Tabla 3.2.** Resultados de los ANOVAs para asimetría para hembras provenientes de la población de llanura de *D. buzzatii*. Entre paréntesis figuran los grados de libertad de dicho factor. Referencia: indiv: individuo. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

Los ANOVAs para el tamaño del centroide en *D. melanogaster* son presentados en la Tabla 3.3 para la población de mayor altitud y en la 3.4 para la de menor altura. En ambas poblaciones, tanto la interacción “individuo x lado” como el factor “lado” fueron significativos en todos los tratamientos. Sin embargo, las comparaciones realizadas entre tratamientos mostraron diferencias significativas en los niveles de asimetría para TCA entre moscas criadas a 25-17°C respecto de las criadas a 17°C en el TCA ( $p < 0.05$ ) solo en la población de altura. Respecto al factor “lado”, si bien los resultados mostraron valores significativos en todos los tratamientos térmicos (Tablas 3.3 y 3.4), no se observaron diferencias entre los ambientes térmicos. Esto, al igual que en *D. buzzatii* sugiere que la diferencia entre lados, la asimetría direccional, es independiente de las condiciones de cría. En otras palabras, se sugiere que no hay evidencia de una respuesta plástica de la asimetría direccional frente a los tratamientos térmicos a los que las moscas fueron sometidas en este experimento.

<b>CM de tamaño Población de altura <i>D. melanogaster</i> Temperatura</b>	<b>Lado (L)</b>	<b>Individuo (I)</b>	<b>L x I</b>	<b>Error</b>
25	5263.182*** (1)	1966.712*** (50)	40.809*** (50)	11.561 (102)
25-09	7864.886*** (1)	2937.489*** (53)	44.918*** (53)	7.5169 (108)
17	6787.493*** (1)	1781.763*** (53)	28.935*** (53)	8.207 (108)
25-17	7753.979*** (1)	1671.161*** (44)	52.450*** (44)	9.552 (90)

**Tabla 3.3.** Resultados de los ANOVAs para asimetría para hembras provenientes de la población de altura de *D. melanogaster*. Entre paréntesis figuran los grados de libertad de dicho factor. Referencia: indiv: individuo. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

<b>CM de tamaño Población de llanura <i>D. melanogaster</i> Temperatura</b>	<b>Lado (L)</b>	<b>Individuo (I)</b>	<b>L x I</b>	<b>Error</b>
25	7656.390*** (1)	848.579*** (53)	35.434*** (53)	26.674 (108)
25-09	7619.115*** (1)	1257.625*** (53)	50.677*** (53)	16.825 (108)
17	8924.032*** (1)	2403.854*** (53)	43.196*** (53)	10.805 (108)
25-17	6386.978*** (1)	1967.643*** (44)	34.514*** (44)	9.843 (90)

**Tabla 3.4.** Resultados de los ANOVAs para asimetría para hembras provenientes de la población de llanura de *D. melanogaster*. Entre paréntesis figuran los grados de libertad de dicho factor. Referencia: indiv: individuo. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

### **Asimetría en la forma del ala**

Los análisis de asimetría para la forma del ala se realizaron utilizando como variables las “coordenadas de procrustes”. Nuevamente se analizaron las interacciones “individuo x lado” (indicador de la asimetría fluctuante) y “lado” (indicador de la asimetría direccional) para los individuos estudiados en la sección anterior sometidos a los mismos cuatro tratamientos térmicos.

Los resultados para la población de mayor altitud de *D. buzzatii* son presentados en la Tabla 3.5, donde se observa que tanto el factor “lado” como la interacción “individuo x lado” fueron significativos en todos los tratamientos térmicos. En el caso de la interacción “individuo x lado” (el indicador de AF), el valor máximo se registró en las moscas criadas a 17°C ( $p < 0.0001$ ) y las magnitudes menores en los individuos sometidos a los tratamientos 25-17°C y 25-09°C (Tabla 3.5,  $p < 0.0001$ ). El factor “lado” también fue significativo en todos los tratamientos, mostrando dos grupos claramente diferenciados. Los valores máximos se registraron en las moscas sometidas a tratamientos de temperaturas constantes (25°C y 17°C), y mínimos en los tratamientos de temperaturas alternadas (25-17°C y 25-09°C) ( $p < 0.0001$ ; Tabla 3.5).

CM de forma Población de altura <i>D. buzzatii</i> Temperatura	Lado (L)	Individuo (I)	L x I	Error
25	1.0.10 <sup>-3</sup> *** (16)	3.7.10 <sup>-4</sup> *** (752)	2.1.10 <sup>-4</sup> *** (752)	0.000009 (1536)
25-09	4.7.10 <sup>-5</sup> *** (16)	1.0.10 <sup>-4</sup> *** (736)	1.5.10 <sup>-5</sup> *** (736)	0.000005 (1504)
17	1.2.10 <sup>-3</sup> *** (16)	5.9.10 <sup>-2</sup> *** (816)	9.3.10 <sup>-3</sup> *** (816)	0.0069 (1664)
25-17	4.5.10 <sup>-5</sup> *** (16)	8.1.10 <sup>-5</sup> *** (848)	1.4.10 <sup>-5</sup> *** (848)	0.000007 (1728)

**Tabla 3.5.** Resultados de los ANOVAs para asimetría para hembras provenientes de la población de altura de *D. buzzatii*. Entre paréntesis figuran los grados de libertad de dicho factor. Referencia: indiv: individuo. \*p<0.05; \*\*p< 0.01; \*\*\*p< 0.001

Los resultados de los ANOVAs efectuados para la población de llanura de *D. buzzatii* se presentan en la Tabla 3.6. Respecto a la interacción “individuo x lado”, los organismos criados a 25°C mostraron valores de asimetría superiores a los detectados en el resto de los tratamientos térmicos (p< 0.0001), en tanto que las diferencias en asimetría entre las moscas desarrolladas en los otros tres tratamientos térmicos no fueron significativas (p >0.05). Por el contrario, para el factor “lado”, si bien se obtuvieron efectos significativos para cada uno de los tratamientos térmicos (Tabla 3.6), no se registraron diferencias significativas entre las temperaturas (p > 0.05).

CM de forma Población de llanura <i>D. buzzatii</i> Temperatura	Lado (L)	Individuo (I)	L x I	Error
25	1.2.10 <sup>-4</sup> *** (16)	1.1.10 <sup>-5</sup> *** (832)	2.7.10 <sup>-5</sup> *** (832)	0.000006 (1696)
25-09	5.4.10 <sup>-5</sup> *** (16)	6.8.10 <sup>-5</sup> *** (688)	1.3.10 <sup>-5</sup> *** (688)	0.000005 (1408)
17	1.2.10 <sup>-4</sup> *** (16)	6.5.10 <sup>-5</sup> *** (768)	1.2.10 <sup>-5</sup> *** (768)	0.000004*** (1568)
25-17	1.1.10 <sup>-4</sup> *** (16)	7.7.10 <sup>-5</sup> *** (736)	1.2.10 <sup>-5</sup> *** (736)	0.000005 (1504)

**Tabla 3.6.** Resultados de los ANOVAs para asimetría para hembras provenientes de la población de llanura de *D. buzzatii*. Entre paréntesis figuran los grados de libertad de dicho factor. Referencia: indiv: individuo. \*p<0.05; \*\*p< 0.01; \*\*\*p< 0.001

Los resultados del análisis de asimetría de la forma del ala en *D. melanogaster* se muestran en la Tabla 3.7 y en la 3.8, para las poblaciones de altura y para la de llanura.

En el caso de la primera, el efecto de la interacción mostró valores significativos para todas las temperaturas analizadas. Sin embargo, en la comparación entre tratamientos térmicos sólo los individuos criados a 25°C mostraron valores de asimetría significativamente diferentes a los de 17°C ( $p < 0.05$ ). Además, las diferencias en forma del ala entre “lados” fueron significativas y similares entre sí ( $p > 0.05$ ; Tabla 3.7).

CM de forma Población de altura <i>D. melanogaster</i> Temperatura	Lado (L)	Individuo (I)	L x I	Error
25	$1.3 \cdot 10^{-4}***$ (16)	$8.2 \cdot 10^{-5}***$ (800)	$2.0 \cdot 10^{-5}***$ (800)	0.000009 (1632)
25-09	$1.7 \cdot 10^{-4}***$ (16)	$9.1 \cdot 10^{-5}***$ (848)	$1.7 \cdot 10^{-5}***$ (848)	0.000006 (1728)
17	$1.3 \cdot 10^{-4}***$ (16)	$8.4 \cdot 10^{-5}***$ (848)	$1.7 \cdot 10^{-5}***$ (848)	0.000005 (1728)
25-17	$1.1 \cdot 10^{-4}***$ (16)	$6.5 \cdot 10^{-5}***$ (704)	$1.9 \cdot 10^{-5}***$ (704)	0.000007 (1440)

**Tabla 3.7.** Resultados de los ANOVAs para asimetría para hembras provenientes de la población de altura de *D. melanogaster*. Entre paréntesis figuran los grados de libertad de dicho factor. Referencia: indiv: individuo. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

Por último, los resultados de la población de llanura de *D. melanogaster* presentan diferencias importantes en la forma de las alas izquierda y derecha en individuos criados en tratamientos térmicos diferentes (Tabla 3.8). Nuevamente, la interacción “individuo x lado” fue significativa para todos los tratamientos. Las comparaciones entre tratamientos mostraron que diferencias significativas entre los individuos criados a 17°C y los sometidos a los tratamientos de 25°C y 25-09°C ( $p < 0.05$ ). Respecto al factor “lado” –al igual que en el caso de la población de altura– todas las temperaturas mostraron valores significativos, aunque se registraron diferencias entre los individuos que fueron sometidos a regímenes térmicos diferentes.

CM de forma Población de llanura <i>D. melanogaster</i> Temperatura	Lado (L)	Individuo (I)	I x L	Error
25	1.1.10 <sup>-4</sup> *** (16)	9.4.10 <sup>-5</sup> *** (848)	1.8.10 <sup>-5</sup> *** (848)	0.000008 (1728)
25-09	1.8.10 <sup>-4</sup> *** (16)	1.3.10 <sup>-5</sup> *** (848)	1.8.10 <sup>-5</sup> *** (848)	0.000006 (1728)
17	1.6.10 <sup>-4</sup> *** (16)	1.1.10 <sup>-4</sup> *** (848)	2.1.10 <sup>-5</sup> *** (848)	0.000006 (1728)
25-17	8.8.10 <sup>-5</sup> *** (16)	1.1.10 <sup>-4</sup> *** (704)	2.10 <sup>-5</sup> *** (704)	0.000007 (1440)

**Tabla 3.8.** Cuadrados medios de los ANOVAs para asimetría para hembras provenientes de la población de llanura de *D. melanogaster*. Entre paréntesis figuran los grados de libertad de dicho factor. Referencia: indiv: individuo. \*p<0.05; \*\*p< 0.01; \*\*\*p< 0.001

## Conclusiones

La búsqueda de caracteres morfológicos que sirvan de indicadores del *stress* ha sido uno de los objetivos de las investigaciones centradas en la temática de la adaptación. Una de las características de los organismos que se han propuesto para dicho rol ha sido la asimetría fluctuante. Tal como hemos planteado en el Capítulo 1, las diferentes perturbaciones que un organismo sufre durante su desarrollo, podrían quedar “registradas” como variaciones aleatorias entre ambos lados de su cuerpo. De este modo, se espera que la magnitud de la asimetría fluctuante aumente frente a condiciones de *stress* ambiental durante el desarrollo. En el presente capítulo hemos analizado la variación del tamaño y de la forma del ala en moscas sometidas a tratamientos de temperatura constante y alternada durante el desarrollo de dos especies de *Drosophila*.

Nuestra expectativa era que los tratamientos de temperatura alternada podían constituir una fuente de *stress* ambiental para los moscas, tal como el estudio de la viabilidad parece sugerir (ver Capítulo 4). Sin embargo, los resultados de esta sección sugieren que no hay un correlato entre la asimetría fluctuante y la amplitud térmica. Más aún, en ningún caso (poblaciones que habitan localidades a diferente altitud de dos especies de *Drosophila*) se observó que los niveles de asimetría fluctuante fueran mayores en los individuos sometidos a tratamientos de mayor amplitud térmica.

Tal como ha sido sugerido, la AF podría considerarse como una medida inversa de la estabilidad del desarrollo y como un predictor del *fitness*. Pese a que esta postura ha sido muy cuestionada (Lens et al. 2002), en algunos casos la AF parece haber sido un buen indicador de variaciones en el *fitness* resultantes de la inestabilidad durante el



desarrollo debido al efecto de tratamientos térmicos extremos (“pulsos” o *shocks* térmicos). Por tal motivo, proponemos que futuros experimentos se basen en la comparación de los efectos de tratamientos térmicos agudos vs. crónicos (tal como los realizados en este trabajo) para poder discernir las características de la AF como indicador de *stress* ambiental.

Si bien no ha sido el centro del estudio del presente capítulo, es importante recordar los resultados de la asimetría direccional en los que, exceptuando la población de mayor altitud de *D. buzzatii* (con valores máximos en los dos tratamientos de temperatura constante), tampoco se observaron diferencias entre los organismos desarrollados a temperatura constante y alternada. Mientras algunos autores consideran a la asimetría direccional como un buen indicador de inestabilidad del desarrollo (Graham *et al.* 1993), otros sugieren que dicho fenómeno, es un ejemplo claro de norma de reacción y no un indicador de la inestabilidad del desarrollo (Klingenberg 2003). Al respecto, nuestros resultados concuerdan con la hipótesis de que la asimetría direccional no debiera ser considerada un indicador de *stress* ambiental, al menos para la amplitud térmica en los rangos analizados.

Estos resultados en su conjunto confirman la complejidad de los efectos de los factores ambientales, así como las dificultades en encontrar caracteres que sean indicadores unívocos del *fitness*. Como hemos visto, nuestros resultados aportan evidencias en favor de la idea que la AF no es un buen indicador de inestabilidad del desarrollo inducida por *stress* térmico, al menos en lo que respecta a los tratamientos de temperaturas constantes vs. alternadas. En el próximo capítulo se analizan otros dos caracteres de historia de vida (el tiempo de desarrollo y la viabilidad) que permitirán agregar más información al estudio de los efectos de la amplitud térmica y su relación con el *stress* térmico.

## Capítulo 4. Estudio comparativo de los patrones de variación interpoblacional en el tiempo de desarrollo, la viabilidad y la adaptación térmica en dos especies de *Drosophila*

### Resumen

**Preguntas:** Diversos autores han sugerido que la variación interpoblacional en el tiempo de desarrollo y la viabilidad debería ajustarse a patrones clinales. De acuerdo a esta predicción nos preguntamos:

- i) ¿Concuerdan los patrones de variación en el tiempo de desarrollo (TD) con las predicciones basadas en las clinas latitudinales observadas para el tamaño del cuerpo?
- ii) ¿Varía clinalmente la viabilidad (VB) a lo largo de gradientes latitudinales y altitudinales?
- iii) ¿*D. melanogaster* y *D. buzzatii* responden de manera similar a diferentes regímenes térmicos para el TD y VB?
- iv) ¿Las poblaciones de altura y de llanura responden de manera similar a regímenes de temperatura constante y alternante?
- v) ¿Puede ser considerada la amplitud térmica un factor ambiental que impone presiones selectivas de magnitud diferente a poblaciones naturales de altitud variable?

**Métodos:** Se recolectaron moscas de diferentes poblaciones de *D. buzzatii* y *D. melanogaster* y se registraron la VB y el TD. Posteriormente se sometieron individuos muestreados en localidades de altura y llanura a regímenes térmicos tanto constantes como alternados.

**Resultados:** Se detectaron patrones clinales de variación para el TD a lo largo de gradientes altitudinales, coincidentes y positivos en ambas especies. Sin embargo, los signos de la correlaciones entre el TD y la latitud fueron diferentes entre *D. buzzatii* (positivos) y *D. melanogaster* (negativos). En cuanto a la VB, los patrones clinales de variación también mostraron signos opuestos entre la variación latitudinal y la

altitudinal en *D. melanogaster*. En cambio, en *D. buzzatii* no se observaron clinas latitudinales ni altitudinales para la VB. Estos patrones motivaron el interrogante de si las moscas que viven a diferente altitud responden diferencialmente a tratamientos térmicos consistentes en regímenes constantes y alternados. Nuestros resultados evidenciaron que las moscas criadas a mayor temperatura se desarrollaron más rápido que las expuestas a menor temperatura media en ambas especies. En contraste, la respuesta de la VB mostró importantes diferencias entre especies. La población de mayor altitud registró una mayor VB para todos los tratamientos, mientras que las moscas de *D. buzzatii* procedentes de la población muestreada a mayor altitud fueron más viables que las de llanura solo en los tratamientos de temperaturas alternadas, mostrando patrones opuestos en los tratamientos constantes.

**Conclusiones:** A partir de nuestros resultados sugerimos que la amplitud térmica es un factor que debería ser considerado en estudios de adaptación térmica. A la vez se indica que las respuestas a diferentes condiciones de cría son especie-específicas, indicando la inconveniencia de extrapolar resultados entre especies, incluso cogenéricas.

## Introducción

Las clinas se suelen interpretar como ejemplos claros de la acción de la selección natural (Endler 1977; Endler 1986; Huey *et al.* 2000), siendo documentadas en especies diferentes (Mousseau & Roff 1989; Negovetic & Jokela 2001). La interpretación que dicho patrón es generado por la selección natural se ve reforzada por la observación de clinas paralelas en diferentes continentes y hemisferios en especies de amplia distribución (Gilchrist & Partridge 1999; Huey & Berrigan 2001). Del mismo modo, los patrones de variación fueron obtenidos bajo condiciones de laboratorio controladas, proveyendo la evidencia definitiva que las clinas no son meramente el resultado de variación inducida por el ambiente sino la respuesta del sistema genético a condiciones ambientales variables (Hoffmann *et al.* 2002; Kennington *et al.* 2003).

Las clinas latitudinales para el tamaño del cuerpo han sido documentadas en *D. melanogaster* (Capy *et al.* 1993; Imasheva *et al.* 1994; James *et al.* 1995; Hallas *et al.* 2002; Sgrò & Blows 2004) y otras especies, tal como *D. subobscura* (Huey & Berrigan 2001). Asimismo, se ha demostrado que el tamaño del cuerpo evoluciona en la dirección de un mayor tamaño corporal en poblaciones naturales de *D. melanogaster* que viven a mayores altitud y que poblaciones experimentales expuestas a bajas temperaturas imitan este patrón (Crill *et al.* 1996; Kari & Huey 2000; David *et al.* 2006). Pese a que el tamaño del cuerpo no es un carácter directamente asociado al *fitness*, está correlacionado con caracteres de asociación directa con el *fitness* de adulto tales como la fecundidad, la habilidad competitiva y la longevidad (Roff 1992; Powell 1997). Sin embargo, existe evidencia de que la evolución del tamaño del cuerpo estaría restringida por una selección que actúa en sentido opuesto en estadios tempranos del ciclo de vida (Hasson *et al.* 1993). A partir de ello, algunos estudios han sugerido un posible compromiso (*trade-off*) entre el tamaño del cuerpo y el tiempo de desarrollo (Bonner & Horn 1982; Gebhardt & Stearns 1988; Hasson *et al.* 1993; Neat *et al.* 1995; Partridge *et al.* 1999; Rodríguez *et al.* 1999; Fernandez Iriarte & Hasson 2000; Cortese *et al.* 2002; Bharathi *et al.* 2004), por lo que la existencia de clinas latitudinales positivas para el tiempo de desarrollo aparece como una derivación lógica de los efectos sobre el tamaño corporal mencionados en el Capítulo 2. Sin embargo, la asociación entre el tiempo de desarrollo y las variables geográficas usualmente se infiere sobre la base de evidencia indirecta (James *et al.* 1995; James & Partridge 1995). Más aún, el escenario se complejiza a partir de la propuesta de algunos autores que sugieren que una

relación positiva entre estacionalidad y latitud, podría conducir a una relación opuesta entre el tamaño del cuerpo y la latitud. En efecto, el acortamiento de las estaciones podría limitar progresivamente el tiempo disponible para alimentación, crecimiento y desarrollo, produciendo exactamente la tendencia opuesta, esto es, una correlación negativa entre el tamaño del cuerpo y la latitud (Blanckenhorn 1997; Chown & Klok 2003; Blanckenhorn & Demont 2004).

Asimismo, es importante destacar que la selección sobre los estadios juveniles en un ciclo de vida complejo puede tener numerosos efectos sobre el *fitness* total (Chippindale et al. 1997). En este sentido, desde una perspectiva ecológica, se podría esperar una correlación negativa entre el tiempo de desarrollo y la supervivencia en los estadios tempranos del ciclo de vida. La lógica en este caso es simple: las moscas de desarrollo más lento “invertirían” más tiempo en un recurso cuya riqueza nutricional se está degradando (con la consiguiente acumulación de compuestos tóxicos) y, paralelamente, quedarían más expuestos a la predación y/o a parásitos, todo lo cual limitaría su supervivencia. En contraposición, una tasa de desarrollo más elevada también traería aparejados riesgos fisiológicos como una menor estabilidad del desarrollo o, eventualmente, altas tasas de mortalidad juvenil. Sin embargo, los pocos estudios realizados hasta el presente que han intentado explicar el nexo entre la supervivencia y el tiempo de desarrollo produjeron resultados que impiden llegar a una conclusión definitiva. Por ejemplo, en *D. melanogaster* se han descrito asociaciones positivas y negativas entre el tiempo de desarrollo y la viabilidad temprana en líneas seleccionadas artificialmente para una mayor longevidad *–postponed senescence–* (Chippindale et al. 1997) y para un tiempo de desarrollo acortado (Chippindale et al. 1994). Del mismo modo, otros estudios han mostrado que el tiempo de desarrollo y la supervivencia de los estadios preadultos están desacoplados en *D. melanogaster* (Zwaan et al. 1995) y en *D. buzzatii* (Fernandez Iriarte & Hasson 2000). Estos resultados contradictorios sugieren la dificultad de inferir el posible comportamiento de la viabilidad en especies que muestran variación clinal para el tiempo de desarrollo. Por tal motivo, nuestra hipótesis de trabajo es que las clinas latitudinales positivas en el tiempo de desarrollo deberían estar acompañadas por clinas negativas en viabilidad.

En general se acepta que la variación en la temperatura media sería uno de los factores determinantes de la variación en caracteres de historia de vida a lo largo de un gradiente latitudinal. En concordancia con esta interpretación, los estudios experimentales que tradicionalmente han puesto a prueba la hipótesis de la temperatura

como factor causal de las clinas latitudinales en el tamaño del cuerpo, han analizado el efecto de regímenes de temperatura constante (Santos et al. 2005). No obstante, el hecho que la relación entre la temperatura y el tamaño se aplique a una parte importante de los ectotermos estudiados no es garantía de que haya una explicación general para la relación entre la temperatura y los caracteres de historia de vida (Angilletta & Dunham 2003). Del mismo modo, otros estudios han mostrado que los efectos de la temperatura sobre caracteres de historia de vida son especie-específicos, incluso en el caso de especies hermanas como *D. melanogaster* y *D. simulans* (Gibert et al. 2004).

En realidad, la temperatura cambia de diversos y complejos modos a lo largo de gradientes tanto latitudinales como altitudinales. En este sentido, los ambientes de mayor y menor altitud difieren fuertemente en las variaciones de la temperatura durante el día, especialmente en la diferencia registrada entre las temperaturas diurnas y nocturnas (amplitud térmica diaria). De este modo, la amplitud térmica ha sido sugerida como un posible factor selectivo en los pocos estudios en los que se ha analizado su efecto sobre la variación de las historia de vida (Loeschcke et al. 1997; Loeschcke et al. 1999; Pétavy et al. 2001a; Pétavy et al. 2004).

En este capítulo se presentan los resultados de los estudios de la variación en el tiempo de desarrollo y la viabilidad del primer estadio hasta la adultez, dentro y entre poblaciones naturales localizadas a lo largo de gradientes latitudinales y altitudinales en las especies *D. buzzatii* y *D. melanogaster*. Nuestro primer objetivo es comparar los patrones de variación natural de dos especies: una especie especialista, la autóctona y cactófila *D. buzzatii*, y otra especie invasiva y generalista, *D. melanogaster*. Nuestro segundo objetivo es investigar la posible respuesta diferencial de poblaciones de altura y llanura a tratamientos térmicos que difieren tanto en temperatura media como en la amplitud térmica.

Nuestras preguntas en relación a los patrones naturales de variación son:

- i) ¿Concuerdan los patrones de variación en el tiempo de desarrollo con las predicciones basadas en las clinas latitudinales del tamaño del cuerpo?
- ii) ¿La viabilidad varía clinalmente a lo largo de gradientes latitudinales y altitudinales?
- iii) ¿Concuerdan las clinas de viabilidad con las predicciones basadas en los patrones observados para el tiempo de desarrollo?

Tal como será expuesto, las comparaciones entre poblaciones de altitud contrastante mostraron tendencias concordantes entre especies para el tiempo de desarrollo pero no para la viabilidad. En este contexto diseñamos experimentos que nos permitieran responder las otras preguntas:

- iv) ¿*D. melanogaster* y *D. buzzatii* responden de manera similar a los regímenes térmicos en términos de TD y VT?
- v) ¿Las poblaciones de altura y llanura responden diferencialmente a los regímenes térmicos de temperatura constante y alternante? ¿Puede ser considerada la amplitud térmica un agente selectivo actuando con diferentes magnitudes en poblaciones naturales que viven en ambientes de mayor y menor altitud?

## **Materiales y métodos**

### **Poblaciones y especies**

Siete poblaciones naturales de *D. buzzatii* y siete de *D. melanogaster* fueron muestreadas a lo largo de gradientes latitudinales y altitudinales en el noroeste (en Febrero del 2003) y el oeste (Febrero del 2004) de Argentina (Figura 2.2, Capítulo 2). Las coordenadas geográficas y la altitud de todas las localidades analizadas se indican en la Tabla 4.1.

Especies	Localidades	Latitud	Altitud (metros)	Longitud
<i>D. melanogaster</i>				
	San Blas	28° 25'	1061	67° 06'
	Chilecito	29° 10'	1043	67° 28'
	Jachal	30° 12'	1238	68° 45'
	San Juan	31° 27'	671	68° 31'
	Barreal	31° 38'	1626	69° 28'
	Uspallata	32° 35'	1915	69° 22'
	Lavalle	32° 50'	647	68° 28'
<i>D. buzzatii</i>				
	Güemes	24° 38'	739	65° 03'
	Cachi	25° 07'	2280	66° 12'
	Quilmes	26° 27'	1855	66° 02'
	Vipos	26° 28'	798	65° 22'
	Termas	27° 28'	248	64° 52'
	Catamarca	28° 28'	519	65° 46'
	San Luis	33° 25'	709	66° 25'

**Tabla 4.1.** Listado de localidades muestreadas en *D. melanogaster* y en *D. buzzatii* con las coordenadas geográficas y las altitudes.

Las moscas fueron recolectadas con redes entomológicas utilizando trampas con banana fermentada como cebo. Una vez en el laboratorio, las moscas fueron separadas por sexos y especies. Las hembras provenientes de cada localidad se usaron para la fundación de grupos de isólinas de cada localidad (en adelante denominadas líneas), criando la descendencia de cada hembra salvaje inseminada individualmente en tubos con medio instantáneo para *Drosophila*. El reconocimiento de las especies y el mantenimiento de las isólinas se realizaron a través del procedimiento detallado en el Capítulo 2.



## **Experimentos de laboratorio**

Se realizaron dos grupos de experimentos, basados en un diseño experimental de hermanos completos (David *et al.* 2005). En el primer grupo, se eligieron doce líneas al azar de cada población de cada una de las especies a los fines de analizar los patrones de variación del tiempo de desarrollo (TD) y la viabilidad (VB) a lo largo de gradientes latitudinales y altitudinales.

Para cada línea, 200 adultos maduros sexualmente (100 de cada sexo) fueron liberados en una cámara de recolección de huevos. En cada cámara se colocó una placa de petri conteniendo un medio preparado con 3 grs. de agar, 5 ml de 3 etanol: 1 ácido acético 60% y 175 ml de agua destilada, para la recolección de huevos. Las placas de petri fueron retiradas de la cámara luego de 12 hs. e incubadas a 25°C hasta la emergencia de las larvas (aproximadamente 24 hs. para *D. melanogaster* y de 36 hs. para *D. buzzatii*). Grupos de 30 (en *D. melanogaster*) y de 40 (en *D. buzzatii*) larvas de primer estadio fueron transferidos a tubos con medio de cultivo instantáneo para *Drosophila* tal como fue descrito en el Capítulo 2. Para cada combinación de especie x población x línea, se hicieron cuatro réplicas (tubos). Todos los tubos se incubaron hasta la emergencia de los adultos en las condiciones descriptas más arriba.

El objetivo del segundo grupo de experimentos realizado fue comparar los efectos de diferentes tratamientos térmicos sobre el TD y la VB entre poblaciones (un par de cada especie) ubicadas a la misma latitud pero a altitudes contrastantes (ver más abajo). Con este fin, se eligieron aleatoriamente seis líneas de los *pooles* de *D. buzzatii* derivados de las poblaciones de Quilmes (población de altura) y Vipos (llanura), y de *D. melanogaster* muestreadas en Uspallata (altura) y en Lavalle (llanura). Cuatro tubos (réplicas) de cada línea fueron aleatoriamente asignados a uno de los siete tratamientos térmicos. En tres de ellos la temperatura se mantuvo constante a 17°C, 25°C o 30°C (regímenes de temperatura constante). En los otros cuatro tratamientos, la temperatura varió a lo largo del día alcanzando su valor máximo durante el período de luz y el mínimo durante la noche (regímenes de temperatura alternada): 30-25°C, 25-17°C, 30-9°C y 25-9°C (en todos los casos se da en primer término la temperatura diurna). Las moscas se expusieron a los tratamientos térmicos desde el primer estadio larval hasta el estadio adulto. A los fines de examinar el efecto de la amplitud térmica sobre el TD y la VB, los tratamientos realizados fueron elegidos de acuerdo a los regímenes térmicos a los que las moscas están expuestas en las áreas muestreadas (ver debajo para la

información climática de las localidades elegidas en este capítulo). A pesar de que el diseño puede parecer incompleto en la medida en que algunos tratamientos con diferente amplitud e igual media no se probaron, es importante subrayar que nuestro objetivo fue explorar si poblaciones de diferente altitud exhiben una respuesta diferencial a los tratamientos térmicos constantes y alternados.

### **Caracteres de historia de vida investigados**

Los adultos recién emergidos en los tubos fueron recogidos cada seis horas. En cada réplica se registró el TD como el tiempo transcurrido desde la transferencia de las larvas de primer estadio a los tubos hasta la emergencia de los adultos, y la VB como la proporción de adultos emergidos en cada uno de las réplicas relativos al número de larvas inicialmente sembrados.

### **Análisis de los datos**

El análisis de los datos se realizó utilizando métodos estadísticos *standard* descritos en Sokal y Rohlf (1997). En primer lugar, se realizaron análisis de regresión múltiple del TD y la VB en función de la latitud y la altitud, con el fin de investigar si los patrones de variación se ajustan a patrones clinales. En estos análisis se consideraron a las líneas como las unidades experimentales. Los datos analizados consistieron en los valores medios de TD y VB de cada línea, promediados entre las respectivas réplicas.

En segunda instancia, se realizaron ANOVAs de un factor con la población como único factor a los fines de analizar los patrones altitudinales de variación en el TD y la VB, en cada especie separadamente. El propósito de estos ANOVAs fue comparar entre pares poblacionales (dos en cada especie) localizados a altitudes contrastantes y a latitudes similares. Los pares poblacionales de altura y llanura fueron: Quilmes/Vipos y Cachi/Güemes en *D. buzzatii* y Uspallata/Lavalle y Barreal/San Juan en *D. melanogaster*. El modelo de estos ANOVAs fue:

$$Y = \mu + P + \varepsilon$$

en donde  $\mu$  es la media general, P corresponde al efecto poblacional y  $\varepsilon$  el error.

En tercer lugar, se realizaron ANOVAs para el TD y la VB para cada población separadamente, con la línea (factor aleatorio) como fuente simple de variación. El modelo en este caso es similar al descrito en el párrafo previo reemplazando a la población [P] por la línea [L]. El objetivo de este análisis fue determinar la contribución relativa de las diferencias entre líneas a la varianza total del carácter. De acuerdo a nuestro diseño experimental, un efecto significativo de la línea podría interpretarse como una estimación de la contribución del componente genético a la varianza fenotípica total en la medida en que todas las líneas fueron criadas bajo las mismas condiciones minimizando la varianza ambiental (Hartl & Conner 2004; David *et al.* 2005). En estos ANOVAs las réplicas fueron consideradas como las unidades experimentales. Continuando los análisis realizados acerca de las correcciones se presentaron además los resultados según análisis múltiples dados de Bonferroni en los análisis de componentes de varianza (Rice 1989; Moran 2003; Neuhäuser 2004; Verhoeven *et al.* 2005).

Los efectos de los tratamientos térmicos sobre el TD y la VB fueron analizados por medio de ANOVAs de dos factores, considerando a la población (llanura vs. altura) y al tratamiento térmico como las fuentes principales de variación, en cada especie separadamente. En estos ANOVAs las líneas individuales fueron consideradas como las unidades experimentales. Este procedimiento hace el ANOVA más conservativo, en la medida en que si consideráramos a las réplicas como unidad experimental, las diferencias entre las mismas incrementarían el error en la razón de varianzas. El modelo de ANOVA resultante es:

$$y = \mu + P + T + P \times T + \varepsilon,$$

en donde  $\mu$  es la media general del carácter, P y T representan los efectos de la población y los tratamientos térmicos respectivamente, y  $\varepsilon$  el error.

Cuando fue necesario, se realizaron comparaciones *a posteriori* utilizando el método de Tukey. Previo a todos los análisis estadísticos, el TD y la VB fueron transformados logarítmicamente y angularmente [arcseno  $(p_i)^{1/2}$ , en donde  $p_i$  es el porcentaje de supervivencia], respectivamente. La homogeneidad de varianza fue

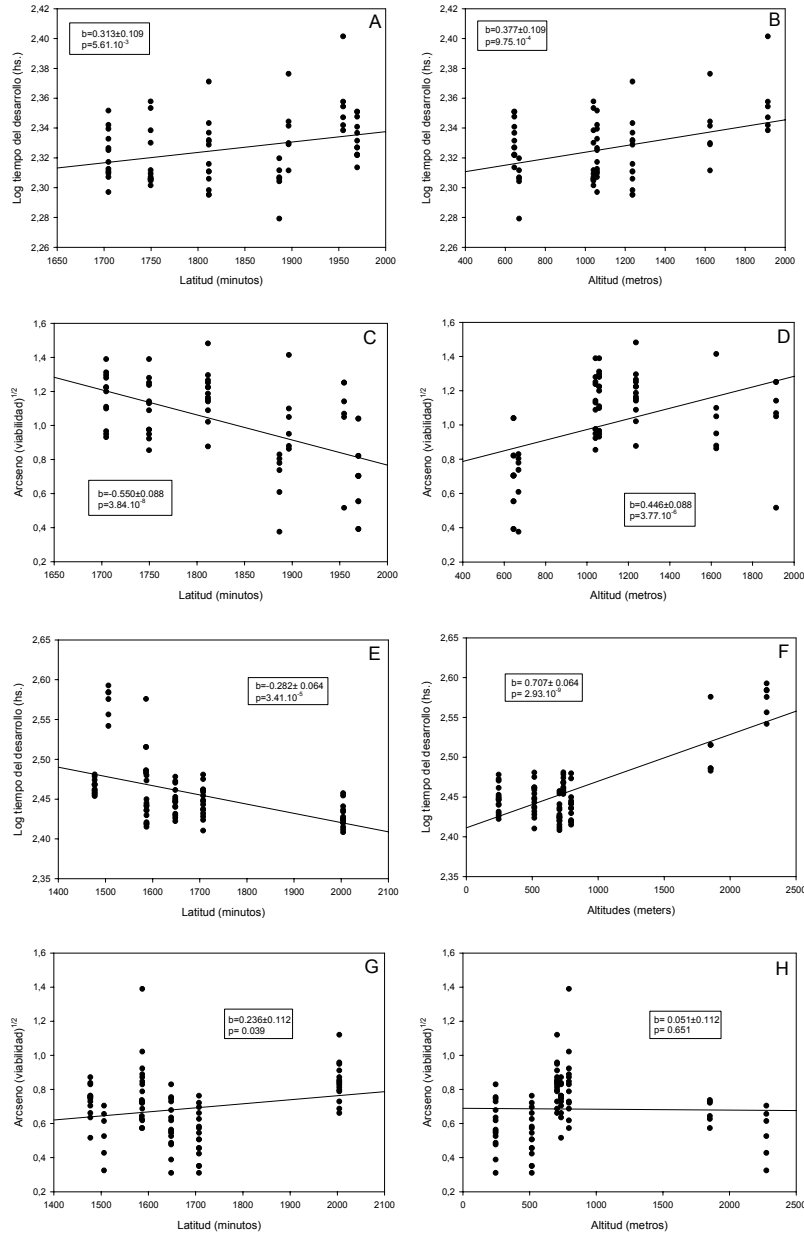
verificada a través de la prueba de Levene. Para todos los análisis, se utilizó el paquete estadístico Statistica para Windows (6.0).

