

Tesis Doctoral

# Bases y arquitectura genética de caracteres morfológicos en *Drosophila melanogaster*

Carreira, Valeria Paula

2009-04-29

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Carreira, Valeria Paula. (2009-04-29). Bases y arquitectura genética de caracteres morfológicos en *Drosophila melanogaster*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Carreira, Valeria Paula. "Bases y arquitectura genética de caracteres morfológicos en *Drosophila melanogaster*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009-04-29.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Bases y arquitectura genética de caracteres morfológicos en  
*Drosophila melanogaster***

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

**Valeria Paula Carreira**

**Director de tesis:** Juan José Fanara

**Consejero de estudios:** Esteban Hasson

Ciudad de Buenos Aires, abril de 2009

# Bases y arquitectura genética de caracteres morfológicos en *Drosophila melanogaster*

## Resumen

La comprensión de la arquitectura genética de cualquier carácter cuantitativo requiere del conocimiento de todos los factores que contribuyen a su expresión. Particularmente, se debe determinar cuáles son los genes involucrados, qué proporción de los mismos es responsable de la variabilidad fenotípica en poblaciones naturales, si estos tienen efectos diferenciales sobre el fenotipo bajo diferentes condiciones ambientales, cuáles son las bases moleculares de la variación entre alelos y cuáles son las fuerzas evolutivas que gobiernan su cambio. Asimismo es imprescindible conocer el modo en el que la acción de tales factores se combina para determinar la expresión de los caracteres analizados. Una vez caracterizada la arquitectura genética del carácter se puede estudiar su relación con otros caracteres de forma tal de realizar un análisis del fenotipo en sentido más amplio. Este tipo de análisis, que debe realizarse en un marco multidisciplinario, sólo pueden llevarse a cabo utilizando organismos modelo como *Drosophila melanogaster* que permitan emplear múltiples herramientas de distintos orígenes. De esta manera, esta tesis se llevó a cabo con el objetivo de contribuir a la caracterización de la arquitectura genética de caracteres vinculados al tamaño y la forma corporal en *D. melanogaster*. En particular, este trabajo permitió: a) identificar y caracterizar 92 genes asociados a caracteres vinculados al tamaño corporal y 98 genes relacionados con la conformación del ala, así como conocer su efecto predominantemente sexo-específico; b) analizar el efecto de la temperatura en la expresión de algunos de los genes identificados, lo que permitió notar el efecto significativo que este factor tiene en la expresión de los genes asociados a los caracteres estudiados; c) cuantificar distintas fuentes de variación que contribuyen a la variación total de los caracteres estudiados en individuos derivados de poblaciones naturales dispuestas a lo largo de gradientes ambientales de Argentina, lo que permitió saber que existe abundante variación genética natural asociada al cromosoma 2 para todos esos caracteres, algunos de los cuales mostraron patrones clinales; d) determinar que los seis genes que fueron analizados presentan altos niveles de variabilidad en las poblaciones naturales estudiadas con respecto a los caracteres vinculados al tamaño corporal y poca variación en relación a la conformación del ala.

**Palabras clave:** arquitectura genética - tamaño corporal - conformación del ala - *Drosophila melanogaster* - genómica funcional - alometría - dimorfismo sexual - clina.

# Basis and genetic architecture of morphological traits in *Drosophila melanogaster*

## Abstract

Understanding the genetic architecture of any quantitative trait requires the knowledge of all the factors that contribute to its expression. Particularly, it must be determined the genes involved in their expression, how many of them show variation in natural populations, whether they show differential effects on the phenotype under different environmental conditions, which is the molecular basis of variation among alleles and which are the evolutive forces that govern their change. It is also indispensable to know the way in which the action of such factors combine to determine the expression of the analyzed traits. Once the genetic architecture of the trait has been characterized, its relationship with other traits may be studied to perform an analysis of the phenotype in a broader sense. This type of analysis, which should be done in a multidisciplinary frame, may only be achieved using model organisms like *Drosophila melanogaster* which allow to employ multiple resources from different origins. In this way, this thesis was carried out with the objective of contributing to the characterization of the genetic architecture of traits related to body size and shape in *D. melanogaster*. In particular, this work allowed: a) to identify and to characterize 92 genes associated to body size related traits and 98 genes related to wing shape, as well as to know their predominantly sex-specific effects; b) to analyze the effect of temperature on the expression of some of the genes identified, which let to note the significant effect of this factor on the expression of the genes associated to the analyzed traits; c) to quantify different sources of variation contributing to total variation of the analyzed traits in individuals derived from natural populations distributed along environmental gradients of Argentina, which allowed to know that plentiful natural genetic variation associated to the second chromosome exists for all those traits, some of which showed clinal patterns; d) to determine that the six genes which were analyzed show high levels of variability in the natural populations studied with respect to body size related traits and low variation in relation to wing shape.

**Keywords:** genetic architecture - body size - wing shape - *Drosophila melanogaster* - functional genomics - allometry - sexual dimorphism - cline

En momentos como este, en los que se comienza a transitar el tramo final y se empieza a vislumbrar la llegada a la meta; es inevitable pensar en todos aquellos que brindaron su apoyo a lo largo del extenso camino recorrido. De esta manera, trataré de hacer una breve referencia (aunque vale la pena recordar que nunca me fue fácil ser concisa) a todas aquellas personas e instituciones que de alguna forma me ayudaron a realizar este doctorado y, en particular, a desarrollar esta tesis.

Juan José Fanara, me brindó la posibilidad de continuar trabajando en el laboratorio de evolución al proponerme llevar a cabo esta tesis. Muchas de las situaciones vividas en ese contexto se transformaron en lecciones que me van a acompañar durante el resto de mi vida.

Esteban Hasson, Ignacio Soto y Julián Mensch me hicieron pensar y repensar algunos aspectos vinculados a esta tesis a partir de distintas charlas que pudimos mantener en medio del trajín cotidiano. Asimismo, tanto ellos como Trudy Mackay y Robert Anholt, realizaron críticas y comentarios sobre manuscritos relacionados con esta tesis que colaboraron para darle forma a algunas partes del trabajo que aquí se muestra.

Muchas personas, además de las mencionadas anteriormente, me acompañaron a lo largo del desarrollo de esta tesis en el Laboratorio de Evolución. Marcelo Cortese, Romina Piccinali, Guillermo Folguera, Ana Massaldi, Luciana Spezzi y Santiago Ceballos ya no están desarrollando sus actividades en “el labo” pero estuvieron al comienzo de esta travesía. Eduardo Soto, Nicolás Lavagnino, Cristian Corio, Marcos Imberti, Julieta Goenaga, Paola Sassi, Paula Lipko, María Betti y Juan Hurtado están trabajando actualmente allí, por lo que son testigos de la finalización de esta etapa de mi vida. Todos ellos fueron, en alguna medida, partícipes de mis días de trabajo de los últimos cinco años y contribuyeron, de alguna manera, con mi formación personal y profesional.

Leandro Nocera me acompaña desde mucho antes de haber comenzado a transitar este camino y lo sigue haciendo todos los días, intentando ayudarme a equilibrar las interminables horas consagradas al trabajo con tiempos comparablemente ínfimos dedicados a algunas de las tantas otras cosas que también son condimentos indispensables de la vida.

Mis papás Luisa y Omar siempre me estimularon a estudiar y me apoyaron cuando elegí esta carrera, aún cuando todo parecía indicar que seguirla iba a requerir de un esfuerzo enorme (no sólo mío) y no iba a brindar los beneficios que otorgan otras profesiones más reconocidas. A partir de ese momento me acompañaron constantemente a lo largo del recorrido, mostrando interés por lo que estaba haciendo en cada momento y compartiendo conmigo los enojos y las alegrías asociados a cada uno de ellos.

Diferentes integrantes del resto de mi extensa (y extendida) familia compartieron más o menos instantes conmigo, dependiendo de las circunstancias que la vida les deparó durante este periodo. Entre ellos quiero destacar a mis hermanos, Lucas, Marcos, Laura, Emmanuel y Pablo. Sus preguntas y comentarios acerca de esta profesión a menudo representaron desafíos que me llevaron a simplificar mis explicaciones (en principio interminables) y a tratar de conectarlas con la realidad común. Si bien creo que todos ellos aún se preguntan, en mayor o en menor medida, a que me dedico realmente; todos esos momentos me permitieron revalorizar no sólo “lo que hago” sino la importancia que tiene hacer lo que a uno le gusta.

Distintas instituciones me brindaron una ayuda que resultó ser indispensable y, de esa manera, me permitieron recorrer este camino hasta el final. Por un lado, la UBA y el CONICET me otorgaron distintas becas (*Beca doctoral*, asignación primaria y renovación, y *Beca Interna de postgrado tipo II*, respectivamente) para poder realizar este doctorado. Por otro lado, esas mismas instituciones contribuyeron al desarrollo de esta tesis a través del financiamiento de los siguientes proyectos:

“De los genes a las poblaciones: un camino para conocer las bases y la arquitectura genética de caracteres adaptativos en *Drosophila melanogaster*”. Director: Dr. Juan José Fanara. Proyecto UBACyT X183 (2004-2007).

“Genómica, adaptación y especiación en *Drosophila*”. Director: Dr. Juan José Fanara. Codirector: Dr. Esteban Hasson. CONICET. PIP 5447 (2006-2008).

“Estudios de la arquitectura genética de caracteres complejos”. Director: Dr. Juan José Fanara. Proyecto UBACyT X076 (2008-2010).

*Al Polaco*

*A Papá y a Mamá*

*A los Maestros que tuve en cada etapa de mi formación*

*A todos aquellos que contribuyeron a sostener*

*la educación pública de alta calidad*

*que me permitió llegar hasta aquí*

---

## Índice

---

	<b>Página</b>
<b>Capítulo I:</b> La arquitectura genética de caracteres complejos: El caso del tamaño corporal.	
Resumen.....	10
El análisis de caracteres cuantitativos.....	11
La arquitectura genética de caracteres cuantitativos.....	12
<i>Drosophila</i> como modelo.....	13
Tamaño, forma y función.....	15
La regulación del tamaño corporal.....	17
La regulación del tamaño de los órganos.....	20
La evolución de tamaño corporal.....	23
El ala de <i>Drosophila</i> como modelo.....	25
Objetivos, hipótesis y predicciones del presente trabajo.....	27
<b>Capítulo II:</b> Identificación y caracterización de genes asociados a la expresión de distintos caracteres vinculados al tamaño corporal en <i>D. melanogaster</i> .	
Resumen.....	30
Introducción.....	31
Materiales y métodos.....	33
Resultados.....	36
Discusión.....	56
<b>Capítulo III:</b> Identificación y caracterización de genes asociados a la conformación del ala en <i>D. melanogaster</i> .	
Resumen.....	64
Introducción.....	65
Materiales y métodos.....	73
Resultados.....	76
Discusión.....	98



**Capítulo IV:** Análisis de la plasticidad fenotípica de un grupo de genes en relación a distintos caracteres morfológicos en *D. melanogaster*.

Resumen.....	104
Introducción.....	105
Materiales y métodos.....	111
Resultados.....	116
Discusión.....	144

**Capítulo V:** Análisis de la variación de distintos caracteres vinculados al tamaño corporal en líneas de *D. melanogaster* derivadas de poblaciones naturales.