## **Resultados**

### **Climas latitudinales y altitudinales en el tiempo de desarrollo y la viabilidad**

La latitud y la altitud no mostraron una correlación significativa en los grupos de localidades muestreados en cada una de las especies analizadas ( $r= 0.16$ ,  $p= 0.74$  y  $r= -0.39$ ,  $p= 0.39$ , en *D. melanogaster* y en *D. buzzatii*, respectivamente). Igualmente, decidimos investigar los patrones de variación mediante regresiones múltiples del TD y de la VB en función de la latitud y la altitud para garantizar la independencia de los efectos correspondientes.

El TD mostró un amplio rango de variación dentro y entre poblaciones en ambas especies. Los coeficientes de regresiones parciales del TD sobre la latitud y la altitud presentaron resultados significativos en ambas especies (Fig. 4.1). En el caso de la latitud los signos de los coeficientes de regresión fueron diferentes para cada especie. Por un lado, el TD incrementó sus valores a mayores latitudes en *D. melanogaster* (Fig. 4.1 A), mientras que en *D. buzzatii* la pendiente fue negativa (Fig. 1E). En contraste, los coeficientes de regresión parcial fueron significativos y concordantes en signo, en ambas especies para la altitud. El TD mostró una asociación positiva con la altitud tanto en *D. melanogaster* como en *D. buzzatii* (Fig. 4.1 B y 4.1 F).



**Figura. 4.1.** Variación altitudinal y latitudinal en el tiempo de desarrollo (en hs.) y viabilidad (valores transformados angularmente) en *D. melanogaster* (A-D) y *D. buzzatii* (E-H). b= coeficientes de regresión parciales.

En vista de estos resultados, se realizaron ANOVAs adicionales comparando el TD entre poblaciones de altura y llanura (en cada par de poblaciones de llanura y altura están ubicados a la misma latitud) muestreadas para cada una de las especies. Las

diferencias entre poblaciones fueron significativas en ambas especies ( $F_{3,34} = 9.5$ ;  $p = 2.1 \cdot 10^{-4}$  en *D. melanogaster* y  $F_{3,34} = 66.4$ ,  $p = 2.7 \cdot 10^{-14}$  en *D. buzzatii*). Además, los resultados de los contrastes *a posteriori* confirmaron que en todos los pares de poblaciones, las de llanura se desarrollaron más rápidamente que las de altura, en *D. melanogaster* (San Juan vs. Barreal, prueba de Tukey:  $p = 1 \cdot 10^{-2}$ ; Lavallo vs. Uspallata  $p = 4.3 \cdot 10^{-2}$ ) y en *D. buzzatii* (Vipos vs. Quilmes  $p = 1.6 \cdot 10^{-4}$ ; Güemes vs. Cachi  $p = 1.3 \cdot 10^{-4}$ ).

Los ANOVAs de un factor –cuyo objetivo fue estimar la proporción de la variación fenotípica de TD explicada por diferencias entre líneas dentro de cada población– fueron significativos para la mayoría de las poblaciones analizadas. Según nuestro diseño, la proporción de varianza fenotípica explicada por el componente línea es un estimador del componente genético (las diferencias entre líneas (familias) dentro de poblaciones). En el caso de *D. melanogaster* los valores variaron entre 54 y 80% en *D. melanogaster*, mientras que en *D. buzzatii* lo hicieron entre 37 y 70%.

Paralelamente, las diferencias interpoblacionales en VB fueron altamente significativas tanto en *D. buzzatii* como en *D. melanogaster* ( $F_{3,34} = 5.77$ ,  $p = 2.7 \cdot 10^{-3}$  y de  $F_{3,34} = 6.12$ ,  $p = 2.7 \cdot 10^{-3}$ , respectivamente). Sin embargo, las regresiones parciales de la VB con la altitud revelaron diferentes tendencias en ambas especies. Por un lado, la VB se correlacionó negativamente con la latitud y positivamente con la altitud en *D. melanogaster* (Fig. 4.1 C y 4.1 D). Por otro lado, en *D. buzzatii* la pendiente de la regresión de la VB sobre la latitud fue positiva y significativa (Fig. 4.1 G), mientras que el coeficiente de regresión parcial sobre la altitud no fue significativo (Fig. 4.1 H).

De acuerdo con los resultados de las regresiones, las comparaciones entre pares poblacionales de diferente altitud revelaron resultados contrastantes entre especies. En tanto que las poblaciones de mayor altitud mostraron valores significativamente mayores de VB que las de menor altitud en *D. melanogaster* (Barreal vs. San Juan prueba de Tukey:  $p = 8.9 \cdot 10^{-3}$ , Lavallo vs. Uspallata  $p = 9.3 \cdot 10^{-3}$ ), en *D. buzzatii* las diferencias fueron significativas entre Cachi y Güemes ( $p = 2.6 \cdot 10^{-3}$ ) y sólo marginalmente significativas entre Vipos y Quilmes ( $p = 7.7 \cdot 10^{-2}$ ).

Tal como para el TD, las diferencias entre líneas (dentro de las poblaciones) fueron significativas en todas las poblaciones de *D. melanogaster* y solamente en 3 de las 7 poblaciones de *D. buzzatii*. El porcentaje de la varianza explicada por el

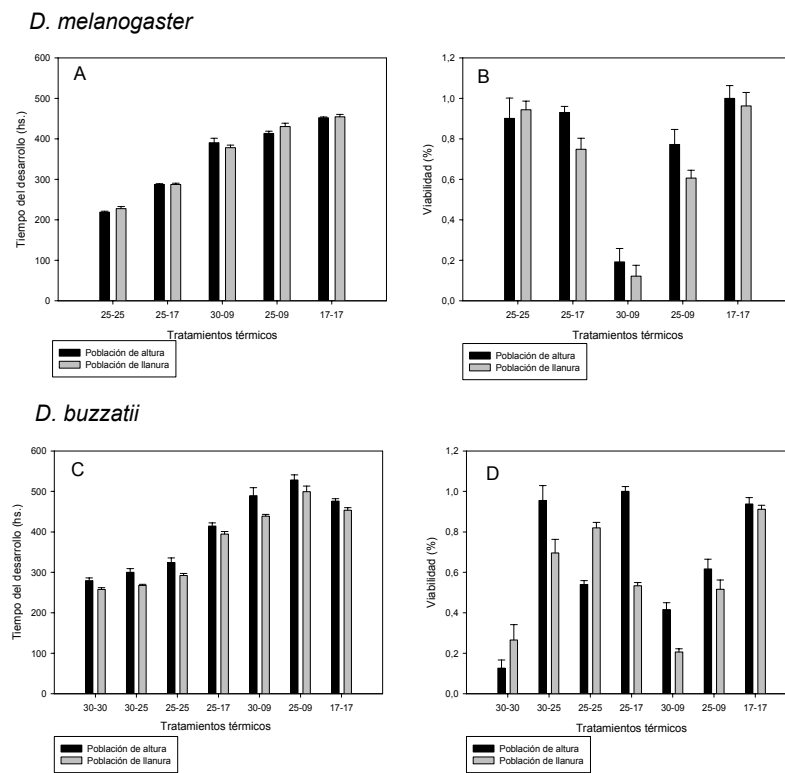
componente línea varió desde 25 a 67% en el caso de *D. melanogaster* y desde 55 a 60 % en el caso de *D. buzzatii*.

### **El efecto de los tratamientos térmicos en el tiempo de desarrollo y la viabilidad**

Considerando los resultados presentados hasta aquí, escogimos pares de poblaciones (uno de cada especie) con el fin de evaluar si las clinas altitudinales observadas en el TD y VB pueden explicarse como respuestas diferenciales a regímenes de temperatura constante y/o alternada. La lógica es sencilla: las poblaciones que viven a diferente altitud (en latitudes similares) no están expuestas a regímenes térmicos que difieren únicamente en su temperatura media, sino que además están sujetas a regímenes térmicos contrastantes a lo largo del día. En general, la temperatura alcanza su máximo valor durante el día y decrece abruptamente luego del atardecer, siendo esto particularmente notorio en los ambientes de altura. Asimismo, la información climática obtenida del Servicio Meteorológico Nacional para la mayoría de las poblaciones analizadas en este trabajo mostraron que las diferencias entre las temperaturas medias máximas y mínimas diarias (amplitud térmica) durante el verano (el período en que se muestrearon las poblaciones de ambas especies) fueron ostensiblemente mayores en las poblaciones de altura. Por ejemplo, al comparar las temperaturas máximas y mínimas en las localidades donde se muestreó *D. melanogaster* las amplitudes térmicas fueron de 20°C en Barreal (media máxima de 31.4 °C, media mínima de 11.4°C) y 22°C en Uspallata (30.9 °C - 12.9°C), mientras que en las localidades de menor altitud las diferencias fueron 13.5°C y de 15.7°C en Lavalle (33.7 °C - 20.2°C) y San Juan (33.9 °C - 18.2°C), respectivamente. Del mismo modo, la amplitud térmica en los sitios de muestreo de *D. buzzatii* fue mayor en las localidades de altura (17.1°C en Quilmes (30.0°C - 12.9°C) y de 21.4°C en Cachi (34.9, 13.5)), que en las de llanura (11°C en Vipos (30.7°C - 19.7°C) y de 13.2°C en Güemes (31.6 °C - 18.4 °C)). A los fines de ilustrar en forma completa la idea que la amplitud térmica presenta las mayores diferencias entre poblaciones de altura y llanura, que en el caso de poblaciones que viven en los extremos de un gradiente latitudinal, cabe mencionar que las temperaturas medias máximas y mínimas en San Luis (el sitio de captura de *D. buzzatii* que se encuentra a la máxima latitud) fueron de 30.5°C y de 16.9°C, los cuales presentan una amplitud térmica de 13.6°C, valor cercano al registrado en Vipos. Los datos climáticos,

por lo tanto, muestran que la amplitud térmica encuentra sus principales variaciones a lo largo de gradientes altitudinales más que latitudinales.

Los valores medios del TD y la VB de las poblaciones de menor y mayor altitud de ambas especies expuestas a los diferentes tratamientos térmicos se presentan en la Figura 4.2. Los tubos expuestos al régimen térmico de 17-9°C no pudieron ser considerados en los análisis dado que no emergieron moscas adultas aún después de 45 días de iniciado el experimento. Además, estos tubos debieron descartarse por contaminación fúngica en el medio de cultivo.



**Figura. 4.2.** Medias del tiempo de desarrollo y la viabilidad (expresado como el porcentaje de sobrevivientes dividido por el valor máximo estimado en cada especie) en poblaciones de diferentes altitudes de *D. melanogaster* (A y B) y de *D. buzzatii* (C y D) expuestas a diferentes tratamientos térmicos.

La primera característica relevante de los ANOVAs para TD fue que la interacción población (P) x tratamiento térmico (T) no fue significativa ni en *D. melanogaster* ni en *D. buzzatii* (Tabla 4.2), sugiriendo que los tratamientos térmicos



afectaron de modo similar a las moscas de ambas poblaciones. Sin embargo, los patrones de variación difirieron entre especies en algunas características. Solo el efecto del tratamiento térmico fue significativo en *D. melanogaster* (Tabla 4.2). En general, las moscas criadas a mayores temperaturas se desarrollaron más rápido. Curiosamente, las moscas desarrolladas a 17°C tuvieron mayores valores de TD que aquellas criadas a 25-9°C. En contraste, tanto las diferencias ente poblaciones como entre tratamientos fueron significativos en *D. buzzatii*. Las moscas de la población de llanura se desarrollaron más rápidamente que las de altura, independientemente del tratamiento (Fig. 4.2). Asimismo, se observó una asociación negativa entre el TD y la temperatura de cría. Otra característica interesante es que las moscas criadas a 17°C se desarrollaron más rápidamente que las crecidas a 25-9°C (análisis de Tukey:  $p= 2.1 \cdot 10^{-4}$ ) (Fig. 4.2), un patrón opuesto al registrado en *D. melanogaster* (Fig. 4.2).

Fuente de variación	Tiempo de desarrollo				Viabilidad			
	g.l.	SC	F	p	g.l.	SC	F	p
<b><i>D. melanogaster</i></b>								
<b>Población (P)</b>	1	136	0.92	0.34	1	0.14	4.38	0.04
<b>Temperatura (T)</b>	4	438272	738.14	$4 \cdot 10^{-7}$	6	14.96	74.59	$7 \cdot 10^{-7}$
<b>P x T</b>	4	1051	1.77	0.15	6	0.23	1.16	0.33
<b>Error</b>	45	6680			68	2.27		
<b><i>D. buzzatii</i></b>								
<b>Población (P)</b>	1	16284	28.94	$1 \cdot 10^{-6}$	1	0.05	2.49	0.12
<b>Temperatura (T)</b>	6	620537	183.83	$2 \cdot 10^{-7}$	6	2.39	19.24	$5 \cdot 10^{-5}$
<b>P x T</b>	6	1909	0.57	0.76	6	0.31	2.50	0.03
<b>Error</b>	64	36006			70	1.45		

**Tabla 4.2.** Resultados de los ANOVAs para el tiempo de desarrollo y la viabilidad en poblaciones de diferente altitud y entre tratamientos térmicos en *D. melanogaster* y en *D. buzzatii*. g.l.: grados de libertad, SC: suma de cuadrados.

Los ANOVAs realizados para cada combinación tratamiento térmico x población mostraron valores significativos del factor línea tanto en *D. buzzatii* como en *D. melanogaster* (Tabla 4.3). Estos resultados sugieren, en términos generales, que una proporción importante de la varianza fenotípica observada tiene base genética.

Tiempo de desarrollo								
Especies	Población	30-30	30-25	25-25	25-17	30-09	17-17	25-09
<i>D. m.</i>	Llanura	(*)	(*)	13.94*** (51.9) <sup>Ω</sup>	5.86** (32.6)	4.71* (32.6)	2.94* (32.6)	3.00* (31.9)
	Altura	(*)	(*)	17.83*** (17.7) <sup>Ω</sup>	27.28*** (44.1) <sup>Ω</sup>	4.12* (69.8)	9.83*** (44.1) <sup>Ω</sup>	4.65** (47.1)
<i>D. b.</i>	Llanura	11.21** (73.1) <sup>Ω</sup>	(*)	11.6*** (70.9) <sup>Ω</sup>	9.76*** (37.5) <sup>Ω</sup>	3.28* (79.9)	17.33*** (37.5) <sup>Ω</sup>	17.69*** (79.2) <sup>Ω</sup>
	Altura	(*)	14.91*** (78.9) <sup>Ω</sup>	45.59*** (90.1) <sup>Ω</sup>	6.05** (86.2) <sup>Ω</sup>	24.37*** (45.9) <sup>Ω</sup>	4.96** (86.2) <sup>Ω</sup>	7.73*** (61.6) <sup>Ω</sup>
Viabilidad								
<i>D. m.</i>	Llanura	4.26* (74.6)	(*)	8.95*** (66.5) <sup>Ω</sup>	6.00** (93.5) <sup>Ω</sup>	11.22** (48.0) <sup>Ω</sup>	4.70** (93.5) <sup>Ω</sup>	3.33* (36.8)
	Altura	(*)	6.07* (45.0)	10.31*** (70.9) <sup>Ω</sup>	2.92* (75.2)	3.79* (56.3)	2.61* (75.2)	ns
<i>D. b.</i>	Llanura	18.87*** (7) <sup>Ω</sup>	4.09* (44.5)	ns	ns	ns	ns	7.17*** (56.4) <sup>Ω</sup>
	Altura	6.25* (14.9)	6.19** (53.2) <sup>Ω</sup>	ns	ns	ns	ns	ns

**Tabla 4.3.** Análisis de componentes de varianza para el tiempo de desarrollo y viabilidad en poblaciones de altitudes contrastantes de *D. buzzatii* y *D. melanogaster*. En cada celda son presentados los valores de F. La contribución relativa del componente de varianza entre líneas para cada combinación población x tratamiento térmico es dada entre paréntesis. *D. m.*: *Drosophila melanogaster*. *D. b.*: *D. buzzatii*. ns: no significativo. (\*) ANOVA no pudo ser realizada \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, <sup>Ω</sup> valores significativos considerando la técnica *standard* de Bonferroni.

En cuanto a la VB los resultados mostraron patrones considerablemente diferentes entre especies. En *D. melanogaster* las dos fuentes principales de variación (población y temperatura) fueron significativas (Tabla 4.2). Las moscas provenientes de la localidad de mayor altitud fueron más viables que las de llanura (Fig. 4.2). Otro resultado llamativo fue la reducida VB de *D. melanogaster* para ambas poblaciones en los tratamientos en los que la temperatura alcanzó un máximo de 30°C (tanto en el que la temperatura se mantuvo constante (30-30°C) así como en los dos regímenes de temperatura alternada (30-25°C y 30-9°C)). Cabe mencionar que estos resultados resultan sorprendentes, en la medida en que la evidencia disponible muestra que *D. melanogaster* puede ser criada, no sin cierta dificultad a 30°C (Das *et al.* 1994).

En *D. buzzatii*, el ANOVA para la VB reveló una interacción población x temperatura (Tabla 4.2), sugiriendo que la respuesta térmica no fue similar en las diferentes localidades analizadas. Curiosamente, las moscas de mayor altitud presentaron una mayor VB en los tratamientos de temperaturas alternadas que las provenientes de la localidad de menor altitud (Fig. 4.2). Las comparaciones *a posteriori* revelaron que las moscas proveniente de mayores altitudes tenían una mayor VB que las correspondientes a menores altitudes a 30-25°C y 30-9°C (análisis de Tukey:  $p < 0.05$  en ambos casos), y un patrón inverso a 25-25°C.

Finalmente, la contribución del componente línea sobre la varianza mostró patrones diferentes en cada especie. Mientras el componente línea fue significativo en casi todos los tratamientos en *D. melanogaster*, en *D. buzzatii* solo unos pocos tratamientos mostraron valores significativos luego de la corrección realizada para correcciones múltiples según el método de Bonferroni (Fig. 4.3).

## Conclusiones

Un gran número de estudios ha demostrado que existe en algunos organismos una relación entre el tamaño del cuerpo y la latitud que ilustran la conocida regla de Bergmann (James *et al.* 1995; Atkinson & Sibly 1997; Huey *et al.* 2000). Asimismo, se sabe que el tamaño del cuerpo correlaciona con algunos componentes del *fitness* del adulto en muchos organismos en general, y en insectos en particular (Partridge & Fowler 1992; Tylor *et al.* 1998; Bublly & Loeschcke 2005). Sin embargo, también se conoce que tener un mayor tamaño corporal trae aparejado el “costo” de un desarrollo extendido (Hasson *et al.* 1993; Fernandez Iriarte & Hasson 2000; Cortese *et al.* 2002). Esta línea de razonamiento lleva a la predicción de clinas latitudinales (y altitudinales) para el TD, en aquellos casos en que el tamaño corporal se ajusta a la regla de Bergmann. Nuestros resultados acuerdan con esta predicción, al menos en *D. melanogaster* (Capy *et al.* 1993; Imasheva *et al.* 1994; James *et al.* 1995; Gilchrist *et al.* 2000; Hallas *et al.* 2002). Es decir, los patrones de variación observados para el TD en *D. melanogaster* son consistentes con la visión que la evolución del TD y las clinas de tamaño del cuerpo serían el resultado de una interacción compleja entre los caracteres, consistente en un “compromiso” o *trade-off*. Por un lado, el mayor tamaño ofrece una ventaja ya que está positivamente correlacionado con una mayor probabilidad de

supervivencia, fecundidad y éxito en el apareamiento de los machos (Santos et al., 1988; Ruiz et al., 1991; Hasson et al., 1993; Santos et al., 1992). Por otro lado, para alcanzar un mayor tamaño una larva debe alimentarse por más tiempo durante su desarrollo, quedando expuesta durante un mayor tiempo a los riesgos de la predación.

El caso de *D. buzzatii* no es tan simple como el de *D. melanogaster*. Las comparaciones entre pares de poblaciones de altura y llanura ubicadas a latitudes similares (Quilmes-Vipos y Cachi-Güemes), revelaron un patrón consistente y coincidente con la tendencia observada en *D. melanogaster*. Sin embargo, si bien se observó un patrón clinal latitudinal en *D. buzzatii*, la misma fue opuesta al patrón predicho al tomar en consideración estudios previos (Fanara et al. 1997) y en el Capítulo 2 de esta Tesis.

En general, las clinas latitudinales y altitudinales observadas en *D. melanogaster* y la clina altitudinal detectada en *D. buzzatii* son consistentes con la predicción de que en climas fríos el aumento del tamaño corporal estaría acompañado por una prolongación del desarrollo. Del mismo modo, las tendencias observadas en la naturaleza son consistentes con los resultados experimentales que mostraron que las moscas provenientes de poblaciones de mayor altitud y expuestas a menores temperaturas de cría exhibieron valores más altos del TD.

Sin embargo, la clina latitudinal invertida observada en *D. buzzatii* requiere un análisis crítico del muestreo realizado, en la medida en que podría tratarse, simplemente de un artefacto estadístico resultante de las particularidades del grupo de poblaciones incluidas en el estudio. Pese a que la latitud y la altitud no están correlacionadas en el grupo de localidades muestreadas, no es solamente un detalle que las dos poblaciones de mayor altitud (Quilmes y Cachi) estén en extremo norte del área muestreada, un hecho que podría afectar el resultado de las regresiones. No obstante, cabe mencionar que cuando fueron excluidos Quilmes y Cachi del análisis, la clina latitudinal continuó mostrando valores significativos y negativos ( $\beta = -0.5$ ,  $p = 6.10^{-6}$ ).

La regla de Bergmann ha llamado la atención de los biólogos por más de un siglo. Tal como fue adelantado en el Capítulo 2, la misma ha sido explicada mecanicísticamente en endotermos por la idea que los individuos de mayor tamaño tienen menores valores de la relación superficie/volumen, lo cual les permitiría conservar el calor más eficientemente en los climas más fríos, sugiriendo un rol primario del tamaño en relación a la variación en la temperatura ambiental

(Blanckenhorn et al. 2006). Sin embargo, las causas mecanicísticas de la regla de Bergmann en ectotermos requeriría explicaciones alternativas, en la medida en que los organismos de menor tamaño, tal como el caso de los insectos, adoptan de forma casi instantánea las nuevas condiciones térmicas ambientales (Blanckenhorn et al. 2006). En este sentido, también se han observado numerosos casos de la llamada regla inversa de Bergmann en ectotermos, los cuales encontrarían su explicación por la extensión estacional, más que por la temperatura (Blanckenhorn 1997; Mousseau 1997; Chown & Klok 2003; Blanckenhorn & Demont 2004). Siguiendo esta línea de razonamiento, la menor extensión estacional a latitudes mayores podría progresivamente limitar el desarrollo produciendo, en forma indirecta, una disminución del tamaño del cuerpo. Esto nos lleva a pensar que bajo esta hipótesis el blanco primario de la selección sería la tasa de crecimiento más que el tamaño corporal. Sin embargo, en nuestro caso esta explicación no es plausible, en la medida en que los valores menores de TD observados en poblaciones ubicadas a mayor latitud no fueron acompañados por una disminución concomitante del tamaño del cuerpo, como podría esperarse. Por el contrario, los datos presentados en el Capítulo 2 sugieren que el tamaño del cuerpo responde a la regla de Bergmann en *D. buzzatii*. Además, existen evidencias indirectas que apuntan a una relación directa entre el tamaño corporal y la latitud en esta especie. Las poblaciones de *D. buzzatii* son polimórficas para varias ordenaciones del cromosoma 2 determinadas por inversiones “solapantes” que abarcan hasta un tercio de la longitud del cromosoma (Hasson et al. 1995). Se ha demostrado que cada una de estas ordenaciones tiene un efecto específico sobre el tamaño del cuerpo y sobre el tiempo de desarrollo (Hasson et al., 1992; Fernández Iriarte y Hasson, 2000), y que además los ordenamientos cromosómicos que incrementan el tamaño de los portadores covarían positivamente con la latitud, en tanto que los ordenamientos que disminuyen el tamaño muestran la tendencia opuesta (Knibb & Barker 1988; Hasson et al. 1995; Rodríguez et al. 2000)

Respecto a la VB, los patrones observados no son fáciles de explicar acudiendo a escenarios adaptativos. Tanto las clinas latitudinales como las altitudinales presentaron valores significativos aunque con signo opuesto en *D. melanogaster*, mientras que en *D. buzzatii* las tendencias latitudinales y altitudinales mostraron débil apoyo estadístico, o no fueron significativas, respectivamente. Más aún, si se corrigen para comparaciones múltiples, ni siquiera la clina altitudinal sería significativa en *D. buzzatii*.

Estos resultados son sorprendentes en la medida en que el poder estadístico para detectar clinas debería ser mayor en el caso de *D. buzzatii*, en la cual las poblaciones fueron muestreadas en gradientes latitudinales mayores (11 grados) que en *D. melanogaster* (4 grados). Nuevamente, deberíamos preguntarnos si la ausencia de una tendencia latitudinal en supervivencia podría ser una consecuencia de nuestra estrategia de muestreo, máxime frente a la respuesta fuerte diferencial a los regímenes térmicos de las poblaciones de altura y llanura observada en *D. buzzatii* (ver más abajo). En efecto, el hecho que las poblaciones muestreadas estén localizadas a altitudes diferentes introduce un factor que podría perturbar al análisis de regresión de la VB sobre la latitud.

En resumen, los patrones de variación en supervivencia sugieren que la autóctona *D. buzzatii* y la cosmopolita *D. melanogaster* responden diferencialmente a los desafíos ambientales impuestos por las variables que covarían con la latitud y/o la altitud. Más aún, estos resultados son consistentes con las respuestas propias de ambas especies a los regímenes térmicos a los cuales las moscas fueron expuestas (ver más adelante).

Una condición necesaria para que las clinas sean consideradas como una respuesta adaptativa del acervo génico de una población es que la variación del carácter debe ser heredable. En este sentido, la evidencia disponible sugiere que la variación del TD y la VB tienen una base genética tanto en *D. melanogaster* (Van Delden & Kamping 1991; Prasad *et al.* 2000) como en *D. buzzatii* (Rodríguez *et al.* 1999; Fernandez Iriarte & Hasson 2000; Fanara *et al.* 2006).

En general, las clinas latitudinales y/o altitudinales han sido explicadas como una respuesta adaptativa a la variación de la temperatura. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la temperatura media proveería sólo una explicación parcial de las clinas. En este trabajo hemos investigado el posible rol de la amplitud térmica como determinante de las tendencias observadas en la naturaleza evaluando los efectos de varios regímenes térmicos en los cuales la temperatura fue mantenida constante o alternada. Para esos experimentos se han elegido dos pares de poblaciones que viven a altitudes contrastantes (una para cada especie). La lógica de esta elección está justificada por el hecho que las diferencias en la amplitud térmica entre las localidades de diferentes altitudes son considerablemente mayores que la existente entre los extremos poblacionales de los gradientes latitudinales.

Curiosamente, los experimentos revelaron importantes diferencias entre especies en la respuesta a los regímenes térmicos. En general, las poblaciones de la especie cosmopolita *D. melanogaster* respondieron de modo similar a los diferentes tratamientos térmicos para la VB y el TD. Por el contrario, en el caso de la especialista *D. buzzatii* las poblaciones de diferente altitud respondieron diferencialmente a los tratamientos de temperaturas constantes y alternadas. Por un lado, las diferencias de TD observadas entre poblaciones y entre tratamientos térmicos fueron similares, sugiriendo un mayor efecto de la media térmica que de la amplitud térmica. En contraste, las diferencias entre especies fueron evidentes cuando las respuestas a los tratamientos térmicos fueron evaluadas en términos de supervivencia. Por un lado, las moscas provenientes de las localidades de mayor altitud fueron más viables que las de llanura en *D. melanogaster*. Sin embargo, la magnitud de las diferencias entre poblaciones no varió entre tratamientos térmicos, tal como lo sugiere la interacción población x tratamiento térmico no significativa.

Por otro lado, en *D. buzzatii* las diferencias en la VB entre las poblaciones de diferente altitud fueron claramente dependientes del tipo de tratamiento térmico (temperaturas constantes vs. alternadas). Las moscas de altura fueron más viables que las de llanura en tratamientos de temperaturas alternadas, mientras que la tendencia fue la contraria en tratamientos de temperaturas constantes. Estas observaciones confirman que *D. buzzatii*, habitante de regiones áridas y semiáridas, parecería presentar adaptaciones que incrementan las probabilidades de supervivencia bajo las condiciones impuestas por las fluctuaciones térmicas en los ambientes de altura, respecto a aquellas habitantes de ambientes de llanura. Estas respuestas ecológicamente relevantes a los regímenes térmicos sugieren que las fluctuaciones térmicas serían un importante factor selectivo en poblaciones naturales de *D. buzzatii*.

Esta interpretación se ve reforzada por las estimaciones de la contribución relativa del componente genético a la varianza fenotípica total en VB en las poblaciones de cada una de las especies. En efecto, las estimaciones del componente genético en VB fueron consistentemente menores en *D. buzzatii* que en *D. melanogaster* (Tabla 4.3). La teoría de la selección natural propuesta por Fisher en 1930 establece que en caracteres que afectan directamente el *fitness* (tal como la supervivencia), la varianza genética aditiva es eliminada por las presiones selectivas direccionales, mientras que en los caracteres que afectan más indirectamente al *fitness* los valores de heredabilidad deberían ser mayores (Mousseau & Roff 1987; Roff & Mousseau 1987). Estas

predicciones se han verificado para la VB y el TD en *D. buzzatii*. Sin embargo, es interesante notar que las poblaciones de diferente altitud respondieron diferencialmente a los tratamientos térmicos, sugiriendo que la respuesta a la variación térmica en la naturaleza ha llevado a la fijación de alelos alternativos en las poblaciones. Por lo tanto, las respuestas diferenciales de las poblaciones de diferente altitud son respuestas plásticas de los diferentes genotipos.

En este sentido, los resultados concuerdan con estudios previos en *D. buzzatii* que muestran una respuesta plástica de la VB y el TD a los cactus de cría, a la vez que una significativa diferenciación entre poblaciones (Hasson *et al.* 1995; Rodríguez *et al.* 2000; Fanara *et al.* 2006). Patrones similares de estructura poblacional han sido detectados para el polimorfismo de inversión utilizando marcadores moleculares (Gómez & Hasson 2003; Piccinali *et al.* 2004; Piccinali *et al.* 2007). Si se acepta, como lo sugieren los patrones de variación molecular, que *D. buzzatii* ha pasado por una reciente expansión poblacional (Piccinali *et al.* 2004), nuestros resultados acuerdan con la hipótesis de fuertes presiones selectivas que han actuado sobre los caracteres de historia de vida a través de la larga historia de adaptación a condiciones áridas y semiáridas.

Finalmente, es interesante marcar que tanto los patrones de respuestas a tratamientos térmicos así como de los componentes genéticos asociados a la VB observados en *D. melanogaster*, difirieron fuertemente de los registrados en *D. buzzatii*. Sin embargo, estas diferencias pueden ser explicadas por la historia reciente de estas especies en Sud América y la dinámica poblacional en las localidades muestreadas. En efecto, las moscas colectadas en Uspallata y Lavalle han mostrado que su presencia está íntimamente ligada a la disponibilidad de diferentes tipos de frutales a lo largo del año. No obstante, las poblaciones en áreas caracterizadas por un fuerte grado de estacionalidad tal como el caso de Uspallata, podrían reestablecerse anualmente a partir de refugios o bien por transporte pasivo junto a productos agrícolas. Si esto es verdadero, las moscas deberían poder sobrevivir el invierno y para esto contar con mecanismos fisiológicos tales como la diapausa, que lo faciliten. En este contexto, es interesante notar los resultados de un estudio reciente en *D. melanogaster* que demostró una correlación entre la incidencia de diapausa y la latitud (Schmidt *et al.* 2005), sugiriendo una posible relación entre la incidencia de diapausa y la altitud.

Para concluir, se indica que el presente capítulo muestra respuestas idiosincrásicas para cada especie, sugiriendo que estos análisis de adaptación térmica



debieran considerar más de una especie en su indagación. A la vez, se propone la incorporación de la amplitud térmica como un aspecto central de la temperatura como factor selectivo.

## Capítulo 5. Efecto estado-dependiente de la temperatura en caracteres de historia de vida en ontogenia en el ciclo de vida de especies de *Drosophila*

### Resumen

**Preguntas:** Algunos autores han propuesto que los efectos de la temperatura son isomórficos entre estadios del ciclo de vida, es decir, son similares a lo largo del desarrollo de un organismo holometábolo. Por ello se interroga:

i-¿Es constante la tasa de desarrollo a lo largo del ciclo de vida entre diferentes poblaciones, especies y tratamientos térmicos?

ii-¿La amplitud térmica debe ser considerada un factor de *stress* para los diferentes estadios del desarrollo de un holometábolo?

**Métodos:** Se recolectaron moscas de pares poblacionales de altitudes contrastantes de *D. buzzatii* y *D. melanogaster*. Individuos de ambas especies se sometieron a diferentes tratamientos térmicos que consistieron en regímenes de temperatura constante y alternada. Se registraron los valores medios del tiempo que cada individuo pasa en cada estadio del ciclo de vida y la proporción de sobrevivientes en el estadio larval y el estadio pupal.

**Resultados:** Se observaron diferencias entre especies y entre estadios del ciclo de vida tanto en el tiempo de desarrollo como en la viabilidad. En términos generales, el tiempo de desarrollo se alargó cuando los organismos se criaron a temperaturas menores. Sin embargo, la velocidad de desarrollo de ambos estadios fue diferente para ambas especies. Del mismo modo, la mortalidad de los diferentes estadios fue diferente, registrándose los mayores valores de mortalidad durante el estadio larval en *D. buzzatii*. En oposición, en *D. melanogaster* los diferentes estadios presentaron en general patrones equivalentes de mortalidad a lo largo del ciclo de vida.

**Conclusiones:** Los datos parecen contradecir la noción de una velocidad del desarrollo constante a través del ciclo de vida para diferentes temperaturas. Asimismo, la amplitud

térmica tiene efectos diferentes e importantes sobre el tiempo de desarrollo y la viabilidad en los diferentes estadios del ciclo de vida.

## Introducción

La discusión acerca del rol ecológico y evolutivo de la metamorfosis ha sido un interrogante que ha ocupado un espacio importante en la bibliografía de la biología. Entre otras razones, el interés parece haber radicado en los cambios profundos que sufren los organismos en períodos muy breves de tiempo. Es que, de hecho, entre otras alteraciones, este fenómeno implica profundas modificaciones tanto comportamentales así como respecto a los caracteres de historia de vida. Ecológica y evolutivamente la metamorfosis ha sido propuesta como una estrategia para evitar la competencia entre organismos de una misma especie en diferentes estadios (Truman & Riddiford 1999). A su vez, la discontinuidad en los patrones de expresión de genes a través de los estadios de desarrollo de los organismos junto a las alteraciones que sufren los “ambientes genéticos”, consolidan a este fenómeno como un excelente campo en el que es posible desarrollar preguntas de corte genético, ecológico y evolutivo (Dahlgard & Loeschke 1997).

Las alteraciones del ambiente durante el desarrollo del organismo han ido conduciendo evolutivamente a la consolidación de estrategias de control interno a los fines de desarrollarse exitosamente. Sin embargo, los efectos de estos cambios ambientales no tienen por qué *a priori*, producir efectos similares y/o "gatillar" respuestas semejantes en los organismos que atraviesan estadios marcadamente diferentes, tal como con los insectos holometábolos. En particular, algunos autores han sugerido que el ambiente puede inducir respuestas “asimétricas” en las diferentes etapas del ciclo de vida de insectos holometábolos a nivel de características biológicas tales como el tiempo de desarrollo, la resistencia a *shocks* térmicos y la viabilidad (Bonner & Horn 1982; Partridge *et al.* 1994; Krebs & Loeschke 1999; Prasad *et al.* 2001). Sin embargo, la aproximación a este fenómeno de “asimetría” se encuentra en etapas aún muy incipientes de investigación. Por ejemplo, los mecanismos que dan origen a estos patrones están aún pobremente entendidos (Peters 1983; Van Voorhies 1996; Angilletta & Dunham 2003). De hecho, siquiera resulta trivial la pregunta sobre si dichas diferencias son parte de verdaderas estrategias evolutivamente seleccionadas, o si dados los diferentes ambientes internos y externos de los organismos, se tratan más bien de consecuencias no necesariamente adaptativas sobre el estado fisiológico de un organismo durante su desarrollo (Stillwell & Fox 2005).

En particular, una de las características de los organismos que permiten abordar este tipo de pregunta es la velocidad del desarrollo para cada etapa del ciclo (tasa de desarrollo) bajo diferentes temperaturas (Jarosik *et al.* 2002; Jarosik *et al.* 2004). La tasa a la que se desarrolla un organismo puede ser estudiada a través del análisis de una variable denominada tiempo de desarrollo (ya presentada en el Capítulo 4). En general, se ha observado que esta variable presenta magnitudes inversamente relacionadas con la temperatura de cría (Prasad *et al.* 2000; Jarosik *et al.* 2002; Jarosik *et al.* 2004).

De hecho, el tiempo de desarrollo (TD) ha sido considerada una variable asociada al *fitness* de los organismos, en las que las estrategias "gatilladas" están directamente relacionadas con el ambiente en el que se desarrollan los organismos (Davis & Hardy 1994). Quizás por ello, se han despertado importantes disputas respecto al modo en que las diferentes condiciones ambientales afectan a cada uno de los estadios a lo largo del desarrollo. En general, una amplia evidencia muestra que el TD se alarga cuando la temperaturas de cría son menores (Partridge *et al.* 1994; Gibert & De Jong 2001; Pétaavy *et al.* 2001a; Angiletta *et al.* 2002). Sin embargo, no existe acuerdo acerca de la magnitud en la cual el TD se ve afectado a través de la ontogenia. Una de las posiciones planteadas al respecto es que existe una verdadera isometría (similares respuestas a los cambios ambientales) en cuanto a los efectos de la temperatura de cría para cada uno de los diferentes estadios (Gillooly *et al.* 2002; Jarosik *et al.* 2002; Jarosik *et al.* 2004). De ser cierto este modelo se espera que los tiempos relativos que el organismo "pasa" en cada estadio sean constantes a través del ciclo de vida. En oposición, grupos de investigación han propuesto la denominada teoría de la "historia de vida dependiente del estadio". En este caso, diferentes investigaciones han enfatizado que los estadios del desarrollo pueden variar considerablemente en términos de su sensibilidad a los cambios en el ambiente térmico de cría (McNamara & Houston 1996; Rombough 2003). De este modo, los diferentes estadios imponen tipos de "decisiones" alternativas en relación a la historia de vida. Estas "decisiones" son vistas como esquemas de "reglas" con base genética que especifican cómo un actor individual debería responder en función de los ambientes internos y externos que enfrenta. Tal como puede verse, la decisión estado-dependiente podría servir como un modelo conceptual para caracterizar diferentes "mecanismos de crecimiento" (Gotthard *et al.* 2000; Gotthard 2001). En este caso, las predicciones conllevan a la negación de grandes regularidades, en la medida en que los ambientes (tanto internos como

externos) presentan importantes diferencias tanto entre organismos como entre diferentes momentos a lo largo de la vida de un mismo organismo.

Tal como hemos adelantado, los ambientes externos con los que se ha experimentado para poder responder a estos interrogantes, han consistido en todos los casos de regímenes térmicos con predominio en temperaturas constantes (Partridge *et al.* 1994; Imasheva *et al.* 1997; Gillooly *et al.* 2002; Jarosik *et al.* 2004). Esto ha significado un sesgo experimental –ya indicado en los capítulos anteriores– ya que en la mayoría de los estudios comparan las respuestas de organismos sometidos a tratamientos térmicos que diferían solamente en su valor medio, y que mantenían la temperatura en valores constantes durante todo el experimento (Economos & Lints 1986; Knibb & Barker 1988; Loeschcke *et al.* 1994; Al-Saffar *et al.* 1996; Loeschcke *et al.* 1997; Pétavy *et al.* 2001a). Por ello, la incorporación de ambientes en los que la temperatura fluctúa, brinda la posibilidad de interrogar acerca de las diferentes “sensibilidades” y estrategias que las especies han desarrollado en los estadios, a la vez que pueden analizarse las respuestas de los diferentes estadios sometidos a tratamientos considerados de *stress*.

Algunos antecedentes sobre estudios de caracteres asociados al *fitness*, han mostrado un aparente desacople entre las respuestas de los diferentes estadios, tal como en el caso de la denominada tolerancia al *shock* térmico (Krebs & Loeschcke 1995; Krebs & Loeschcke 1996; Dahlgaard & Loeschcke 1997).

Los insectos holometábolos son, en este sentido, modelos ejemplares para investigar si durante las fases por las que pasan estos organismos a lo largo de su vida existen respuestas diferenciales a un mismo desafío ambiental. Es evidente que no sería sorprendente encontrar que las respuestas de las fases larvaria, pupal y de adulto a una misma variable ambiental pudieran ser diferentes. Los desafíos que enfrentan y las características diferentes que tienen la larva, la pupa y el imago hacen pensar en respuestas idiosincrásicas de cada fase. Un ejemplo de ello es el caso del tiempo de desarrollo. Un individuo debe transitar rápidamente las fases larvales debido a que puede “correr el riesgo” de quedarse sin alimento ya que los recursos tróficos son efímeros, y las larvas no tienen la capacidad de escapar hacia otro parche ambiental adecuado. En tanto, un adulto tiene una capacidad dispersiva mucho mayor que podría permitirle escapar de una situación de *stress*. En este sentido, el análisis de caracteres asociados al *fitness* tales como la duración de cada estadio y la supervivencia en cada etapa del ciclo, podría arrojar luz a este interrogante de evidente complejidad.

En este contexto, *Drosophila* es un excelente modelo para investigar algunas de las preguntas relacionadas a la adaptación térmica de organismos holometábolos. En este capítulo, se analizaron dos especies del género *Drosophila*: *D. buzzatii* y *D. melanogaster*. A su vez, de cada especie se incluyeron dos poblaciones: una colectada en localidades de altura y otra de llanura con el fin de comparar entre especies y entre poblaciones (dentro de especies). Se analizaron las respuestas adaptativas, en términos del TD y la VB, en las diferentes fases del ciclo de vida larvas y pupas a diferentes regímenes térmicos. Las moscas se sometieron a 7 tratamientos térmicos, 3 de temperatura constante y 4 de temperaturas alternadas, con el fin de estudiar los efectos de la temperatura media y de la amplitud térmica sobre los caracteres mencionados a lo largo de la ontogenia. El objetivo de estos experimentos fue investigar los efectos de la temperatura sobre los patrones de variación del tiempo de desarrollo y la viabilidad en los estadios larvales y pupales de individuos provenientes de pares de localidades que se encuentran a similar latitud pero a altitudes contrastantes.

En particular, en esta investigación nos propusimos responder las siguientes preguntas:

i- ¿Es constante la tasa de desarrollo en diferentes poblaciones, especies y al ser sometidas las moscas a diferentes tratamientos térmicos?

ii- ¿Debe ser considerada la amplitud térmica un factor de *stress*? ¿La amplitud térmica afecta de manera similar a los diferentes estadios del ciclo de vida en *Drosophila*?

## **Materiales y métodos**

### **Poblaciones experimentales**

Dos poblaciones naturales de *D. buzzatii* (798 metros sobre el nivel del mar (m. s. n. m.), lat. 26° 28' S; 1855 m.s.n.m., lat. 26° 27' S) y dos de *D. melanogaster* (647 m.s.n.m., lat. 32° 50' S; 1915 m.s.n.m., lat. 32° 35' S) se muestrearon en el noroeste (Febrero 2003) y en el oeste (Febrero 2004) de Argentina, respectivamente.

La recolección de individuos, la fundación de líneas, el mantenimiento de las mismas en el laboratorio y la “siembra” de larvas en los tubos con medio instantáneo, fueron realizados siguiendo el protocolo detallado en el Capítulo 2.

Cuatro tubos (réplicas) de cada línea fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los 7 tratamientos térmicos a los cuales las moscas fueron expuestas durante su desarrollo, es decir desde la siembra de las larvas hasta la eclosión de todos los adultos. En tres de los tratamientos los tubos fueron incubados a 17°C, 25°C o 30°C desde la siembra hasta la emergencia de los adultos, mientras que en los restantes cuatro tratamientos térmicos la temperatura varió entre el día y la noche: 25-9°C, 30-9°C, 25-17°C y 30-25°C, en todos los casos se presenta en primer lugar la temperatura diurna. En todos los casos, las temperaturas fueron elegidas dentro del rango térmico que ambas especies enfrentan en la naturaleza (Cohet *et al.* 1980; Imasheva *et al.* 1997; David *et al.* 1998).

### **Caracteres de historia de vida medidos**

Para cada tubo se registraron dos variables: el tiempo de desarrollo y la viabilidad. El primero se estimó midiendo el tiempo comprendido entre el momento en que las larvas de primer estadio fueron sembradas en el medio de cultivo, hasta el momento de inicio del estadio pupal, definido como el momento en el cual las larvas de tercer estadio dejan de moverse y extienden los espiráculos anteriores. Nos referiremos a esta variable como el tiempo de desarrollo larval (TDL). En segundo lugar, se midió la duración del estadio pupal (referido como el tiempo de desarrollo pupal, TDP), como el tiempo comprendido entre el inicio de este estadio y la emergencia del adulto. En cada tubo se midió además, la proporción de individuos que alcanzaron el estadio pupal relativo a la cantidad de larvas que se sembraron en cada tubo y el número de individuos que lograron superar el estadio pupal y alcanzar el estadio reproductivo. Estas variables se denominaron viabilidad larval (VL) y viabilidad pupal (VP), respectivamente.

### **Análisis de datos**

Se utilizaron ANOVAs de dos factores para analizar las fuentes de variación que afectan TDL, TDP, VL y el VP. El modelo utilizado fue el siguiente:

$$y = \mu + P + T + P \times T + \varepsilon,$$



en donde  $\mu$  es la media total del carácter, P y T representan los factores población y tratamiento (fijos) respectivamente, y  $\varepsilon$  el error. En estos ANOVAs la unidad experimental fue la línea, promediando todas las replicas dentro de cada línea. Este procedimiento hace que nuestro ANOVA sea una prueba conservativa en la medida en que el efecto de réplica queda sumido en el término de error.

Asimismo, se registraron para cada tubo los índices TDL/TDP y VL/VP para investigar si las fuentes principales de variación (población y tratamiento térmico) afectaron diferencialmente la duración y/o supervivencia en cada estadio. Los patrones de variación de estos índices se analizaron mediante ANOVAs similares a los realizados para las variables individuales.

Los tubos que fueron sometidos a los tratamientos de 30°C de ambas especies y los de *D. melanogaster* sometidos al tratamiento de temperaturas alternadas 30-25°C, fueron excluidos del análisis estadístico debido a que el número de larvas que alcanzaron el estadio pupal fue excesivamente bajo.

Además, se hicieron ANOVAs para cada combinación población x temperatura, considerando a las líneas como la única fuente de variación. De acuerdo a nuestro diseño experimental –basado en la técnica de la isolínea (*isofemale line technique*)– las diferencias entre líneas pueden ser consideradas como un estimador de la contribución relativa del componente genético a la varianza fenotípica total (David *et al.* 2005). En estos ANOVAs las unidades experimentales fueron las réplicas.

En los casos en que fue necesario, se realizaron comparaciones *post hoc* usando el método Tukey. Previo a todos los análisis estadísticos, los datos del tiempo de desarrollo y la viabilidad se normalizaron usando las transformaciones logarítmica y angular [ $\arcsin(\pi)^{1/2}$ , donde  $\pi$  es el porcentaje de la supervivencia], respectivamente (Freeman & Tukey 1950). La homogeneidad de varianza fue verificada utilizando el *test* de Levene. En todos los análisis estadísticos se ha utilizado el paquete Statistica para Windows (6.0).

## Resultados

### Tiempo de desarrollo

El TDL exhibió un importante rango de variación tanto entre poblaciones como entre tratamientos térmicos en las dos especies analizadas. En *D. buzzatii*, los valores mínimos y máximos de TDLs fueron registrados en la población de llanura criada a 30°C (189.0 hs.) y en la de altura criada a 25-09°C (338.1 hs.), respectivamente. En el caso de *D. melanogaster* el TDL varió desde 118.9 hs. en moscas de llanura criadas a 25°C, hasta 204.9 hs. en individuos de altura criados a 17°C.

Los ANOVAs realizados para TDL revelaron que las diferencias entre las localidades no fueron significativas en *D. melanogaster*, mientras que las moscas de llanura se desarrollaron de manera significativamente más rápida que las de altura en *D. buzzatii* (Tabla 5.1). La interacción población (P) x tratamiento térmico (T) no fue significativa ni en *D. buzzatii* ni en *D. melanogaster* (Tabla 5.1), sugiriendo que los tratamientos térmicos afectaron de manera similar a las moscas de ambas poblaciones en ambas especies. Las diferencias en la duración del estadio larval entre los tratamientos térmicos fueron significativas en ambas especies (Tabla 5.1). Aunque ambas especies exhibieron patrones especie-específicos en sus respuestas a la variación térmica (Figura 5.1 A y 5.1 B), encontramos algunos elementos coincidentes. Uno de los más claros es que en ambas especies las moscas criadas a mayor temperatura media se desarrollaron más rápidamente que aquellas criadas a menor temperatura. Sin embargo, hay también algunas diferencias importantes entre ambas especies. Una de ellas radicó en que las respuestas cuando las moscas se sometieron a tratamientos con similar temperatura media y diferente amplitud (17°C y 25-9°C) fueron diferentes. En *D. melanogaster* las diferencias no fueron significativas, mientras que en *D. buzzatii* las criadas a 25-9°C se desarrollaron más lentamente que a 17°C (análisis de Tukey:  $p < 0.05$ , Fig. 5.1 A y 5.1 B).

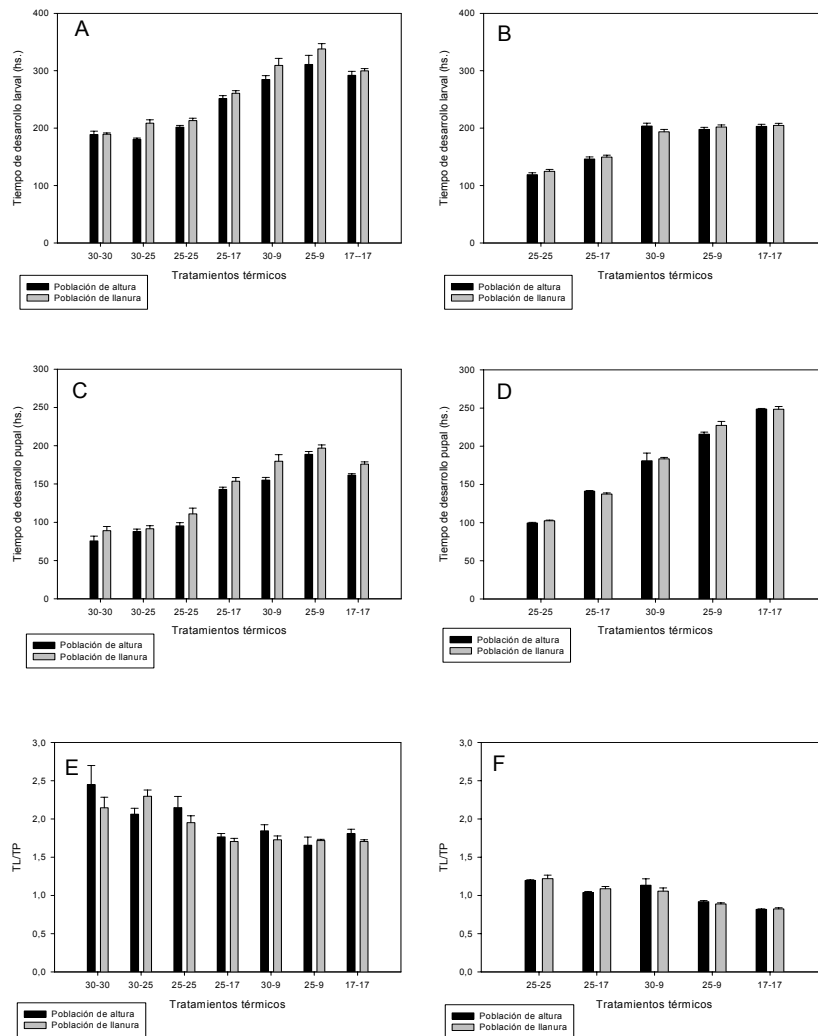
	TDL				TDP				TDL/TDP			
	g.l.	SC	F	p	g.l.	SC	F	p	g.l.	SC	F	p
<i>D. buzzatii</i>												
<b>Población (P)</b>	1	0.07	17.4	$9.6 \cdot 10^{-5}$	1	0.17	22.2	$1.5 \cdot 10^{-5}$	1	0.09	2.26	0.14
<b>Temperatura (T)</b>	6	3.08	123.8	$8.1 \cdot 10^{-9}$	6	6.82	145.9	$3.2 \cdot 10^{-7}$	6	3.26	14.30	$1.1 \cdot 10^{-9}$
<b>P x T</b>	6	0.03	1.3	0.26	6	0.04	0.9	0.52	6	0.43	1.89	0.09
<b>Error</b>	63	0.26			61	0.48			61	2.31		
<i>D. melanogaster</i>												
<b>Población (P)</b>	1	$1.10^{-3}$	0.3	0.56	1	0.01	0.8	0.38	1	$6.9 \cdot 10^{-3}$	1.27	0.27
<b>Temperatura (T)</b>	4	2.45	229.9	$2.3 \cdot 10^{-12}$	4	6.29	138.6	$2.6 \cdot 10^{-7}$	4	1.35	61.12	$5.6 \cdot 10^{-12}$
<b>P x T</b>	4	0.01	1.0	0.42	4	0.08	1.7	0.17	4	0.03	1.39	0.25
<b>Error</b>	45	0.12			47	0.53			45	0.25		

**Tabla 5.1.** Resumen de los ANOVAs para tiempo de desarrollo larval (TDL), pupal (TDP) y el índice de tiempo de desarrollo (TDL/TDP) en *D. buzzatii* y *D. melanogaster*. Referencias: g.l.: grados de libertad. SC: suma de cuadrados.

	VL				VP				VL/VP			
	g.l.	SC	F	p	g.l.	SC	F	p	g.l.	SC	F	p
<i>D. buzzatii</i>												
<b>Población (P)</b>	1	0.16	4.59	$3.6 \cdot 10^{-2}$	1	$1.24 \cdot 10^{-3}$	0.02	0.88	1	0.011	11.31	$1.4 \cdot 10^{-3}$
<b>Temperatura (T)</b>	6	1.86	8.85	$4.2 \cdot 10^{-4}$	6	0.941	3.05	0.01	5	0.599	6.71	$5.6 \cdot 10^{-5}$
<b>P x T</b>	6	0.24	1.14	0.35	6	0.25	0.79	0.58	5	0.091	1.02	0.41
<b>Error</b>	67	2.35			59	3.04			57	0.089		
<i>D. melanogaster</i>												
<b>Población (P)</b>	1	0.01	0.011	0.92	1	0.53	14.51	$4.26 \cdot 10^{-4}$	1	1.54813	4.12	$4.8 \cdot 10^{-2}$
<b>Temperatura (T)</b>	6	16.12	4.14	$1.3 \cdot 10^{-3}$	4	2.09	14.32	$8.3 \cdot 10^{-7}$	4	2.27258	1.51	0.22
<b>P x T</b>	6	0.44	0.11	0.99	4	0.65	4.53	$4.01 \cdot 10^{-4}$	4	3.04627	2.02	0.11
<b>Error</b>	45	0.12			47	0.53			45	16.92502		

**Tabla 5.2.** Resumen de los ANOVAs para viabilidad larval (VL), pupal (VP) y el índice de viabilidad (VL/VP) en *D. buzzatii* y *D. melanogaster*. Referencias: g.l.: grados de libertad. SC: suma de cuadrados.

La duración del estadio pupal (TDP) varió en *D. buzzatii* desde 75.7 hs. en la población de llanura criada a 30°C hasta 196.9 hs. en la población de altura criada a 25-09°C. En *D. melanogaster*, el TDP varió desde 99.4 hs. hasta 248.6 hs. en las moscas de menor altitud expuestas a 25°C y 17°C, respectivamente. Los ANOVAs revelaron patrones similares a los obtenidos para TDL. Las diferencias entre las poblaciones en *D. melanogaster* no fueron significativas, en tanto que la duración del estadio pupal fue menor en la población de llanura que la de altura en *D. buzzatii*. Del mismo modo que para TDL, los ANOVAs para TDP mostraron que las diferencias entre moscas expuestas a diferentes regímenes térmicos fueron significativas en ambas especies (Tabla 5.1). En general, se observó una relación inversa entre el tiempo pupal y la temperaturas media (Figura 5.1 C y 5.1 D). Sin embargo, los patrones de variación en respuesta a los diferentes tratamientos térmicos difirieron entre las especies en algunos aspectos. Curiosamente, en *D. buzzatii* el TDP en tubos expuestos a 17°C fue más corto que los expuestos a 25-09°C (media térmica equivalente y diferente amplitud térmica), mientras que en el caso de *D. melanogaster* el patrón observado fue exactamente el opuesto (análisis de Tukey  $p < 0.05$ , Fig. 2 A y B). Estos resultados sugieren, en principio, que los patrones de respuesta a los tratamientos térmicos fueron especie-específicos también para TDP.



**Figura 5.1.** Valores medios del TDL y el TDP (ambos en hs.) y del índice de desarrollo en poblaciones de altura y llanura de *Drosophila buzzatii* (A, C y E, respectivamente) y *D. melanogaster* (B, D y F, respectivamente) en siete tratamientos térmicos. Los tratamientos térmicos de 30-30°C y de 30-25°C no pudieron ser analizados en *D. melanogaster* debido a los elevados valores registrados de mortalidad en ambos casos.

Uno de los objetivos de este estudio fue determinar si la duración de los estadios larvales y pupales se verían afectados diferencialmente por los regímenes térmicos a los cuales las moscas fueron expuestas durante su desarrollo. A estos fines, calculamos el índice TDL/TDP (índice de tiempo de desarrollo) y analizamos sus patrones de variación a los fines de establecer si los factores principales de nuestros ANOVAs afectaron diferencialmente la duración de los estadios larval y pupal en cada especie, población y tratamientos térmicos. El índice de tiempo de desarrollo mostró importantes

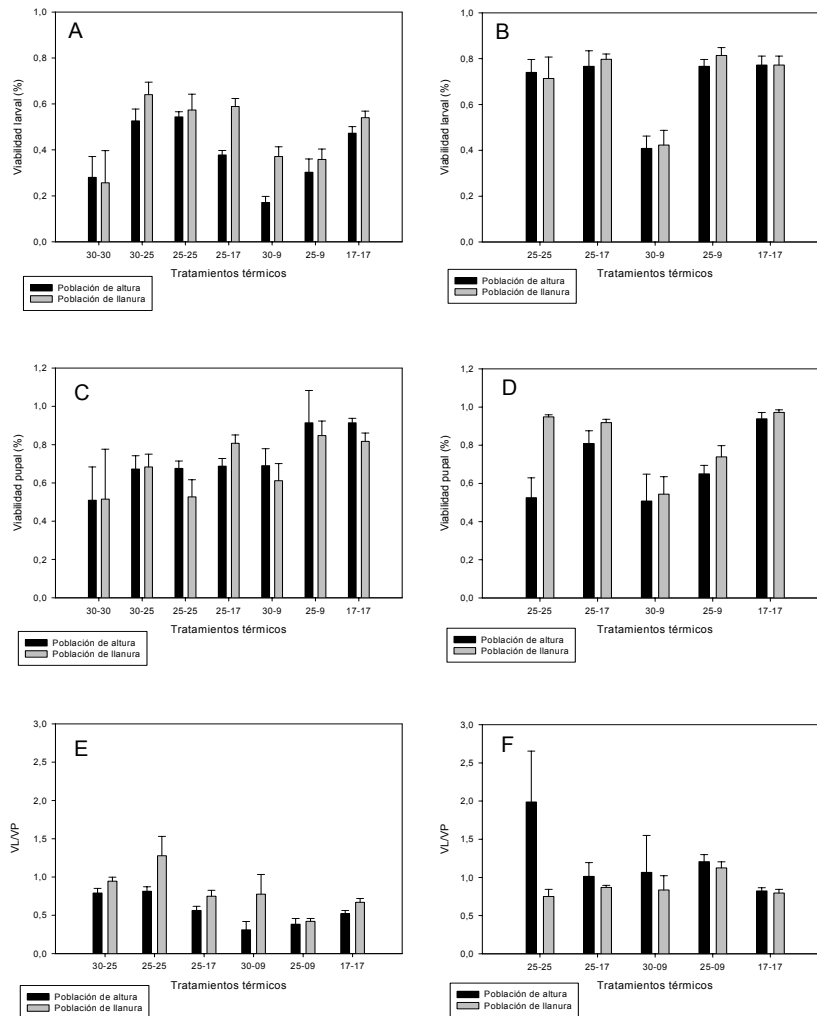
variaciones tanto entre especies como entre individuos criados a diferentes tratamientos térmicos. Mientras que en el caso de *D. buzzatii* el valor promedio del índice presentó valores cercanos a 2, mostrando que las moscas pasan el doble de tiempo en la fase de larva que en la de pupa (Fig. 5.1 E), en el caso de *D. melanogaster* el índice presentó valores cercanos a 1 que indican una duración similar de ambas fases (Fig. 5.1 F). En *D. buzzatii* el índice varió entre 1.7 y 2.4 en las moscas de llanura expuestas a 30°C y 25-09°C, respectivamente, mientras que en *D. melanogaster* el índice de tiempo de desarrollo varió entre 0.8 en los individuos de ambas poblaciones expuestos a 17°C hasta 1.2 en las moscas de la población de altura criadas a 25°C. Los ANOVAs mostraron que tanto las diferencias interpoblacionales como la interacción población x temperatura, no fueron significativos en *D. buzzatii* ni en *D. melanogaster*, sugiriendo que los tratamientos térmicos no afectaron diferencialmente la duración relativa de ambas variables del tiempo de desarrollo en las moscas derivadas de las poblaciones de diferente altitud. En general los valores del índice del TD fueron mayores en las moscas criadas a mayor temperatura media, independientemente de las especies. Sin embargo, volvimos a ver que existen importantes diferencias entre los patrones específicos. En el caso de *D. buzzatii*, los individuos expuestos a los tratamientos con mayor temperatura media (30°C, 30-25°C y 25°C) mostraron mayores valores medios del índice al compararlos con las moscas expuestas a los tratamientos de menor temperatura media (análisis de Tukey:  $p < 0.05$ ). Una tendencia equivalente fue observada en *D. melanogaster*, dado que en los tratamientos de menor media (17°C y 25-9°C), los valores del índice de TD presentaron valores menores en comparación a los registrados en el resto de los tratamientos térmicos (prueba de Tukey:  $p < 0.005$ , Fig. 5.1 F).

### **Viabilidad larval y pupal**

Los valores mínimos y máximos de la viabilidad larval (VL) en *D. buzzatii* fueron registrados en los individuos provenientes de la población de menor altitud expuestos a 30-09°C y en moscas criadas a 25-17°C, respectivamente. En *D. melanogaster*, la VL mostró una gran varianza entre tratamientos: desde un mínimo de casi 0% en los individuos de ambas localidades sometidos a los tratamientos de 30-30°C y 30-25°C, hasta un máximo de 81% en las moscas provenientes de la población de altura a 25-09°C.

Los ANOVAs revelaron que tanto las diferencias interpoblacionales así como entre tratamientos fueron significativas en *D. buzzatii* (Tabla 5.2), mostrando que las moscas de altura presentaron en promedio una mayor VL que la población de menor altitud, en todos los tratamientos térmicos analizados. Las comparaciones *a posteriori* entre tratamientos mostraron que las moscas criadas a mayor temperatura media (30-30°C, 30-9°C y 25-9°C) fueron menos viables que en tratamientos de menor media (análisis de Tukey:  $p < 0.05$ , Fig. 5.2 A).

Respecto a *D. melanogaster*, los ANOVAs revelaron que las diferencias en VL fueron significativas entre tratamientos térmicos. En particular, las moscas expuestas a 30°C (sea tanto en el régimen constante así como en los dos de temperaturas alternadas) mostraron valores muy elevados de mortalidad. Sin embargo, y sorpresivamente, las diferencias en VL entre tratamientos térmicos (excluyendo los tubos sometidos a 30°C, ya sea de manera constante o en algún tratamiento de temperatura alternada) no fueron significativos (Fig. 5.2 B).



**Figura 5.2.** Valores medios de viabilidad larval (VL) y viabilidad pupal (VP) (ambos en hs.) y del índice de viabilidad en poblaciones de altura y llanura de *Drosophila buzzatii* (A, C y E, respectivamente) y *D. melanogaster* (B, D y F, respectivamente) en siete tratamientos térmicos. Los tratamientos térmicos de 30-30°C y de 30-25°C no pudieron ser analizados en *D. melanogaster* debido a los elevados valores registrados de mortalidad en ambos casos.

Los valores de la viabilidad pupal (VP) en *D. buzzatii* variaron entre 51% a 30°C en moscas de llanura y 91% en moscas de la misma población pero sometidas a 17°C y 25-09°C, (Fig. 5.2 C). En *D. melanogaster*, la VP varió desde 51% a 30-09°C en moscas de llanura hasta 97% en moscas de altura criadas a 17°C. En el ANOVA, sólo el efecto del tratamiento térmico fue significativo en *D. buzzatii* (Tabla 5.2). Las comparaciones *a posteriori* entre tratamientos térmicos revelaron que las únicas diferencias



significativas fueron observadas entre los tratamientos 17-17°C y 25-25°C (análisis de Tukey  $p < 0.05$ ).

En cambio, los ANOVAs para VP en *D. melanogaster* presentaron una interacción población x tratamiento significativa, sugiriendo que los efectos de la temperatura no fueron independientes de la población analizada. Sin embargo, las comparaciones *a posteriori* solo revelaron diferencias interpoblacionales a 25°C.

Por último, los ANOVAs realizados para investigar las fuentes de variación del índice VL/VP en cada especie se presentan en la Tabla 5.2. Los valores de VL/VP mostraron diferencias significativas entre tratamientos térmicos y entre poblaciones de *D. buzzatii* (Tabla 5.2, Fig. 5.2 E). En promedio, las moscas de altura exhibieron magnitudes del índice mayores que la de llanura (Fig. 5.1 E). En cambio, únicamente el factor poblacional fue significativo en el ANOVA realizado para VL/VP en *D. melanogaster*. Sin embargo, la tendencia observada en esta especie fue la opuesta a la descrita en *D. buzzatii*, mostrando para la población de altura valores menores del índice en todos los tratamientos térmicos (Fig. 5.2 E).

### **Variación intrapoblacional**

Los resultados de los ANOVAs realizados para investigar patrones de variación intrapoblacional en el TD y la VB en cada combinación población x tratamiento se presentan en la Tabla 5.3 para *D. buzzatii* y en la Tabla 5.4 para *D. melanogaster*. En líneas generales, se observó que: i) existen diferencias entre líneas en la mayoría de las poblaciones, ii) la proporción de la varianza explicado por las diferencias entre líneas (un estimador de la varianza genética) varió entre las combinaciones de las poblaciones y los tratamientos térmicos, iii) la proporción de la varianza explicada por las diferencias entre líneas fue mayor para VL que para VP. Finalmente, las comparaciones entre los caracteres investigados mostraron que la proporción de varianza explicados por las diferencias entre líneas fue, en promedio, mayor para el TD que para la VB en ambos estadios del ciclo de vida, lo cual puede ser interpretado a la luz de la proximidad que cada carácter tiene respecto del *fitness* total (componentes directos e indirectos).

		Tiempo de desarrollo larval				Tiempo de desarrollo pupal				Índice			
		(TDL)				(TDP)				(TDL/TDP)			
		<i>D. buzzatii</i>		<i>D. melanogaster</i>		<i>D. buzzatii</i>		<i>D. melanogaster</i>		<i>D. buzzatii</i>		<i>D. melanogaster</i>	
T°C	Media térmica	Altitud poblacional											
		Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta
<b>30-30</b>	30	55.4	ns	94.2	(*)	ns	ns	(*)	(*)	ns	ns	(*)	(*)
<b>30-25</b>	27.5	34.4	74.6	(*)	ns	ns	32.0	(*)	ns	37.0	ns	(*)	(*)
<b>25-25</b>	25	46.5	76.2	69.2	83.6	89.0	77.7	ns	ns	86.5	55.5	ns	67.9
<b>25-17</b>	21	77.4	47.6	54.0	77.1	ns	42.8	ns	ns	ns	ns	ns	50.4
<b>30-09</b>	19.5	42.9	88.6	47.0	81.0	ns	63.4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>25-09</b>	17	86.4	74.5	70.5	36.5	ns	ns	ns	ns	65.4	ns	ns	ns
<b>17-17</b>	17	90.4	34.0	49.0	55.3	ns	31.3	ns	53.1	74.2	ns	ns	32.9

**Tabla 5.3.** Contribución relativa del componente entre líneas (varianza genética) en los ANOVAs para tiempo de desarrollo para cada combinación población x tratamiento. El componente de varianza entre líneas fue estimado para cada combinación tratamiento x población x especie. Los resultados son presentados en porcentajes de la varianza entre líneas respecto de la varianza total. Referencias: ns: no significativo. (\*) ANOVAs no pudieron ser realizados.

		Viabilidad larval				Viabilidad pupal				Índice de viabilidad			
		<i>D. buzzatii</i>		<i>D. melanogaster</i>		<i>D. buzzatii</i>		<i>D. melanogaster</i>		<i>D. buzzatii</i>		<i>D. melanogaster</i>	
T°C	Media térmica	Altitud poblacional											
		Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta
30-30	30	91.9	96.8	77.8	(*)	90.0	89.1	ns	(*)	81.7	ns	(*)	(*)
30-25	27.5	46.2	50.3	(*)	42.4	ns	ns	(*)	ns	ns	ns	(*)	(*)
25-25	25	ns	50.4	ns	81.2	ns	ns	56.2	ns	ns	ns	42.6	63.6
25-17	21	ns	ns	45.9	ns	ns	ns	43.1	ns	ns	ns	ns	ns
30-09	19.5	32.9	37.0	ns	80.6	ns	ns	ns	ns	78.7	44.3	ns	ns
25-09	17	67.1	ns	ns	ns	ns	50.9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
17-17	17	ns	ns	ns	ns	42.2	ns	31.9	ns	31.3	ns	ns	ns

**Tabla 5.4.** Contribución relativa del componente entre líneas (varianza genética) en los ANOVAs para la viabilidad en cada combinación población x tratamiento. El componente de varianza entre líneas fue estimado para cada combinación tratamiento x población x especie. Los resultados son presentados en porcentajes de la varianza entre líneas respecto de la varianza total. Referencias: ns: no significativo. (\*) ANOVAs no pudieron ser realizados.

## Conclusiones

Las comparaciones entre los estadios de desarrollo en organismos holometábolos conforman un novedoso y fundamental campo de conocimiento de la evolución. De este modo, los organismos holometábolos abren la posibilidad de estudiar si existe o no una continuidad a través de los estadios del ciclo de vida. Dos posiciones fueron sostenidas al respecto: por un lado una respuesta isomórfica en las diferentes etapas del ciclo de vida, por otro diferentes respuestas para cada estadio del ciclo de vida, lo que sugeriría importantes diferencias en cuanto a las estrategias ecológico-evolutivas.

Una de las vías para estudiar este campo reside en la indagación de caracteres de historia de vida. En particular, el estudio de las tasas de desarrollo abre la posibilidad de establecer si existen variaciones a través del ciclo de vida. En este sentido hemos verificado la presencia de importantes discontinuidades entre las etapas del desarrollo, que se refleja en respuestas que no son isomórficas entre los diferentes estadios frente a los cambios térmicos. De esta manera, nuestros resultados no acuerdan con la idea de una tasa de desarrollo constante a lo largo del ciclo de vida en insectos holometábolos.

En concordancia con la literatura específica, hemos observado una correlación negativa entre el tiempo de desarrollo y la temperatura de cría (Partridge et al. 1994). Sin embargo, los efectos de la amplitud térmica arrojaron importantes desvíos respecto de los resultados obtenidos en tratamientos de temperatura constante. Por ejemplo, encontramos importantes diferencias en las temperaturas de similar o cercana media térmica (i.e. 25-9°C, 30-9°C y 17°C) para las larvas y las pupas de *D. melanogaster*.

Otra forma de investigar si existe isometría entre las respuestas larvales y pupales es mediante un índice generado por las magnitudes de los caracteres en los diferentes estadios. De este modo, la relación TDL/TDP nos permitirá entender mejor cómo se integra la duración de cada estadio en la construcción del tiempo total de desarrollo. En este aspecto, nuestros resultados mostraron una gran consistencia entre *D. melanogaster* y *D. buzzatii*. En primer lugar, los valores de TDL/TDP no difirieron entre poblaciones de altura y llanura en ninguna de las dos especies. Este resultado es consistente en el caso de *D. melanogaster* ya que en esta especie las diferencias interpoblacionales para TDL y TDP no fueron significativas. En cambio, en *D. buzzatii* cada una de las variables que conforman el índice de TD presentó diferencias significativas entre las poblaciones. Estos resultados sugieren entonces, que los cambios

en la duración del estadio larval (TDL), estuvieron acompañados por alteraciones proporcionales en la misma dirección en la duración del otro estadio (TDP). En cambio, los diferentes tratamientos ejercieron un efecto significativo sobre el cociente TDL/TDP en ambas especies. En efecto, observamos una relación directa entre la temperatura de cría y el índice. En general nuestros resultados aportan evidencias tanto a favor como en contra de la idea del isomorfismo de la tasa de desarrollo entre estadios en función del nivel jerárquicos analizado. Por un lado el efecto poblacional, al menos en *D. buzzatii*, sugiere que la tasa de desarrollo varió isomórficamente entre el estadio larval y el pupal. En cambio, la temperatura de cría parece haber afectado diferencialmente la duración de cada uno de los estadios. Más aún, la interacción población x tratamiento térmico no fue significativa, lo cual indica que los efectos de la temperatura de cría sobre la relación TDL/TDP fueron independientes de la población. En conclusión, nuestros resultados aportan una refutación de la hipótesis que postula que la tasa constante de desarrollo se mantiene constante entre estadios (al menos en los rangos térmicos analizados) sugiriendo que cada estadio respondería de manera diferente a la variación térmica.