Resumen.....	153
Introducción.....	154
Materiales y métodos.....	159
Resultados.....	163
Discusión.....	175

**Capítulo VI:** Análisis de la variación de la conformación del ala en líneas de *D. melanogaster* derivadas de poblaciones naturales.

Resumen.....	183
Introducción.....	184
Materiales y métodos.....	188
Resultados.....	192
Discusión.....	207

**Capítulo VII:** Identificación de regiones genómicas responsables de la variación de los caracteres estudiados en las líneas de *D. melanogaster* derivadas de poblaciones naturales.

Resumen.....	214
Introducción.....	215
Materiales y métodos.....	218
Resultados.....	221
Discusión.....	229

<b>Capítulo VIII: Conclusiones generales de la tesis: la arquitectura genética de caracteres morfológicos en <i>D. melanogaster</i></b>	
Resumen.....	237
La arquitectura genética del tamaño y la forma del cuerpo en <i>D. melanogaster</i> .....	238
El análisis de la morfología: la forma, el tamaño y la conformación.....	239
El estudio de la arquitectura genética: el aporte de distintos factores.....	244
Conclusiones generales.....	260
<b>Anexo metodológico I: Líneas de <i>D. melanogaster</i> y diseño experimental general utilizados a lo largo de la tesis.</b>	
Líneas de <i>D. melanogaster</i> utilizadas en la primera parte del trabajo.....	262
Líneas de <i>D. melanogaster</i> utilizadas en la segunda parte del trabajo.....	267
Mantenimiento de las líneas de trabajo.....	269
Diseño experimental general utilizado a lo largo del trabajo.....	271
<b>Anexo metodológico II: Caracteres morfológicos y análisis estadísticos generales utilizadas a lo largo de la tesis.</b>	
Estimación de los caracteres morfológicos.....	273
Generalidades sobre el estudio de la morfología.....	274
Generalidades sobre los análisis estadísticos.....	285
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>289</b>

---

## **Capítulo I**

### La arquitectura genética de caracteres complejos: el caso del tamaño corporal.

---

#### **Resumen**

El estudio de la evolución de caracteres adaptativos es difícil debido a los múltiples factores (genéticos, ambientales e interacciones entre ambos) implicados en su expresión. Por este motivo es necesario identificar las bases genéticas, es decir, los genes que orquestan la expresión de los caracteres estudiados; para luego comprender el modo en que la acción de muchos loci conduce a su expresión, ya sea a través de la suma de los efectos de cada locus (aditividad), de las interacciones entre loci (epístasis), o de los efectos pleiotrópicos de los mismos. Asimismo, es indispensable entender si cambios en el ambiente determinan cambios en la expresión de los genes implicados en su expresión que podrían tener como consecuencia una modificación de las interacciones génicas. La comprensión de la arquitectura genética de estos caracteres requiere, además, de la cuantificación de la variación genética natural intrapoblacional y de la divergencia interpoblacional en loci asociados. Este tipo de análisis requiere la utilización conjunta de herramientas de la genómica funcional, la genética cuantitativa, la bioinformática y la genética ecológica. Pocos organismos modelo ofrecen la posibilidad de realizar estudios tan abarcativos como *Drosophila melanogaster*. El tamaño del cuerpo es un carácter adaptativo que presenta tanto variabilidad genética como dependencia de factores ambientales y muestra una multiplicidad de interacciones con otros componentes del fitness. En *Drosophila* se ha demostrado que este carácter se relaciona con la fecundidad, la capacidad dispersiva, el éxito en el apareamiento, la longevidad y el tiempo de desarrollo. En insectos, en general, y en *Drosophila* en particular, se han descrito clinas latitudinales para caracteres fenotípicos entre los cuales se encuentra el tamaño corporal. Si bien los patrones clinales podrían explicarse como el resultado de procesos demográficos, las evidencias sugieren que son el producto de la acción de la selección natural. Por ejemplo, la observación de clinas latitudinales paralelas para el tamaño del cuerpo en diferentes continentes y distintas especies de *Drosophila* avala fuertemente su origen adaptativo. A pesar del desarrollo de un creciente cuerpo de conocimiento acerca de los factores fisiológicos y genéticos que subyacen a las diferencias en el tamaño corporal, es poco lo que se conoce acerca de la arquitectura genética de este carácter complejo.

## El análisis de caracteres cuantitativos

Muchas de las hipótesis vinculadas con la genética de la adaptación requieren que se especifiquen los detalles acerca de las bases genéticas de caracteres complejos como el número y los efectos de los loci involucrados en su expresión (Phillips, 2005). En este sentido, una de las controversias más duraderas relacionadas con la biología evolutiva fue mantenida entre quienes sostenían que dicha base esta constituida por numerosos genes de efecto pequeño y aditivo, y aquellos que le daban mayor importancia a la epístasis y la pleiotropía (Mauricio, 2005). Sin embargo, recientemente se demostró que la expresión de los caracteres complejos está gobernada por redes epistáticas de múltiples genes pleiotrópicos (Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2004).

La mayoría de los caracteres complejos muestran variación continua debido a que su expresión suele ser el resultado de la acción de muchos genes, denominados loci de caracteres cuantitativos o QTLs (por su sigla en inglés: *Quantitative Trait Loci*; Falconer & Mackay, 1996). La genética cuantitativa es el área de la biología que se ocupa del análisis de estos caracteres utilizando una aproximación estadística basada en el análisis matemático de la variación fenotípica (Falconer & Mackay, 1996). De acuerdo con sus postulados, cuando se considera un único locus, el efecto genotípico suele ser considerado como la suma de un componente *aditivo* heredable y de un efecto de *dominancia* no heredable, que es el producto de la interacción entre los alelos. Asimismo, cuando el genotipo se refiere a más de un locus, el valor genotípico puede contener desviaciones adicionales debidas a combinaciones no aditivas de los genes en cuestión. De esta manera, en aquellos casos en que los genes interactúan entre si existe, además, un componente *epistático* no heredable. Por lo tanto, la varianza genotípica total de un carácter cuantitativo puede expresarse como:

$$V_G = V_A + V_D + V_I$$

donde  $V_A$  es la varianza aditiva,  $V_D$  es la varianza de dominancia y  $V_I$  es la varianza epistática (Falconer & Mackay, 1996).

Finalmente, el valor fenotípico de un carácter habitualmente se ve influenciado tanto por el genotipo como por el ambiente en el que este se expresa y, de hecho, puede existir una interacción entre ambos componentes. Por lo tanto, la varianza fenotípica total de un carácter cuantitativo puede expresarse como:

$$V_P = V_G + V_E + V_{ExG}$$

donde  $V_G$  es la varianza genotípica,  $V_E$  es la varianza ambiental y  $V_{ExG}$  es la varianza explicada por la interacción entre el genotipo y el ambiente (Falconer & Mackay, 1996).

Los mecanismos subyacentes a la evolución fenotípica, cuyo conocimiento permitiría predecir la trayectoria de dicho cambio, no son fáciles de analizar. Para lograr un primer

acercamiento a tal cuestión, se han desarrollado distintos modelos que se basan en la suposición de que la selección natural optimiza los caracteres dentro de ciertos límites. Tales modelos de *optimalidad* han desatado fuertes controversias vinculadas, predominantemente, con las unidades sobre las que actúa la selección y los límites de su acción optimizadora (por ejemplo, Gould & Lewontin, 1979; Maynard Smith, 1978). En resumen, las dos visiones más extremas difieren en cuanto a lo que consideran como blanco de la selección natural y, en ese sentido, pueden resumirse de la siguiente manera:

- Los caracteres pueden ser seleccionados independientemente.
- Los caracteres integran complejos funcionales que son los objetos de la selección.

La primera representa la visión *particulada* de la evolución y se debe, en gran medida, a Fisher (1930). De acuerdo con este modelo, la expresión de un carácter está determinada por genes que presentan un efecto pequeño e independiente, de modo tal que el fenotipo será el resultado de la sumatoria de los efectos de cada gen individual y de la varianza ambiental. Bajo este modelo, la selección natural juega un papel central como fuerza modeladora de la evolución fenotípica. De esta manera, las poblaciones sometidas a condiciones ambientales idénticas evolucionarán en la misma dirección y eventualmente alcanzarán el mismo *pico adaptativo*, en términos de la conocida metáfora de las topografías adaptativas de Wright (1931).

En cambio, la visión debida a Wright postula que, además de los efectos aditivos de los genes, las interacciones epistáticas y la pleiotropía cumplen roles fundamentales en la evolución del fenotipo. Según este modelo, los alelos que se encuentran presentes en otros loci (el genotipo residual), tiene una importancia singular en la determinación del fenotipo. Este modelo es conocido como teoría de los equilibrios cambiantes (*Shifting Balance Theory*) y, básicamente, propone que la población se encuentra estructurada en pequeñas subpoblaciones cada una de las cuales ocupa un pico adaptativo diferente determinado por las distintas condiciones locales. Por lo tanto, de acuerdo con este modelo, tanto la selección natural como los procesos estocásticos gobiernan el cambio evolutivo.

A pesar de las diferencias, ambos modelos le adjudican una gran importancia al efecto que ejerce la variación ambiental en los loci de caracteres cuantitativos. En general, tanto la teoría (Wade & Goodnight, 1998; Wright, 1968) como los datos empíricos (por ejemplo, Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2004) sugieren que los efectos genéticos no aditivos y el efecto de las interacciones entre el genotipo y el ambiente juegan un rol central en la evolución fenotípica.

### **La arquitectura genética de caracteres cuantitativos**

A partir de todo lo mencionado anteriormente, se puede denominar como *arquitectura genética* de un carácter a la manera en que los factores genéticos interactúan entre si y con el

ambiente de forma tal de construir y controlar la expresión del carácter en cuestión así como sus patrones de variación (Hansen, 2006). De esta manera, la comprensión de la arquitectura genética de cualquier carácter cuantitativo requiere del conocimiento de todos los factores que intervienen en su expresión (Anholt & Mackay, 2004). En particular, los estudios destinados a conocer la arquitectura genética de un carácter cuantitativo requieren (Mackay, 2004):

- Determinar cuáles son los genes involucrados en su expresión (QTLs),
- Conocer la proporción de los QTLs responsable de la variabilidad fenotípica observada en poblaciones naturales,
- Saber si dichos genes tienen efectos diferenciales sobre el fenotipo bajo diferentes condiciones ambientales,
- Investigar las bases moleculares de las diferencias entre alelos y cuáles son las fuerzas evolutivas que gobiernan su cambio,
- Conocer el modo en el que la acción de los factores genéticos y ambientales se combina para determinar la expresión de los caracteres estudiados.

Una vez caracterizada la arquitectura genética del carácter se puede estudiar su relación con otros caracteres del organismo de forma tal de realizar un análisis del fenotipo en sentido más amplio. Este tipo de análisis requiere la utilización conjunta de herramientas de la genómica funcional, la genética cuantitativa, la bioinformática y la genética ecológica. Pocos organismos modelo ofrecen la posibilidad de realizar estudios tan abarcativos como *Drosophila melanogaster* (Rubin & Lewis, 2000).