Las estimaciones de la contribución relativa del componente de variación genética para los tres caracteres del tiempo de desarrollo (larval, pupa e índice de TD), ofrecieron resultados contrastantes entre la duración larval y las otras dos variables, siendo este resultado consistente en las dos especies. Respecto al estadio pupal y al índice se registra un resultado equiparable al planteado para los caracteres asociados al tamaño del cuerpo en el Capítulo 2 de esta Tesis. Nuevamente, no se observaron valores mayores de varianza del factor línea para los individuos criados a los tratamientos de 30-09°C y de 25-09°C.

Respecto a la VB, son dos los aspectos relevantes. En primer lugar, los patrones de variación de la VB permiten evaluar críticamente la relación entre la temperatura y el *stress*, continuando con la temática ya iniciada capítulos anteriores. Tal como fue sugerido en investigaciones previas (Pétavy *et al.* 2001a), la amplitud térmica no implica necesariamente una depresión en el *fitness*. Esto se ve reflejado en que la VB de las moscas sometidas a tratamientos con menor rango térmico (30-25°C y 25-17°C) no difirió significativamente respecto de la VB estimada en moscas sometidas a tratamientos de temperatura constante. La segunda característica digna de mención es la ausencia de una correlación entre estadios en los patrones de mortalidad. En particular, en los casos en que la amplitud térmica actuó como un factor de *stress*, el efecto parece ser especie-específico. En *D. buzzatii* los valores mayores de mortalidad se registraron

durante la etapa larval. En cambio en *D. melanogaster*, se observaron patrones similares a través de su ciclo de vida, salvo para el tratamiento de 30°C.

Finalmente, los resultados de este capítulo llevan a la necesidad de poner una nota de atención a cualquier intento de extrapolación entre los estadios, sugiriendo la necesidad de evitar reglas generales y simples en caracteres asociados al *fitness* en organismos holometábolos tal como ha sido sugerido por otros autores (Sørensen *et al.* 2005). En este contexto, nuestros resultados aportan nueva información acerca de las diferentes estrategias que pueden adoptar desde una perspectiva evolutiva especies diferentes durante los estadios tempranos del ciclo de vida, una temática que será complementada con los resultados que se presentarán en el Capítulo 8.

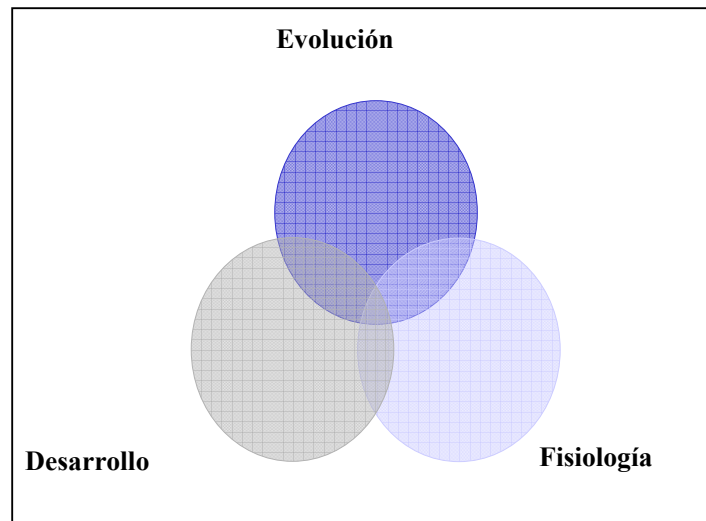
## Capítulo 6. Fisiología y caracteres de historia de vida: el caso del tamaño del cuerpo

### Resumen

En los últimos años, el trabajo interdisciplinario ha sido valorado por su mayor poder explicativo. Sin embargo, algunas dificultades surgen en esta modalidad de investigación. En este capítulo nos centraremos en un inconveniente no suficientemente reconocido: la polisemia en ciertos conceptos comunes a los diferentes marcos teóricos pero que llevan a importantes confusiones a los fines de la investigación desarrollada. En particular, analizaremos el caso del término “tamaño corporal”. Se abordarán dos caracterizaciones diferentes que se han dado del mismo desde la bibliografía especializada: como masa y como longitud. Si bien esta doble caracterización podría no conllevar necesariamente a problemas que atenten contra los objetivos planteados, en el caso del tamaño pueden visualizarse al menos dos problemas. Por un lado, uno de características *a priori* está dado por una confusión al explicar, por ejemplo, los patrones clinales. A partir del reconocimiento de los posibles mecanismos que pudieron haber actuado en la formación de la clina, se ve que ambas variables son muy diferentes dentro del escenario teórico. Por otro lado, el segundo problema es de índole empírico: la ausencia de una correlación entre las longitudes y las masas corporales a determinadas escalas jerárquicas que podría implicar una falta de identificación entre ambas mediciones. Ambos problemas analizados en su conjunto sugieren que el uso de la longitud como indicador del tamaño corporal debe ser objeto de una revisión crítica a los fines de un trabajo interdisciplinario exitoso.

## Introducción

En los capítulos anteriores se ha indagado acerca de los efectos de la temperatura sobre caracteres diversos, tanto en componentes directamente relacionados con el *fitness* (viabilidad) como en otros indirectamente relacionados (tamaño, forma, tiempo de desarrollo). Los mismos han sido estudiados a través de los diferentes estadios que componen el ciclo de vida de un organismo holometábolo como *Drosophila*. A su vez, en los Capítulos 7 y 8 se trabajará sobre la relación de éstos con una variable fisiológica: la tasa metabólica. Sin embargo, resulta preciso analizar algunas de las dificultades existentes en el trabajo interdisciplinario entre el desarrollo, la evolución y la fisiología (Figura 6.1).



**Figura 6.1.** Representación gráfica del trabajo interdisciplinario en las diferentes áreas articuladas en la Tesis. La polisemia surge en las zonas de integración entre áreas diferentes.

Una de las virtudes que tienen los trabajos multidisciplinarios es la posibilidad de integrar marcos teóricos de áreas que en una primera instancia podrían parecer separados, si bien intentan dar cuenta de los mismos fenómenos. A la vez, el trabajo interdisciplinario ha sido propuesto como una vía eficiente para enfrentar cierto “reduccionismo” creciente en las ciencias naturales en general y en la biología en particular. Las peculiaridades de este reduccionismo no han sido profundamente analizadas en el área de la biología, pero parte de su expresión se evidencia por un desconocimiento de áreas afines a la investigación desarrollada en fenómenos comunes,



produciendo la inevitable consecuencia de marcos teóricos descontextualizados e incluso, contradictorios entre sí. Así, esta conjunción entre diferentes disciplinas reviste la esperanza de que se encuentren elucidaciones comunes de mayor grado de generalidad y, por lo tanto, de un mayor poder explicativo. Por último, los trabajos interdisciplinarios podrían producir efectos positivos en las disciplinas particulares que son parte de dicha integración. La razón de ello, reside en el reconocimiento y posterior modificación o eliminación de todas aquellas teorías contradictorias. Veamos un ejemplo en donde esto se expresa claramente: la integración esperada entre evolución y desarrollo. Consolidada en las últimas décadas, trajo a un primer plano las problemáticas de los constreñimientos generados por el desarrollo de los organismos. Necesariamente, estas restricciones ponían algún tipo de “freno” a la postura “panselccionista” que dominaba la teoría evolutiva, obligando más bien a la representación de un escenario de posibles opciones limitadas y/o combinaciones de variables arrojadas a campos de posibilidad acotados. Por ello, algunos autores han sugerido que la integración entre la biología evolutiva, la fisiología y la biología del desarrollo “provee un punto ventajoso invaluable desde el cual examinar los límites de los procesos evolutivos”<sup>5</sup> (Burggren & Warburton 2005).

Sin embargo, evidentemente el trabajo interdisciplinario adolece de dificultades que se contraponen a las ventajas indicadas. La compatibilización entre áreas no siempre es una tarea lineal y sencilla. En algunos casos, las diferencias metodológicas y teóricas resultan ser lo suficientemente grandes como para que esta distancia se torne importante y digna de ser abordada con cuidado. A partir de ello, la integración de conceptos diferentes no resulta una práctica trivial. Pero si acaso estas dificultades se hacen presentes con cierta frecuencia, surge otra dificultad: la aparente “coincidencia” conceptual y/o terminológica entre los términos provenientes de diferentes áreas. El múltiple significado de un mismo término entre distintos campos de investigación es un problema epistémico denominado “polisemia”<sup>6</sup>.

Tal como fue presentado en los Capítulos 2 y 3, uno de los conceptos que han sido abordados desde la ecología, la genética, la fisiología y la biología evolutiva, ha sido el de tamaño corporal (*body size*) (Gilchrist & Partridge 1999; Blackburn *et al.* 1999; De Jong & Bochdanovits 2003; Ochocinska & Taylor 2003; Gibert *et al.* 2004).

---

<sup>5</sup> Traducido por el autor.

<sup>6</sup> Según la Real Academia Española se trata de “pluralidad de significados de una palabra o cualquier signo lingüístico” (Real Academia Española 2003).

Pese a una claridad conceptual primaria, esta es solo aparente ya que el tamaño del cuerpo frecuentemente ha sido objeto de múltiples confusiones, entre las que se destacan las comparaciones de tipos diferentes de datos, a la vez que una no visualización de diferentes niveles jerárquicos existentes, junto a una confusión entre patrones evolutivos y ontogenéticos (LaBarbera 1989).

En el presente capítulo nos centraremos en la polisemia que se ha dado respecto al tamaño del cuerpo en cuanto a las caracterizaciones de longitud y de masa. Dicha polisemia posiblemente responda (al menos en parte) a una historia generada a partir de una “herencia” metodológica (y como veremos, no necesariamente conceptual) vinculadas con las áreas de las que provienen ambas caracterizaciones. Posteriormente, se analizarán dos tipos de consecuencias: la *a priori* que responde a las diferencias conceptuales entre ambas caracterizaciones y la segunda que se trata de una consecuencia *a posteriori*, referida a la posible ausencia de una correlación empírica entre ambas variables.

### **Dos áreas, dos caracterizaciones**

Con respecto a la integración entre la ecología, la fisiología, la genética y la biología evolutiva, la variación de un determinado carácter puede tener diferentes explicaciones causales. Tal como se ha analizado en los capítulos previos, en el caso de los patrones clinales para el tamaño corporal se han esgrimido propuestas (con las excepciones ya abordadas en el Capítulo 2) que sugieren a la temperatura como el factor responsable. Por ejemplo, observaciones como las que dieron lugar a la regla de Bergmann, se explicaron en endotermos en base a una conservación más eficiente del calor a través de un aumento del índice área/volumen.

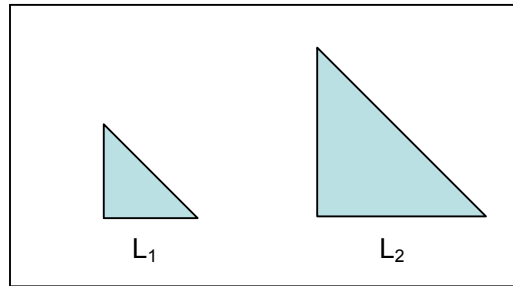
Sin embargo, debe interrogarse cuáles han sido los indicadores del tamaño del cuerpo utilizados en el reconocimiento de los patrones clinales. En general, los trabajos que han considerado a la masa como un indicador del tamaño corporal han sido generados especialmente en áreas afines a la fisiología. Contrariamente, las indagaciones provenientes de la ecología y/o la genética no han abundado en el estudio de esta variable como estimador del tamaño corporal, con la excepción de algunas investigaciones (De Jong & Bochdanovits 2003). Sin embargo, abundan los estudios que han considerado la longitud o el área de un determinado órgano como indicadores del tamaño corporal. Sea tanto utilizando variables métricas del ala, del tórax o de la

cabeza, la mayor parte de los trabajos revisados han recuperado este tipo de variables como estimadores del tamaño corporal a los fines de investigar los efectos de la variación ambiental en las poblaciones (Chippindale *et al.* 1994; James *et al.* 1997; Loeschcke *et al.* 1999; Partridge *et al.* 1999; Thomas & Barker 1999; Huey *et al.* 2000; Bublly & Loeschcke 2001; Pétavy *et al.* 2001a; Hallas *et al.* 2002; Calboli *et al.* 2003; Ochocinska & Taylor 2003; Gibert *et al.* 2004; David *et al.* 2006). Del mismo modo, existen numerosos trabajos que han tomado el área de ciertos órganos como medida del tamaño (Gebhardt & Stearns 1988; Krebs & Barker 1993; Bochdanovits & De Jong 2003a; Bochdanovits & De Jong 2003b). No obstante, a los fines de nuestro objetivo podemos aunar aquellos trabajos en los que se han medido tanto variables métricas lineales así como de área, en contraposición a aquellos en los que se han medido la masa corporal.

### **Los problemas de la polisemia del tamaño del cuerpo**

#### **La polisemia y los problemas conceptuales (problemas *a priori*)**

Tal como hemos presentado, de manera general aunque no exclusivamente, puede verse un fuerte predominio de las medidas de longitud corporal (o de área) en los trabajos provenientes de ciertas líneas de indagación, tales como el caso de la genética evolutiva. En contraposición, las estimas del tamaño del cuerpo a partir de la masa corporal es una vía que ha sido analizada con menor frecuencia. A los fines de analizar los problemas *a priori*, veamos brevemente las relaciones conceptuales entre ambas nociones. Para desarrollar este análisis comencemos por una figura sencilla. Si los diferentes lados de un triángulo, por ejemplo, poseen las mismas proporciones, evidentemente también sus ángulos serán similares. En tales casos se indican que ambas figuras son “geométricamente similares” (Figura 6.2).



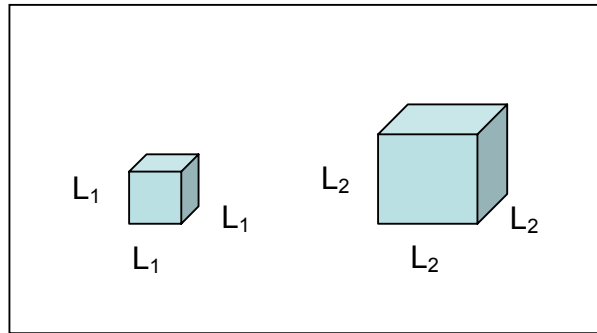
**Figura 6.2.** Dos triángulos geoméricamente similares.

En tales casos se cumple que

$$L_2 = kL_1$$

Las mismas consideraciones pueden extenderse a otras figuras geométricas. Así, los cuerpos geoméricamente similares son llamados “isométricos”. Para un análisis de las relaciones entre superficies y volúmenes, pensemos ahora en dos cubos de diferente tamaño. Debido a que todas las medidas lineales de ambos cubos están en la misma proporción y, a la vez, que todos sus ángulos son similares, puede caracterizarse a los dos cubos nuevamente como isométricos. Sin embargo, las superficies de los dos cubos no cambian del mismo modo que sus dimensiones lineales, sino como el cuadrado de las relaciones lineales:

$$L_2 = k_L \times L_1$$
$$(L_2)^2 = (k_L)^2 \times (L_1)^2$$



**Figura 6.3.** Dos cubos geoméricamente similares.

Del mismo modo se ve que sus volúmenes cambian en una tercera potencia respecto a las relaciones lineales. Para el caso del cubo puede verse que si uno de ellos tiene el doble del largo en sus lados respecto al primero, su superficie será  $2^2$  y su volumen  $2^3$  (Figura 6.3). Las mismas reglas se aplican a cualquier otro cuerpo tridimensional, independientemente de su forma. Luego de una serie de pasos (Schmidt-Nielsen 1977), se deriva que:

- La superficie es proporcional al cuadrado de la longitud.
- El volumen es proporcional al cubo de la longitud.
- La superficie es  $2/3$  proporcional al volumen.

Es decir, el volumen es proporcional al cubo de la longitud, por lo que la medida de la masa y la longitud de un órgano deberían guardar estas relaciones. Si todas las dimensiones lineales de los animales escalan geoméricamente aumentando su tamaño isométricamente, debe esperarse que la masa sea proporcional al volumen corporal, el cual debería ser a su vez proporcional al cubo de las dimensiones lineales (largo, ancho y profundidad) (Calder III 1984). De esta manera en una primera aproximación teórica se espera una relación estrecha entre ambas variables.

Cabe ahora preguntarse si ambas medidas del tamaño corporal, masa y longitud son *a priori* equivalentes en cuanto al escenario teórico analizado. Esta semejanza *a priori* está dada en la medida en que ambos caracteres estén relacionados con las hipótesis que explican el efecto de la temperatura sobre los organismos. Y la respuesta es negativa. Veamos la justificación de ello. En general, la biología moderna ha hecho

un fuerte hincapié en el reconocimiento de los mecanismos, es decir, las causas próximas de los fenómenos analizados. En el caso aquí estudiado, debemos reconocer las hipótesis propuestas para explicar los gradientes clinales del tamaño del cuerpo. En general, las explicaciones que se han ofrecido consideran a la variación en la temperatura como el principal factor selectivo determinante de la evolución de las clinas latitudinales. Sin embargo, si en efecto es la temperatura el factor ambiental selectivo, las explicaciones en juego dan cuenta de variaciones en la masa de los organismos aunque no necesariamente de sus longitudes. De este modo, que la distribución de la masa en un organismo esté o no correlacionada con la extensión de sus diferentes partes del cuerpo resulta una pregunta de segundo orden en relación al fenómeno registrado. Por ello, las mediciones de longitud, si bien evidentemente importante tal como lo indica la abundante literatura al respecto, poseen un rol sólo de segundo grado con vistas a una explicación verosímil de los patrones clinales del tamaño corporal. Esto no resulta un problema en sí mismo en la medida en que se explicita que la longitud (o el área) de un órgano no constituye carácter blanco sobre el que actúa la selección natural. De este modo, su funcionalidad dentro del estudio de las adaptaciones térmicas de los organismos sólo estará dada en la medida en que sean indicadoras confiables de blancos plausibles, tales como en el caso de la masa. ¿Pero esto realmente es así? Veamos para ello qué nos sugiere una primera aproximación al registro empírico.

#### La polisemia y los problemas empíricos (problema *a posteriori*)

El problema *a priori* puede tratarse de un inconveniente conceptual, sin que tenga necesariamente una injerencia en cuanto a los patrones empíricos obtenidos. Para verificar esto, es necesario establecer si ambas variables se encuentran correlacionadas, de modo que la longitud de un órgano pueda ser considerado un indicador confiable de las variables que sí están directamente involucradas en los procesos causales. Para ello, es necesario recurrir en la bibliografía específica a investigaciones que hayan considerado para sus análisis mediciones tanto de las variables de extensión como de masa. Una búsqueda exhaustiva mostró que existen muy pocos trabajos en los que se presenten relaciones entre las variables de longitud y de peso. Además en la mayoría de dichos casos, no ha sido su objetivo verificar dicha relación. Por tal motivo, la bibliografía es en este aspecto, excesivamente fragmentaria y escasa. De hecho, nuestra

impresión es que la posibilidad de que dicha información sea recuperada y analizada es más bien exigua.

A partir de ello, surge una alternativa posible: el análisis del *wing loading* (WL). Este se caracteriza como el cociente entre la longitud o el área del ala y el peso o la longitud del tórax. El WL encuentra su justificación biológica en que podría constituir un buen indicador de la capacidad de vuelo. Mientras algunos trabajos en efecto lo han caracterizado utilizando como denominador a una medida de longitud corporal (Crill *et al.* 1996; Gilchrist & Huey 2004; Bublly & Loeschcke 2005; David *et al.* 2006), otros lo han presentado utilizando medidas de peso (Gilchrist & Huey 2004). Esta diferencia presenta parte de las consecuencias derivadas del problema inicial, y a las que en este marco podemos denominar como “polisemias derivadas”. Por todo esto, el análisis del WL puede ser de cierta utilidad para nuestro objetivo inicial de comparar la masa corporal y las medidas de longitud. En ese sentido, el WL permitiría así, verificar las hipótesis y predicciones para escenarios de diferentes niveles jerárquicos, comparando los cocientes en los que el denominador es la masa corporal respecto a aquellos otros en los que el denominador es alguna medida de longitud, tal como el largo del tórax.

## Conclusiones

La polisemia que ha sido presentada respecto a los diferentes usos del término tamaño (*size*) tal como se intentó justificar aquí, presenta inconvenientes *a priori* y *a posteriori*. Respecto del primero, surgen claros problemas gnoseológicos, en la medida en que los mecanismos causales de los patrones de uno y otro pueden ser absolutamente diferentes. Este problema puede ser saldado sólo en la medida en que queden en consideración las explicaciones de los escenarios evolutivos de una y otra variable para los casos analizados, aspecto no habitualmente realizado en la literatura. Pero más aún, esta omisión no necesariamente forma parte de una responsabilidad individual de los autores en cuestión, sino que parece estar íntimamente relacionado con la falta de una explicación mecanicística clara de los patrones clinales (Robinson & Partridge 2001). Y acaso el problema sea más severo en la medida en que siquiera está claro que los factores selectivos involucrados sean similares en las diferentes especies. Por ejemplo, algunos autores han sugerido que mientras la temperatura pueda tratarse del factor selectivo en el caso de *D. melanogaster*, en otras especies de *Drosophila* podría tratarse más bien de su capacidad de vuelo (Hallas *et al.* 2002).

Del mismo modo, se han sugerido posibles problemas *a posteriori*. Como hemos visto, estos problemas están relacionados con la posibilidad de que la longitud y la masa no presenten una relación directa y clara. Aunque una respuesta a este tipo de problema requeriría estudios diferentes en cuanto a taxones y niveles jerárquicos estudiados, los resultados de esta Tesis darán un pequeño aporte al respecto. Considerando los resultados ya presentados en el Capítulo 2 y aquellos otros que serán oportunamente presentados en el Capítulo 7, en términos generales observamos características muy diferentes entre las variables de longitud y la de masa. Las características de ambas serán oportunamente discutidas en los Capítulos 7 y 9.

Finalmente, surge el lógico interrogante acerca de cuáles de ambos cocientes representa un “mejor indicador” del tamaño corporal en estos escenarios selectivos. La respuesta, pese al comentario previo que se ha realizado acerca de las causas proximales que remiten a la masa, no resulta evidentemente una tarea sencilla. Más aún, quizás siquiera tenga un carácter de tipo universal, sino que deba ser remitida al contexto de aplicación en la que la misma sea dada. Algunos autores han sugerido, por ejemplo, que los patrones clinales tales como los descritos por la regla de *Bergmann* sólo deben darse con la masa como indicadora del tamaño corporal, en la medida en que pueden estar implicados fuertes cambios de formas (Blackburn et al. 1999). De este modo, sugerimos que las posibles dificultades *a priori* y *a posteriori* deban ser analizadas para cada caso en particular, verificando el supuesto de la longitud como indicador de la masa corporal de los organismos.



## **Capítulo 7. La relación entre caracteres fisiológicos y de historia de vida: un estudio experimental en *Drosophila***

### **Resumen**

**Pregunta:** Según investigaciones realizadas en el área de la ecofisiología, el tiempo de desarrollo (TD) y la tasa metabólica (TM) están correlacionados a altos niveles de organización. ¿Se conserva esta relación alométrica a nivel intraespecífico?

**Método:** Se expusieron moscas de tres especies de *Drosophila* recolectadas a similares latitudes y altitudes contrastantes, a diferentes regímenes térmicos. La TM fue medida como la producción de CO<sub>2</sub> utilizando un “sistema cerrado”. El TD fue estimado como el tiempo comprendido entre el primer estadio larval y el momento de emergencia del adulto.

**Resultados:** Se observó una correlación positiva entre la TM y el TD al considerar a las tres especies en forma simultánea. Sin embargo, tal alometría no fue detectada dentro de las especies. Se registró además, que ambas variables presentan diferentes patrones de interacción con el sexo y los tratamientos térmicos.

**Conclusiones:** La extrapolación de las reglas alométricas de la macroecología a la variación intraespecífica no parece totalmente garantizada. De hecho, los factores que afectan la variación en las variables fisiológicas en los niveles intra e interespecíficos serían diferentes.

## Introducción

Los caracteres de historia de vida tales como la longevidad, la tasa de crecimiento, la fecundidad y la edad a la madurez sexual, son consideradas medidas indirectas del *fitness* de los organismos en la naturaleza (Stearns 1992). La expresión de tales caracteres, al igual que para cualquier carácter fenotípico, está mediada por influencias ambientales. Sin embargo, los caracteres de historia de vida tienen una incidencia particularmente fuerte en el *fitness* de un organismo. Del mismo modo, la variación fisiológica a lo largo de la historia de la vida de un individuo también influye sobre el *fitness*.

El estudio de la conexión entre el genotipo y el fenotipo ha sido tradicionalmente objeto de indagación de la fisiología y la biología del desarrollo. Sin embargo, estas disciplinas en general no nos informan acerca del modo en que se “diseña” el fenotipo para la reproducción y la supervivencia, un campo del que generalmente se ocupan los biólogos evolutivos (Stearns 1992). Aún cuando la fisiología (y eventualmente la biología molecular dirigida al estudio del desarrollo) provea las explicaciones mecanicísticas de la variación fenotípica, poco se conoce acerca de las denominadas causas proximales que subyacen la variación en el *fitness* o de los caracteres relacionados con él. Una razón posible de la escasa cantidad de estudios que vinculan los caracteres fisiológicos y los caracteres de historia de vida es que éstos últimos se investigan a una escala poblacional, basada en el análisis de una gran cantidad de individuos por poblaciones. Por el contrario, el foco de los estudios fisiológicos comparativos se ha hecho mayoritariamente a niveles taxonómicos superiores. A pesar de la importancia de la fisiología comparada, se ha prestado poca atención a la variación inter e intrapoblacional en caracteres fisiológicos, así como al efecto de variables ambientales en las respuesta fisiológicas de las poblaciones (Spicer & Gaston 1999; Lardies *et al.* 2004). Sin embargo, existen algunos trabajos que han analizado el vínculo entre historia de vida y fisiología (Townsend & Calow 1981; Stearns 1992; Roff 2001; Zera & Harshman 2001; Lardies & Bozinovic 2006). En este camino, el propósito del presente capítulo es profundizar en la integración de la fisiología y la biología evolutiva, de modo de lograr incrementar nuestro conocimiento acerca de los factores próximos que subyacen a la variación de caracteres de historia de vida en poblaciones naturales.

Debido a que la temperatura del ambiente varía tanto en el tiempo como en el espacio, los organismos ectotérmicos se ven enfrentados al desafío de mantener la homeostasis. Por ello, la fisiología térmica debe ser un campo a ser considerado para comprender el éxito evolutivo y ecológico de los animales, por lo que resulta necesario profundizar en el conocimiento de las respuestas fisiológicas implicadas en la adaptación térmica (Berrigan 1997; Forsman 1999; Rogowirz & Chappel 2000; Huey & Berrigan 2001; Tomanek & Somero 2002; Neargarder *et al.* 2003; Nespolo *et al.* 2003).

Tal como hemos adelantado en capítulos anteriores, en general las poblaciones que viven en el llano frecuentemente enfrentan diferentes desafíos relacionados con la adaptación térmica. En primer lugar, la diferencia primaria radica en una mayor temperatura media a lo largo del año en poblaciones que viven en ambientes de menor altura respecto a las que viven a mayor altitud. Sin embargo, la diferencia en la media térmica anual no es el único aspecto contrastante entre ambientes de llanura y altura. En este sentido, un aspecto que no se ha tomado muy en cuenta es la amplitud térmica diaria, que es la variación en la temperatura entre el día y la noche. En general, la amplitud presenta magnitudes superiores en ambientes de altura que en los de llanura.

Los estudios de adaptación térmica tienen una gran tradición en los organismos ectotérmicos (Johnston & Bennett 1996). Sin embargo, hasta la actualidad la mayor parte de los protocolos experimentales se han basado en el uso de tratamientos que difieren en las medias térmicas, mientras que los estudios que abordan la problemática de los efectos de la amplitud térmica sobre los caracteres de historia de vida han sido en general escasos (Economos & Lints 1986; Loeschcke & Krebs 1994; Loeschcke *et al.* 1997; Borash *et al.* 1998; Pétavy *et al.* 2001a).

El tiempo de desarrollo, el intervalo temporal comprendido entre el huevo y el estadio de adulto, es particularmente importante en los organismos que dependen de los recursos efímeros tal como es el caso de *Drosophila*, en la que se conoce que está inversamente correlacionado con la temperatura a la cual los estadios larvales se encuentran sometidos (Partridge *et al.* 1994; Gibert & De Jong 2001; Pétavy *et al.* 2001a; Angiletta *et al.* 2002).

En el Capítulo 4 hemos presentado los resultados de las investigaciones de los patrones de variación del tiempo de desarrollo dentro y entre poblaciones de *D. buzzatii* y *D. melanogaster*. A la vez, se ha mostrado que una proporción significativa de la variación entre poblaciones está dada por importantes diferencias entre poblaciones que viven a diferente altitud en ambas especies. Sin embargo, no está claro que la variación

en el tiempo de desarrollo sea una mera consecuencia de las diferencias registradas en el tamaño del cuerpo (Cortese et al. 2002).

Las relaciones entre la tasa metabólica y la masa corporal, y entre el tiempo generacional y la masa corporal, se encuentran suficientemente establecidas en la literatura (Ginzburg & Colyvan 2004). Sobre la base de estas alometrías, es posible inferir una correlación entre el tiempo generacional y la tasa metabólica. Sin embargo, si esta relación es cierta, la misma está mediada por la relación que ambas variables tienen con la masa corporal. En este sentido, la tasa metabólica (tanto absoluta como la corregida por la masa) podría proveer la base fisiológica para la variación en el tiempo de desarrollo, un área que no ha sido profundamente investigada.

El principal objetivo del presente capítulo es estudiar la relación entre el tiempo de desarrollo y la tasa metabólica en tres especies de *Drosophila* que coexisten en dos localidades que se encuentran a prácticamente la misma latitud, pero a altitudes muy contrastantes. Nuestra hipótesis de trabajo es que el tiempo de desarrollo está positivamente correlacionado con la tasa metabólica, tal como puede ser inferido a partir de las bien conocidas relaciones alométricas de la macroecología, tanto en la escala intraespecíficas (intra e interpoblacional) como en la interespecífica. Asimismo, parece lógico suponer una relación negativa entre el tiempo de desarrollo y la tasa metabólica luego de remover los efectos dados por la masa. Además, nuestro diseño experimental permite estudiar el grado de plasticidad fenotípica en respuesta a diferentes regímenes térmicos (constantes y alternados), la variación interpoblacional y comparar las respuestas de una especie nativa, *D. buzzatii*, con las de *D. melanogaster* y *D. simulans*, dos especies cosmopolitas e invasoras que recientemente han colonizado el área.

## **Materiales y métodos**

Las moscas que se utilizaron fueron recolectadas en dos localidades en donde *Drosophila buzzatii*, *D. melanogaster* y *D. simulans* son simpátricas (Cachi: 2340 m.s.n.m., 25° 07' S, 66° 09' W y Güemes: 720 m.s.n.m., 24° 40' S, 65° 02' W, ambas en la provincia de Salta). En ambas localidades, al menos dos especies de cactáceas (*Trichocereus terscheckii* y *Opuntia sulphurea*) constituyen los sitios de cría y alimentación de *D. buzzatii* (Hasson et al. 1995), en tanto que *D. simulans* y *D. melanogaster* encuentran sus recursos de cría y alimentación en los viñedos.

La colecta de individuos y la fundación de líneas se realizaron siguiendo el protocolo detallado en el Capítulo 2. En todos los casos, las isóneas fueron mantenidas durante 4 generaciones a baja densidad para evitar la competencia y a 25°C con un fotoperíodo de 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad. En la quinta generación de cría, una cantidad equivalente de individuos de cada una de las líneas fueron asignados aleatoriamente a 6 *stocks*, uno para cada combinación población x especie.

### Obtención de las moscas utilizadas en los experimentos

De cada *stock* se separaron 200 moscas que fueron liberadas en cajas de recolección de huevos, en cada una de las cuales se colocó una placa de petri con medio de oviposición (ver Capítulo 2 para detalles). Al cabo de 24 hs. las cajas de petri se retiraron e incubaron a 25°C durante 24 hs. en el caso de *D. melanogaster* y *D. simulans*, y 36 hs. en *D. buzzatii*). Posteriormente, grupos de 30 larvas de primer estadio en los casos de *D. simulans* y *D. melanogaster* y 40 en *D. buzzatii*, se transfirieron a tubos que contenían medio instantáneo para *Drosophila*. Estudios previos han mostrado que esas densidades larvales son óptimas.

Se realizaron dos tipos de experimentos. El primero se realizó para analizar si existe alguna relación entre el tiempo de desarrollo, la tasa metabólica y la masa corporal. Con este fin se sembraron larvas de primer estadio en 96 tubos, 16 para cada combinación de especie (3) y localidades (2). Los tubos fueron posteriormente asignados a 4 tratamientos térmicos, en tres de ellos la temperatura se mantuvo constante a 17°C, 21°C o 25°C; mientras que el restante consistió en un régimen alternado en el cual la temperatura varió entre 25°C durante las 12 hs. del período de luz y 17°C durante el período de oscuridad. En todos los casos los tratamientos térmicos fueron elegidos dentro del rango térmico que naturalmente las especies analizadas enfrentan en la naturaleza (Loeschcke *et al.* 1994; Bublly & Loeschcke 2005). Cada 12 hs. los tubos fueron examinados con el fin de detectar la presencia de adultos. Cuando los adultos comenzaron a emerger, se consideró el momento y día de emergencia, y se reconoció el sexo de cada mosca a los fines de poder contar con un indicador provisorio del tiempo de desarrollo. Posteriormente, dos adultos, uno de cada sexo, fueron elegidos aleatoriamente para las mediciones de tasa metabólica.

El segundo experimento tuvo como objetivo analizar las fuentes de variación del tiempo de desarrollo. Para esto, 40 tubos por cada combinación de especie y localidad

(240 en total) fueron aleatoriamente asignados a los mismos tratamientos térmicos indicados previamente. En este caso, los adultos fueron recuperados cada 6 horas y el tiempo de desarrollo fue estimado como el tiempo comprendido entre el momento de siembra de las larvas en los tubos hasta la emergencia de los adultos.

### **Medición de la tasa metabólica**

La tasa metabólica fue medida como la producción de CO<sub>2</sub>, usando un “sistema cerrado” (Vleck 1987) comprendido por una jeringa de vidrio de 2 cm<sup>3</sup> con tres válvulas (Chappell 1983; Ashby 1997; Chown *et al.* 1997). Todas las mediciones fueron realizadas durante el día, que es cuando los individuos están con niveles más elevados de actividad. En todos los casos las mediciones se realizaron dentro de las primeras 24 hs. luego de su emergencia.

Cada mosca fue ubicada dentro de las jeringas de vidrio. Posteriormente se cerraron y se ubicaron en una incubadora a 25°C durante 2 hs. Por cada tanda de medición, se realizaron controles representados por registros realizados en jeringas sin animales. En todos los casos, antes de que el aire sea inyectado desde la jeringa de vidrio a un tubo Tygon® (20 cm. de largo) conectado a un analizador de CO<sub>2</sub>, el aire pasó a través de gránulos pequeños de Baralyme® y Drierite® a los fines de absorber el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O, respectivamente. Luego de cada intervalo de incubación las concentraciones de CO<sub>2</sub> fueron determinados usando un sistema de respirometría (Sable Systems, Henderson, NV). Una computadora equipada con el programa DATACAN registró la salida del analizador de CO<sub>2</sub>.

La tasa de producción de CO<sub>2</sub> (ml CO<sub>2</sub>/h) fue estimada para cada jeringa usando la siguiente ecuación:

$$V \text{ CO}_2 \text{ (ml/hora)} = (V (F_m \text{CO}_2 - F_c \text{CO}_2)) / t,$$

en donde V CO<sub>2</sub> es el volumen de CO<sub>2</sub> (que es el dato utilizado en los análisis estadísticos), VF<sub>m</sub>CO<sub>2</sub> es el volumen de CO<sub>2</sub> en la jeringa con el animal, VF<sub>c</sub>CO<sub>2</sub> es el volumen de CO<sub>2</sub> registrado en la jeringa sin el animal (control). En todos los casos, el tiempo de incubación (t) fue 2 hs. Previo a todo el proceso de medición del CO<sub>2</sub>, todas las moscas fueron pesadas en una balanza analítica.

## Análisis de datos

Los análisis de datos fueron realizados usando métodos estadísticos *standard* descriptos Sokal y Rohlf (1997). En primer lugar, se realizaron análisis de correlación entre la tasa metabólica, el peso corporal y el tiempo de desarrollo. Los coeficientes de correlación entre pares de variables se obtuvieron tanto a nivel intra como interspecifico. Las correlaciones fueron calculadas para cada sexo por separado.

Para el análisis de los datos de tasa metabólica, el diseño experimental incluyó cinco variables predictoras: cuatro categóricas (localidad, especie, tratamiento térmico y sexo) y una variable continua (masa corporal), el cual fue considerada como covariable en el diseño general.

El tiempo de desarrollo fue analizado por medio de un ANOVA, en los que el tratamiento térmico, población, especie y sexo fueron las fuentes de variación. Previo a los análisis estadísticos el tiempo de desarrollo, la tasa metabólica y el peso corporal fueron transformadas logarítmicamente. Comparaciones '*post hoc*' entre las especies y el tratamiento térmico fueron realizados mediante el *test* de TUKEY (HSD). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statistica para windows (6.0).

## **Resultados**

### Análisis de correlación

Tanto la tasa metabólica como el tiempo de desarrollo mostraron una correlación positiva y significativa con la masa corporal en las comparaciones que incluyeron a las 3 especies (Tabla 7.1). Tal como se esperaba, *D. buzzatii* –la especie de mayor tamaño corporal– presentó los valores absolutos más altos de tasa metabólica y un mayor tiempo de desarrollo que las otras dos especies (Figuras 7.1 y 7.2).

	TD-PC		TM-PC	
	r	p	r	p
Interespecífica	0.234	0.003	0.273	<0.0001
Hembras (N=24)	0.298	0.005	0.226	0.015
Machos (N=24)	0.320	0.006	0.220	0.061
Intraespecífico				
<i>D. melanogaster</i>	-0.034	0.808	0.403	0.003
Hembras (N=29)	0.054	0.780	-0.038	0.844
Machos (N=23)	0.324	0.131	0.329	0.124
<i>D. simulans</i>	-0.060	0.652	0.579	<0.0001
Hembras (N=35)	0.147	0.407	0.658	<0.0001
Machos (N=25)	-0.223	0.283	0.359	0.077
<i>D. buzzatii</i>	-0.066	0.649	0.172	0.233
Hembras (N=25)	-0.415	0.844	-0.295	0.889
Machos (N=25)	0.104	0.619	0.198	0.343

**Tabla 7.1.** Coeficientes de correlación (r) entre el peso corporal (PC) y el tiempo de desarrollo (TD), y la tasa metabólica (TM) y el peso corporal (PC), en las comparaciones inter e intraespecífica.

A su vez, los coeficientes de correlación entre la tasa metabólica y la masa corporal fueron positivos y significativos en *D. simulans* y *D. melanogaster* pero no en *D. buzzatii* (Tabla 7.1). Los análisis realizados (considerando hembras y machos analizados por separado) presentaron valores significativos, con la excepción de las hembras de *D. simulans* (Tabla 7.1).



## Análisis de tasa metabólica

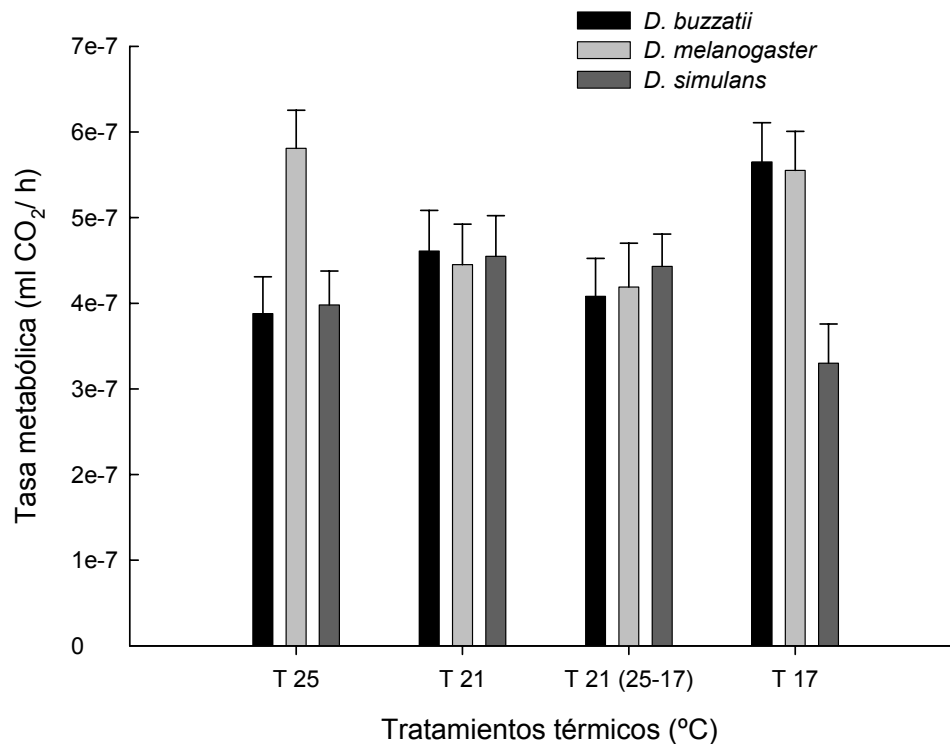
La tasa metabólica mostró un amplio rango de variación entre sexos, tratamientos, localidades y especies. Los resultados del ANCOVA revelaron que las diferencias entre las localidades, especies y sexos fueron significativos (Tabla 7.2).

Tasa metabólica	SC	g.l.	F	P
Peso (mgr) (covariable)	$1.3 \cdot 10^{-5}$	1	5.048	0.026
Población (P)	$1.6 \cdot 10^{-5}$	1	5.843	0.017
Especie (Sp)	$3.2 \cdot 10^{-5}$	2	6.064	0.003
Tratamiento térmico (T)	$1 \cdot 10^{-5}$	3	1.234	0.299
Sexo (S)	$2.3 \cdot 10^{-5}$	1	8.725	0.004
P*Sp	$2 \cdot 10^{-5}$	2	0.306	0.736
P*T	$1.2 \cdot 10^{-5}$	3	1.517	0.213
Sp*T	$6.8 \cdot 10^{-5}$	6	4.231	$6 \cdot 10^{-4}$
P*S	$1.9 \cdot 10^{-6}$	1	0.058	0.810
Sp*S	$1 \cdot 10^{-6}$	2	0.178	0.836
T*S	$7.1 \cdot 10^{-7}$	3	0.041	0.988
P*Sp*T	$1.8 \cdot 10^{-5}$	6	1.113	0.357
P*Sp*S	$1.9 \cdot 10^{-6}$	2	0.203	0.816
P*T*S	$3 \cdot 10^{-6}$	3	0.410	0.745
Sp*T*S	$1 \cdot 10^{-5}$	6	0.654	0.686
P*Sp*T*S	$5 \cdot 10^{-5}$	6	0.286	0.942
Error	$3.7 \cdot 10^{-4}$	139		

**Tabla 7.2.** ANCOVA para las diferencias en la tasa metabólica entre especies, entre localidades muestreadas (poblaciones), entre tratamientos térmicos y entre sexos, con el peso considerado como covariable. Referencias: g.l.: grados de libertad. SC: suma de cuadrados.

Estos efectos fueron independientes de la masa corporal en la medida en que a ésta se la consideró como covariable en el ANCOVA. En todos los tratamientos térmicos, la tasa metabólica en las hembras fue mayor que en los machos. Paralelamente, las moscas provenientes de la localidad de menor altura exhibieron una mayor tasa metabólica que las de mayor altura. La única interacción significativa fue especie x tratamiento térmico (Tabla 7.2). Las comparaciones ‘*post hoc*’, realizadas para

interpretar dicha interacción, mostraron que la tasa metabólica a 17°C fue significativamente mayor en *D. buzzatii* y en *D. melanogaster* que en *D. simulans*, mientras que a 25°C la tasa metabólica en *D. melanogaster* fue significativamente mayor que en las otras dos especies (Figura 7.1). Asimismo, la tasa metabólica no varió significativamente entre regimenes de temperatura constante y alternada con media semejante (21°C).



**Figura 7.1.** Tasa metabólica media (sexos y localidades promediadas) en *D. buzzatii*, *D. melanogaster* y *D. simulans* expuestas a 4 tratamientos térmicos

### **Análisis del tiempo de desarrollo**

También se observó un amplio rango de variación en el tiempo de desarrollo entre localidades y entre especies en todos los tratamientos térmicos (Tabla 7.3). En *D. buzzatii* los valores mínimos y máximos de tiempo de desarrollo fueron registrados en las hembras de la localidad de menor altura a 25°C (298.2 hs.) y a 17°C (513.8 hs.). En *D. melanogaster*, el tiempo de desarrollo varió desde 212.6 hs. en machos de la

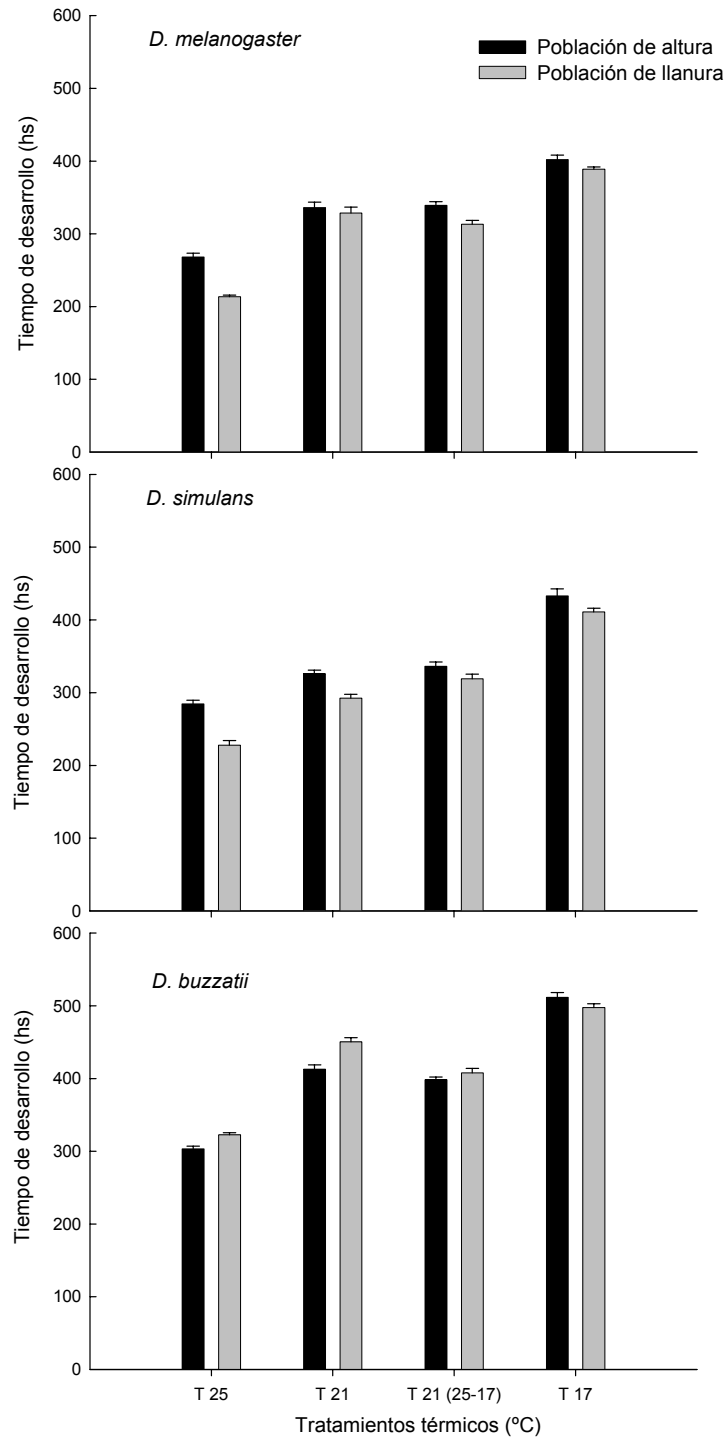
localidad de mayor altura a 411.1 hs. en machos de la localidad de menor altura a 25°C y a 17°C, respectivamente. Finalmente, el tiempo de desarrollo en *D. simulans* varió entre 227.5 hs. y 435.2 hs., en hembras de altura criadas a 25°C y machos de llanura criados a 17°C, respectivamente.

En los ANOVAs realizados para investigar el tiempo de desarrollo, todas las fuentes principales de variación –población, especie, tratamiento térmico y sexo– fueron significativas (Tabla 7.3). El tiempo de desarrollo fue, en promedio, mayor en moscas criadas a 17°C que en las expuestas a tratamientos térmicos con temperatura media mayor, y en machos respecto de hembras. Estas observaciones están de acuerdo con las relaciones negativas esperadas entre tiempo de desarrollo y la temperatura (Pétavy *et al.* 2001a) y con el dimorfismo sexual que se observa usualmente en *Drosophila*. Las interacciones dobles población x especie, población x tratamiento térmico, especie x tratamiento térmico y la interacción triple población x especie x tratamiento térmico fueron significativas en todos los casos. El patrón dado por la interacción triple se muestra en la Figura 7.2. Asimismo, las comparaciones *post hoc* entre especies no reveló diferencias significativas entre *D. melanogaster* y *D. simulans*, pero sí estas últimas se desarrollaron más rápidamente que *D. buzzatii*.

Tiempo de desarrollo	SC	g.l.	F	p
Localidad (L)	23946	1	38.44	1.4.10 <sup>-9</sup>
Especie (Sp)	688430	2	552.54	2.10 <sup>-3</sup>
Tratamiento térmico (TT)	1510184	3	808.06	3.10 <sup>-3</sup>
Sexo (S)	8827	1	14.17	1.9.10 <sup>-4</sup>
L*Sp	41080	2	32.97	5.7.10 <sup>-14</sup>
L*TT	12578	3	6.73	1.9.10 <sup>-4</sup>
Sp*TT	58717	6	15.71	3.3.10 <sup>-16</sup>
L*S	87	1	0.14	0.71
Sp*S	581	2	0.47	0.63
TT*S	1250	3	0.67	0.58
L*Sp*TT	19270	6	5.16	4.1.10 <sup>-5</sup>
L*Sp*S	440	2	0.35	0.71
L*TT*S	191	3	0.10	0.96
Sp*TT*S	2470	6	0.66	0.68
L*Sp*TT*S	2101	6	0.56	0.76
Error	246071	395		

**Tabla 7.3.** ANOVA para las diferencias en el tiempo de desarrollo entre especies, localidades, tratamientos térmicos y sexos. Referencia: SC: suma de cuadrados. g.l.: grados de libertad.

Las moscas de poblaciones de altura se desarrollaron más rápidamente que las de llanura tanto en *D. melanogaster* como en *D. simulans*, para todos los tratamientos térmicos. Sin embargo las respuestas de *D. buzzatii* fueron muy diferentes: la población de menor altitud se desarrolló más rápidamente que la de altura a 21°C y a 25°C. Los análisis comparando el efecto de regímenes constantes y alternados de temperatura revelaron respuestas especie-específicas. Por un lado, las diferencias entre regímenes térmicos no fueron significativas en *D. melanogaster* y en *D. simulans*. Por otro, el tiempo de desarrollo fue más corto en el tratamiento de temperaturas alternadas que en el de temperatura constante de 21°C. Curiosamente, las comparaciones entre regímenes (constante vs. alternado) en *D. buzzatii*, mostraron que la interacción fue principalmente debida a la localidad de mayor altura.



**Figura 7.2.** Tiempo de desarrollo en hs. (sexos promediados) en *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. buzzatii* colectados en localidades de diferente altitud expuestas a diferentes tratamientos térmicos.

## Conclusiones

El primer aspecto relevante de este capítulo es la correlación positiva observada entre la tasa metabólica y la masa corporal cuando las tres especies fueron consideradas como las unidades de análisis. Los análisis intraespecíficos revelaron una tendencia similar en la tasa metabólica en las tres especies (aunque fueron significativos en *D. melanogaster* y *D. simulans*). Estos resultados no son triviales en la medida en que los estudios en *D. melanogaster* han mostrado resultados contradictorios respecto a la relación entre la tasa metabólica y la masa corporal. En este sentido, nuestros estudios son coincidentes con los obtenidos en investigaciones recientes que muestran que la tasa metabólica y la masa corporal no se encuentran correlacionados a menores escalas jerárquicas (Van Voorhies *et al.* 2004), a diferencia de las correlaciones positivas observadas por otros autores en moscas derivadas de poblaciones naturales (Berrigan & Partridge 1997).

Del mismo modo, hay otras conclusiones interesantes que pueden extraerse del ANCOVA realizado para la tasa metabólica, en la que se consideró a la masa corporal como covariable. En primer lugar, nuestro trabajo muestra que la tasa metabólica es un carácter sexualmente dimórfico en la medida en que las hembras tienen mayor tasa metabólica que los machos, una característica común a las tres especies estudiadas y, notablemente, independiente de la masa corporal (se debe recordar aquí que en *Drosophila* tal como en otros insectos, los machos son generalmente más pequeños y livianos que las hembras). En segundo lugar, las diferencias entre localidades de altura y llanura son consistentes entre especies, sexos y tratamientos térmicos. Las moscas colectadas en la localidad de altura mostraron menor tasa metabólica que las moscas provenientes de llanura, sugiriendo que variables ambientales similares que correlacionan con la altitud podrían potencialmente afectar la tasa metabólica de un modo consistente entre especies. Además, es de destacar que en este sentido nuestros resultados son coincidentes con trabajos que muestran que la variación en la tasa metabólica correlaciona con gradientes geográficos (Berrigan & Partridge 1997).

El último elemento a ser analizado está vinculado con la variación interespecífica de la tasa metabólica. La interacción significativa “especie x tratamiento térmico” limita la posibilidad de ofrecer una explicación general respecto a los efectos de la temperatura, en la medida en que nuestros resultados mostraron respuestas

especie-específicas. En términos generales, *D. melanogaster* exhibió los valores más elevados de la tasa metabólica, seguido por su especie hermana *D. simulans*, y finalmente, por *D. buzzatii*. Del mismo modo, resulta interesante notar que las respuestas específicas fueron independientes de la localidad muestreada, esto es, las diferencias en la tasa metabólica entre localidades fueron de la misma magnitud y dirección en las tres especies y entre los diferentes tratamientos térmicos analizados. Aún cuando *D. simulans* y *D. melanogaster* se encuentran muy cercanas filogenéticamente, mostraron respuestas idiosincrásicas para los diferentes tratamientos térmicos.

Particularmente interesante es el caso de *D. buzzatii*. En esta especie la tasa metabólica de moscas criadas a 17°C fue significativamente mayor que en los tratamientos con mayor temperatura media, sugiriendo un posible efecto compensatorio. Los datos de estudios comparativos sugieren además que la compensación es una solución posible al problema de la variación de la temperatura. Más aún, la compensación es vista como adaptativa, en la medida en que permite obtener altos niveles de actividad en individuos que experimentan temperaturas más frías (Berrigan & Partridge 1997).

Respecto al tiempo de desarrollo, los patrones de variación difirieron en varios aspectos respecto del cuadro que mostró la tasa metabólica. La primera característica destacable es la correlación entre el tiempo de desarrollo y la masa corporal observada a nivel interespecífico, mientras que a nivel intraespecífico no sólo no se observó correlación en ninguna de las tres especies, sino que incluso el signo de los coeficientes fue negativo en todos los casos. Al igual que en el caso de la tasa metabólica, todas las fuentes de variación (especies, localidades, sexos y tratamientos térmicos) contribuyeron significativamente a la variación en el ANOVA. Sin embargo, todos los factores exceptuando a los sexos, estuvieron involucrados en interacciones de segundo y tercer orden, indicando que las diferencias entre localidades y entre tratamientos son especie-específicas. Considerando la interacción especie x localidad, nuestros resultados muestran que la predicción de una relación positiva entre el tiempo de desarrollo y la altitud sólo se comprobó en *D. buzzatii*, una tendencia que fue homogénea entre tratamientos térmicos. Sin embargo, en *D. simulans* y *D. melanogaster* el patrón fue el opuesto.

En general, los patrones de variación de la tasa metabólica y el tiempo de desarrollo difieren en algunos aspectos relevantes, sugiriendo que cada variable biológica respondería diferencialmente a la variación ambiental y/o a las condiciones experimentales. No obstante las tres especies están expuestas a las mismas condiciones macroambientales en la naturaleza, las dos variables biológicas respondieron de modos diferentes. En este sentido, podría argumentarse que las condiciones naturales imponen un régimen selectivo que promueve respuestas similares en la tasa metabólica en las tres especies, sugiriendo que la intensidad de las restricciones que gobiernan la evolución de la tasa metabólica y la del tiempo de desarrollo serían sustancialmente diferentes.

En resumen, nuestros resultados nos alertan respecto de la validez de extrapolar las llamadas reglas alométricas de la macroecología desde el nivel interespecífico al intraespecífico. El tiempo de desarrollo mostró una asociación negativa con la tasa metabólica, particularmente en las comparaciones entre sexos (dimorfismo sexual) y entre especies. Las moscas de menor tiempo de desarrollo presentaron mayor tasa metabólica tanto en *D. melanogaster* como en *D. buzzatii*. Por otro lado, *D. simulans* ocupó una posición intermedia en ambos casos. En contraste, en el nivel intraespecífico el menor tiempo de desarrollo estuvo asociado a valores mayores de la tasa metabólica (corregida por la masa) sólo en *D. buzzatii*. Esto último puede deducirse a partir del hecho que las moscas colectadas a menor altitud se desarrollaron más rápido y tuvieron mayores valores de tasa metabólica que las de la localidad de altura.

En conclusión, no observamos una coincidencia perfecta entre los niveles inter e intraespecíficos en relación a las predicciones de las reglas alométricas de la macroecología. En este sentido nuestro trabajo brinda apoyo experimental a la Tesis de (Kozlowski & Weiner 1997) quienes sostienen que diferentes factores podrían estar afectando la variación en caracteres fisiológicos en los niveles intra e interespecíficos.

Finalmente, es importante recordar que las inferencias dadas acerca de la relación entre la tasa metabólica y el tiempo de desarrollo están basadas en mediciones de adultos. Las moscas del género *Drosophila* son insectos holometábolos que pasan gran parte de su vida en estadios tempranos como larva y pupa, en los cuales podrían haber evolucionado adaptaciones a diferentes desafíos ambientales, incluso para una misma variable ambiental. En este sentido, resulta interesante preguntarnos si la respuesta de la tasa metabólica en adultos es representativa de los que ocurre en estadios juveniles o tempranos. Por lo tanto, indicamos que el estudio de las relaciones entre la



tasa metabólica y el tiempo de desarrollo en estadios tempranos del ciclo de vida podría ayudarnos a iluminar nuestro entendimiento de las relaciones alométricas en organismos con ciclos de vida complejos. De esto, precisamente, se trata el siguiente capítulo.

## **Capítulo 8. Alometrías ontogenéticas entre la tasa metabólica, el peso corporal y el tiempo de desarrollo en *Drosophila***

### **Resumen**

**Pregunta:** Según investigaciones realizadas en el área de la ecofisiología, el tiempo de desarrollo (TD), el peso corporal (PC) y la tasa metabólica (TM) se encuentran correlacionadas cuando se analizan niveles de organización superiores (*taxa* muy distanciados evolutivamente). Nuestra pregunta es: ¿se conservan estas relaciones a lo largo del ciclo de vida de un organismo holometábolo?

**Método:** En términos generales, la metodología fue similar a la desarrollada en el Capítulo 7. Nuevamente fueron registradas las variables tiempo de desarrollo (TD), peso corporal (PC) y tasa metabólica (TM) pero ahora en el estadio larval, pupal y adulto (ambos sexos) del ciclo de vida de *Drosophila*.

**Resultados:** En los análisis realizados los factores que explicaron porcentajes importantes de la variación fueron: el de especie (para el TD y el PC), temperatura (el TD) y el error (PC y TM). A la vez, nuestros resultados mostraron importantes diferencias entre los patrones de cada uno de los estadios, tanto para cada una de las variables medidas (principalmente para el TD) así como en cuanto a las relaciones alométricas entre las mismas.

**Conclusiones:** Los resultados sugieren variaciones importantes durante el desarrollo de los caracteres individuales y de sus relaciones alométricas. Esto implica que no deberían extrapolarse las hipótesis generadas en estudios realizados sobre el estadio reproductivo al resto de los estadios.

## Introducción

La fisiología comparada del desarrollo es una interfase fértil que emergió de la integración disciplinar entre la evolución, la fisiología y la biología del desarrollo. La importancia central de este campo interdisciplinario reside en que permite investigar el nexo entre la fisiología y las historias de vida (Burggren & Warburton 2005). Considerando además, que las funciones fisiológicas constituyen el nexo entre los organismos y el ambiente, la fisiología comparada del desarrollo proporciona un marco conceptual que permite aproximarnos a las causas de la diversificación de las historias de vida (Ricklefs & Wikelski 2002).

La ecofisiología ha propuesto varias reglas alométricas. Una de las más relevantes ha sido la indicada por Kleiber en 1932, que sostiene que el tamaño de los animales y su tasa de metabolismo se encuentran positivamente correlacionados (ver Figura 1.13, cap. 1). Posteriormente, un número importante de investigaciones han confirmado esta regla (Heusner 1982; Feldman & McMahon 1983; Addo-Bediako *et al.* 2002; Makarieva *et al.* 2005), explicada biológicamente a través de la idea que los organismos de mayor tamaño requieren una mayor ingesta (y/o calidad) de recurso para mantener sus funciones corporales. Asimismo, una gran cantidad de investigaciones han sugerido una aparente universalidad bioquímica de la materia viviente, la cual parece requerir una tasa uniforme de suplemento energético por unidad de masa para su mantenimiento, independientemente del tamaño del organismo de que se trate (Makarieva *et al.* 2005). Sin embargo, es importante remarcar que estas explicaciones y predicciones se han propuesto a partir de estudios que toman en cuenta niveles jerárquicos de organización superiores, esto es, a partir de comparaciones entre grandes *taxa*. Sin embargo, la extrapolación de “reglas” inferidas a partir de comparaciones entre grandes grupos a niveles de organización inferiores (por ejemplo entre especies cercanamente emparentadas o incluso entre poblaciones dentro de una misma especie) no está necesariamente garantizada. De este modo, los abordajes jerárquicos sugieren la necesidad de proponer hipótesis y ponerlas a prueba en los diferentes niveles (Van Voorhies *et al.* 2004).

Otra de las alometrías propuestas desde la ecofisiología, es la que relaciona el tiempo de maduración de los organismos (tiempo generacional) y el tamaño corporal (Millar & Zammuto 1983). Esta noción indica que los organismos de mayor tamaño corporal requieren necesariamente un mayor tiempo de gestación, relación que

nuevamente fue establecida a partir de la comparación entre *taxa* muy distanciados evolutivamente.

Si tomamos en cuenta las alometrías entre la tasa metabólica y el tamaño del cuerpo y, a la vez, la dada entre el tamaño y el tiempo generacional, es posible inferir una correlación positiva entre el tiempo generacional y la tasa metabólica. La importancia de esta relación alométrica es significativa en el marco de lo discutido en capítulos previos, ya que a partir de ella pueden plantearse hipótesis claramente delineadas acerca de las bases fisiológicas de la variación en el tiempo de desarrollo, algo que parece no haber sido estudiado con la profundidad necesaria hasta el presente.

Frecuentemente, la plasticidad fenotípica de un determinado genotipo está dada por las diferentes relaciones alométricas entre caracteres que ocurren a través de las sucesivas etapas por las que atraviesa un organismo durante su desarrollo. Estas alometrías –conocidas como alometrías ontogenéticas (ver Figura 1.15, cap. 1)– han sido objeto de una mayor atención en los últimos años a partir de la revalorización de los estudios de la biología del desarrollo (Schlichting & Pigliucci 1998).

En este sentido, los insectos holometábolos brindan una gran oportunidad para el estudio de las alometrías ontogenéticas, considerando las bruscas transiciones que ocurren a lo largo de la ontogenia (Pigliucci 1996; Schlichting & Pigliucci 1998). Del mismo modo, este tipo de estudio abre la posibilidad de entender los factores y las restricciones que gobiernan el desarrollo de un organismo (Garland & Carter 1994), en la medida en que permite el diseño de modelos teóricos que logren dar cuenta del *fitness* de un organismo como un todo y no reducido únicamente al estadio reproductivo del ciclo de vida (Chippindale et al. 1997). Pese a la reciente atención que se le ha prestado al estudio de las alometrías ontogenéticas, en la mayoría de los casos se han utilizado modelos biológicos vegetales y sólo excepcionalmente modelos animales.

Las alometrías pueden ser presentadas e indagadas a través de metodologías y técnicas estadísticas diversas. En general, se han establecido a partir de estudios de correlación entre estadísticos de centralidad de los caracteres sujetos a estudio. Sin embargo, hay vías alternativas que permiten recuperar información adicional biológicamente relevante. Una de ellas está dada por el análisis de la distribución de las varianzas de cada uno de los diferentes caracteres en las sucesivas etapas del ciclo de vida. Este tipo de abordaje no sólo aporta información con vistas a una mayor comprensión de los procesos evolutivos involucrados, sino que a su vez permite una comparación de la variación de caracteres de naturaleza diferente.

En este contexto, y tal como hemos abundado en capítulos anteriores, *Drosophila* constituye un excelente modelo para el estudio de las alometrías entre variables entre y dentro de los estadios del ciclo de vida. Al igual que en el capítulo anterior, se contó con material de tres especies de *Drosophila* derivado de muestreos realizados en dos localidades ubicadas a la misma latitud y que se encuentran a altitudes muy contrastantes. A su vez, los organismos experimentales fueron sometidos a diferentes regímenes térmicos (tres regímenes de temperatura constante y uno de temperaturas alternadas) dentro del rango térmico que las moscas enfrentan en su ambiente de origen (Loeschke *et al.* 1994; Partridge *et al.* 1994; Imasheva *et al.* 1997; Bublik & Loeschke 2005). Nuestro estudio se centra en la comparación de las varianzas de cada una de los caracteres, y el análisis de las alometrías tanto dentro de cada uno de los estadios (larva, pupa y adulto) del ciclo de vida así como a lo largo del desarrollo en las tres especies de *Drosophila*.

Las preguntas específicas que nos hemos realizado son:

i) ¿Cómo se distribuye la variación de un carácter de historia de vida (tiempo de desarrollo), otro relacionado con el tamaño del cuerpo (masa corporal) y una variable fisiológica (tasa metabólica) en diferentes especies, poblaciones e individuos sometidos a diferentes tratamientos térmicos?

ii) ¿Cómo se alteran los patrones de cada una de las variables y sus alometrías a lo largo del desarrollo de *Drosophila*?

## **Materiales y Métodos**

### **Poblaciones experimentales**

Las especies, las poblaciones muestreadas, los métodos de recolección de moscas y de obtención del material biológico que se usaron en los experimentos se han descrito en el Capítulo 7.

## **Diseño experimental**

Los coeficientes de correlación entre el tiempo de desarrollo, la tasa metabólica y la masa corporal se estimaron a partir de los individuos que nacieron en 432 tubos iniciales [72 para cada combinación especie (3) x localidad (2)]. En cada tubo se sembraron larvas de primer estadio conforme a la metodología descrita en el Capítulo 2. Los tubos fueron asignados aleatoriamente a 4 tratamientos térmicos; en tres de ellos la temperatura se mantuvo constante a 17°C, 21°C o 25°C, mientras que el restante se trató de un régimen de temperaturas alternadas, en el cual la temperatura varió entre 25°C durante las 12 hs. del período de luz y 17°C (temperatura nocturna) durante el período de oscuridad. Dos veces al día se eligió al azar un tubo del conjunto de réplicas correspondiente a cada combinación especie x población x tratamiento térmico. De cada tubo se tomaron todos los individuos y de cada uno se registró la masa (peso en grs.) y la tasa metabólica utilizando la misma metodología detallada en el capítulo anterior. Una vez realizadas las mediciones, los tubos (réplicas) se descartaron. Se decidió adoptar este protocolo con el objeto de que las estimaciones de las variables fueran independientes entre sí. El tiempo de desarrollo se registró mediante la técnica detallada en los Capítulos 4 y 5 para el tiempo larval, pupal y total. Salvo en los análisis realizados sobre las larvas del primer estadio (estadio en el que la tasa metabólica se midió para un conjunto de 5 individuos), en el resto de los estadios (larvas de segundo y tercer estadio, pupa y adulto) la medición de la tasa metabólica se realizó en larvas, pupas o moscas adultas individuales.

## **Análisis de los datos**

Tres grupos diferentes de pruebas estadísticas se llevaron a cabo en el presente estudio. En primer lugar, a los fines de determinar los factores responsables de la variación de la tasa metabólica, el peso corporal y el tiempo de desarrollo, se realizaron ANOVAs con el fin de estimar la contribución relativa de cada uno de los factores aleatorios a la varianza total para cada una de las variables en los diferentes estadios. Para esto los factores especie, tratamiento y localidad fueron considerados como factores aleatorios. De este modo, se lograron estimar los componentes de varianza de las interacciones superiores a los fines de investigar los patrones de distribución de la variación fenotípica para cada uno de los caracteres.

El segundo grupo de pruebas se hizo con el fin de investigar las alometrías entre la tasa metabólica, el tiempo de desarrollo y el peso corporal, mediante análisis de correlación entre pares de variables para cada uno de los estadios investigados. En el caso de los adultos las correlaciones se estimaron para cada sexo por separado.

Finalmente, se efectuó un estudio comparativo entre estadios para cada una de las variables. En este caso utilizamos el cociente entre los valores medios del TD, PC y TM registrados en los estadios larvales y pupales. Mientras que para el índice del peso se consideraron únicamente las larvas de tercer estadio, en el caso de la tasa metabólica se utilizaron todos los estadios larvales analizados. Los patrones de variación de los cocientes (TML/TMP, TDL/TDP y PCL/PCP) se analizaron mediante ANOVAs considerando nuevamente a la especie, la población y tratamiento como factores aleatorios. Se decidió considerar a los tres factores como aleatorios ya que, también en este caso, el objetivo principal fue determinar la contribución relativa de cada uno de ellos a la varianza total de los cocientes entre pares de variables. Debido a que no se utilizaron medidas dependientes, la asignación de los valores utilizados para cada índice (proveniente de cada una de las réplicas) fue dada a través de una asignación aleatoria.

Al igual que en los capítulos anteriores, las variables tasa metabólica, tiempo de desarrollo y peso corporal fueron transformadas logarítmicamente para garantizar su distribución normal. Para todos los análisis realizados, la homogeneidad de varianza fue verificada a través de un *test* de Levene. Todos los análisis estadísticos descriptos se realizaron utilizando el paquete estadístico Statistica Windows.

## **Resultados**

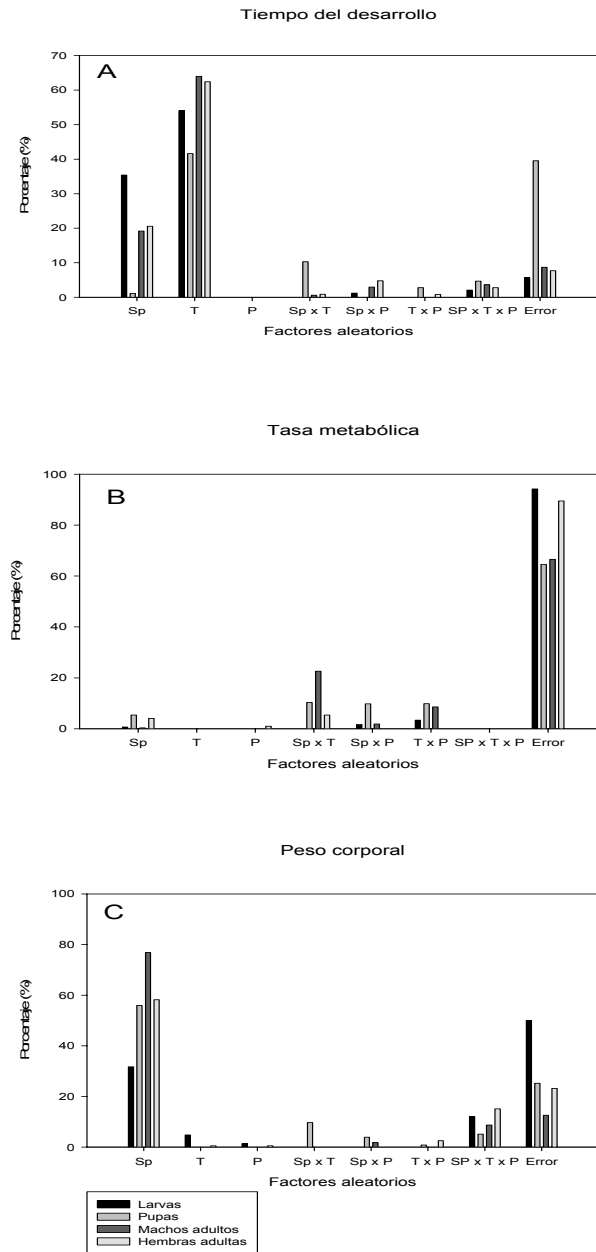
### **Análisis de variables individuales**

En general, los análisis de los componentes de varianza presentaron resultados no coincidentes entre las diferentes variables. En el caso del tiempo de desarrollo (TD) se observó que las diferencias entre los tratamientos lograban explicar la mayor parte de la varianza en todos los estadios analizados (Figura 8.1 A). En el estadio larval los factores especie (35.4%,  $p < 0.05$ ) y tratamiento (55%) dieron cuenta en su conjunto de más del 90% de la varianza. De todos los factores restantes, sólo la interacción triple fue significativa ( $p < 0.05$ , ver Tabla 8.2 del Anexo). En cambio, en el estadio pupal la

distribución de los porcentajes de varianza entre los factores para el TD se diferenció notablemente de lo observado en el estadio larval. En particular, una de las diferencias más marcadas y, a la vez, más interesantes desde el punto de vista biológico, fue el bajo porcentaje de varianza explicado por las diferencias interespecíficas ( $p > 0.05$ , ver Tabla 8.3 del Anexo). Coincidentemente con el estadio larval, el factor tratamiento explicó la mayor parte la varianza (41.6%,  $p < 0.05$ ), y se observó un aporte significativo de la interacción triple población x especie x tratamiento ( $p < 0.05$ , Tabla 8.3 del Anexo).