### ***Drosophila* como modelo**

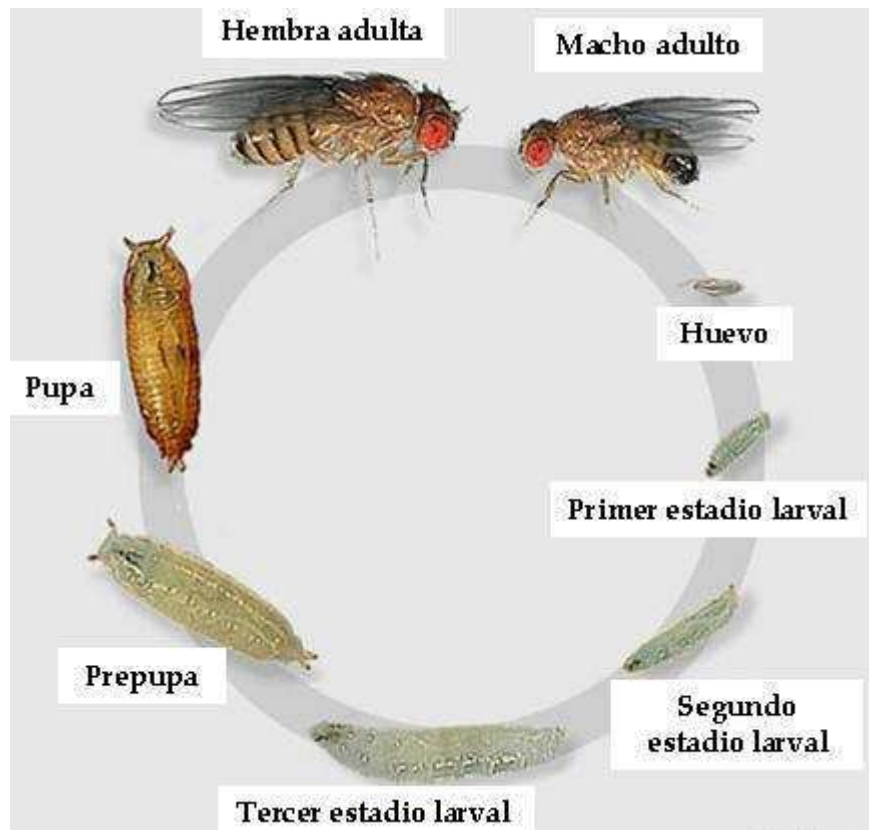
Para analizar en forma detallada las bases y la arquitectura genética de caracteres complejos se requiere de organismos modelo que reúnan, idealmente, las siguientes propiedades:

- Un genoma conocido,
- Una ecología accesible y de fácil estudio,
- Marcadores genéticos de fácil monitoreo,
- Un tiempo de generación relativamente corto tal que la probabilidad de observar la respuesta a los diferentes estímulos sea mayor.

Muy pocas especies reúnen estos requisitos y quizás, entre ellas, *D. melanogaster* es la que más se acerca a este ideal (Mackay, 2004; Matthews *et al.*, 2005).

*D. melanogaster* es un díptero cosmopolita que desde principios del siglo XX se convirtió en un organismo modelo para diversas clases de estudios: genéticos, comportamentales, fisiológicos, etc. (Rubin & Lewis, 2000; Matthews *et al.*, 2005). Esta especie, al igual que la mayor

parte de las especies del género, presenta tres pares de cromosomas autosómicos (llamados 2, 3 y 4) y un par de cromosomas sexuales, X e Y. El ciclo de vida de *D. melanogaster* consta de una etapa embrionaria, seguida por tres estadios larvales donde el individuo va aumentando de tamaño hasta alcanzar el estadio pupal. Una vez que el adulto emerge del pupario no aumenta más de tamaño y alcanza la madurez sexual en pocas horas (Roberts, 1998).



**Figura 1.1:** Ciclo de vida de *D. melanogaster*. Se muestran los distintos estadios por los que pasa el individuo hasta alcanzar la madurez. Figura modificada a partir del original extraído de la página de Internet [www.flickr.com](http://www.flickr.com).

*D. melanogaster* es un modelo excelente para estudios genéticos, ya que (Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2004; Matthews *et al.*, 2005):

- Su tiempo generacional es corto y permite generar grandes cantidades de individuos genéticamente similares y criarlos bajo condiciones controladas.
- Existe una extensa base de datos disponible, en la cual se puede encontrar abundante información que facilita el diseño de experimentos utilizando esta especie. Por ejemplo, el sitio de Internet denominado *FlyBase* (<http://www.flybase.org>).
- Su genoma ya fue secuenciado (Adams *et al.*, 2000; Celniker & Rubin, 2003) y se encuentra disponible de manera gratuita para los investigadores

(<http://flybase.bio.indiana.edu/>) lo que facilita enormemente la identificación de genes candidatos a influir en los caracteres complejos bajo estudio.

- En el centro de *stocks* de *Drosophila* de la Universidad de Indiana (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>), se encuentran distintas cepas de *D. melanogaster* a disposición de los investigadores las cuales facilitan la ejecución de diferentes estudios genéticos. Se pueden citar, entre otros, los siguientes ejemplos:
  - Cepas portadoras de inserciones de elementos transponibles en diferentes sitios del genoma que constituyen una ayuda invaluable para los estudios de mapeo genético y de genómica funcional.
  - Líneas portadoras de cromosomas balanceadores que hacen posible propagar mutaciones en forma estable y obtener líneas completamente homocigóticas para cromosomas completos.

Estas facilidades permiten, por ejemplo, manipular cromosomas enteros para construir los genotipos de interés. Asimismo, se pueden generar líneas altamente endogámicas en las que la varianza genética ha sido prácticamente eliminada, lo cual facilita enormemente el análisis de la base y la arquitectura genética de caracteres complejos.

### **Tamaño, forma y función**

Los análisis morfológicos y fisiológicos contribuyen al estudio de la evolución de los organismos básicamente de dos maneras (Futuyma, 1998):

- Muchas diferencias entre los seres vivos son morfológicas o fisiológicas por lo que al estudiar caracteres vinculados con dichas diferencias se pueden comenzar a entender las causas de la diversidad biológica.
- El estudio de la morfología y fisiología de los organismos a menudo permite conocer los mecanismos de su funcionamiento. De esta manera, tales estudios pueden ayudar a entender qué modificaciones son ventajosas, cuales son los límites de la evolución fenotípica y qué camino evolutivo sería el más probable.

Posiblemente, ninguna otra característica de los seres vivos esté tan relacionada con otras como el tamaño corporal, por lo que conocer los mecanismos subyacentes a su expresión puede ser indispensable para entender los de muchos otros caracteres morfológicos y fisiológicos (por ejemplo, Calder, 1984; Schmidt-Nielsen, 1984). El tamaño que puede alcanzar un organismo, así como el de sus partes, son caracteres complejos de variación cuantitativa, que están determinados tanto por factores genéticos como ambientales que operan a través de mecanismos moleculares y fisiológicos complejos (por ejemplo, Conlon & Raff, 1999; Edgar, 2006; Mirth & Riddiford, 2007; Shingleton, 2007).



El carácter tamaño corporal se puede definir en función de múltiples parámetros mensurables a partir de las distintas partes que conforman al individuo, ya que todas las especies animales presentan una relación específica entre el tamaño de cada órgano y el tamaño corporal total (Conlon & Raff, 1999; Shingleton *et al.* 2007). Esta relación entre el tamaño de distintos caracteres del individuo o entre cada uno de ellos y su tamaño corporal total se denomina *alometría* (Schlichting & Pigliucci, 1998; Shingleton *et al.*, 2007; Stern & Emlen, 1999). Sin embargo, es necesario aclarar que este término está relacionado con tres fenómenos alternativos: la alometría ontogenética, la alometría estática y la alometría evolutiva o filogenética (Schlichting & Pigliucci, 1998; Shingleton *et al.*, 2007; Stern & Emlen, 1999). La *alometría ontogenética* describe el crecimiento de una parte del cuerpo en relación a otra parte o al tamaño corporal total a lo largo de un determinado periodo de crecimiento de un individuo. La *alometría evolutiva* describe el tamaño relativo de distintas partes del cuerpo entre individuos de distintas especies que se encuentran en el mismo estadio ontogenético. Finalmente, la *alometría estática* es similar a la anterior pero, en este caso, las medidas se refieren a individuos del mismo estadio ontogenético pertenecientes a una determinada especie. Como la variación del tamaño de los órganos y del cuerpo en un determinado estadio del desarrollo depende de la variación del crecimiento hasta dicha etapa, se puede concluir que las alometrías estáticas y las evolutivas son consecuencia de cambios en las alometrías ontogenéticas (Shingleton *et al.*, 2007).

La concepción moderna de la alometría fue desarrollada por Huxley (1924), quien llamó de esta manera al fenómeno en el que la tasa de crecimiento de un carácter difiere de la de otro resultando en un cambio de forma. En cambio, se denomina *isometría* al caso especial en el que dos caracteres varían exactamente de la misma manera (Schlichting & Pigliucci, 1998). Las relaciones alométricas se suelen modelar a través de la ecuación:

$$y = bx^a$$

donde  $x$  e  $y$  son los caracteres analizados,  $b$  es el valor que adopta  $y$  cuando  $x = 1$  y  $a$  es la tasa de cambio de  $y$  con cada unidad de incremento de  $x$  (Schlichting & Pigliucci, 1998; Shingleton *et al.*, 2007). En el caso más sencillo, en el que los caracteres se relacionan linealmente en una escala logarítmica,  $b$  es la ordenada al origen y  $a$ , el *coeficiente alométrico*, es la pendiente de la recta. Tal y como notó Gould (1966),  $a = 1$  es el caso especial de isometría para una relación lineal entre dos variables. Sin embargo, las alometrías estáticas no son siempre lineales sino que pueden ser sigmoidales o discontinuas dependiendo del carácter, la especie y la unidad de medición (Schlichting & Pigliucci, 1998; Shingleton *et al.*, 2007). Independientemente de su forma, las alometrías estáticas revelan como se relaciona el tamaño de distintos caracteres entre sí y con el tamaño corporal total  $y$ , de esta manera, capturan la relación entre el tamaño y la forma en organismos complejos (Shingleton *et al.*, 2007).

La variación de las alometrías estáticas puede deberse a diferencias genéticas entre individuos, a diferencias en el ambiente en el que estos se han criado o a la interacción entre ambos factores, los cuales pueden influir en el crecimiento a través de mecanismos diferentes (Shingleton *et al.*, 2007). Distintas fuentes de variación ambiental (por ejemplo, la temperatura, la nutrición, etc.) pueden generar relaciones alométricas diferentes. De manera similar, distintas fuentes de variación genética, como por ejemplo distintos alelos, pueden producir alometrías diferentes. Desde hace tiempo, los genetistas cuantitativos han particionado los componentes genéticos y ambientales de la variación en caracteres correlacionados (Falconer, 1960) con el fin de analizar los factores causales de la alometría estudiada. Sin embargo, en estos casos, el componente ambiental de la covariación fenotípica ha sido, típicamente, el no explicado por el componente genético (Atchley *et al.*, 1981). Esta aproximación genético-cuantitativa toma en cuenta la importancia de las fuentes de covariación ambientales pero no analiza la naturaleza de estas fuentes (Shingleton *et al.*, 2007). Es más, el estudio a nivel del desarrollo de las alometrías estáticas ambientales puede tener importantes implicaciones debido a que cada vez más evidencias sugieren que la variación genética y la ambiental convergen en los mismos caminos de señalización para regular la expresión de la variación fenotípica (West-Eberhard, 2003). Dado que la variación en la forma de las alometrías estáticas sería un componente importante de la diversidad fenotípica, se ha estudiado extensamente su importancia a nivel evolutivo (Schlichting & Pigliucci, 1998). Sin embargo, aun no se terminan de comprender los procesos ligados al desarrollo que producen alometrías y la manera en la que estos procesos pueden ser modificados de forma tal de producir las diversas relaciones alométricas intra e interespecíficas conocidas (Shingleton *et al.*, 2007). A continuación se consideran algunos avances recientes en relación con los mecanismos genéticos y fisiológicos que controlan el tamaño corporal que proveyeron las primeras pistas acerca la regulación de las alometrías estáticas a lo largo del desarrollo.