En el estadio adulto, el ANOVA mostró en términos generales patrones similares a los registrados en el estadio larval. En ambos sexos las diferencias entre tratamientos explicaron más del 60% de la varianza ( $p < 0.005$ , Tablas 8.4 y 8.5 del Anexo). A su vez, el factor especie dio cuenta de porcentajes de varianza similares en ambos sexos (aproximadamente 20% en ambos casos), e inferiores respecto de lo observado en las larvas. En ambos sexos ningún otro factor explicó porcentajes de varianza superiores al 10% (Figura 8.1 A). Los patrones similares observados en los dos sexos sugieren una ausencia de dimorfismo en lo que refiere a la contribución relativa de las fuentes de variación a la varianza total en los ANOVAs.





**Figura 8.1.** Componentes de varianza calculados a partir de los ANOVAs para el tiempo de desarrollo (A), la tasa metabólica (B) y el peso corporal (C) en los tres estadios del ciclo de vida analizados (larva, pupa, adulto). En el caso de la tasa metabólica en la etapa larval los valores representados corresponden a los tres estadios tomados en conjunto. En el caso del peso corporal se consideraron únicamente las larvas de los estadios superiores. Referencias: Sp: especie, T: temperatura, P: población.

Los resultados de los ANOVAs para la tasa metabólica (TM) difirieron significativamente de lo descrito para el tiempo de desarrollo. Para TM, el factor que explicó la mayor proporción de varianza fue el error (valor superior al 90%), esto es, las

diferencias entre individuos provenientes de las mismas poblaciones y especies, y sometidos a un mismo tratamiento durante su desarrollo. En tanto, en la pupa el factor error explicó el 64.5% de la varianza total (Fig. 8.1 B). Asimismo, la contribución de las interacciones dobles (especie x tratamiento, especie x población y tratamiento x población) que fueron significativas fue relativamente grande en el estadio pupal. Por último, los ANOVAs para la TM en adultos de ambos sexos mostraron diferencias notables respecto a los estadios previos. En este caso se observó que sólo la interacción especie x tratamiento fue significativa, dando cuenta de casi el 23% de la varianza en machos (22.6%) y poco más del 5% en hembras (Figura 8.1 B).

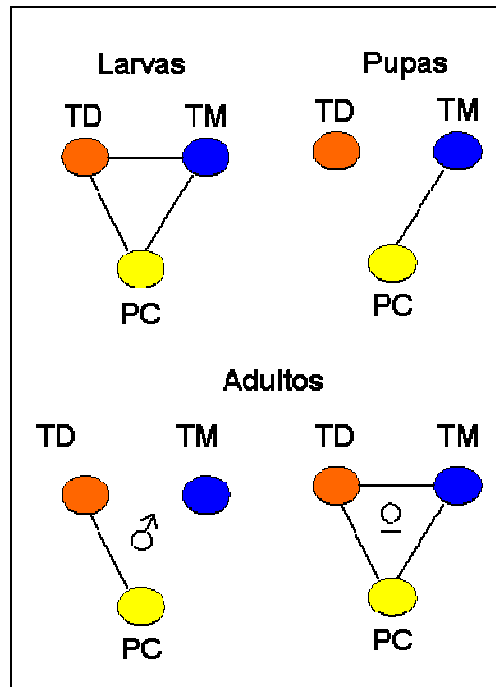
Finalmente, los ANOVAs realizados para el peso corporal (PC) presentaron un patrón claramente diferente respecto de las otras variables. Para el PC la mayor parte de la varianza fue explicada por diferencias entre especies en todos los estadios analizados, aunque sólo en el estadio pupal los valores fueron significativos ( $p < 0.05$ , Tabla 8.11 del Anexo). La mayor particularidad de los ANOVAs para el PC estuvo dada por la interacción triple. Si bien el porcentaje de varianza explicado por la interacción triple varió desde el 5.1% en la pupa hasta el 15.1% en las hembras adultas, la misma fue significativa en todos los estadios ( $p < 0.05$ ). A su vez, nuevamente el error contribuyó fuertemente a la varianza total, desde el 50% en la etapa larval a valores cercanos al 30% en los otros estadios (Figura 8.1 C). Las variaciones observadas en los porcentajes de varianza a través de los diferentes estadios larvales se presentan en el Anexo del presente capítulo (Figuras 8.4 y 8.5 del Anexo).

### **Alometrías estáticas, ontogenéticas y evolutivas**

A los fines de establecer si existe correlación entre la tasa metabólica, el tiempo de desarrollo y el peso corporal para los individuos derivados de ambas localidades de las tres especies, se calcularon los coeficientes de correlación entre pares de variables. Como puede verse, se observaron importantes diferencias en los patrones de correlación entre las diferentes etapas del ciclo de vida (Figura 8.2).

En el estadio larval todos los coeficientes de correlación fueron altamente significativos y positivos: TM-PC, TM-TD y TD-PC (Figura 8.2, Tabla 8.1). En cambio, en el estadio pupal sólo el coeficiente de correlación entre TM y PC fue significativo (Figura 8.2, Tabla 8.1). Por su parte, las correlaciones entre TD y PC y entre TM y TD no fueron significativas (Figura 8.2, Tabla 8.1). Finalmente, en el

estadio adulto se observaron diferencias respecto a los otros estadios y, sorprendentemente, entre sexos. Por un lado, en las hembras las correlaciones entre TM y TD, entre TM y PC y entre TD y PC fueron significativas. En contraste, en los machos sólo la correlación entre TD y PC fue significativa, en tanto que los coeficientes de correlación entre TM y TD y entre TM y PC no fueron significativos. Estos resultados no sólo sugieren diferencias importantes en cuanto a las alometrías ontogenéticas (ver la definición de los diferentes tipos de alometría presentada en el Capítulo 1) sino que además insinúan importantes diferencias entre los sexos en las relaciones alométricas entre caracteres.



**Figura 8.2.** Diagrama de las correlaciones entre caracteres. Las líneas que conectan variables indican correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ) y positivas entre pares de variables. Referencias: PC: peso corporal, DT: tiempo de desarrollo, MR: tasa metabólica.

Estadios	TM-PC		PC-TD		TM-TD	
	r	p	r	p	r	p
Larva	0.81	<0.0001	0.59	0.002	0.52	0.009
Pupa	0.76	<0.0001	-0.14	0.49	-0.26	0.21
Adulto	0.48	<0.001	0.79	<0.0001	0.51	<0.0001
Hembras	0.51	0.011	0.79	<0.0001	0.78	<0.0001
Machos	0.17	0.44	0.51	0.011	0.08	0.69

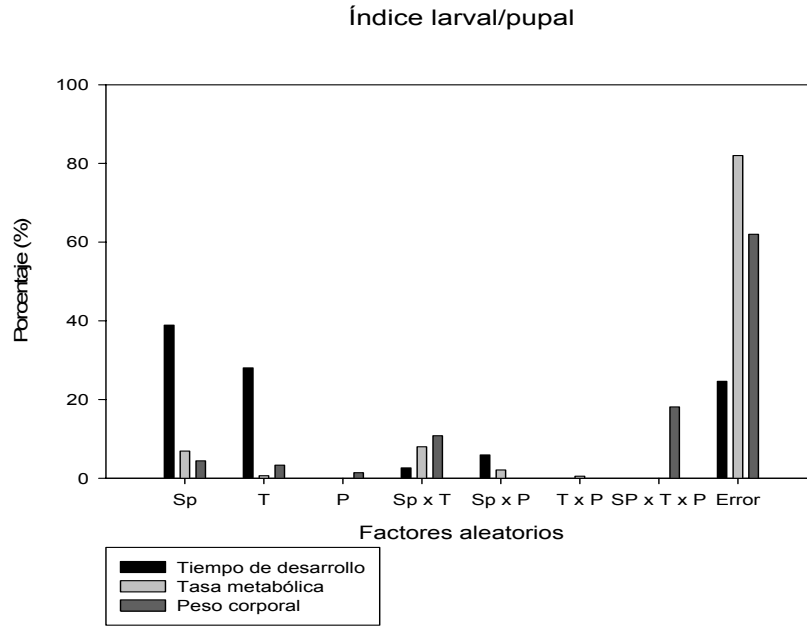
**Tabla 8.1.** Índices de correlaciones (r) y significancia (p) de las alometrías entre la tasa metabólica (TM), el peso corporal (PC) y el tiempo de desarrollo en los diferentes estadios del ciclo de vida.

El último grupo de análisis se realizó con el fin de examinar los efectos relativos de los diferentes factores estudiados sobre las variables investigadas en cada etapa del ciclo de vida. Con este fin utilizamos un índice similar a los descriptos en el Capítulo 5. Para cada una de las variables (tiempo de desarrollo, la tasa metabólica y el peso corporal) se calcularon cocientes entre los valores registrados en los estadios larvales y pupales. Este índice permite analizar la magnitud de los cambios en las variables investigadas entre etapas del desarrollo.

El índice del TD (TDL/TDP) mostró valores de varianza explicados principalmente por los factores especie (38.9%) y tratamiento (28.0%). Excepto por el término de error (24.6%), el resto de los factores mostró valores inferiores al 10% (Figura 8.3).

En el caso de la tasa metabólica, salvo en el término error (variaciones entre individuos de la misma localidad, de similar especie y desarrollados a la misma temperatura) que alcanzó un valor de 82%, ninguno de los factores restantes mostraron contribuciones superiores al 10% de la varianza total. Sin embargo, los valores fueron diferentes en los diversos estadios larvales (ver Figura 8.6 del Anexo)

Por último, los patrones de variación del índice de peso corporal difirieron respecto de lo observado en los análisis individuales del PC. El ANOVA realizado con los valores del cociente de PC (PCL/PCP) reveló, contrariamente a lo observado para TD y TM, que solamente la interacción especie x tratamiento y, principalmente, la interacción triple especie x población x tratamiento térmico contribuyeron significativamente a la varianza total (18% en ambos casos, Figura 8.3).



**Figura 8.3.** Análisis de las alometrías ontogenéticas. Se indican las contribuciones relativas de cada uno los factores (principales e interacciones) a la varianza de los índices de tiempo de desarrollo (TDL/TDP), la tasa metabólica (TML/TMP) y el peso corporal (PCP/PCL) registrados en los estadios larval y pupal. En el caso de la tasa metabólica los valores que se utilizaron en el cálculo del índice corresponden a las mediciones realizadas en larvas de los tres estadios larvales. En el caso del peso corporal solo se consideraron las mediciones realizadas en las larvas del tercer estadio. Referencias: Sp: especie, T: temperatura, P: población.

## Conclusiones

En los capítulos anteriores analizamos los diferentes patrones de variación en caracteres de historia de vida (tiempo de desarrollo, viabilidad y tamaño corporal) y en la tasa metabólica en respuesta a la variación en la temperatura, tanto en la naturaleza como bajo condiciones experimentales. En este capítulo nos hemos centrado en las variaciones de estos caracteres a lo largo del ciclo de vida de *Drosophila*.

La búsqueda por comprender los fenómenos que ocurren durante el desarrollo de un organismo, ha llevado en los últimos años a dos tipos diferentes de teorías antagónicas entre sí (ver Capítulo 5 para mayor detalle). La primera de ellas propone que los diferentes estadios del ciclo de vida presentan una respuesta equivalente frente a los cambios ambientales (isomorfismo en la respuesta). La segunda teoría indica que la respuesta a los cambios ambientales varía en función del estado interno de los organismos. Esta línea de razonamiento, lleva a pensar al estado interno como una parte

significativa del ambiente que enfrenta un organismo. La justificación de ello es clara: si recordamos que el ciclo de vida está acompañado por fuertes variaciones en los patrones de expresión de los genes y del ambiente fisiológico de un organismo, podemos considerar a estas alteraciones dentro del ciclo de vida como variaciones del “ambiente interno” de un organismo. De este modo, los cambios que sufren los organismos a lo largo de la ontogenia pasan a formar parte del “ambiente”, entendido en un sentido amplio.

A los fines de la comparación entre ambos escenarios teóricos, podemos ver en este capítulo tres grupos de resultados que sugieren que estos cambios ambientales “internos” (discretizados aquí conforme a las etapas del ciclo de vida: larval, pupal y adulto) tienen efectos importantes en las respuestas de cada una de las variables analizadas y en los patrones alométricos a los factores considerados en los experimentos.

### **Patrones de variación de los caracteres a lo largo del desarrollo.**

La búsqueda de evidencias que aporten en dirección de una u otra teoría, puede darse a través de diferentes enfoques metodológicos. Uno de los enfoques utilizados en este trabajo es la comparación de los componentes de varianza de cada una de las variables entre los estadios. De este modo, el primer grupo de resultados proviene del análisis de los componentes de varianza explicados por los diferentes factores (especie, tratamiento térmico, población) para cada una de las variables a lo largo del ciclo de vida de las especies de moscas de la fruta.

Temperatura: Sorpresivamente, el tiempo de desarrollo fue la única variable que presentó contribuciones significativas por parte del factor tratamiento, siendo significativo para todos los estadios analizados. Estos resultados complementan lo que se ha presentado y discutido en los Capítulos 4, 5 y 7, en los que se mostraron coincidentemente con la literatura (Partridge *et al.* 1994; James *et al.* 1997; Bochdanovits & De Jong 2003a; Santos *et al.* 2004; Santos *et al.* 2006), fluctuaciones importantes en el tiempo de desarrollo larval, pupal y total ante la variación de la temperatura durante la ontogenia.

En el caso de la tasa metabólica, los resultados mostraron efectos no significativos. Sin embargo, debe considerarse aquí su forma de medición, registrada a través de un experimento de “jardín común” considerando una aclimatación previa a

una misma temperatura de 25°C de los individuos que se midieron. De todos modos, debe mencionarse que esta metodología se eligió a los fines de poder realizar estudios comparativos entre grupos sometidos a diferentes tratamientos.

En el caso de la masa, los resultados son sumamente interesantes y se vinculan con lo discutido en los Capítulos 2 y 6. Recordemos que en el Capítulo 2 fueron reconocidas fluctuaciones importantes en la longitud de diferentes partes del cuerpo (fémur y ala) frente a la variación en la temperatura. Considerando todos estos resultados en su conjunto, se sugieren respuestas diferenciales de la longitud corporal y la masa (ambos sugeridos en la literatura como indicadores del “tamaño corporal”). Esta diferencia entre ambas medidas del tamaño corporal se enlaza con lo discutido en el Capítulo 6, permitiendo una primera respuesta negativa respecto a la pregunta que interroga sobre una relación directa entre ambas variables.

Especie: La duración de la etapa larval y el tiempo total en alcanzar el estadio adulto mostraron importantes diferencias entre las especies, lo cual da cuenta del elevado porcentaje explicado por este factor. En oposición, la duración del estadio pupal no presentó mayores diferencias entre las especies analizadas, siendo un resultado muy interesante en la medida en que estamos comparando especies alejadas evolutivamente que han divergido hace 50 millones de años, aproximadamente. Esto termina de confirmar un aspecto novedoso de este trabajo: la duración del estadio de la pupa no parece contribuir significativamente a las diferencias entre especies en el tiempo de desarrollo, sugiriendo una gran conservación en el ‘*timing*’ de los procesos fisiológicos, que desembocan en la emergencia de la mosca adulta, ocurren durante la última etapa de la metamorfosis entre las especies de *Drosophila* (esta problemática será profundizada en el Capítulo 9).

Población: En general la contribución de las diferencias entre poblaciones de altura y llanura a la varianza total fue escasa, más allá de que el factor población fuera significativo. Si bien las poblaciones de altura y llanura se diferencian en el TD, tales diferencias parecen ser pequeñas en comparación con los otros factores considerados en el estudio.

Interacciones: Si bien los porcentajes de varianza explicados por las interacciones no fueron elevados, algunas interacciones fueron significativas. Sin embargo, las interacciones que fueron significativas difirieron entre los caracteres analizados. En los casos del tiempo de desarrollo y del peso corporal, en la mayoría de los análisis se observaron efectos significativos de la interacción triple población x

especie x tratamiento térmico. Diferente fue el caso de la tasa metabólica, en la que sólo en el caso de la pupa y de los machos adultos pudieron observarse efectos significativos de una o más interacciones dobles.

Hasta aquí hemos analizado el aporte de los factores a la varianza de cada uno de los caracteres analizados. Sin embargo, debe mencionarse que las metodologías de medición de cada una de las variables conllevan a errores de medición de magnitud diferente. Debido a esto, nuestros resultados pueden admitir dos interpretaciones alternativas: la primera, no es de carácter biológico y está relacionada con las características de la medición realizada para cada uno de los estadios y variables. La segunda interpretación está dada por la consideración que los patrones registrados poseen en efecto un correlato con la biología de estos organismos, por lo que las diferencias entre los caracteres y entre los estadios, confirmarían la hipótesis de una respuesta diferencial para cada uno de los estadios a los cambios ambientales. Sin embargo, a los fines de aportar mayor cantidad de elementos a esta problemática, analicemos los patrones alométricos que han sido registrados en este capítulo.

### **Comparación de los patrones de variación entre estadios: la transición larva a pupa.**

El segundo grupo de resultados permite analizar las variaciones que ocurren en los caracteres en la transición larva-pupa. Los mismos fueron obtenidos a partir del análisis de un índice que consiste en el cociente de los valores registrados en la larva y en la pupa para cada uno de los caracteres.

Tratamiento: Nuevamente el porcentaje de varianza que explican las variaciones del índice tiempo de desarrollo entre tratamientos fue elevado, lo cual acompaña una de las conclusiones avanzadas en el Capítulo 5: los tratamientos afectan diferencialmente la duración de los estadios larval y pupal. Estos resultados indican que un incremento en el tiempo larval no está necesariamente acompañado por incrementos de magnitud y signo similar en el tiempo pupal. Diferente es el caso de la tasa metabólica y el peso corporal, para las cuales las diferencias entre estadios no pueden ser explicadas por las diferencias entre tratamientos.

Especie: Al igual que para la temperatura, este factor dio cuenta de una parte importante de la variación en el índice del tiempo de desarrollo, lo cual acompaña otra conclusión adelantada en el Capítulo 5: el tiempo de desarrollo larval y pupal no



parecen variar isométricamente entre especies. En oposición, la contribución dada para los índices de tasa metabólica y de peso corporal fue muy baja. Estos resultados sugieren que las especies presentaron diferencias similares para estos caracteres entre el estadio larval y el estadio pupal.

Población: Tal como se observó para las variables individuales, en general las diferencias entre poblaciones contribuyeron escasamente a la varianza de los índices. Sin embargo, cabe observar que las mayores contribuciones estuvieron dadas por las interacciones, principalmente la dada para el peso corporal por la interacción triple “población x especie x tratamiento”.

### **Alometrías ontogenéticas**

El tercer grupo de resultados es el que surge del análisis de las relaciones alométricas entre pares de caracteres para cada uno de los estadios analizados. Por ello, se estudiaron las variaciones ontogenéticas de los tres caracteres entre los estadios larval, pupal y adulto.

Tal como se ha indicado en la introducción del Capítulo 8, se conoce que los tres caracteres analizados en este trabajo se encuentran correlacionados, al menos en estudios que consideran al estadio reproductivo y a *taxas* muy distanciadas evolutivamente para su análisis. Sin embargo, estas correlaciones solamente pudieron confirmarse en el estadio larval en el caso de los estadios no reproductivos. De hecho, la pupa únicamente presentó valores significativos para la relación entre la tasa metabólica y la masa, en tanto que el tiempo de desarrollo no estuvo correlacionado con ninguna de las otras variables. Por otro lado, para el caso de los adultos se observó un interesante dimorfismo sexual en cuanto a las relaciones alométricas entre variables. Mientras que en las hembras se verificaron todas las correlaciones entre las variables, en los machos sólo la relación entre el tiempo y la masa corporal fue significativa.

Todos estos resultados analizados en su conjunto agregan evidencias en favor de la teoría que sostiene que la respuesta de los organismos es dependiente del estado interno de los mismos, sobre todo para el tiempo de desarrollo. En oposición, las otras dos variables presentan un mayor grado de canalización.

En el próximo capítulo intentaremos integrar los resultados más relevantes de esta Tesis, y de evaluarlos en el marco de las particularidades biológicas de cada uno de los estadios a los fines de interpretarlos en un marco ecológico-evolutivo.

## Anexo

### Tiempo de desarrollo

Tiempo larval	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	0,046	1,6	0,031	1,5	0,373
Especie (2)	2	0,571	2,3	0,038	14,8	0,047
Tratamiento (3)	3	0,651	1,5	0,007	97,9	0,026
1*2	2	0,035	6	0,007	5	0,052
1*3	3	0,003	6	0,007	0,5	0,706
2*3	6	0,01	5,9	0,007	1,5	0,324
1*2*3	6	0,007	212	0,001	5,2	5.10 <sup>-5</sup>

**Tabla 8.2.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para el tiempo larval. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Tiempo pupal	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	0,005	0,7	0,006	0,8	0,594
Especie (2)	2	0,024	3,2	0,018	1,3	0,377
Tratamiento (3)	3	0,266	5,5	0,029	9,3	0,014
1*2	2	0,001	6	0,007	0,2	0,839
1*3	3	0,012	6	0,007	1,7	0,271
2*3	6	0,024	6	0,007	3,4	0,081
1*2*3	6	0,007	212	0,003	2,2	0,044

**Tabla 8.3.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para el tiempo pupal. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Tiempo adulto macho	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	9081,2	2,0	9629,4	0,9	0,431
Especie (2)	2	127203,1	3,9	13552,9	9,4	0,033
Tratamiento (3)	3	260088,5	4,3	4612	56,4	0,001
1*2	2	9253,5	5,9	1668,3	5,5	0,043
1*3	3	1751,6	5,9	1665,1	1	0,436
2*3	6	4449,9	5,9	1642,1	2,7	0,126
1*2*3	6	1637,1	198	675,57	2,4	0,028

**Tabla 8.4.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para el tiempo total considerando sólo a los machos. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Tiempo adulto hembra	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	5221,8	2,1	14917,9	0,4	0,61
Especie (2)	2	141660,6	3,6	19614,7	7,2	0,055
Tratamiento (3)	3	253473,2	4,8	6287,2	40,3	0,001
1*2	2	14119,1	6,1	1980,7	7,1	0,026
1*3	3	2341,0	6,0	1974,1	1,2	0,391
2*3	6	5805,8	6,0	1936,9	2,9	0,104
1*2*3	6	1928,6	197	570,1	3,4	0,003

**Tabla 8.5.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para el tiempo total considerando sólo a las hembras. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Tasa metabólica larval	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	$4.3 \cdot 10^{-4}$	3,8	0,348	$1.2 \cdot 10^{-3}$	0,974
Especie (2)	2	0,266	1,7	0,157	1,7	0,395
Tratamiento (3)	3	0,099	2,7	0,22	0,4	0,738
1*2	2	0,165	4,6	0,044	3,8	0,108
1*3	3	0,226	5,1	0,045	5	0,057
2*3	6	0,041	5,5	0,047	0,9	0,569
1*2*3	6	0,048	205	0,179	0,269	0,951

**Tabla 8.6.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para la tasa metabólica larval. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Tasa metabólica pupal	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	0,064	4,3	0,572	0,1	0,754
Especie (2)	2	0,836	4,2	0,492	1,7	0,289
Tratamiento (3)	3	0,392	6,6	0,415	0,9	0,472
1*2	2	0,319	3,9	0,013	25,4	0,005
1*3	3	0,247	3,9	0,013	19,5	0,008
2*3	6	0,174	4,5	0,013	13,3	0,009
1*2*3	6	0,015	116	0,088	0,2	0,985

**Tabla 8.7.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para la tasa metabólica pupal. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Tasa metabólica adultos machos	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	0,021	3,1	0,072	0,3	0,622
Especie (2)	2	0,107	5,8	0,101	1,1	0,407
Tratamiento (3)	3	0,022	6,8	0,131	0,2	0,913
1*2	2	0,029	6,2	0,017	1,7	0,258
1*3	3	0,058	6	0,017	3,4	0,093
2*3	6	0,087	5	0,015	5,7	0,039
1*2*3	6	0,016	64	0,029	0,5	0,776

**Tabla 8.8.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para la tasa metabólica de los machos adultos. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Tasa metabólica adultos hembras	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	0,036	0,2	0,012	2,9	0,676
Especie (2)	2	0,108	1,9	0,046	2,3	0,307
Tratamiento (3)	3	0,015	1,9	0,043	0,4	0,797
1*2	2	0,026	5,4	0,035	0,7	0,521
1*3	3	0,022	5,3	0,035	0,6	0,621
2*3	6	0,055	5,8	0,035	1,6	0,303
1*2*3	6	0,035	78	0,04	0,9	0,516

**Tabla 8.9.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para la tasa metabólica de las hembras adultos. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Peso corporal larval	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	1,102	0,3	0,368	2,9	0,625
Especie (2)	2	12,36	0,2	0,332	37,3	0,507
Tratamiento (3)	3	1,72	0,4	0,383	4,5	0,578
1*2	2	0,625	5,7	0,988	0,6	0,565
1*3	3	0,69	5,7	0,968	0,7	0,58
2*3	6	0,65	5,8	0,952	0,7	0,674
1*2*3	6	0,929	119	0,399	2,3	0,037

**Tabla 8.10.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para el peso corporal de las larvas. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Peso corporal pupal	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	0,716	2,2	1,203	0,6	0,515
Especie (2)	2	19,758	4,2	1,831	10,8	0,022
Tratamiento (3)	3	0,826	4,9	1,296	0,6	0,623
1*2	2	1,014	6,0	0,395	2,6	0,156
1*3	3	0,497	6,2	0,4	1,2	0,372
2*3	6	1,15	5,9	0,38	3,0	0,104
1*2*3	6	0,375	116	0,177	2,1	0,056

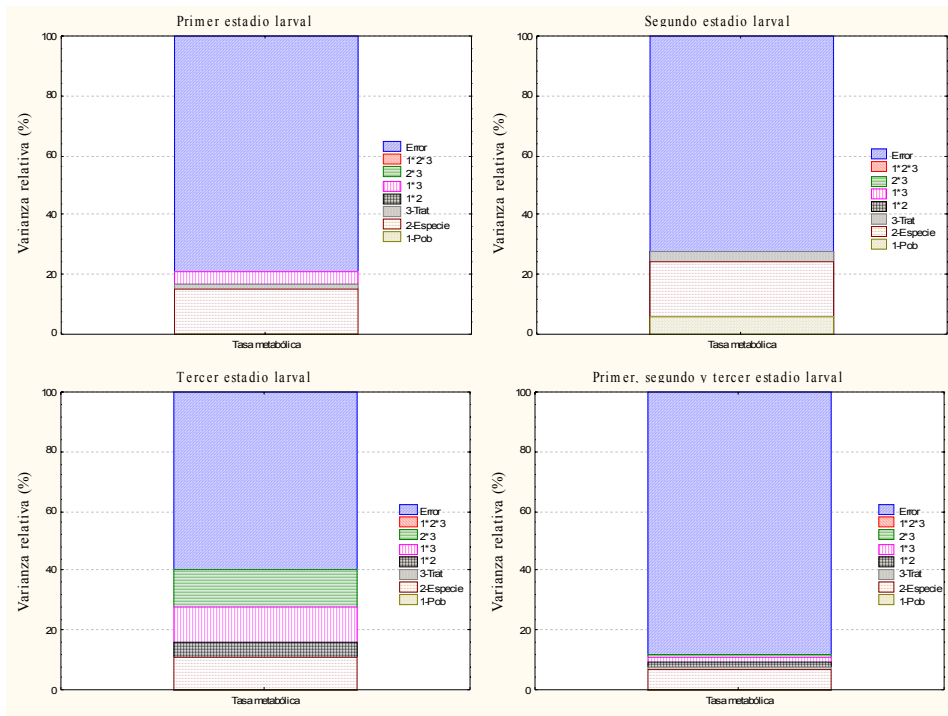
**Tabla 8.11.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para el peso corporal de las pupas. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Peso corporal adultos machos	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	0,001	2,4	0,350	$4 \cdot 10^{-3}$	0,953
Especie (2)	2	8,218	1,6	0,261	31,5	0,050
Tratamiento (3)	3	0,09	1,4	0,151	0,6	0,693
1*2	2	0,251	6,1	0,159	1,6	0,28
1*3	3	0,144	6,1	0,159	0,9	0,493
2*3	6	0,16	5,8	0,157	1,0	0,493
1*2*3	6	0,152	64	0,045	3,4	0,006

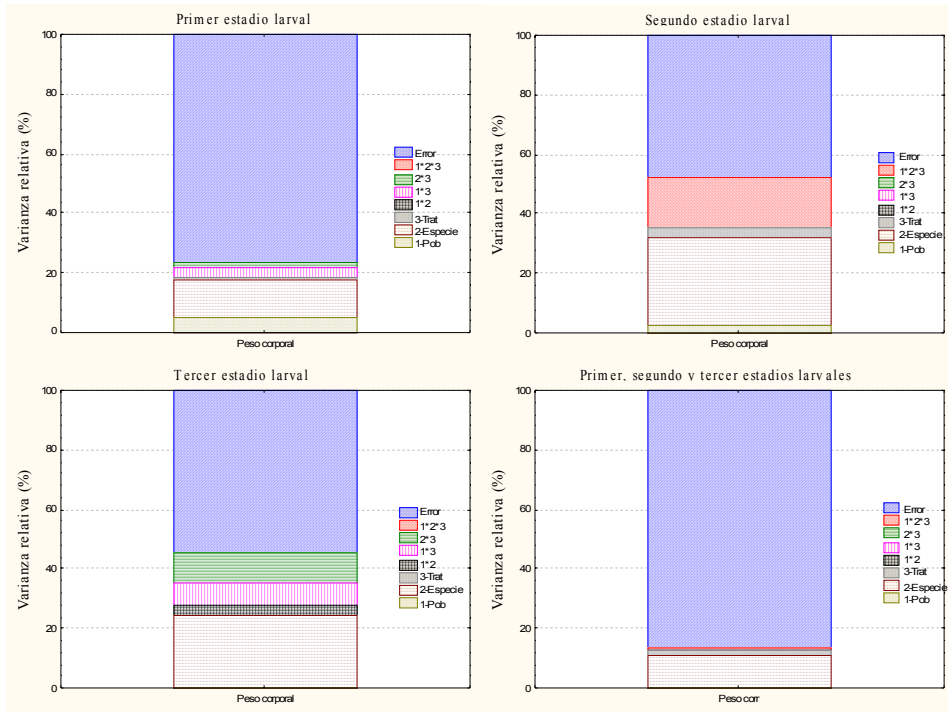
**Tabla 8.12.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para el peso corporal de los machos adultos. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.

Peso corporal adultos hembras	Factor		Error		F	p
	g.l.	C.M.	g.l.	C.M.		
Población (1)	1	0,379	1,4	0,316	1,2	0,425
Especie (2)	2	5,271	0,7	0,171	30,8	0,198
Tratamiento (3)	3	0,29	1,4	0,256	1,1	0,542
1*2	2	0,225	5,9	0,231	1,0	0,429
1*3	3	0,311	5,9	0,23	1,3	0,346
2*3	6	0,168	5,9	0,223	0,8	0,63
1*2*3	6	0,221	78	0,06	3,6	0,003

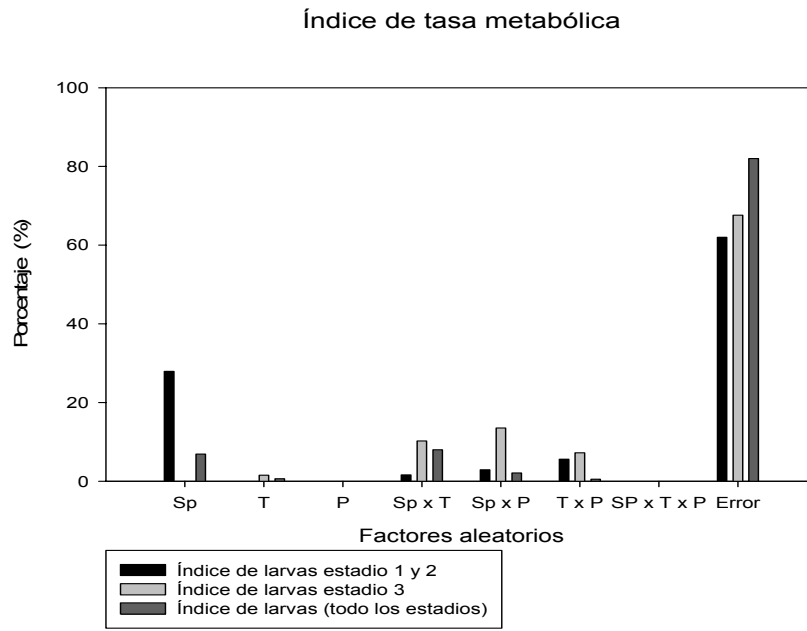
**Tabla 8.13.** Análisis de componentes de varianza analizando los factores población, especie y tratamiento térmico para el peso corporal de las hembras adultos. Referencias: C.M.: cuadrados medios. g.l.: grados de libertad.



**Figura 8.4.** Contribución relativa de los factores población, especie y temperatura, y sus respectivas interacciones a la varianza de la tasa metabólica (en %). Referencias: Pob: población. Trat: tratamientos térmicos.



**Figura 8.5.** Contribución relativa de los factores población, especie y temperatura, y sus respectivas interacciones a la varianza del peso corporal (en %). Referencias: Pob: población. Trat: tratamientos térmicos.



**Figura 8.6.** Variación del índice de la tasa metabólica para los diferentes estadios larvales. Referencias: Sp: especie, T: temperatura, P: población.

## **Capítulo 9. Conclusiones generales**

### **Hipótesis sobre los caracteres y las alometrías en diferentes niveles jerárquicos**

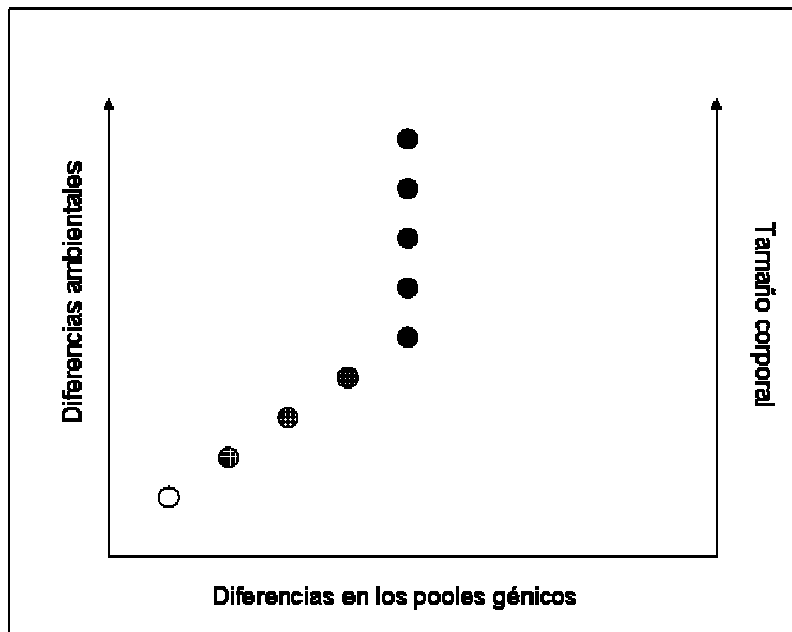
Durante el recorrido de esta Tesis, hemos podido analizar diferentes hipótesis que fueron esgrimidas tanto desde niveles jerárquicos en donde actúan procesos evolutivos (ej.: interpoblacionales, interespecíficos) como desde los vinculados al desarrollo de un individuo (tal como los análisis de plasticidad realizados en diferentes condiciones de cría). En términos generales, la formulación de una hipótesis busca explicar un conjunto de fenómenos particulares. Considerando esto, uno de los requisitos epistémicos al abordar cualquier problemática científica, es la explicitación del denominado “campo de aplicación” asociado a la hipótesis sostenida. Sin embargo, con cierta frecuencia puede reconocerse en la bibliografía específica, que las hipótesis elaboradas a partir de determinadas problemáticas (por ejemplo las realizadas sobre la variación de los caracteres fisiológicos y/o de historia de vida) suelen ser presentadas mediante un panorama impreciso en cuanto a cuál es su “campo de aplicación”. Esta imprecisión es un problema importante para cualquier campo científico, pero más aún en la medida en que se trabaje con diferentes niveles de organización. De hecho, la idea de que explicaciones generadas a partir de un único nivel jerárquico puedan aplicarse al resto de los niveles estudiados, ha sido cuestionada reiteradamente a partir de la proliferación de disciplinas y subdisciplinas en la biología moderna.