### **La regulación del tamaño corporal**

El control del tamaño corporal está ligado, sobretodo, a la “decisión” de cuándo detener el crecimiento (Conlon & Raff, 1999; Edgar, 2006; Mirth & Riddiford, 2007). Esto es así, particularmente, para muchos insectos ya que su tamaño corporal se incrementa exponencialmente a medida que transcurre su desarrollo.

Los insectos holometábolos, como las especies del género *Drosophila*, sufren una dramática transformación entre los estadios de larva y adulto. El desarrollo post-embrionario de este tipo de insectos consiste en una serie de estadios limitados entre sí por mudas. Luego del último estadio larval, la larva se transforma en pupa, fase durante la cual se produce la

metamorfosis y se forman las estructuras adultas que reemplazarán a las larvales (Gilbert, 1997). Como la pupa no se alimenta, sus requerimientos energéticos deben, necesariamente, provenir de los recursos acumulados durante la fase de alimentación, que son los estadios larvales que el individuo atraviesa a lo largo de su ciclo de vida. De este modo, el tamaño del adulto está determinado por la cantidad de alimento ingerida por la larva antes de pupar (Edgar, 2006; Mirth & Riddiford, 2007; Nijhout *et al.*, 2006). Aparentemente, *Manduca sexta* es la especie en la que los procesos fisiológicos que controlan el crecimiento han sido estudiados en mayor profundidad. En esta especie de polilla se observó una reducción en los niveles de circulación de la hormona juvenil cuando la larva del tercer estadio alcanza un “tamaño crítico” o “peso crítico”, lo cual desencadena un proceso fisiológico muy complejo, que concluye con la emergencia del adulto de la pupa (Davidowitz *et al.*, 2003; Nijhout, 1981; Nijhout & Williams, 1974a). La caída en los niveles de la hormona juvenil permite la liberación de la hormona protoraxicotrópica la cual, a su vez, estimula a la glándula protorácica para liberar ecdisteroides y poner fin a la alimentación (Nijhout & Williams, 1974b). Una vez que la larva ha alcanzado el peso crítico, pasa un tiempo hasta que comienza a mostrar los comportamientos asociados con la metamorfosis, incluido el dejar de alimentarse. En este período, que en *M. sexta* se llama “intervalo hasta el cese del crecimiento” o ICG (por su sigla en inglés: *Interval to Cessation of Growth*), la larva continúa creciendo de manera específica, lo que probablemente está relacionado con las diferencias de tamaño entre especies (Edgar, 2006). De todos modos, una vez que se alcanzó el tamaño crítico, se inicia de manera irreversible la cascada que termina en la metamorfosis y el periodo de crecimiento remanente disponible para la larva está fijado. Por lo tanto, el tamaño final de *M. sexta* está determinado por el tamaño crítico, la duración del ICG y la tasa de crecimiento durante el ICG (Nijhout *et al.*, 2006).

Los mecanismos fisiológicos de la regulación del tamaño en otros insectos holometábolos no se conocen tan bien pero se piensa que son similares. Como *M. sexta*, *D. melanogaster* tiene un tamaño crítico y también presenta un retraso entre el momento en el que alcanza este tamaño crítico y aquel en el que deja de crecer (De Moed *et al.*, 1999). La finalización del crecimiento en esta especie también es causada por un aumento en el nivel de ecdisona (Baehrecke, 1996; Berrear *et al.*, 1979). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos que vinculan el alcance del tamaño crítico con este aumento no se han dilucidado en otra especie que no sea *M. sexta*. Entonces, no está claro que el retraso de *Drosophila* sea equivalente al ICG de *M. sexta*. Por lo tanto, ese período suele ser llamado, en general, “período de crecimiento terminal” o TGP (por su sigla en inglés: *Terminal Growth Period*) del cual el ICG de *M. sexta* representa un caso particular (Shingleton *et al.*, 2007).

Aún cuando la fisiología del control del crecimiento en los insectos difiere de la de los mamíferos, los genes y los caminos de señalización involucrados son similares (Dong *et al.*, 2007; Edgar, 2006; Mirth & Riddiford, 2007; Pan, 2007; Saucedo & Edgar, 2007). El camino de señalización vía factores de crecimiento de tipo insulínico emerge como el principal sistema que regula la proliferación (número de células) y el crecimiento celular (tamaño celular) y juega un rol fundamental en la determinación del metabolismo y el almacenamiento de nutrientes en la mayoría de los metazoos (Conlon & Raff, 1999; Edgar, 2006; Mirth & Riddiford, 2007). En *Drosophila*, los péptidos de tipo insulínico o dILPs (por su sigla en inglés: *Insulin-Like Peptides*) son producidos por células neurosecretoras del cerebro y por varios otros tejidos en respuesta a la nutrición (Britton *et al.*, 2002; Brogiolo *et al.*, 2001; Ikeya *et al.*, 2002; Rulifson *et al.*, 2002;). Estos dILPs se unen al receptor transmembrana similar al de la insulina de las células en división iniciando una cascada de transducción de señales que termina estimulando la proliferación celular en los tejidos en desarrollo. La inanición regula negativamente este camino de señalización en los órganos en crecimiento de distintas maneras. Las células en división la detectan directamente y este sistema de señalización es suprimido mediante un mecanismo desconocido a través del camino llamado blanco de Rapamycina o TOR (por su sigla en inglés: *Target of Rapamycin*; Neufeld, 2003; Oldham *et al.*, 2000). Este sistema regula el crecimiento celular más que la proliferación celular (Hennig *et al.*, 2006; Oldham & Hafen, 2003; Wullschlegel *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2000). Particularmente, TOR podría funcionar como un sensor de aminoácidos (Cardenas *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). La nutrición también regula el sistema de señalización de la insulina indirectamente a través de una reducción en la liberación de dILPs por parte de las células neurosecretoras del cerebro (Ikeya *et al.*, 2002) y mediante un mecanismo humoral desconocido vía el cuerpo graso (el equivalente del hígado en los insectos; Colombani *et al.*, 2003). Finalmente, el camino de señalización de la insulina también es regulado por otras hormonas, por ejemplo la ecdisona (Caldwell *et al.*, 2005; Colombani *et al.*, 2005; Mirth *et al.*, 2005), la hormona juvenil (Truman *et al.*, 2006) y los factores de crecimiento de los discos imaginales (ver más adelante; Kawamura *et al.*, 1999) cuya liberación puede ser también regulada nutricionalmente. Todos los órganos en crecimiento están probablemente expuestos a la misma concentración de dILPs y nutrientes a través de la hemolinfa circulante (Nijhout, 2003) por lo que el camino de señalización de la insulina puede coordinar el crecimiento de todo el cuerpo en respuesta a las condiciones nutricionales.

Ni la nutrición (de Moed *et al.*, 1999) ni la señalización vía insulina (Shingleton *et al.*, 2005) parecen influenciar el tamaño crítico en *Drosophila*. La privación de nutrientes simplemente disminuye su crecimiento y retrasa el momento en el que alcanzan el tamaño crítico. Asimismo, la nutrición tiene un efecto muy pequeño en la duración del TGP en

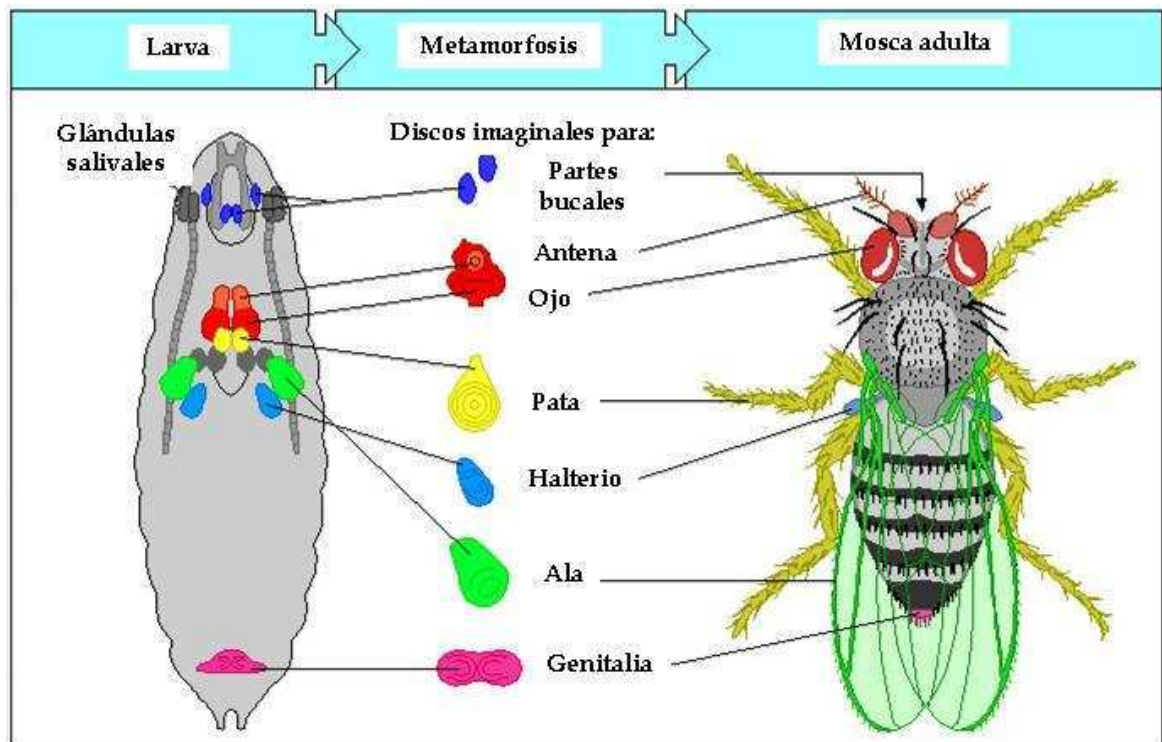
*Drosophila*, ya que la inanición acelera levemente la metamorfosis (Mirth *et al.*, 2005) causando una reducción en el tamaño corporal final. Sin embargo, el efecto es probablemente pequeño en relación con el efecto que tiene la nutrición en la tasa de crecimiento y podría ocurrir únicamente cuando la larva está completamente hambreada más que cuando ha sido criada en un medio de baja calidad nutricional (Shingleton *et al.*, 2007). En resumen, el tamaño corporal está regulado en gran medida mediante el efecto de la señalización vía insulina en la tasa de crecimiento durante un TGP fijo en *Drosophila*. Finalmente, estudios recientes han delineado un camino de señalización nuevo, el camino llamado Hippo, el cual cumple un rol importante en la regulación del tamaño de los órganos a través de la proliferación celular (Dong *et al.*, 2007; Pan, 2007; Saucedo & Edgar, 2007).

### **La regulación del tamaño de los órganos**

A pesar de los considerables avances mencionados anteriormente, aún se comprende poco acerca de la manera en que se percibe el tamaño y como el tamaño específico de los órganos interactúa con la fisiología general del cuerpo (Conlon & Raff, 1999; Shingleton *et al.*, 2007; Stern & Emlen, 1999). En los insectos holometábolos, los órganos adultos se desarrollan a partir de unas estructuras epiteliales en forma de sacos, llamadas discos imaginales, que se forman durante la embriogénesis y que funcionan como primordios de los apéndices y de otras estructuras del adulto. El momento en el que los discos comienzan a desarrollarse varía intraespecíficamente entre distintos discos e interespecíficamente entre discos homólogos (Madhavan & Schneiderman, 1977; Truman & Riddiford, 1999). De manera similar, distintos discos dejan de crecer y se diferencian en las estructuras adultas en diferentes momentos del desarrollo. A pesar de esta variación, el cese del crecimiento de los discos siempre ocurre después de haber alcanzado el tamaño crítico. Entonces, igual que el tamaño corporal total, todos los órganos tienen un TGP asociado y, para muchos órganos, este período es mayor que el del cuerpo (Freeman, 1997; Garcia-Bellido & Merriam, 1971).

Por un lado, existen evidencias que apoyan un modelo de regulación autónoma del crecimiento de los discos imaginales. Por ejemplo, cuando se transplantan los discos imaginales a un ambiente que permiten su crecimiento, como puede ser el abdomen de una mosca adulta, estos crecen lentamente hasta alcanzar un tamaño similar al que presentan los discos normalmente al momento de pupar (Bryant & Simpson, 1984; Bryant & Levinson, 1985; Jursnich *et al.*, 1990). Por otro lado, el tamaño de los órganos está regulado por señales parácrinas de corto alcance (morfogenes) que modelan el desarrollo de los discos. Estos morfogenes definen compartimentos dentro de los órganos en desarrollo, dentro de los cuales la proliferación

celular está controlada por los niveles de los morfogenes que lo especifican (Martin-Castellanos & Edgar, 2002; Neumann & Cohen, 1996).



**Figura 1.2:** Los discos imaginales de *D. melanogaster* y las estructuras del adulto que derivan de ellos. Figura modificada a partir del original extraído de la página de Internet de la Universidad Memorial de Canadá ([www.mun.ca](http://www.mun.ca)).

La manipulación de los niveles de expresión de los morfogenes cambia el tamaño y la forma del órgano resultante (Capdevila & Guerrero, 1994; Ng *et al.*, 1996; Potter & Xu, 2001), sugiriendo que su constitución final depende de la distribución final órgano-específica de estos morfogenes. Al igual que el camino de la insulina, muchos de estos morfogenes regulan la tasa de crecimiento y proliferación celular (Crickmore & Mann, 2006). Por lo tanto, los morfogenes podrían interactuar con el camino de la insulina durante el TGP de cada órgano de forma tal de controlar su tasa crecimiento y, a la vez, de mantener la constitución correcta del mismo. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que tanto el receptor de la insulina (Jun & Gjoerup, 1999) como los morfogenes *Decapentaplegic (Dpp)* y *Wingless (Wg)*; Halfon *et al.*, 2000) regulan la ruta de señalización Ras/Ras la cual, a su vez, regula la tasa de división celular. Además, existen evidencias de que el tamaño de los órganos está controlado hormonalmente (por ejemplo, Champlin & Truman, 1998a, b; Chihara *et al.*, 1972; Cullen & Milner, 1991; Currie *et al.*, 1988; Mirth, 2005). Particularmente, distintos estudios demostraron que niveles bajos de ecdisona promueven el crecimiento y la división celular en contraste con el rol tradicional de la ecdisona

como hormona de muda (por ejemplo, Champlin & Truman, 1998a; Hodgetts *et al.*, 1977; Nijhout, 1994; Postlethwait & Schneiderman, 1970). Los resultados de estos estudios sugieren: a) que se requieren niveles bajos de hormonas para el crecimiento de los órganos, b) que aumentos graduales en los niveles hormonales hasta un cierto límite conducen a aumentos graduales del crecimiento y c) que las diferencias intrínsecas entre órganos pueden hacer que respondan de distinta manera a la misma señal hormonal. Asimismo, recientemente se han obtenido otras evidencias a favor de una regulación no autónoma del crecimiento de los órganos a partir de estudios en *D. melanogaster*. Kawamura y colaboradores (1999) descubrieron una nueva familia de factores de crecimiento de los discos imaginales o IDGFs (por su sigla en inglés: *Imaginal Disc Growth Factors*) en *Drosophila* que se expresan en altos niveles en el cuerpo graso y que aumentan el crecimiento de las células imaginales *in vitro* actuando sinérgicamente con la insulina.

Por otra parte, distintos estudios han demostrado que el crecimiento de los discos imaginales retrasa la metamorfosis y sugieren que este proceso detiene la cascada endócrina y, en particular, la liberación de ecdisona (por ejemplo, Jursnich *et al.*, 1990; Sehnal & Bryant, 1993; Simpson *et al.*, 1980). Esta represión de la producción de ecdisona por los discos en crecimiento podría representar un mecanismo de retroalimentación que coordina el desarrollo de todos los tejidos en crecimiento (Sehnal & Bryant, 1993). En ese sentido, los resultados de un trabajo reciente indican que los discos imaginales pueden regular el tamaño crítico y el inicio de la metamorfosis en *D. melanogaster* (Bradley *et al.*, 2008). De esta manera, la finalización del crecimiento podría estar regulada por los tejidos en crecimiento de forma tal de asegurar que todos los órganos alcancen un tamaño final característico (Bradley *et al.*, 2008). Finalmente, ciertos experimentos han demostrado que el crecimiento de un tejido puede ser alterado por la presencia o ausencia de otro tejido. Particularmente, se determinó que existe una regulación negativa del crecimiento entre discos imaginales diferentes (por ejemplo, Klingenberg & Nijhout, 1998; Nijhout & Emlen, 1998). Esto sugiere que los distintos órganos compiten entre sí por algún recurso limitante para el crecimiento (Klingenberg & Nijhout, 1998; Nijhout & Emlen, 1998). Esta competencia podría estar mediada por alguno de los reguladores del crecimiento mencionados cuya concentración sería baja. Por lo tanto, la actividad receptora tejido-específica podría cumplir un importante rol en el control del crecimiento relativo de los tejidos. De esta manera, los cambios en el patrón espacial de la actividad receptora darían cuenta de la evolución de las proporciones corporales y la alometría (Nijhout, 2003). En ese sentido, las diferencias de TGP entre discos mencionadas anteriormente podrían deberse a que la respuesta en cada uno ocurre a un nivel hormonal límite (umbral) distinto (Emlen & Allen, 2003).

## La evolución de tamaño corporal

Como los organismos deben distribuir sus recursos energéticos y materiales entre el crecimiento, el mantenimiento y la reproducción, existen límites al tamaño corporal que estos pueden alcanzar (Roff, 1992). De esta manera, el tamaño corporal impone ciertos límites a la evolución de otros caracteres y, simultáneamente, puede estar limitado por las numerosas consecuencias funcionales que puede tener el cambio de tamaño (Futuyma, 1998).

El papel de los genes y del ambiente en la determinación del tamaño corporal ha suscitado especial interés para los genetistas evolutivos debido a la correlación entre el tamaño corporal y el *fitness* (Calder, 1984; Roff, 1992; Schlichting & Pigliucci, 1998; Stearns, 1992). En efecto, este carácter contribuye al éxito en el apareamiento, la longevidad, la evitación de la predación, la resistencia a la inanición, el frío y el calor entre otros caracteres (Roff, 1992; Schmidt-Nielsen, 1984; Stearns, 1992). Particularmente en *Drosophila* se ha demostrado que la selección natural actúa sobre caracteres relacionados con el tamaño corporal debido a que es un carácter que está estrechamente vinculado al *fitness* en distintos ambientes (Wolf *et al.*, 2000). Este carácter afecta el éxito en el apareamiento y las interacciones agresivas (por ejemplo, Leibowitz *et al.*, 1995; McCabe & Partridge, 1997; Partridge *et al.*, 1987; Partridge & Farquhar, 1983; Santos *et al.*, 1988), la fecundidad (Robertson, 1957; Santos *et al.*, 1992), la capacidad dispersiva (Roff, 1977), la longevidad (Hasson *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1992) y el tiempo de desarrollo (Betrán *et al.*, 1998; Fernández Iriarte & Hasson, 2000; Partridge & Fowler, 1993). Otros estudios han demostrado que el tamaño corporal y otros caracteres relacionados responden de manera compleja ante la variación ambiental (por ejemplo, Bitner-Mathé & Klaczko, 1999; Cavicchi *et al.*, 1991; Loeschcke *et al.*, 1999; Norry & Loeschcke, 2002; Nunney & Cheung, 1997; Stalker, 1980; Thomas & Barker, 1993) sugiriendo una respuesta adaptativa en este género.

La variación en el tamaño corporal en poblaciones naturales así como aquella debida a factores ambientales como la temperatura, ha sido estudiada exhaustivamente en *Drosophila* (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 2002; Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Capy *et al.*, 1994; Carreira *et al.*, 2006; de Moed *et al.*, 1997; Hallas *et al.*, 2002; Louis *et al.*, 1982; Misra & Reeve, 1964; Parkash *et al.*, 1999; Partridge *et al.*, 1994; Sokoloff, 1966; Stalker & Carson, 1947; Trotta *et al.*, 2006). En general, el tamaño corporal en los organismos ectotérmicos muestra una respuesta fenotípica plástica a los cambios en la temperatura a la que se crían. Particularmente, los individuos adultos suelen ser más pequeños cuando las larvas se desarrollan a altas temperaturas al igual que cuando se crían en un sustrato de baja calidad (por ejemplo, Atkinson, 1994; Chapman, 1998; Partridge *et al.*, 1994).



Asimismo, en *Drosophila*, se han descrito clinas para distintos caracteres entre los que están los morfológicos (por ejemplo, Arthur *et al.*, 2008; Bitner-Mathé *et al.*, 1995; de Jong & Bochdanovits, 2003; Folguera *et al.*, 2008; Gilchrist *et al.*, 2001; Hallas *et al.*, 2002; Hoffmann & Weeks, 2007; Louis *et al.*, 1982; Misra & Reeve, 1964; Parkash *et al.*, 1999; Sokoloff, 1966; Stalker & Carson, 1947). Si bien los patrones clinales podrían explicarse como el resultado de procesos demográficos (contacto entre poblaciones diferenciadas genéticamente, cuellos de botella, efecto fundador, etc.), las evidencias sugieren que son el producto de la acción de la selección natural (Calboli *et al.*, 2003; Gilchrist *et al.*, 2001; Gilchrist & Partridge, 1999; Gockel *et al.*, 2001; Huey *et al.*, 2000; Long & Singh, 1995; Zwaan *et al.*, 2000). Por ejemplo, la existencia de clinas latitudinales paralelas para el tamaño del cuerpo en diferentes continentes y distintas especies de *Drosophila* parece avalar su origen adaptativo (Calboli *et al.*, 2003; Gilchrist *et al.*, 2001; Gilchrist & Partridge, 1999; Huey *et al.*, 2000; Zwaan *et al.*, 2000). Por un lado, Huey y colaboradores (2000) estudiaron la tasa de evolución de una clina geográfica de *D. subobscura* en Norteamérica comparándola con otra de Europa y llegaron a la conclusión de que la longitud del ala está correlacionada positivamente con la latitud. Sin embargo, los patrones de variación clinal de la longitud de ala son el resultado de la variación de diferentes porciones del ala. En efecto, en el Viejo Mundo es la porción proximal del largo del ala la que permite explicar el patrón clinal, en tanto que en Norteamérica es la distal. Por otro lado, otros autores (Gilchrist & Partridge, 1999) estudiaron clinas del tamaño corporal en *D. melanogaster* de Australia y Sudamérica y hallaron diferencias entre las mismas en cuanto a la arquitectura genética del tamaño del ala. Estos autores analizaron las medias generacionales del área y de la longitud del ala y estimaron las varianzas aditiva, epistática, de dominancia y la debida a los efectos maternos subyacentes a la divergencia dentro de cada clina. Los resultados obtenidos indicaron que sólo una clina podía ser descripta adecuadamente por un modelo simple de varianza aditiva. En las otras dos clinas encontraron efectos epistáticos, maternos y de ligamiento significativos. Por lo tanto, Gilchrist y Partridge (1999) concluyeron que la selección natural habría producido una divergencia fenotípica similar en ambos continentes mediante distintas combinaciones de acción e interacción génica.