Desde la década del 30’, a partir de la consolidación de la teoría sintética de la evolución, el reconocimiento de las propiedades de diferentes niveles de organización ha sido fundamental a los fines de delimitar aquellos niveles en los que actúan mecanismos evolutivos, de aquellos otros asociados al desarrollo de un individuo. La distinción clara entre ambos tipos de escenarios conlleva a una pregunta que no ha sido abordada con la profundidad que amerita en la literatura especializada: ¿deben ser planteadas las mismas hipótesis/predicciones en los escenarios interpoblacionales y en los escenarios de plasticidad?

Para responder a esta pregunta debemos comparar los resultados obtenidos en los estudios interpoblacionales (a lo largo de gradientes ambientales) con los escenarios de plasticidad (generados a partir de diferentes tratamientos térmicos durante el



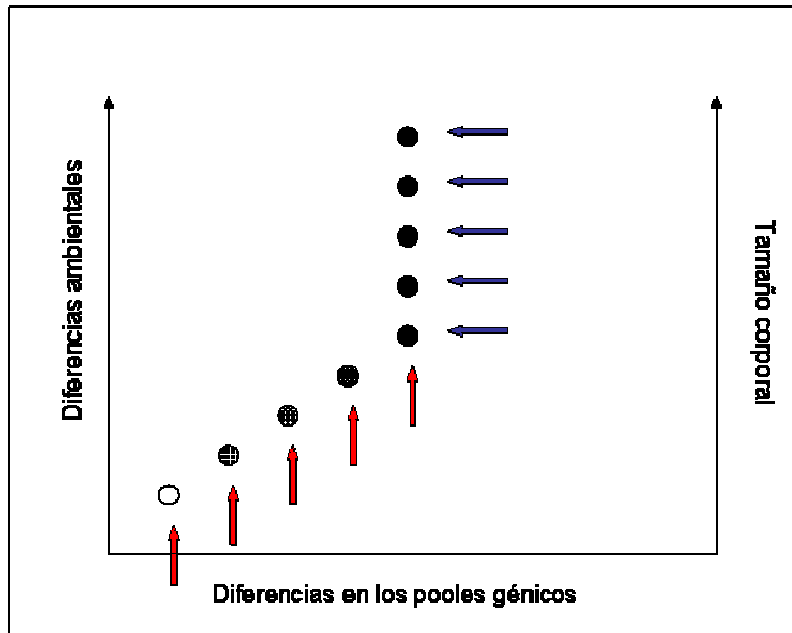
desarrollo). En primer lugar, centrémonos en los estudios que se presentaron en el Capítulo 2 donde se analizaron las variaciones en el tamaño corporal. Tal como hemos planteado previamente, las hipótesis sostenidas en la bibliografía específica respecto a la variación del tamaño corporal entre poblaciones (que poseen diferenciación genética) y entre tratamientos térmicos (diferencias plásticas) son, en términos generales equivalentes. En ambas, las predicciones indican que los organismos criados a menores temperaturas ambientales presentarán mayores tamaños corporales (Figura 9.1).



**Figura 9.1.** Predicciones equivalentes para los casos de variación en el tamaño corporal en comparaciones interpoblacionales (las diferencias en los *pools* génicos son representadas con círculos con diferentes intensidades de grises, mientras que los casos de plasticidad se lo simboliza con círculos negros).

En efecto, sin que las causas evolutivas queden claramente establecidas –dado que se ha trabajado con organismos ectotermos– las hipótesis fueron confirmadas, tanto en el caso del estudio interpoblacional a lo largo de gradientes ambientales, así como en el estudio de plasticidad a diferentes temperaturas. En términos generales, uno y otro escenario parecen haber presentado los “mismos” patrones de variación del tamaño corporal (Figura 9.2). Sin embargo, esta aparente equivalencia debe ser evaluada cuidadosamente. Los procesos y mecanismos que les dan origen son evidentemente diferentes (simbolizados con colores diferentes en la Figura 9.2). Es decir, mientras en

el caso de la plasticidad se tratan de procesos vinculados al desarrollo (plasticidad fenotípica), en el caso de los gradientes ambientales ocurren procesos evolutivos (selección natural). A partir de esto nos planteamos otra pregunta: ¿cuál es la relación que existe entre la plasticidad fenotípica y los procesos evolutivos?

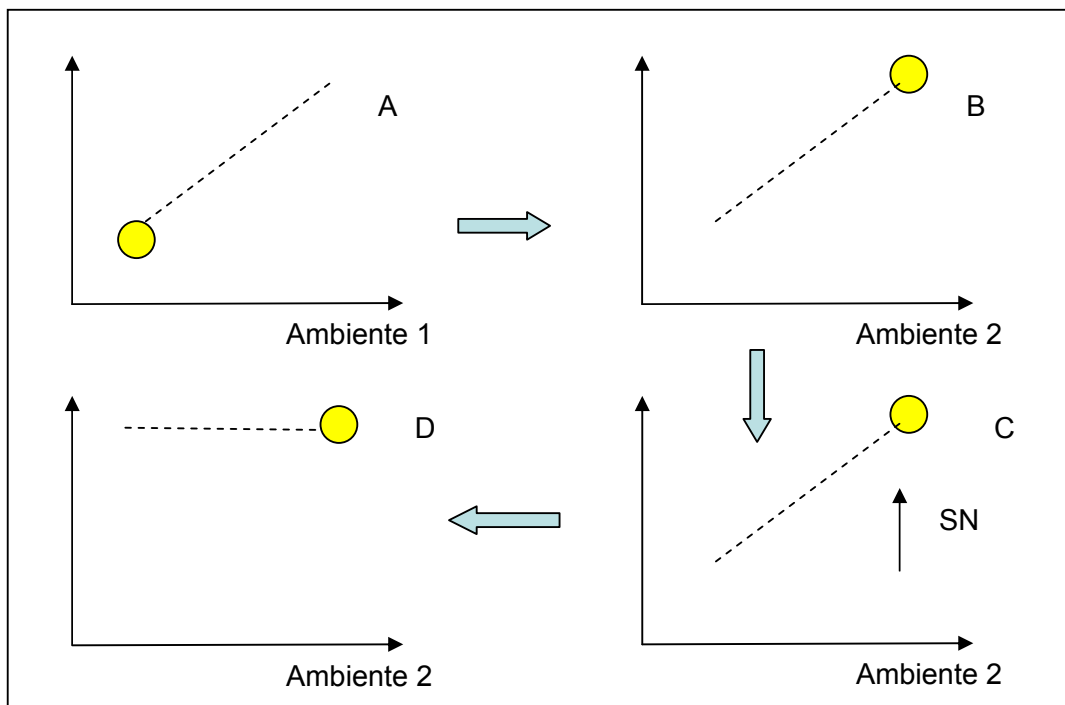


**Figura 9.2.** Esquema de los patrones generales confirmados para los casos interpopulacionales (remarcado en rojo) y los de plasticidad (remarcado en azul).

Tal como hemos expuesto en capítulos anteriores, la integración dada entre la biología del desarrollo y la evolución ha puesto en un lugar central a los constreñimientos señalados por la bioquímica, la fisiología o la biología del desarrollo. Estas restricciones obligaron a incorporar, frente a un escenario de “topografías óptimas”, la idea de que los fenotipos observados no necesariamente hayan sido evolutivamente seleccionados. De esta manera, se debe analizar cuidadosamente cuáles son los escenarios en donde la plasticidad “contribuye” a la adaptación de los organismos.

En los últimos años se han propuesto diversos modelos que intentaron analizar la relación entre los mecanismos evolutivos y la plasticidad. En particular, nos centraremos en el sostenido recientemente por Pigliucci *et al.* (2006). En la Figura 9.3 se representa una secuencia en donde la plasticidad y las presiones selectivas son

visualizadas como pasos sucesivos de un mismo gran proceso. En el cuadro A (Figura 9.3) se representa el caso en donde un organismo que se ha desarrollado en un ambiente dado (1) alcanza un fenotipo determinado. A su vez, el genotipo presenta una norma de reacción (simbolizada por la línea de puntos) que es consecuencia del desarrollo en otros ambientes. En B, ocurre un cambio ambiental (1 al 2), que altera el desarrollo del organismo en cuestión produciendo los cambios fenotípicos correspondientes. A partir de allí (etapa C, Fig. 9.3), dado el cambio ambiental, se genera un proceso selectivo sobre el nuevo fenotipo. Luego de n generaciones, se produce el fenómeno denominado por algunos autores como “asimilación genética”, implicando la fijación de la variante genética involucrada (Pigliucci *et al.* 2006). Este proceso de “asimilación” trae aparejado una pérdida de plasticidad, justificada a través de la noción de que el comportamiento plástico tendría asociado un importante “costo”. De este modo, este proceso finaliza a partir de la consolidación de un correlato genético del fenotipo seleccionado y la aparición de una nueva norma de reacción (etapa D, Fig. 9.3).



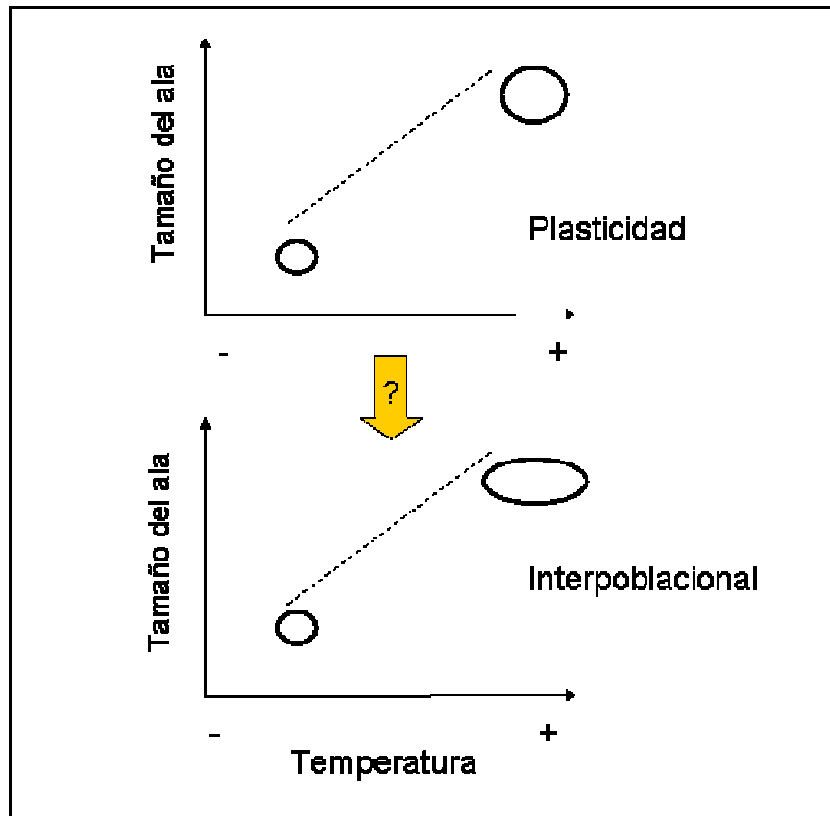
**Figura 9.3.** Representación gráfica de la relación entre plasticidad fenotípica y la acción selectiva (Pigliucci *et al.* 2006).

Hemos elegido este modelo para nuestro análisis, pues permite visualizar claramente en cuáles escenarios la plasticidad podría conllevar en sí misma, una ventaja

adaptativa. Se trata de, tal como hemos visto, en los casos en que la plasticidad “ofrece” –no en forma preadaptativa sino a partir de un origen azaroso– la posibilidad de generar una amplia gama de fenotipos (norma de reacción) que le permite a una población persistir en el tiempo mediante fenotipos novedosos sin cambios genéticos.

Sin embargo, a nuestro entender, el modelo presupone un elemento que debe ser críticamente analizado. Nos referimos a que el fenotipo generado por la plasticidad (Fig. 9.3 C) es similar al “obtenido” luego del proceso de selección (Fig. 9.3 D). *A priori*, la diferencia entre ambos fenotipos resulta esperable, en la medida en que los procesos que actúan en uno y otro caso (pre y post proceso de “asimilación genética”) son diferentes. Por ello, debemos acudir a los patrones empíricos registrados en los capítulos previos, a los fines de verificar o rechazar la “identificación” que se da entre el fenotipo “ofrecido” por la plasticidad y el fenotipo que resulta luego del proceso de selección. En particular, algunos de nuestros resultados sugieren, si bien no de manera concluyente, que el fenotipo obtenido por los procesos de plasticidad y el obtenido por el proceso de “asimilación genética” podrían no ser equivalentes, al menos en los casos estudiados. Analicemos brevemente cuáles son estas evidencias:

a) En el Capítulo 2 se presentaron resultados acerca de la relación entre el tamaño y la forma de las alas. En el mismo podía observarse que, en una primera aproximación, las hipótesis generales acerca de la relación entre el tamaño y la temperatura de cría eran parcialmente verificadas (esto es, que las moscas criadas a menor temperatura presentaban un mayor tamaño). Sin embargo, importantes diferencias fueron detectadas entre los escenarios interpoblacionales y los de plasticidad respecto a la forma de las alas. Mientras que en el caso de las respuestas “plásticas” se observó en general cierta isometría en el tamaño de las alas, en las comparaciones interpoblacionales el mayor tamaño del ala era debido a diferentes porciones del ala. Considerando esto, integremos estos datos con el modelo sostenido por Pigliucci *et al* (2006, Fig. 9.3). Las “semejanzas” en cuanto al tamaño y las “diferencias” en cuanto a la forma de las alas presentadas en el Capítulo 2, obligan a interrogar acerca de las similitudes sostenidas entre el fenotipo presentado por la plasticidad fenotípica (Fig. 9.3 C) y al que se “obtiene” luego del proceso selectivo (Fig. 9.3. D). Como puede verse, las diferencias en la forma del ala obligan a dejar abierto el interrogante acerca de si el “camino” de uno a otro fenotipo es tan lineal como dicho modelo sostiene (Fig. 9.4).



**Figura 9.4.** Representación gráfica de la relación entre los patrones de tamaño corporal en el caso de la plasticidad fenotípica y en el escenario interpoblacional. Las diferencias de tamaño y de forma están exacerbadas para una mejor representación gráfica.

b) La segunda evidencia proviene de los estudios reseñados en el Capítulo 5. En el mismo se puso a prueba la hipótesis de que las tasas de desarrollo en diferentes etapas del ciclo de vida guardaban una relación isométrica ante cambios en la temperatura ambiental. Esta propuesta fue generada a partir de recientes estudios comparativos sobre la tasa del desarrollo de los organismos, realizados entre *taxa* muy diferenciados evolutivamente (Gillooly *et al.* 2002; Jarosik *et al.* 2002; Jarosik *et al.* 2004). Tal como hemos indicado, esta propuesta implica que los diferentes estadios responden de manera similar a los cambios del ambiente en cuanto al tiempo de desarrollo. No obstante, nuestros resultados no presentaron valores constantes en cuanto a la velocidad de crecimiento para diferentes ambientes térmicos. De hecho, nuestro estudio mostró que a mayores temperaturas, la tasa de crecimiento de la pupa aumentaba en mayor grado que en las larvas. De esta manera, observamos que la tasa de crecimiento dista de ser constante entre los estadios a diferentes temperaturas de cría.

En la medida en que estos resultados están evaluando hipótesis generadas a partir de estudios realizados en *taxa* muy alejados evolutivamente, nuestros resultados nos llevan a dudar acerca de la validez de la extrapolación de predicciones planteadas para niveles superiores al caso de la plasticidad. Nuevamente, a partir de este segundo ejemplo, observamos que los fenotipos observados a través de procesos selectivos, pueden no ser equivalentes a los patrones registrados en escenarios de plasticidad.

c) La tercera evidencia surge a partir del estudio de las relaciones alométricas entre el tiempo de desarrollo, la viabilidad y el peso corporal analizadas en el Capítulo 7. Las relaciones positivas entre las variables fueron verificadas a partir de investigaciones realizadas, nuevamente, en *taxas* muy diferenciados. En este capítulo se analizaron las relaciones existentes entre las tres variables tanto entre tres especies (dos cercanamente emparentadas y una tercera evolutivamente más distante) como dentro de cada una de las especies. Los resultados fueron muy interesantes en el marco de lo aquí discutido. En el análisis interespecífico se confirmaron las hipótesis enunciadas sobre las relaciones positivas entre la masa corporal, el tiempo de desarrollo y la tasa metabólica. Sin embargo, distinto fue el resultado en el caso alometrías plásticas (es decir, entre pares de caracteres medidos en varias familias (isolíneas) bajo condiciones ambientales diferentes) dentro de cada una de las especies. En general, en los estudios realizados para cada una de las especies se observó, en términos generales, una ausencia de correlaciones.

De esta manera, los tres grupos de resultados mencionados nos sugieren que los patrones fenotípicos en los escenarios en donde actúan mecanismos evolutivos, pueden no ser similares a aquellos de plasticidad. Estos resultados refuerzan el interrogante antes planteado, acerca de si el fenotipo observado previo al proceso de “asimilación genética” es similar al registrado luego del proceso selectivo.

## **El *stress* y la adaptación térmica**

Otras de las temáticas comunes en esta Tesis es la del *stress* térmico. Como hemos visto, el reconocimiento de los efectos estresantes de un determinado ambiente, implica un análisis complejo que involucra la consideración de medidas directas e indirectas del *fitness*. Sin embargo, la naturaleza estresante de una determinada condición ambiental debe ser verificada experimentalmente. Considerando ello, puede

verse que una determinada condición ambiental corre “el peligro” de ser confundida con sus indicadores. Esta confusión puede derivar en que la temperatura de *stress* resulte ser más una condición caracterizada *a priori* que una hipótesis confrontada empíricamente. Más aún, algunos autores han sugerido que debido a que deben recurrirse necesariamente a los indicadores, la condición de “estresante” de un determinado ambiente no podría ser probada en sentido estricto (Hoffmann & Merilä 1999).

En esta Tesis, se utilizaron y evaluaron presuntos indicadores del *stress*: la disminución de la viabilidad, el menor tamaño corporal y los efectos sobre el tiempo de desarrollo. A los fines de caracterizar cada uno de los tratamientos térmicos, repasemos los resultados generales obtenidos:

i) En los casos en que las temperaturas de cría alcanzaron los 30°C (tanto de manera continua como en los tratamientos de temperatura alternada), las moscas sufrieron una reducción marcada en los indicadores de *performance*, si bien las respuestas fueron diferentes entre las especies. Por un lado, la viabilidad presentó caídas abruptas en estos tratamientos, alcanzando valores incluso cercanos a 0 en *D. melanogaster*. Del mismo modo, se registraron caídas abruptas del tamaño corporal en *D. buzzatii*. Estas respuestas a nivel del tamaño corporal han sido sugeridas como posibles indicadores de *stress*. Sin embargo, otros elementos deben ser considerados en este análisis. Por ejemplo, cabe aclarar que la relación inversa entre el tamaño corporal y la temperatura de cría coincide con la predicción basada para organismos criados a mayores medias térmicas. Por ello, consideramos que estos resultados poseen una dificultad clara en cuanto a su interpretación, dado que resulta difícil separar los efectos causados por las temperaturas medias y aquellos otros dados por las condiciones estresantes.

ii) El análisis de los efectos de los tratamientos en los que la amplitud térmica fue considerable –tales como los casos de 30-09 °C y 25-09 °C– se abordó a través del estudio de diferentes caracteres y protocolos experimentales. Utilizando a la viabilidad como un indicador directo del *stress*, podemos reconocer su disminución en estos dos tratamientos para los individuos de ambas especies. Del mismo modo, el tamaño corporal disminuyó notablemente en moscas sometidas a estas temperaturas. En este caso, a diferencia del análisis realizado sobre las temperaturas extremas, el diseño experimental utilizado brinda la oportunidad de comparar entre tratamientos con y sin amplitud térmica, coincidentes en su temperatura media. En todos los casos se observó una conspicua disminución en el tamaño corporal en las moscas emergidas en los tubos

sometidos a los tratamientos con marcada amplitud, tal como fue sugerido por recientes investigaciones (Pétavy *et al.* 2001b).

Si bien los resultados descriptos sugieren que la amplitud térmica podría ser considerada un factor de *stress*, los patrones observados en los otros caracteres de historia de vida, deben ser incorporados en el análisis. Por ejemplo, la amplitud térmica parece haber producido importantes desvíos en el tiempo de desarrollo respecto de los valores observados en los tratamientos de temperatura constante. Sin embargo, estas alteraciones, en general, no muestran tendencias consistentes en cuanto al efecto causado sobre la tasa de desarrollo (aceleración o retardación). De este modo, los resultados acuerdan con investigaciones en las que se verifica un efecto de la amplitud térmica sobre la tasa de desarrollo, sin observarse un patrón consistente en sus signos (Pétavy *et al.* 2004).

El segundo resultado que obliga a analizar críticamente los efectos de tratamientos térmicos considerados *a priori* como estresantes (25-09 °C y 30-09 °C), son los efectos de las amplitudes térmicas sobre las alometrías entre caracteres corporales, analizadas en el Capítulo 2. En dicho capítulo hemos podido observar cómo los patrones observados en las relaciones entre caracteres del ala no presentaron diferencias entre los organismos expuestos a condiciones presuntamente estresantes y los organismos criados en condiciones óptimas.

Otro posible indicador de los efectos del *stress* sobre la biología de los organismos es la asimetría fluctuante (ver Capítulo 3). Interpretada biológicamente en términos de inestabilidad durante el desarrollo, nuestros resultados coinciden en que parece no haber un correlato directo entre los tratamientos considerados estresantes (por ejemplo amplitud térmica) y la magnitud de la asimetría fluctuante.

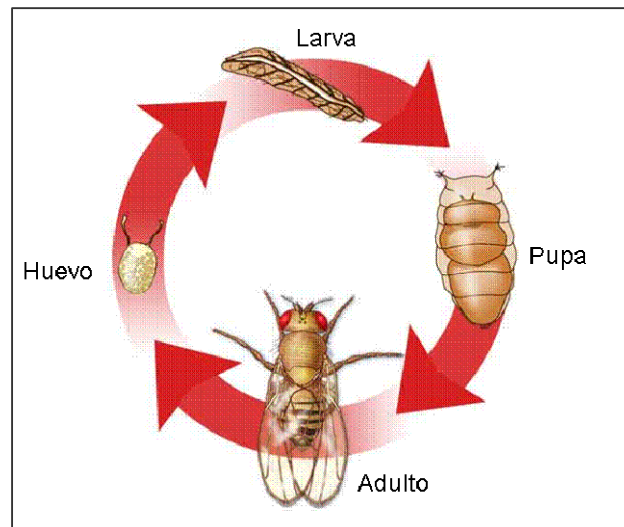
iii) Los resultados obtenidos en los cultivos expuestos al tratamiento térmico de temperaturas alternadas pero con menor amplitud térmica (25-17 °C) fueron, al menos, sugerentes. En términos generales, los diferentes indicadores utilizados no dejan entrever que sus efectos sean catalogables (necesariamente) como estresantes. En lo que concierne a la viabilidad, al tamaño corporal y a las alometrías analizadas, generalmente no se observaron efectos diferenciales respecto a las moscas criadas bajo regímenes de temperaturas constantes. Esto, pese a tratarse sólo de una aproximación a la problemática, abre el interrogante acerca de si los ambientes fluctuantes constituyen en sí mismos ambientes de *stress*, o si, tal como sugieren nuestros resultados, en el caso de la temperatura esto es cierto sólo cuando la amplitud térmica es grande. Todos estos



resultados analizados en su conjunto, nos obligan a caracterizar al *stress* térmico como una temática de gran complejidad, que debería ser abordada a través de diferentes metodologías, modelos biológicos y caracteres de diferente naturaleza.

## **De los caracteres a las estrategias del desarrollo: primeras notas sobre los estadios del ciclo de vida**

En esta Tesis, la adaptación térmica fue abordada a través del estudio de caracteres fisiológicos y de historia de vida, en los diferentes estadios que componen el ciclo de vida de *Drosophila* (Figura 9.5). Dentro de los desafíos que propone este tipo de abordaje, surgen evidentemente los cambios profundos que sufren los organismos durante la ontogenia. Considerando esto, surge el interrogante: ¿se observan cambios importantes a lo largo del ciclo de vida para los caracteres que hemos analizado (tasa metabólica, tiempo de desarrollo, tamaño corporal)? Veamos en primer lugar los resultados de las diferentes variables ya que nos permitirán entender las principales características de cada uno de los estadios.



**Figura 9.5.** Representación de los diferentes estadios del ciclo de vida en un organismo holometábolo como en el caso de las especies de *Drosophila*.

## La larva

En esta Tesis el estadio larval se caracterizó en base a su duración (Cap. 4), la viabilidad (Cap. 4), la tasa metabólica (Cap. 8) y el peso corporal (Cap. 8), ya sea en condiciones de cría *standard* (25 °C, 12:12 luz: oscuridad y humedad ambiente) o sometiendo los cultivos a diferentes tratamientos térmicos. Respecto al tiempo de desarrollo, en términos generales, la duración de la larva respondió de acuerdo a las predicciones, esto es, una relación inversa con la temperatura de cría. Del mismo modo, se observaron diferencias interpoblacionales e interespecíficas, registrándose una relación directa entre el tiempo de desarrollo larval y el tamaño del cuerpo del adulto. En todos los casos (tanto en escenarios donde se estimó la plasticidad como en las comparaciones interpoblacionales) se observó que una porción importante de la varianza del tiempo de desarrollo larval tiene base genética. Del mismo modo, en nuestro recorrido hemos podido confrontar las características de las larvas correspondientes a especies lejanas evolutivamente. Tal como se esperaba, los porcentajes explicados por el factor especie fueron muy elevados para el caso del tiempo de desarrollo. Esto puede ser explicado por organismos que se diferencian por la masa corporal lo cual aumenta notablemente el tiempo de gestación.

Los resultados obtenidos en el estudio de la masa corporal y de la tasa metabólica de las larvas revelaron que una gran proporción de la varianza era explicada por el error. En términos generales, ambos resultados eran esperables en la medida en que durante la etapa larval el individuo experimenta notables cambios en el tamaño corporal durante los tres estadios que atraviesa antes de pupar, a la vez que presenta fuertes diferencias entre los organismos criados para un determinado estadio larval.

Considerando los patrones de los caracteres individuales, estos resultados permiten caracterizar a la larva como un estadio que parece responder fuertemente a los cambios de la temperatura, y en el que las variables medidas mostraron valores especie-específicos.

## La pupa

El estadio pupal frecuentemente ha sido excluido de los análisis de los caracteres de historia de vida. Esta “omisión” puede deberse a diferentes motivos, pero uno de los posibles está dado por uno de los resultados principales de esta Tesis: la presencia de

características distintivas de la pupa respecto a los otros estadios. En particular, la ausencia de diferencias interpoblacionales e interespecíficas para el tiempo de desarrollo, la masa y la tasa metabólica, describe un estadio en el que parece existir una fuerte canalización aún entre especies que han divergido hace un tiempo considerable (recordemos que los subgéneros *Sophophora* [*D. melanogaster* y *D. simulans*] y *Drosophila* [*D. buzzatii*] divergieron hace aproximadamente 50 M.a.).

En cambio, las pupas –al igual que los individuos del estadio larval– respondieron diferencialmente a los tratamientos térmicos (escenario de plasticidad). Estos resultados, indican que el comportamiento de la pupa es muy similar a lo observado en la etapa larval frente a las variaciones térmicas.

### El adulto

Los caracteres analizados en el estadio adulto respondieron, en general, conforme a lo esperado. Las diferencias observadas entre tratamientos para el tiempo de desarrollo, pueden explicarse principalmente por la variación en el tiempo de desarrollo larval, aunque el aporte del tiempo del período pupal no ha sido despreciable. A su vez, tanto el tiempo de desarrollo, la tasa metabólica, como las longitudes del ala y del fémur, presentaron importantes diferencias entre las especies y las poblaciones. Los resultados de la viabilidad sugirieron una mortalidad fuerte a 30°C y, paralelamente, indicios de mayor adaptación a la amplitud térmica de la población de altura respecto a la de llanura, al menos en la especie autóctona *D. buzzatii*.

Con respecto a la comparación entre el peso corporal y el tamaño del cuerpo (estimado mediante la medición de la longitud de diferentes partes del cuerpo), los resultados fueron sumamente interesantes, en la medida en que las respuestas de ambos caracteres a los cambios de temperatura no fueron equivalentes. A la luz de lo anticipado en los Capítulos 6 y 8, esta diferencia alerta respecto al uso de conceptos polisémicos con vistas a trabajos de tipo interdisciplinarios.

A la vez, en este estadio pudieron compararse los patrones de variación entre sexos. En general, las variables respondieron en consonancia con los patrones descritos en la bibliografía específica (Thomas & Barker 1993; Fanara & Hasson 1999; Santos *et al.* 2004; Carreira *et al.* 2006):

- Tamaño corporal mayor en hembras que en machos.

- Si bien la denominada regla de Rensch propone una mayor variabilidad en el tamaño corporal en machos que en hembras, nuestros resultados no confirman esta hipótesis.
- Menores tiempo de desarrollo en hembras que en machos.
- Mayor tasa metabólica en hembras que en machos (corregidas por las diferencias en masa corporal).

Todas las observaciones en los adultos muestran, en principio, patrones muy similares a los registrados en la larva en cuanto a la respuesta frente a la temperatura. Aunque para el caso de la tasa metabólica o de la masa, en los adultos se registraron además importantes diferencias interpoblaciones e interespecíficas.

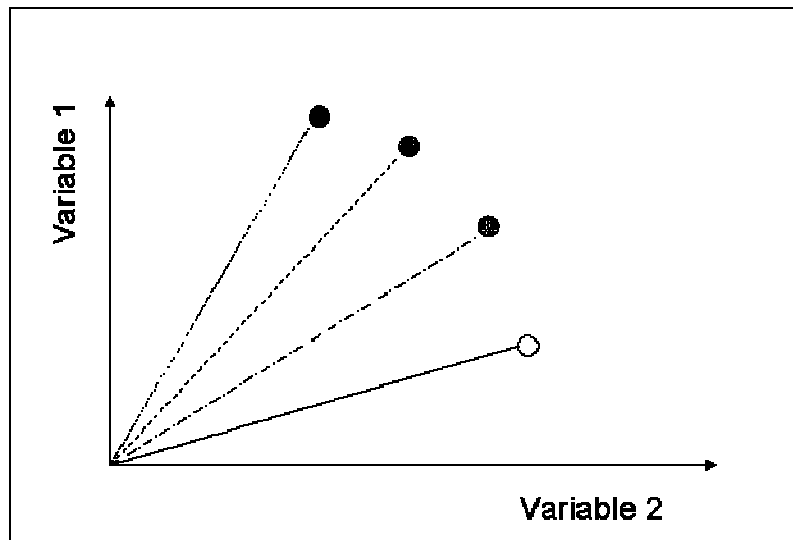
Todos estos resultados admiten, al menos, dos interpretaciones. La primera, de orden metodológico, indica que los errores dados a través de los procesos de medición pueden ser marcadamente diferentes entre los estadios, lo cual podría explicar una menor “sensibilidad” en los análisis larvales y pupales, explicando en parte los resultados antes descriptos. Una segunda interpretación está dada por considerar que los resultados reflejan diferencias existentes entre los diferentes estadios. Esta segunda interpretación confirma la hipótesis de una “respuesta dependiente de los estados” de los organismos, a partir que los patrones de las variables analizadas fueron marcadamente diferentes entre los estadios del ciclo de vida. Sin embargo, esta segunda interpretación debe ser acompañada por un estudio de las alometrías ontogenéticas analizadas, como se efectuará a continuación.

### **De las alometrías ontogenéticas a las estrategias del desarrollo: segundas notas sobre los estadios del ciclo de vida**

Los resultados de la alometrías ontogenéticas han mostrado en general cierta semejanza entre los resultados larvales y los del adulto. Tal como se ha relatado en las secciones anteriores, las alometrías en la pupa son muy diferentes respecto de lo observado en las otras etapas del ciclo de vida, registrándose en general una ausencia de las relaciones entre los diferentes caracteres analizados. Mientras que en este estadio se ha observado que el tiempo de desarrollo, tasa metabólica y el peso corporal no presentó relaciones entre ellas, en el caso de las larvas y del imago se observaron importantes

relaciones positivas entre estos caracteres (con la excepción del dimorfismo sexual oportunamente presentado).

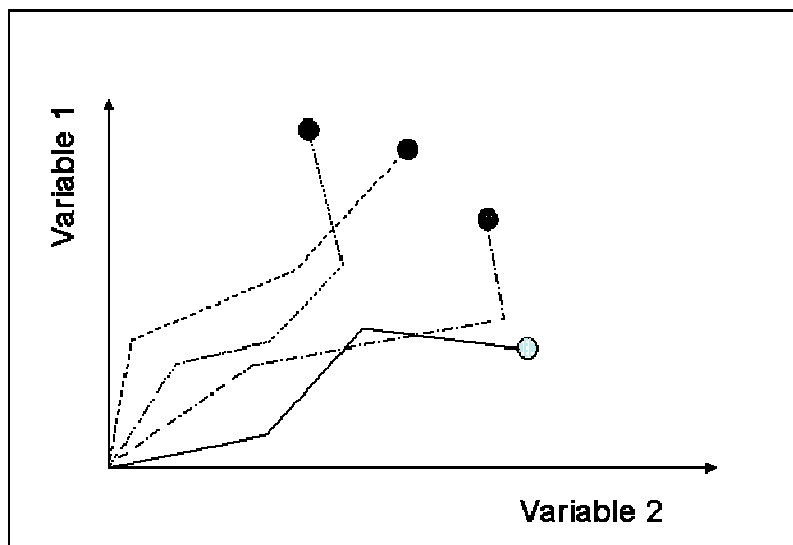
A partir de estos resultados se puede analizar críticamente la propuesta que sostiene grandes regularidades en las relaciones entre las variables a través del desarrollo de un organismo. Esta posición, puede ser caracterizada a partir de la idea que durante el desarrollo de un organismo las relaciones establecidas entre los diferentes caracteres son equivalentes. En la Figura 9.6 puede verse representada esta posición mediante un esquema en el que se simboliza la relación de dos variables a través del desarrollo de un organismo. Como puede verse, las relaciones entre ambas variables es equivalente en el tiempo. De este modo, ambos caracteres alteran sus magnitudes absolutas, pero los valores relativos entre sí permanecen constantes (Fig. 9.6).



**Figura 9.6.** Representación gráfica de un desarrollo isomórfico para una alometría determinada. Los círculos representan al estadio adulto de diferentes organismos, mientras que las líneas simbolizan las correspondientes trayectorias ontogenéticas.

No obstante, una segunda posición puede ser esgrimida con respecto a las trayectorias ontogenéticas. A partir de la ampliación del concepto de “ambiente” (con la incorporación de lo que hemos denominado “ambiente interno”), las interacciones genotipo x “ambiente” que se dan durante el desarrollo, obligan a incorporar fuertes complejidades al escenario lineal sugerido en la Figura 9.6. En este nuevo contexto, la trayectoria de las alometrías ontogenéticas se alejarían de las posiciones que sostienen

un isomorfismo a través del ciclo de vida. De esta manera, considerando las alteraciones durante el desarrollo de los organismos en la expresión génica y en el ambiente fisiológico, se esperan trayectorias ontogenéticas con marcadas discontinuidades (Fig. 9.7). En el esquema simplificado de la Figura 9.7 se representan discontinuidades en la relación entre dos caracteres a través del desarrollo de diferentes organismos. Si bien las relaciones alométricas en los estados reproductivos son similares en ambos casos (simbolizados con los círculos en la Fig. 9.6 y Fig. 9.7), existen marcadas diferencias en las trayectorias ontogenéticas que anteceden a la formación del organismo adulto (Fig. 9.6 y Fig. 9.7).



**Figura 9.7.** Representación gráfica de un desarrollo alejado de una isomorfia para una alometría determinada. Los círculos representan al estadio adulto de diferentes organismos, mientras que las líneas simbolizan las correspondientes trayectorias ontogenéticas.

A la luz del debate entre las teorías que proponen isomorfismos para los diferentes estadios y las que proponen trayectorias ontogenéticas dependientes del ambiente externo e interno del organismo (conocidas como teorías dependientes del estado), nuestros resultados parecen dar apoyo a esta última. Tanto en lo referido a los caracteres analizados individualmente, así como respecto a las relaciones alométricas entre las diferentes variables hemos podido observar importantes discontinuidades durante el desarrollo de un organismo holometábolo tal como el caso de *Drosophila*.

En este recorrido hemos intentado aportar algunos elementos a la problemática de la adaptación de los organismos a la temperatura. Junto a la búsqueda por aportar nuevo material empírico a este problema, ha sido nuestro interés la revisión de las teorías que componen el *corpus* teórico vigente. Esperamos que el lector haya disfrutado la lectura del camino recorrido, tanto como nosotros al realizarlo.