En términos generales, las adaptaciones y la emergencia de nuevos fenotipos requerirían de algún grado de independencia entre las partes del cuerpo en cuanto a su desarrollo (ver Cowley & Atchley, 1990 y referencias). Sin embargo, los distintos caracteres morfológicos no pueden ser completamente independientes debido a la existencia de la pleiotropía y el ligamiento (Cowley & Atchley, 1990; Nijhout & Emlen, 1998). De esta manera, los caracteres que derivan de un mismo disco imaginal estarían genéticamente más ligados entre si y, en consecuencia, presentarían una correlación mayor que con aquellos derivados de otros discos

(ver Cowley & Atchley, 1990 y referencias). Similarmente, los mismos caracteres analizados en machos y hembras estarían genéticamente correlacionados entre si (ver Cowley & Atchley, 1988; Cowley *et al.*, 1986 y referencias). En consecuencia, una respuesta ante la acción de la selección natural actuando en un sexo generaría un cambio fenotípico correlacionado en el otro sexo. A su vez, esto implica que la selección actuando sobre un determinado carácter en un sexo no podría generar grandes cambios en el nivel de dimorfismo sexual asociado al mismo (ver Cowley & Atchley, 1988; Cowley *et al.*, 1986 y referencias).

Con respecto a lo anterior, distintos estudios muestran que diferentes caracteres estimadores del tamaño corporal están correlacionados genéticamente entre si y entre los sexos en Diptera (por ejemplo, Barker & Krebs, 1995; Cowley & Atchley, 1988, 1990; David *et al.*, 2006a, b; Loeschcke *et al.*, 1999; Misra, 1966; Moreteau *et al.*, 2003; Norry *et al.*, 1997c; Rohlf & Sokal, 1972; Sisodia & Singh, 2001; Wilkinson *et al.*, 1990). De esto se deduce que la selección sobre el tamaño corporal debería tener respuestas correlacionadas a nivel de otros caracteres y viceversa. Sin embargo, algunos de estos caracteres pueden, en algunos casos, limitar la respuesta directa del tamaño a la selección; lo cual podría deberse a la existencia de un compromiso o *trade-off*. Estos compromisos han sido estudiados entre distintos caracteres morfológicos (Norry *et al.*, 2000) y, en mayor medida, entre dichos caracteres y otros relacionados con la historia de vida de los organismos; siendo una de sus posibles consecuencias el mantenimiento de la variabilidad genética (Roff, 1992; 2000; Stearns, 1992). El tamaño del ala y el número de ovarias son dos características importantes que están correlacionadas genéticamente con el tamaño corporal en *Drosophila* (Santos *et al.*, 1992) y se encuentran potencialmente sujetas a diferentes presiones selectivas directas. Algo similar ocurre entre el tamaño corporal y el tiempo de desarrollo larvario, ya que un menor tiempo de desarrollo puede aumentar la supervivencia de las larvas en condición de hacinamiento o adelantar la reproducción en poblaciones en expansión; mientras que un mayor tamaño corporal favorecería al adulto debido a su correlación positiva con numerosos componentes del *fitness* (Betrán *et al.*, 1998; Cortese *et al.*, 2002; Fernández Iriarte & Hasson, 2000).

### **El ala de *Drosophila* como modelo**

Durante las últimas décadas, muchos estudios han utilizado al ala de *Drosophila* como modelo y han analizado como contribuye el número y el tamaño de las células al tamaño del órgano (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 2002; Cavicchi *et al.*, 1985; Delcour & Lints, 1966; de Moed *et al.*, 1997; Guerra *et al.*, 1997; James *et al.*, 1995; McCabe *et al.*, 1997; Partridge *et al.*, 1994; Pezzoli *et al.*, 1997; Robertson, 1959; Stevenson *et al.*, 1995). Aunque estos estudios utilizaron distintos diseños experimentales, todos coinciden en que la temperatura durante el desarrollo altera el

tamaño de las células del órgano pero no su número. Todos los demás tratamientos utilizados produjeron resultados contradictorios o cambios en ambos componentes. Particularmente, en las poblaciones naturales, el tamaño y el número de las células tienden a covariar negativamente por lo que las alas de un determinado tamaño con células más grandes tienen menos células y viceversa (McCabe *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren que, bajo la mayoría de las condiciones, el tamaño del ala se regula independientemente del número o del tamaño de las células.

Asimismo, los resultados de otros experimentos sugieren que los mecanismos de crecimiento y modelado del ala no dependen del número de células sino que producen un área total apropiada independientemente del número de células (por ejemplo, Garcia-Bellido *et al.*, 1973; Morata & Ripoll, 1975; Neufeld *et al.*, 1998; Weigmann *et al.*, 1997). En ese sentido, la disección genético-molecular del desarrollo del ala en *Drosophila* permitió conocer cómo se establecen los ejes dorso-ventral y antero-posterior de este apéndice y cómo los productos de los morfogenes determinan la ubicación de las futuras venas (para una revisión reciente del tema ver Blair, 2007). Gran parte de los genes implicados en el posicionamiento de las venas del ala codifican componentes de rutas metabólicas intercelulares ampliamente utilizadas. En gran medida, dicha localización está determinada por las respuestas celulares a los productos de los morfogenes *Decapentaplegic (Dpp)*, *Wingless (Wg)* y *Hedgehog (Hh)*; Strigini & Cohen, 1999). Esto es consistente con resultados que mostraron que la formación de las regiones entre las venas depende predominantemente de factores genéticos y es independiente de la temperatura y el sexo (Birdsall *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2000). Dado que el número y el tamaño celular de regiones particulares del ala se ven afectados de manera diferencial por el sexo y la temperatura, se ha argumentado que su forma está definida por un mecanismo que es independiente del crecimiento y la densidad celular (Birdsall *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2000).

Por un lado, muchos de los trabajos en relación con la variación del tamaño corporal en *Drosophila* se vinculan con el tamaño del ala (por ejemplo, Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Capy *et al.*, 1994; Carreira *et al.*, 2006; Hallas *et al.*, 2002; McCabe *et al.*, 1997; Parkash *et al.*, 1999; Partridge *et al.*, 1994; Trotta *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2000). Asimismo, varios de los estudios que buscaron una asociación entre el tamaño corporal y diferentes gradientes ambientales (es decir, clinas) analizaron la variación de dicho órgano (Arthur *et al.*, 2008; Calboli *et al.*, 2003; Capy *et al.*, 1993; Coyne & Beecham 1987; Folguera, 2007; Gilchrist & Partridge, 1999; Gockel *et al.*, 2002; Hallas *et al.*, 2002; Huey *et al.*, 2000; Imasheva *et al.*, 1994; James *et al.*, 1995; Karan *et al.*, 1998; Parkash *et al.*, 1999; van't Land *et al.*, 1999; Zwaan *et al.*, 2000). Por otro lado, algunos trabajos analizaron la variación natural asociada a distintos estimadores de la forma de ala de *D. melanogaster* y unos

pocos estudiaron su relación con gradientes ambientales (Azevedo *et al.*, 1998; Bublly *et al.*, 1996; Gilchrist *et al.*, 2000; Huey *et al.*, 2000; Imasheva *et al.*, 1995; van't Land *et al.*, 1999).

### **Objetivos, hipótesis y predicciones del presente trabajo**

Tomando en consideración todo lo anterior, el objetivo general de esta tesis es contribuir a la caracterización de la arquitectura genética de caracteres morfológicos asociados a procesos de adaptación. Particularmente, los objetivos de esta tesis son:

- Identificar y caracterizar genes asociados a la expresión de caracteres vinculados al tamaño y la forma corporal en *D. melanogaster*
- Cuantificar distintas fuentes de variación que contribuyen a la variación total de los caracteres estudiados en individuos de *D. melanogaster* derivados de poblaciones naturales dispuestas a lo largo de gradientes geográficos de Argentina.
- Identificar regiones genómicas responsables de la variación de los caracteres estudiados en las poblaciones naturales mencionadas.

El estudio de la arquitectura genética de los caracteres adaptativos es difícil debido a que múltiples factores intervienen en su expresión. Por lo tanto, el trabajo se desarrolló en módulos de forma tal de realizar un estudio más detallado de los diferentes tópicos relacionados con el objetivo principal. De esta manera, el trabajo se estructuró en tres partes que conforman unidades de análisis con objetivos particulares pero complementarios. Estas tres etapas son:

#### **1. Identificación y caracterización de genes asociados a la expresión de distintos caracteres vinculados al tamaño corporal en *D. melanogaster*.**

Esta etapa permitió identificar loci que contribuyen a la expresión de cada carácter morfológico estudiado y caracterizarlos mediante la utilización de métodos bioinformáticos. A continuación se detallan algunas de las preguntas que motivaron estos análisis así como las predicciones que se desprenden de las hipótesis generadas a partir de cada una de ellas.

- ¿Cuántos y cuáles son los genes relacionados con los caracteres morfológicos estudiados en *D. melanogaster*?

Se espera que una gran proporción de los genes analizados estén involucrados en la expresión de los caracteres estudiados. Asimismo se espera que los genes identificados tengan orígenes y funciones variadas y que afecten la expresión de los distintos caracteres morfológicos a través de diferentes vías de regulación.

- ¿Los factores genéticos asociados a los caracteres morfológicos analizados se distribuyen al azar en el genoma de *D. melanogaster*?

Se espera una distribución azarosa de dichos genes, proporcional al tamaño de los cromosomas del organismo analizado. En el caso de que se detecte una distribución no aleatoria, se estaría ante la presencia de grupos de ligamiento físico entre los genes que afectan a los caracteres en cuestión.

➤ ¿Los genes identificados presentan el mismo efecto en machos y en hembras?

Se espera que la mayor parte de los genes muestren un efecto similar en ambos sexos y que una pequeña proporción de ellos afecte a los distintos caracteres de manera sexo-específica.

➤ ¿Los genes identificados presentan el mismo efecto a distintas temperaturas?

Se espera que la mayor parte de los genes muestren un efecto similar en ambas temperaturas y que una pequeña proporción de ellos afecte a los distintos caracteres de manera específica con respecto a la temperatura.

➤ ¿Los genes identificados presentan el mismo efecto en los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal?

Se espera que la mayor parte de los genes muestren un efecto similar en todos los caracteres estudiados y que una pequeña proporción de ellos afecte a los distintos caracteres de manera específica.

➤ ¿Los genes identificados presentan efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres?

Se espera que una gran proporción de los genes identificados muestre algún efecto en otros caracteres y que sólo algunos de ellos afecte específicamente a los distintos caracteres morfológicos estudiados.

## **2. Cuantificación de distintas fuentes de variación que contribuyen a la variación total de los caracteres estudiados en individuos de *D. melanogaster* derivados de poblaciones naturales dispuestas a lo largo de gradientes geográficos de Argentina.**

Esta etapa permitió cuantificar distintas fuentes de variación que contribuyen a la variación total de cada carácter vinculado al tamaño corporal. A continuación se detallan algunas de las preguntas que motivaron estos análisis así como las predicciones que se desprenden de las hipótesis generadas a partir de cada una de ellas.

➤ ¿Qué proporción de la variabilidad vinculada a cada carácter morfológico estudiado puede ser explicada por el cromosoma 2?

Dado que se utilizaron líneas isogénicas, en cada una de las cuales se ha sustituido el cromosoma 2 por uno derivado de la naturaleza; la porción de la varianza total de cada carácter debida al factor genético está asociada a ese cromosoma. Se espera que una proporción importante de la varianza fenotípica total esté explicada por este

componente genético ya que el cromosoma 2 representa, aproximadamente, un 40% del genoma de *D. melanogaster*.

- ¿Existen diferencias entre los sexos para los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal?

Se espera que las hembras sean más grandes que los machos y que la varianza genética asociada al cromosoma 2 sea similar en ambos sexos para cada carácter en todas las poblaciones. Asimismo, se espera que el dimorfismo sexual sea diferente entre líneas, al menos en algunos casos; lo que conduciría a la existencia de una interacción entre dicho componente genético y el sexo.

- ¿Existen diferencias entre las poblaciones para los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal?

Se espera encontrar diferencias entre las poblaciones para cada carácter morfológico analizado y que estas diferencias sean similares en ambos sexos.

- ¿Las diferencias entre las poblaciones apoyan la hipótesis de adaptación térmica asociada a la existencia de clinas latitudinales y altitudinales para los distintos caracteres morfológicos analizados?

Se espera que los resultados estén de acuerdo con la hipótesis de adaptación térmica asociada a la existencia de clinas latitudinales y altitudinales para cada carácter vinculado al tamaño corporal. Particularmente, se espera que valores más grandes de cada uno de los caracteres en ambos sexos estén asociados a latitudes y altitudes mayores y viceversa.

- ¿Los efectos de los distintos factores analizados (población, línea y sexo) son similares entre los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal?

En general se espera que las distintas fuentes de variación analizadas muestren un efecto similar en todos los caracteres morfológicos estudiados.

### **3. Identificación de regiones genómicas responsables de la variación de los caracteres estudiados en las poblaciones naturales mencionadas.**

Durante esta etapa se utilizaron los resultados de los dos puntos anteriores para identificar genes localizados en el cromosoma 2 que presenten distintas variantes en las poblaciones naturales bajo estudio. Esta última parte del trabajo permitió determinar la existencia de genes de caracteres cuantitativos ó QTGs (por su sigla en inglés: *Quantitative Trait Genes*) que serían responsables de, al menos, una parte de la variabilidad observada en las poblaciones naturales.

---

## **Capítulo II**

Identificación y caracterización de genes asociados a la expresión de distintos caracteres vinculados al tamaño corporal en *D. melanogaster*.

---

### **Resumen**

A pesar del desarrollo de un creciente cuerpo de conocimientos acerca de los factores fisiológicos y ambientales que subyacen a las diferencias en el tamaño corporal, es poco lo que se conoce acerca de las bases genéticas de este carácter complejo. Asimismo, todas las especies presentan una relación específica entre el tamaño de cada órgano y el tamaño corporal total. Debido a esto, se deben analizar diferentes caracteres vinculados al tamaño corporal así como su dimorfismo sexual, el que puede tener un impacto importante en la evolución del tamaño corporal. De esta manera, se estudiaron 191 líneas co-isogénicas de *D. melanogaster*, cada una de ellas homocigota para una única inserción de un elemento transponible, y se analizó el efecto de las mutaciones en diferentes caracteres de tamaño corporal comparadas con un control co-isogénico carente del transposón. Cerca del 60% de las líneas mostró diferencias significativas con respecto al control para estos caracteres en uno o ambos sexos y casi el 35% presentó efectos carácter y sexo-específicos. Las mutaciones de los genes candidatos frecuentemente aumentaron el tamaño corporal en los machos y lo disminuyeron en las hembras. Los resultados indican que las mutaciones que redujeron las diferencias de tamaño entre los sexos estuvieron localizadas en los cromosomas autosómicos más frecuentemente que aquellas que afectaron a ambos sexos por igual o que aumentaron el dimorfismo sexual, las cuales se estuvieron predominantemente ligadas al cromosoma X. Entre los 92 genes identificados, la mayoría está involucrada en el desarrollo y/o en procesos metabólicos y sus funciones moleculares incluyen principalmente las de unión a proteínas y a ácidos nucleicos. Aunque varios genes mostraron efectos pleiotrópicos en relación con el tamaño corporal, pocos estuvieron involucrados en la expresión de todos los caracteres en uno o ambos sexos. Estos genes parecen ser importantes para diferentes aspectos relacionados con el funcionamiento general del organismo. En general, los resultados indican que la arquitectura genética de los caracteres de tamaño corporal involucra una gran fracción del genoma y es en gran medida carácter y sexo-específica.

## Introducción

Comprender la arquitectura genética de caracteres complejos como el tamaño corporal requiere, ante todo, de la identificación de los genes que contribuyen a la expresión del carácter en cuestión (Mackay, 2004). En los últimos años se ha ido acumulando mucha información acerca de los factores fisiológicos y ambientales que subyacen a las diferencias en el tamaño corporal así como sobre los genes y los caminos de señalización involucrados en su expresión (Dong *et al.*, 2007; Edgar, 2006; Mirth & Riddiford, 2007; Pan, 2007; Saucedo & Edgar, 2007). A pesar de esto y del creciente cuerpo de conocimientos acerca de la manera en que se produce el desarrollo morfológico (Freeman & Gurdon, 2002; Lecuit & Le Goff, 2007; Mann & Morata, 2000), la búsqueda de genes que afectan al tamaño corporal y otros caracteres relacionados está en sus comienzos.

Desde hace un tiempo se están desarrollando diversos proyectos genoma en distintas clases de organismos con la intención de construir un mapa genético de alta resolución de los mismos (por ejemplo, The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium, 2005; The International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; The Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002; *Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007). Estos proyectos, que se llevan a cabo con el objetivo último de obtener la secuencia completa de ADN para cada uno de los organismos estudiados, se enmarcan en el área de investigación conocida como *genómica estructural* (por ejemplo, Baker & Sali, 2001; Burley *et al.*, 1999; Stevens *et al.*, 2001). Este tipo de análisis permite desarrollar estudios en otras áreas de la genética como los de la *genómica funcional*, que son aquellos que pretenden determinar la función biológica del producto de los genes en estudio (por ejemplo, Collins *et al.*, 2003; Hieter & Boguski, 1997; Plasterk, 1999). Fundamentalmente, la genómica funcional extiende el estudio de unos pocos genes y/o proteínas a una gran cantidad de genes lo que permite obtener resultados de manera sistemática que sirven para realizar investigaciones más detalladas (Collins *et al.*, 2003; Hieter & Boguski, 1997). En términos generales, los *screenings* genéticos permiten identificar genes candidatos en relación a determinados caracteres fenotípicos que luego requieren de la realización de análisis más específicos para confirmarlos como integrantes de las bases genéticas de dichos caracteres (Mackay, 2004).

Una metodología ampliamente utilizada en la búsqueda QTLs es la utilización de la mutagénesis por inserción de elementos móviles que permite identificar genes candidatos a formar parte de la base genética de tales caracteres (Mackay, 2004). Esta clase de estudios se ha llevado a cabo en diferentes organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae* (Bidlingmaier & Zinder, 2002; Burns *et al.*, 1994), *Arabidopsis thaliana* (Alonso *et al.*, 2003; Bhatt *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996), *Caenorhabditis elegans* (Korswagen *et al.*, 1996; Plasterk, 1993), *Danio (Brachydanio)*



*rerio* ó *zebrafish* (Allende *et al.*, 1996; Gaiano *et al.*, 1996), *Mus musculus* (Mikkers *et al.*, 2002; Mitchell *et al.*, 2001; Wurst *et al.*, 1995; Zambrowicz *et al.*, 1998) y *Drosophila* (Anholt *et al.*, 1996; Grossniklaus *et al.*, 1989; Harbison *et al.*, 2004; Lyman *et al.*, 1996; Norga *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; Rørth 1996, Rørth *et al.*, 1998; Salzberg *et al.*, 1997; Sambandan *et al.*, 2006; Sekelsky *et al.* 1999; Török *et al.*, 1993).

El elemento transponible *P* ha sido el vehículo más utilizado para interrumpir genes en *Drosophila* y realizar estudios genéticos y genómicos porque posee ciertas ventajas en comparación con otros, entre las que se encuentran las siguientes:

- Se transpone a tasas elevadas,
- Depende completamente de transposasa exógena,
- Se inserta tanto en regiones heterocromáticas como eucromáticas (por ejemplo, Konev *et al.*, 2003; Wallrath & Elgin 1995; Zhang & Spradling, 1994),
- Se transpone preferencialmente cerca de promotores (Spradling *et al.*, 1995),
- Se escinde de manera imprecisa,
- Genera deleciones locales (Cooley *et al.*, 1990; Huet *et al.*, 2002; Preston *et al.*, 1996),
- Se transpone localmente (Timakov *et al.*, 2002; Tower *et al.*, 1993),
- Induce la recombinación en machos (Preston & Engels, 1996),
- Reemplaza preferencialmente elementos existentes (Heslip & Hodgetts, 1994; Sepp & Auld, 1999),
- Induce recombinación no idéntica en secuencias repetidas en tándem (Thompson-Stewart *et al.*, 1994).

Sin embargo, hay que considerar ciertas desventajas como son la existencia de regiones *puntos calientes*, donde se produce la inserción más frecuentemente y la posibilidad de que no todos los genes puedan ser blanco de la inserción del elemento *P* (Spradling *et al.*, 1999).