## Bibliografia

- Abouheif, E. and D. J. Fairbairn. 1997. A comparative analysis of allometry for sexual size dimorphism: assessing Rensch's rule. *The American Naturalist*, 149: 540-562.
- Adams, D. C., F. J. Rohlf and D. E. Slice. 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the "revolution". *Italian Journal of Zoology*, 71: 5-16.
- Addo-Bediako, A., S. L. Chown and J. Gaston. 2002. Metabolic cold adaptation in insects: a large scale perspective. *Functional Ecology*, 16: 332-338.
- Al-Saffar, Z. Y., J. N. R. Grainger and J. Aldrich. 1996. Temperature and humidity affecting development, survival and weight loss of the pupal stage of *Drosophila melanogaster*, and the influence of alternating temperature on the larvae. *Journal of Thermal Biology*, 21: 389-396.
- Angiletta, Jr. M. J., P. H. Niewiarowski and C. A. Navas. 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, 27: 249-268.
- Angiletta, M. J. and A. E. Dunham. 2003. The temperature size rule in Ectotherms: Simple evolutionary explanations may not be general. *The American Naturalist*, 162: 332-342.
- Ashby, P. D. 1997. Conservation of mass-specific metabolic rate among high- and low-elevation populations of the acridid grass-hopper *Xanthippus corallipes*. *Physiological Zoology*, 70: 701-711.
- Atkinson, D. and R. M. Sibly. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends in ecology & evolution*, 12: 235-239.
- Barker, J. S. F. and R. A. Krebs. 1995. Genetic variation and plasticity of thorax length in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii*. *Journal of Evolutionary Biology*, 8: 689-709.
- Barker, J. S. F. and J. C. Mulley. 1976. Isozyme variation in natural populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, 30: 213-233.
- Berrigan, D. 1997. Acclimation of metabolic rate in response to developmental temperature in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Thermal Biology*, 22: 213-218.
- Berrigan, D. and L. Partridge. 1997. Influence of Temperature and Activity on the metabolic rate of adult *Drosophila melanogaster*. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, 118: 1301-1307.



- Bharathi, N. S., N. G. Prasad, M. Shakarad and A. Joshi. 2004. Correlates of sexual dimorphism for dry weight and development time in five species of *Drosophila*. *Journal of zoology*, 264: 87-95.
- Bjorksten, T. A., P. David, A. Pomiankowski and K. Fowler. 2000a. Fluctuating asymmetry of sexual and nonsexual traits in stalk-eyed flies: a poor indicator of developmental stress and genetic quality. *Journal of Evolutionary Biology*, 13: 89-97.
- Bjorksten, T. A., K. Fowler and A. Pomiankowski. 2000b. What does sexual trait FA tell us about stress? *Trends in ecology & evolution*, 15: 163-166.
- Blackburn, T. M., K. J. Gaston and N. Loder. 1999. Geographic gradients in body size: a clarification of Bergmann's rule. *Diversity & distributions*, 5: 165-174.
- Blanckenhorn, W. U. 1997. Altitudinal life history variation in the dung flies *Scathophaga stercoraria* and *Sepsis cypsea*. *Oecologia*, 109: 342-352.
- Blanckenhorn, W. U. and M. Demont. 2004. Bergmann and Converse Bergmann latitudinal clines in Arthropods: two ends of a continuum? *Integrative and comparative biology*, 44: 413-424.
- Blanckenhorn, W. U., R. C. Stillwell, K. A. Young, C. W. Fox and K. G. Ashton. 2006. When Rensch meets Bergmann: does sexual size dimorphism change systematically with latitude. *Evolution*, 60: 2004-2011.
- Bochdanovits, Z. and G. De Jong. 2003a. Temperature dependence of larval resource accumulation and adult body size in *Drosophila melanogaster* in *Tekst.- Proefschrift Universiteit Utrecht (ed) Some like it hot... : the evolution and genetics of temperature dependent body size in Drosophila melanogaster*.
- Bochdanovits, Z. and G. De Jong. 2003b. Larval energy metabolism and a life history trade-off in *Drosophila melanogaster* in *Tekst.- Proefschrift Universiteit Utrecht (ed) Some like it hot... : the evolution and genetics of temperature dependent body size in Drosophila melanogaster*.
- Bonner, J. T. and H. S. Horn. 1982. Selection for size, shape and development timing in Bonner, J. T. (ed) *Evolution and Development*. Springer-Verlag.
- Borash, D. J., A. G. Gobbs, A. Joshi and L. D. Muell. 1998. A genetic polymorphism maintained by natural selection in a temporally varying environment. *The American Naturalist*, 151: 148-156.
- Bubliy, O. A. and V. Loeschke. 2005. Variation of life-history and morphometrical traits in *Drosophila buzzatii* and *D. simulans* collected along an altitudinal gradient from a Canary Island. *Biological journal of the Linnean Society*, 84: 119-136.

Bubliy, O. A. and V. Loeschcke. 2001. High stressful temperature and genetic variation of five quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 110: 79-85.

Burggren, W. and S. Warburton. 2005. Comparative Developmental Physiology: an interdisciplinary convergence. *Annual review of physiology*, 67: 203-223.

Calboli, F. C. F., J. Kennington and L. Partridge. 2003. QTL mapping reveals a striking coincidence in the positions of genomic regions associated with adaptive variation in body size in parallel clines of *Drosophila melanogaster* on different continents. *Evolution*, 57: 2653-2658.

Calder III, W. A. 1984. *Size, Function and Life History*. Harvard University Press, Massachusetts.

Capy, P., E. Pla and J. R. David. 1993. Phenotypic and genetic variability of morphometrical traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. I. Geographic variations. *Genetics, selection, evolution. : GSE*, 25: 517-536.

Carreira, V. P., I. M. Soto, E. Hasson and J. J. Fanara. 2006. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 1275-1282.

Castañeda, L. E., M. A. Lardies and F. Bozinovic. 2005. Interpopulational variation in recovery time from chill coma along a geographic gradient: A study in the common woodlouse, *Porcellio laevis*. *Journal of Insect Physiology*, 51: 1346-1351.

Chappell, M. A. 1983. Metabolism and thermoregulation in desert and montane grasshoppers. *Oecologia*, 56: 126-131.

Chippindale, A. K., J. A. Alipaz, H. W. Chen and M. R. Rose. 1997. Experimental evolution of accelerated development in *Drosophila*. 1 Developmental speed and larval survival. *Evolution*, 51: 1536-1551.

Chippindale, A. K., D. T. Hoang, P. M. Service and M. R. Rose. 1994. The evolution of development in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Evolution*, 48: 1880-1899.

Chown, S. L. and C. J. Klok. 2003. Altitudinal body size clines: Latitudinal effects associated with changing seasonality. *Ecography*, 26: 445-455.

Chown, S. L., M. van der Merwe and V. R. Smith. 1997. The influence of habitat and altitude on oxygen uptake in sub-Antarctic weevils. *Physiological Zoology*, 70: 116-124.

Clarke, G. M. 1995. Relationships between developmental stability and fitness: how good is the evidence? *Pacific Conservation Biology*, 2: 146-149.

- Cleland, E. C. 2002. Methodological and epistemic differences between historical science and experimental science. *Philosophy of Science*, 69: 474-496.
- Cohet, Y., J. Voudibio and J. R. David. 1980. Thermal tolerance and geographic distribution: a comparison of cosmopolitan and tropical endemic *Drosophila* species. *Journal of Thermal Biology*, 5: 69-74.
- Cortese, M. D., F. M. Norry, R. Piccinali and E. Hasson. 2002. Direct and correlated responses to artificial select on developmental time and wing length in *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, 56: 2541-2547.
- Crill, W. D., R. B. Huey and G. W. Gilchrist. 1996. Within and between generation effects of temperature on the morphology and physiology of *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 50: 1205-1218.
- Dahlgaard, J. and V. Loeschcke. 1997. Effects of inbreeding in three life stages of *Drosophila buzzatii* after embryos were exposed to a high temperature stress. *Heredity*, 78: 410-416.
- Das, A., S. Mohanty and B. B. Parrida. 1994. Abdominal pigmentation and growth temperature in Indian *Drosophila melanogaster*: Evidence for genotype-environment interaction. *Journal of biosciences*, 19: 267-275.
- David, J. R., P. Gibert, H. Legout, G. Pétavy, P. Capy and B. Moreteau. 2005. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative traits analysis in natural populations. *Heredity*, 94: 3-12.
- David, J. R., P. Gibert, B. Moreteau, G. W. Gilchrist and R. B. Huey. 2003. The fly that came in from the cold: geographic variation of recovery time from low temperature exposure in *Drosophila subobscura*. *Functional Ecology*, 17: 425-430.
- David, J. R., P. Gibert, E. Pla, G. Pétavy, D. Karan and B. Moreteau. 1998. Cold stress tolerance in *Drosophila*: analysis of chill coma recovery in *D. melanogaster*. *Journal of Thermal Biology*, 23: 291-299.
- David, J. R., H. Legout and B. Moreteau. 2006. Phenotypic plasticity of body size in a temperate population of *Drosophila melanogaster*: when the temperature-size rule does not apply. *Journal of Genetics*, 85: 9-23.
- David, J. R., B. Moreteau, J. P. Gauthier, G. Pétavy, A. Stockel and A. G. Imasheva. 1994. Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in *Drosophila melanogaster*: an isofemale line analysis. *Genetics, selection, evolution: GSE*, 26: 229-251.
- Davis, A. and I. Hardy. 1994. Hares and tortoises in *Drosophila* community ecology. *Trends in ecology & evolution*, 9: 119-120.

- De Jong, G. and Z. Bochdanovits. 2003. Latitudinal clines in *Drosophila melanogaster*: body size, allozyme frequencies, and the insulin-signalling pathway. *Journal of Genetics*, 82: 207-223.
- De Moed, G. H., G. De Jong and W. Scharloo. 1997. Environmental effects on body size variation in *Drosophila melanogaster* and its cellular basis. *Genetical research*, 70: 35-43.
- Debat, V., M. Bégin, H. Legout and J. R. David. 2003. Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution*, 57: 2773-2784.
- Debat, V. and J. R. David. 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in ecology & evolution*, 16: 555-561.
- Economos, A. C. and F. A. Lints. 1986. Developmental temperature and life span in *Drosophila melanogaster*. II. Oscillating temperature. *Gerontology*, 32: 28-36.
- Endler, J. A. 1977. *Geographic variation, Speciation, and Clines*. Princeton University Press, Princeton.
- Endler, J. A. 1986. *Natural selection in the wild*. Princeton University Press, Princeton.
- Fairbairn, D. J. and R. F. Preziosi. 1994. Sexual selection and the evolution of allometry for sexual size dimorphism. *The American Naturalist*, 144: 101-118.
- Falconer, D. S. and T. F. C. Mackay. 1996. *Introduction to quantitative genetics*, 4 edn. Longman Group.
- Fanara, J. J., G. Folguera, P. F. Iriarte, J. Mensch and E. Hasson. 2006. Genotype by environment interactions and development time in populations of cactophilic *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 900-908.
- Fanara, J. J., E. Hasson and C. Rodríguez. 1997. The effect of polymorphic inversions on body size in two natural populations of *Drosophila buzzatii* from Argentina. *Hereditas*, 126: 233-237.
- Fanara, J. J. F. A. and E. Hasson. 1999. Oviposition preference and life history traits in cactophilic *Drosophila koepfeare* and *D. buzzatii* in association with their natural hosts. *Evolutionary ecology*, 13: 173-190.
- Feldman, H. A. and T. A. McMahon. 1983. The 3/4 mass exponent for energy metabolism is not a statistical artifact. *Respiration physiology*, 52: 149-163.

Fernandez Iriarte, P. and E. Hasson. 2000. The role of the use of different host plants in the maintenance of the inversion polymorphism in the cactophilic *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, 54: 1295-1302.

Fontdevila, A. 1989. Founder effects in colonizing populations: the case of *Drosophila buzzatii* in Fontdevila, A. (ed) *Evolutionary Biology of Transient Unstable Populations*. Springer-Verlag, Berlin.

Forsman, A. 1999. Variation in thermal sensitivity in performance among colour morphs of a pygmy grasshopper. *Journal of Evolutionary Biology*, 12: 869-878.

Fox Keller, E. 2000. Lenguaje y Ciencia: la genética, la embriología y el discurso de la acción de los genes. in Manantial (ed) *Lenguaje y vida. Metáforas de la biología en el siglo XX*. Buenos Aires.

Freeman, M. F. and J. W. Tukey. 1950. Transformation related to angular and the square root. *Annals of Mathematical Statistics*, 21: 607-611.

Fuller, R. C. and D. Houle. 2003. Inheritance of developmental instability in Polak, M. (ed) *Developmental Instability*. Nueva York.

Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*, Tercera edn. Sinauer Associates, Massachusetts.

Gangestad, S. W. and R. Thornhill. 2003. Fluctuating asymmetry, developmental instability, and fitness: toward model-based interpretation in Polak, M. (ed) *Developmental instability*. Oxford University Press, Nueva York.

Garland, T. and P. A. Carter. 1994. Evolutionary physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 56: 579-621.

Gaston, K. J. and T. M. Blackburn. 2000. *Pattern and process in macroecology*. Balckwell Scientific, Oxford.

Gebhardt, M. D. and S. C. Stearns. 1988. Reaction norms for developmental time and weight at eclosion in *Drosophila meracatorum*. *Journal of Evolutionary Biology*, 1: 335-354.

Gibert, P., P. Capy, A. Imasheva, B. Moreteau, J. P. Morin, G. Pétavy and J. R. David. 2004. Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. *Genetica*, 120: 165-179.

Gibert, P. and G. De Jong. 2001. Temperature dependence of development rate and adult size in *Drosophila* species: biophysical parameters. *Journal of Evolutionary Biology*, 13: 267-276.

- Gilchrist, A. S., R. B. R. Azevedo, L. Partridge and P. O. O'Higgins. 2000. Adaptation and constraint in the evolution of *Drosophila melanogaster* wing shape. *Evolution & development*, 2: 114-124.
- Gilchrist, A. S. and L. Partridge. 2001. The contrasting genetic architecture of wing size and shape in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 86: 144-152.
- Gilchrist, A. S. and L. Partridge. 1999. A comparison of the genetic basis of the wing size divergence in three parallel body size clines of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 153: 1775-1787.
- Gilchrist, G. W. and R. B. Huey. 2004. Plastic and genetic variation in wing loading as a function of temperature within and among parallel clines in *Drosophila subobscura*. *Integrative and comparative biology*, 44: 461-470.
- Gillooly, J. F., E. L. Charnov, G. B. West, V. M. Savage and J. H. Brown. 2002. Effects of size and temperature on developmental time. *Nature*, 417: 70-73.
- Ginzburg, L. and M. Colyvan. 2004. *Ecological Orbits. How Planets Move and Population Grow*. Oxford University Press, Oxford.
- Gómez, G. A. and E. Hasson. 2003. Transpecific Polymorphisms in an Inversion Linked Esterase Locus in *Drosophila buzzatii*. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 410-423.
- Gotthard, K. 2001. Growth strategies of ectothermic animals in temperate environments. Animal Development Ecology. in Atkinson, D. and M. Thorndyke (eds) *Environmental and Animal Development*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Gotthard, K., N. Sören and C. Wiklund. 2000. Individual state controls temperature dependence in a butterfly (*Lasiommata maera*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 267: 589-593.
- Graham, J. H., D. C. Freeman and J. M. Emlen. 1993. Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. *Genetica*, 89: 121-137.
- Hallas, R., M. Schiffer and A. A. Hoffmann. 2002. Clinal variation in *Drosophila serrata* for stress resistance and body size. *Genetical research*, 79: 141-148.
- Hartl, D. L. and J. K. Conner. 2004. *A primer of ecological genetics*. Sinauer Associates, Michigan State University.
- Hasson, E., H. Naveira and A. Fontdevila. 1992. The breeding sites of the Argentinian species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). *Revista chilena de historia natural*, 65: 319-326.

- Hasson, E., J. J. Fanara, C. Rodriguez, J. C. Vilaridi, O. A. Reig and A. Fontdevila. 1993. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXVII. Thorax history is positively correlated with longevity in a natural population from Argentina. *Genetica*, 92: 61-65.
- Hasson, E., C. Rodríguez, J. J. Fanara, H. Naviera, O. A. Reig and A. Fontdevila. 1995. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*: XXVI, Macrogeographic patterns of inversion polymorphism in New World populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 8: 369-384.
- Heusner, A. A. 1982. Energy metabolism and body size, I. Is the 0.75 mass exponent of Kleiber's equation a statistical artifact? *Respiration physiology*, 48: 1-12.
- Hoffman, A. A. and P. A. Parson. 1991. *Evolutionary Genetics and enviromental Stress*. Oxford.
- Hoffmann, A. A., A. Anderson and R. Hallas. 2002. Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*. *Ecology letters*, 5: 614-618.
- Hoffmann, A. A. and J. Merilä. 1999. Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends in ecology & evolution*, 14: 96-101.
- Huey, R. B. and D. Berrigan. 2001. Temperature, demography and ectotherm fitness. *The American Naturalist*, 158: 204-210.
- Huey, R. B., G. W. Gilchrist, M. L. Carlson, D. Berrigan and L. Serra. 2000. Rapid evolution of a Geographic Cline in Size in an Introduced Fly. *Science*, 287: 308-309.
- Imasheva, A. G. 1998. Stressful temperatures and quantitative variation in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 81: 246-253.
- Imasheva, A. G., O. A. Bubli and O. E. Lazebny. 1994. Variation in wing length in Eurasian populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 72: 508-514.
- Imasheva, A. G., V. Loeschke, L. A. Zhivotovsky and O. E. Laze. 1997. Effects of extreme temperatures on phenotypic variation and developmental stability in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila buzzatii*. *Biological journal of the Linnean Society*, 61: 117-126.
- James, A. C., R. B. R. Azevedo and L. Partridge. 1995. Cellular basis and developmental timing in size cline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 140: 659-666.
- James, A. C., R. B. R. Azevedo and L. Partridge. 1997. Genetic and environmental responses to temperature of *Drosophila melanogaster* from a latitudinal cline. *Genetics*, 146: 881-890.

- James, A. C. and L. Partridge. 1995. Thermal evolution of rate of larval development in *Drosophila melanogaster* in laboratory and field populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 8: 315-330.
- James, A. C. and L. Partridge. 1998. Geographic variation in competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *The American Naturalist*, 151: 530-537.
- Jarosik, V., A. Honek and A. F. G. Dixon. 2002. Developmental Rate Isomorphy in Insects and Mites. *The American Naturalist*, 160: 498-510.
- Jarosik, V., L. Kratochvíl, A. Honek and A. F. G. Dixon. 2004. A general rule for the dependence of developmental rate on temperature in ectothermic animals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*.
- Johansson, F., P. H. Crowley and T. Brodin. 2005. Sexual size dimorphism and sex ratios in dragonflies (Odonata). *Biological journal of the Linnean Society*, 86: 507-513.
- Johnston, L. A. and A. F. Bennett. 1996. *Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation*. Society of Experimental Biology. Seminar Series. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jorgensen, K. T., J. G. Sorensen and J. Bundgaard. 2006. Heat tolerance and the effect of mild heat stress on reproductive characters in *Drosophila buzzatii* males. *Journal of Thermal Biology*, 31: 280-286.
- Kari, J. S. and R. B. Huey. 2000. Size and seasonal temperature in free-ranging *Drosophila subobscura*. *Journal of Thermal Biology*, 25: 267-272.
- Kennington, W. S., J. Gockel and L. Partridge. 2003. Testing for asymmetrical gene flow in a *Drosophila melanogaster* body-size cline. *Genetics*, 165: 667-673.
- Klingenberg, C. P. 2003. A developmental perspective on developmental instability: theory, models, and mechanisms. in Polak, M. (ed) *Developmental Instability*. Oxford University Press, Nueva York.
- Klingenberg, C. P. and H. F. Nijhout. 1999. Genetics of fluctuating asymmetry: a developmental model of developmental instability. *Evolution*, 53: 358-375.
- Klingenberg, C. P. and S. D. Zaklan. 2000. Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution*, 54: 1273-1285.
- Knibb, W. R. and J. S. F. Barker. 1988. Polymorphic inversion and esterase loci complex on chromosome 2 of *Drosophila buzzatii* II. Spatial variation. *Australian journal of biological sciences*, 41: 239-246.



- Kozlowski, J. and J. Weiner. 1997. Interspecific allometries are by-products of body size optimization. *The American Naturalist*, 149: 352-380.
- Kraushaar, U. and W. U. Blanckenhorn. 2002. Population variation in sexual selection and its effect on body size allometry in two species of flies with contrasting sexual size dimorphism. *Evolution*, 56: 307-321.
- Krebs, R. A. and J. S. F. Barker. 1993. Coexistence of ecologically similar colonising species. II. Population differentiation in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii* for competitive effects and responses at different temperatures and allozyme variation in *D. aldrichi*. *Journal of Evolutionary Biology*, 6: 281-298.
- Krebs, R. A. and V. Loeschcke. 1995. Resistance to thermal stress in preadult *Drosophila buzzatii*: Variation among populations and changes in relative resistance across life stages. *Biological journal of the Linnean Society*, 56: 517-531.
- Krebs, R. A. and V. Loeschcke. 1999. A genetic analysis of the relationship between life-history variation and heat-shock tolerance in *Drosophila buzzatii*. *Heredity*, 83: 46-53.
- Krebs, R. A. and V. Loeschcke. 1996. Selection for increased resistance and acclimation to thermal stress in *Drosophila buzzatii*. *Genetics*, 142: 471-479.
- Krebs, R. A. and V. Loeschcke. 1994. Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, 8: 730-737.
- LaBarbera, M. 1989. Analyzing body size as a factor in ecology and evolution. *Annual Review of ecology and Systematics*, 20: 97-117.
- Lachaise, D., M. L. Cariou, J. David, F. Rier, L. Tsacas and M. Ashburner. 1988. Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Evolutionary Biology*, 22: 159-225.
- Lansing, E., J. Justensen and V. Loeschcke. 2000. Variation in the expression of Hsp70, the major heat shock protein, and thermotolerance in larval and adult selection lines of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Thermal Biology*, 25: 443-450.
- Lardies, M. A. and F. Bozinovic. 2006. Geographic covariation between metabolic rate and life-history traits. *Evolutionary ecology research*, 8: 1-16.
- Lardies, M. A., T. P. Catalán and F. Bozinovic. 2004. Metabolism and life-history correlates in a lowland and highland population of a terrestrial isopod. *Canadian journal of zoology*, 82: 677-687.
- Lemeunier, F. and S. Aulard. 1992. Inversion polymorphism in *Drosophila melanogaster*. in Krimbas, C. B. and J. R. Powell (eds) *Inversion polymorphism in Drosophila*. C.R.C. Press Inc., Boca Raton, Florida.

- Lens, L., S. Van Dongen, S. Kark and E. Matthysen. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *The Biological review*, 77: 27-38.
- Leung, B. and M. R. Forbes. 1997. Modelling fluctuating asymmetry in relation to stress and fitness. *OIKOS*, 78: 397-405.
- Loeschcke, V., J. Bundgaard and J. S. F. Barker. 1999. Reaction norms and genetic parameters at different temperatures for thorax and wing size traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii*. *Journal of Evolutionary Biology*, 12: 605-623.
- Loeschcke, V. and R. A. Krebs. 1994. Genetic variation for resistance and acclimation to high temperature stress in *Drosophila buzzatii*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 52: 83-92.
- Loeschcke, V., R. A. Krebs and J. S. F. Barker. 1994. Genetic variation across for resistance and acclimation to high temperature stress in *Drosophila buzzatii*. *Biological journal of the Linnean Society*, 52: 83-92.
- Loeschcke, V., R. A. Krebs, J. Dahlgard and P. Michalak. 1997. High-temperature stress and the evolution of thermal resistance in *Drosophila*. in R. Bijlsma and V. Loeschcke (ed) *Environmental stress, Adaptation and evolution*. Birkhäuser-Verlag, Basel.
- Makarieva, A. M., V. G. Gorshkov and B. L. Li. 2005. Biochemical universality of living matter and its metabolic implications. *Functional Ecology*, 19: 547-557.
- Matta, B. P. and B. C. Bitner-Mathé. 2004. Genetic architecture of wing morphology in *Drosophila simulans* and an analysis of temperature effects on genetic parameter estimates. *Heredity*, 93: 330-341.
- McMahon, T. A. and J. T. Bonner. 1986. *Tamaño y vida*. Editorial Labor, Barcelona.
- McNamara, J. M. and A. I. Houston. 1996. State-dependent life histories. *Nature*, 380: 215-221.
- Millar, J. S. and R. M. Zammuto. 1983. Life histories of mammals: an analysis of life tables. *Ecology*, 64: 631-635.
- Moller, A. P. 1997. Developmental stability and fitness: a review. *The American Naturalist*, 149: 916-932.
- Moran, M. D. 2003. Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies. *OIKOS*, 100: 403-405.

- Mousseau, T. A. 1997. Ectotherms follow the converse Bergmann's rule. *Evolution*, 51: 630-632.
- Mousseau, T. A. and D. A. Roff. 1987. Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity*, 59: 181-198.
- Mousseau, T. A. and D. A. Roff. 1989. Adaptation to seasonality in a cricket: patterns of phenotypic and genotypic variance in body size and diapause expression along a cline in season length. *Evolution*, 43: 1483-1496.
- Navas, C. A. 2003. Anfibios y lagartos de alta montaña: ecofisiología evolutiva y límites altitudinales in Bozinovic, F. (ed) *Fisiología Ecológica & Evolutiva*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile.
- Neargarder, G., E. P. Dahlhoff and N. E. Rank. 2003. Variation in thermal tolerance is linked to phosphoglucose isomerase genotype in a montane leaf beetle. *Functional Ecology*, 17: 213-221.
- Neat, F., K. Fowler, V. French and L. Partridge. 1995. Thermal evolution of growth efficiency in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 260: 73-78.
- Negovetic, S. and J. Jokela. 2001. Life-history, phenotypic plasticity, and subpopulation structure in a freshwater snail. *Ecology*, 82: 2805-2815.
- Nespolo, R. F., L. D. Bacigalupe and F. Bozinovic. 2003. Heritability of energetic in a wild mammal, the leaf-eared mouse (*Phyllotis darwini*). *Evolution*, 57: 1679-1688.
- Neuhäuser, M. 2004. Testing whether any of the significant tests within a table are indeed significant. *OIKOS*, 106: 409-410.
- Nijhout, H. F. and G. Davidowitz. 2003. Developmental perspectives on phenotypic variation, canalization and fluctuating asymmetry. in Polak, M. (ed) *Developmental Instability*. Oxford University Press, Nueva York.
- Ochocinska, D. and J. R. E. Taylor. 2003. Bergmann's rule in shrews: geographical variation of body size in Palearctic *Sorex* species. *Biological journal of the Linnean Society*, 78: 365-381.
- Palmer, A. R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer *Developmental instability: its origin and evolutionary implications*. Kluwer, Dordrecht.
- Palmer, A. R. and C. Strobeck. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of ecology and Systematics*, 17: 391-421.

Partridge, L., B. Barrie, K. Fowler and V. French. 1994. Thermal Evolution of pre-adult life history traits in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, 7: 645-663.

Partridge, L. and K. Fowler. 1992. Direct and correlated responses to selection for age at reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 46: 76-91.

Partridge, L., R. Langelan, K. Fowler, K. F. Boszwaan and V. French. 1999. Correlated responses to selection on body size in *Drosophila melanogaster*. *Genetical research*, 74: 43-54.

Patterson, J. T. and W. S. Stone. 1952. *Evolution in the Genus Drosophila*. The Macmillan Company, New York.

Pétavy, G., J. R. David, V. Debat, P. Gibert and B. Moreteau. 2004. Specific effects of cycling stressful temperatures upon phenotypic and genetic variability of size traits in *Drosophila melanogaster*. *Evolutionary ecology research*, 6: 873-890.

Pétavy, G., J. R. David, P. Gibert and B. Moreteau. 2001a. Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes. *Journal of Thermal Biology*, 26: 29-39.

Pétavy, G., B. Moreteau, P. Gibert, J.-P. Morin and J. R. David. 2001b. Phenotypic plasticity of body size in *Drosophila*: effects of a daily periodicity of growth temperature in two sibling species. *Physiological Entomology*, 26: 351-361.

Peters, R. H. 1983. *The ecological implications of body size*, x edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Piccinali, R. El papel de la selección natural y de la demografía histórica sobre la variabilidad nucleotídica de los genes *Xdh* (Xantina deshidrogenada) y *áEst-5* (alfa esterasa 5) en *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*. 2004. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Piccinali, R., M. Aguadé and E. Hasson. 2004. Comparative Molecular Population Genetics of the *Xdh* Locus in the Cactophilic Sibling Species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 141-152.

Piccinali, R., L. J. Mascord, J. S. F. Barker, J. G. Oakeshott and E. Hasson. 2007. Molecular Population Genetics of the *á-Esterase5* Gene Locus in Original and Colonized Populations of *Drosophila buzzatii* and Its Sibling *Drosophila koepferae*. *Journal of Molecular Evolution*, 64: 158-170.

Pigliucci, M., C. J. Murren and C. D. Schlichting. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 2362-2367.

- Pigliucci, M. 1996. How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends in ecology & evolution*, 11: 168-173.
- Podrabsky, J. E. and G. N. Somero. 2004. Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 2237-2254.
- Powell, J. R. 1997. *Progress and prospects in evolutionary biology. The Drosophila model*. Oxford University Press, Oxford.
- Prasad, N. G., M. Shakarad, D. Anitha, M. Rajamani and Joshi A. 2001. Correlated responses to selection for faster development and early reproduction in *Drosophila*: the evolution of larval traits. *Evolution*, 55: 1363-1372.
- Prasad, N. G., M. Shakarad, V. M. Gohil, V. Sheeba, M. Rajamani and A. Joshi. 2000. Evolution of reduced preadult viability and larval growth rate in laboratory populations of *Drosophila melanogaster* selected for shorter development time. *Genetical research*, 76: 249-259.
- Real Academia Española. 2003. *Diccionario de la lengua española*, Vigésima segunda edn. Espasa Calpe, S. A..
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Ricklefs, R. E. and M. Wikelski. 2002. The physiology/life history nexus. *Trends in ecology & evolution*, 17: 462-468.
- Robinson, S. J. W. and L. Partridge. 2001. Temperature and clinal variation in larval growth efficiency in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 14-21.
- Rodríguez, C., J. J. Fanara and E. Hasson. 1999. Inversion polymorphism, longevity, and body size in a natural population of *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, 53: 612-620.
- Rodríguez, C., R. Piccinalli, E. Levy and E. Hasson. 2000. Contrasting population genetic structures using allozymes and the inversion polymorphism in *Drosophila buzzatii*. *Journal of Evolutionary Biology*, 13: 976-984.
- Roff, D. A. 1992. *The evolution of life histories*. Chapman & Hall, New York.
- Roff, D. A. 2001. *Life history evolution*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Roff, D. A. and T. A. Mousseau. 1987. Quantitative genetics and fitness: lessons from *Drosophila*. *Heredity*, 58: 103-118.

- Rogowitz, G. L. and M. A. Chappel. 2000. Energy metabolism of eucalyptus-boring better at rest and during locomotion: gender makes a difference. *The Journal of Experimental Biology*, 203: 1131-1139.
- Rohlf, F. J. and L. F. Marcus. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in ecology & evolution*, 8: 129-132.
- Rombough, P. 2003. Modelling developmental time and temperature. *Nature*, 424: 268-269.
- Santos, M., D. Brites and H. Laayouni. 2006. Thermal evolution of pre-adult life history traits, geometric size and shape, and developmental stability in *Drosophila subobscura*. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 2006-2021.
- Santos, M., W. Céspedes, J. Balanyà, V. F. Trotta, C. F. Calboli, A. Fontdevila and L. Serra. 2005. Temperature-related genetic changes in laboratory populations of *Drosophila subobscura*: evidence against simple climatic-based explanations for latitudinal clines. *The American Naturalist*, 165: 258-273.
- Santos, M., P. F. Iriarte, W. Céspedes, J. Balanyà, A. Fontdevila and L. Serra. 2004. Swift laboratory thermal evolution of wing shape (but not size) in *Drosophila subobscura* and its relationship with chromosomal inversion polymorphism. *Journal of Evolutionary Biology*, 17: 841-855.
- Schlichting, C. D. and M. Pigliucci. 1998. *Phenotypic evolution. A Reaction norm perspective*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Schmidt, P. S., L. Matzkin, M. Hipólito and W. F. Eanes. 2005. Geographic variation in diapause incidence, life-history traits and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 59: 1721-1732.
- Schmidt-Nielsen, K. 1977. Scaling in biology: the consequences of size. *The Journal of experimental zoology*, 194: 287-307.
- Sgrò, C. M. and M. W. Blows. 2004. The genetic covariance among clinal environments after adaptation to an environmental gradient in *Drosophila serrata*. *Genetics*, 167: 1281-1291.
- Silbermann, R. and M. Tatar. 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 54: 2038-2045.
- Sinclair, B. J., P. Vernon, C. J. Klok and S. L. Chown. 2003. Insects at low temperatures: an ecological perspective. *Trends in ecology & evolution*, 18: 257-262.
- Sivinski, J. and G. Dodson. 1992. Sexual dimorphism in *Anastrepha suspensa* (Loew) and other tephritid fruit flies: possible roles of developmental rate, fecundity and dispersal. *Journal of Insect Behavior*, 5: 491-506.

- Sokal, R. and F. Rohlf. 1997. *The principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Co, New York.
- Sørensen, J. G., F. M. Norry, A. C. Scannapieco and V. Loeschcke. 2005. Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 829-837.
- Spicer, J. I. and K. J. Gaston. 1999. *Physiological diversity and its ecological implications* Blackwell Science, Oxford.
- Stearns, S. C. 1992. *The Evolution of life histories* Oxford University Press, Oxford.
- Stearns, S. C., M. Kaiser and T. J. Kawecki. 1995. The differential genetic and environmental canalization of fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, 8: 539-557.
- Stillwell, R. C. and C. W. Fox. 2005. Complex patterns of phenotypic plasticity: interactive effects of temperature during rearing and oviposition. *Ecology*, 86: 924-934.
- Székely, T., R. P. Freckleton and J. D. Reynolds. 2004. Sexual selection explains Rensch's rule of size dimorphism in shorebirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 12224-12227.
- Thomas, R. H. and J. S. F. Barker. 1999. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theoretical and applied genetics*, 85: 598-608.
- Thomas, R. H. and J. S. F. Barker. 1993. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theoretical and applied genetics*, 85: 598-608.
- Tomanek, L. and G. N. Somero. 2002. Interspecific and acclimation-induced variation in levels of heat shock protein 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus *Tegula*): implications for regulation of hsp gene expression. *The Journal of Experimental Biology*, 205: 677-685.
- Townsend, C. R. and P. Calow. 1981. *Physiological Ecology: An Evolutionary Approach to Resource Use*. Blackwell Scientific, Oxford.
- Trotta, V., F. C. F. Calboli, F. Garoia, D. Grifoni and S. Cavicchi. 2005. Fluctuating asymmetry as a measure of ecological stress in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *European journal of entomology*, 102: 195-200.
- Truman, J. W. and L. M. Riddiford. 1999. The origins of insect metamorphosis. *Nature*, 401: 447-452.

- Taylor, B. W., C. R. Anderson and B. L. Peckarsky. 1998. Effects of size at metamorphosis on stonely fecundity, longevity and reproductive success. *Oecologia*, 114: 494-502.
- Van Delden, W. and A. Kamping. 1991. Changes in relative fitness with temperature among second chromosome arrangements in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 127: 507-514.
- Van Dongen, S. and L. Lens. 2000. The evolutionary potential of developmental instability. *Journal of Evolutionary Biology*, 13: 326-335.
- Van Voorhies, W. A. 1996. Bergmann size clines: a simple explanation for their occurrence in ectotherms. *Evolution*, 50: 1259-1264.
- Van Voorhies, W. A., A. A. Khazaeli and J. W. Curtsinger. 2004. Testing the "rate of living" model: further evidence that longevity and metabolic rate are not inversely correlated in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 50: 445-453.
- Verhoeven, K. J. F., K. L. Simonsen and L. M. McIntyre. 2005. Implementing false discovery rate control: increasing your power. *OIKOS*, 108: 643-647.
- Vleck, D. 1987. Measurement of O<sub>2</sub> consumption, CO<sub>2</sub> production, and water vapor production in a closed system. *Journal of applied physiology*, 62: 2103-2106.
- Weber, K. E. 1990. Selection on wing allometry in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 126: 975-989.
- Wilkins, A. S. 1996. Canalization: a molecular genetic perspective. *BioEssays*, 19: 257-262.
- Willmore, K. E., C. P. Klingenberg and B. Hallgrímsson. 2005. Ther relationship between fluctuating asymmetry and environmental variance in Rhesus macaque skulls. *Evolution*, 59: 898-909.
- Woods, R. E., C. M. Sgrò, M. J. Hercus and A. A. Hoffmann. 1999. The association between fluctuating asymmetry, trait variability, trait heritability, and stress: a multiply replicated experiment on combined stressed in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 53: 493-505.
- Zakharov, V. M. 1992. Populations phenogenetics: analysis of developmental stability in natural populations. *Acta Zoologica Fennica*, 191: 7-30.
- Zera, A. J. and L. G. Harshman. 2001. The physiology of life- history trade-offs in animals. *Annual review of ecology, evolution & systematics*, 32: 95-126.



Zwaan, B., R. Bijlsma and R. F. Hoekstra. 1995. Artificial selection for developmental time in *Drosophila melanogaster* in relation to the evolution of aging: direct and correlated responses. *Evolution*, 49: 635-648.