Uno de los proyectos genoma más ambiciosos que se está desarrollando, que utiliza la mutagénesis por inserción del elemento móvil *P*, es el de *D. melanogaster*. Este proyecto es llevado adelante por la Universidad de California, en Berkeley (Estados Unidos) desde el año 1993 (Bellen *et al.*, 2004; Spradling *et al.*, 1995, 1999). En el marco de este proyecto, denominado *Berkeley Drosophila Genome Project* (BDGP), se ha generado una gran colección de líneas que contienen un mismo fondo genético (es decir, son isogénicas) y sólo se diferencian en el sitio del genoma en el que se inserta el elemento *P*, el cual generalmente interrumpe la secuencia de un gen en particular (Lukacsovich *et al.*, 2001). Además, se ha generado una línea control que posee el mismo fondo genético que las demás líneas pero carece de la inserción del elemento transponible. Este sistema permite cuantificar los cambios producidos a nivel fenotípico para el conjunto de las líneas mutagenizadas y atribuir las diferencias fenotípicas observadas entre ellas

y el control a la inserción del elemento móvil. Particularmente, se pueden realizar análisis fenotípicos y genéticos a gran escala, lo que permite acelerar el proceso de búsqueda y caracterización de genes asociados a la expresión de un determinado carácter y, en definitiva, realizar un análisis genómico-funcional más extensivo. De esta forma, en *D. melanogaster*, se ha podido estudiar el aporte que hace la varianza genética producida por mutagénesis a la varianza total en distintos caracteres cuantitativos tales como el número de quetas (Lyman *et al.*, 1996; Norga *et al.*, 2003), la resistencia a la inanición (Harbison *et al.*, 2004), el comportamiento olfativo (Anholt *et al.*, 1996; Sambandan *et al.*, 2006) y el tiempo de desarrollo (Mensch *et al.*, 2008). Este tipo de metodología permite, además, realizar una primera aproximación al análisis de los efectos epistáticos entre diferentes loci (por ejemplo, Fedorowicz, 1998; Greenspan, 2001; Sambandan *et al.*, 2006).

Esta parte de la tesis tiene como objetivo realizar un análisis genómico funcional en *D. melanogaster* con el fin de caracterizar parte de la arquitectura genética del carácter complejo tamaño corporal. En particular, se identificaron loci que contribuyen a la expresión de cuatro caracteres vinculados al tamaño corporal y se realizó un análisis genómico-funcional de los mismos. Asimismo, se estudió el efecto de dichos genes en ambos sexos lo que permitió conocer el efecto sexo-específico de la mayoría de ellos. Por último, se analizó el nivel de pleiotropía de distintos genes en relación con los caracteres morfológicos estudiados.

## **Materiales y métodos**

### ***Stocks de Drosophila***

Se emplearon líneas del BDGP viables y homocigotas, cada una de las cuales presenta una mutación independiente originada por la inserción de un elemento transponible (Bellen *et al.*, 2004; Lukacsovich *et al.*, 2001, Spradling *et al.*, 1995, 1999). Estas líneas se han obtenido mediante un esquema de cruzamientos que permitió inactivar un gen por línea y que todas las líneas compartan el fondo genético *Canton-S B* (es decir, son líneas isogénicas). Además se cuenta con una línea control (también isogénica) libre de inserciones (para conocer más detalles acerca de la obtención de estas líneas y de sus características, ver el Anexo Metodológico I). Este sistema permite, tras criar a las moscas bajo las mismas condiciones, atribuir las diferencias fenotípicas observadas entre las líneas BDGP y el control a factores genéticos y, en este caso en particular, al efecto producto de la mutación por inserción que, generalmente, afecta un único gen. En total se analizaron 191 líneas para identificar genes candidatos a integrar la base genética de los caracteres vinculados al tamaño corporal analizados. Estas líneas fueron provistas por la Dra. Trudy Mackay (Universidad Estatal de Carolina del Norte, Raleigh, Estados Unidos).

## **Diseño Experimental**

El análisis de las líneas BDGP se realizó en nueve bloques en los cuales se estudiaron simultáneamente un promedio de 20 líneas además del control. En cada bloque se aplicó el diseño experimental detallado en el Anexo Metodológico I de forma tal de obtener las moscas adultas utilizadas para estimar las variables morfológicas. Algunas de las líneas utilizadas presentaron una viabilidad muy baja por lo que, en esos casos, la cantidad de adultos emergidos en los tubos fue bastante menor que la de las líneas que mostraron una viabilidad mayor. En estos casos se disecaron, fotografiaron y midieron todos los adultos de cada sexo que emergieron en los tubos correspondientes a la línea. En el resto de los casos se disecaron, fotografiaron y midieron cuatro moscas adultas de cada sexo por tubo.

### **Caracteres vinculados al tamaño corporal**

Los caracteres vinculados al tamaño corporal medidos en esas moscas adultas son: la distancia interocular (DO), el ancho de la cabeza (AC), el largo del tórax (LT) y el tamaño del ala (TA). La manera en la que se fotografiaron los individuos y se realizaron las mediciones se detalla en el Anexo Metodológico II.

### **Análisis Estadísticos**

*Análisis de correlación genética.* Para poder realizar un análisis con todas las líneas medidas en distintos bloques, los valores correspondientes a cada variable morfológica fueron transformados restándole al valor de cada individuo el valor medio de la línea control del sexo y bloque respectivo y dividiéndolo por el mismo valor. Se realizó un análisis de correlación entre cada par de variables en cada sexo por separado y otro entre sexos para cada variable. En estos análisis se utilizaron los valores medios de las 191 líneas. Debido a que se utilizaron los mismos valores en diferentes análisis de correlación, se aplicó la corrección de Bonferroni ( $P_B = 0,0125$ )

*Análisis genético-cuantitativo.* Los valores correspondientes a cada variable, transformados como se explicó en el ítem anterior, fueron analizados de acuerdo al siguiente modelo de análisis de varianza (ANOVA):

$$Y = \mu + L + S + L \times S + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media general del carácter analizado en cada caso; L es el factor línea (aleatorio), con tantos niveles como líneas se utilizaron, que permitió analizar la existencia de varianza genética; S es el factor sexo (fijo), con dos niveles, que permitió estudiar la existencia de diferencias entre machos y hembras; y  $\epsilon$  representa al error. Asimismo, para cada variable morfológica se estimó el componente de la varianza fenotípica total explicado por cada fuente de variación aleatoria.

*Identificación y análisis funcional de genes.* Dado que se obtuvo un resultado significativo

para la interacción entre la línea y el sexo, todas las variables fueron analizadas en cada sexo por separado. Los valores correspondientes a cada carácter fueron analizados de acuerdo al siguiente modelo de ANOVA:

$$Y = \mu + L + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media general del carácter analizado en cada caso; L es el factor línea (fijo), con tantos niveles como líneas se estudiaron en el bloque correspondiente y  $\epsilon$  representa al error. En los casos en los que el factor línea resultó significativo, se determinó qué líneas son las responsables de dicho efecto mediante comparaciones con el control del bloque respectivo (contrastes de Dunnett). Aquellas líneas que mostraron diferencias significativas con respecto al control correspondiente fueron consideradas como líneas portadoras de una inserción que afecta a un gen candidato para el carácter morfológico en cuestión.

El número de líneas en las que el tamaño aumentó o disminuyó significativamente con respecto al control en cada sexo se analizó mediante un análisis de frecuencias considerando todos los caracteres juntos y cada uno por separado.

Para identificar los genes potencialmente afectados por la inserción del elemento *P* en las líneas que exhibieron diferencias significativas con respecto al control, se realizó una búsqueda bioinformática en las regiones eucromáticas del genoma de *D. melanogaster* empleando como sonda *in silico* la secuencia nucleotídica flanqueante a la inserción disponible en el sitio de Internet del BDGP (<http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/pscreen>) que tiene esta información para cada una de las líneas. Las búsquedas de homología se realizaron utilizando la quinta publicación de la secuencia genómica de *D. melanogaster* disponible en el sitio de Internet de Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). De este modo se individualizaron los genes que intervienen de alguna manera en la expresión de los caracteres morfológicos estudiados y se determinó si dicha expresión es sexo-específica.

Los genes candidatos fueron distribuidos en distintos términos de ontología génica correspondientes a las categorías *Proceso biológico*, *Función molecular* y *Componente celular* de acuerdo con sus anotaciones (The Gene Ontology Consortium, 2000). Este análisis fue hecho automáticamente con la ayuda del programa FatiGO+ (Al-Shahrour *et al.*, 2005; 2006) del conjunto de herramientas bioinformáticas disponibles en el sitio de Internet de BABELOMICS (<http://www.fatigo.org/>) que los distribuye en términos de ontología génica correspondientes a las categorías mencionadas. Este programa distribuye los genes entre los términos de ontología génica correspondientes a cada categoría de manera no excluyente (es decir, un determinado gen puede estar asociado a más de un término de ontología génica dentro de una misma categoría).

*Efectos pleiotrópicos en los caracteres de tamaño corporal.* Las líneas fueron clasificadas de

acuerdo con la cantidad de caracteres que mostraron diferencias significativas con respecto al control para determinar el nivel de pleiotropía de los genes candidatos implicados. Los valores transformados de las cuatro variables correspondientes a las líneas en las que cambiaron la mayor parte de los caracteres con respecto a la línea control (los cuatro caracteres en un sexo y tres en el otro) fueron analizados, en cada línea por separado, de acuerdo con el siguiente modelo de ANOVA:

$$Y = \mu + C + S + C \times S + \epsilon$$

donde C es el efecto del carácter (fijo), con cuatro niveles, que permitió estudiar la existencia de diferencias en la magnitud del cambio entre caracteres (DO, AC, LT y TA); S es el factor sexo (fijo), con dos niveles y  $\epsilon$  representa al error. En aquellos casos en los que todos los caracteres mostraron diferencias con respecto a la línea control sólo en un sexo, los valores transformados de las cuatro variables fueron analizados, en cada línea por separado, mediante un ANOVA de una vía con el factor carácter únicamente. Cuando las fuentes de variación C y/ó C x S fueron significativas en el análisis de una línea, se identificaron las medias de los caracteres que mostraron diferencias significativas mediante comparaciones a posteriori (contrastes de Tukey HSD).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el paquete STATISTICA (StatSoft Inc., 1999; 2001).

## Resultados

### Análisis de correlación genética

Se realizaron análisis de correlación para estudiar hasta qué punto distintos caracteres vinculados al tamaño corporal están correlacionados entre si dentro de cada sexo y entre sexos. La correlación entre cada par de variables fue positiva y altamente significativa en ambos sexos (Tabla 2.1). El porcentaje de la varianza total explicado por la correlación (el cuadrado de  $r$  x 100) varió entre el 9% (DO-TA) y el 37% (AC-LT) en hembras y entre el 4% (DO-TA) y el 70% (AC-LT) en machos (Tabla 2.1). El ordenamiento de los pares de variables de acuerdo a dichos porcentajes es casi idéntico en ambos sexos (Tabla 2.1).

La correlación entre los sexos para cada variable fue positiva y altamente significativa sólo para DO y TA y el porcentaje de la varianza total explicado por la correlación en estos casos fue del 27% y 47%, respectivamente (Tabla 2.1). Cada uno de estos caracteres mostró una correlación mayor entre sexos que con ningún otro carácter dentro del mismo sexo. En cambio, la correlación entre sexos para AC no fue significativa tras aplicar la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples ( $P_B = 0,0125$ ; Tabla 2.1); y tampoco fue significativa para LT (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1:** Principales resultados de los análisis de correlación genética de los caracteres vinculados al tamaño corporal (valor de  $r$  y su significancia). Se realizó un análisis de correlación entre cada par de variables en los machos (sobre la diagonal), en las hembras (bajo la diagonal) y entre sexos para cada variable (sobre la diagonal). Los análisis se realizaron utilizando el valor medio de cada línea para cada carácter y sexo.

		Machos			
		DO	AC	LT	TA
Hembras	DO	0,52***	0,37***	0,44***	0,19**
	AC	0,33***	0,15*§	0,84***	0,59***
	LT	0,49***	0,61***	-0,02	0,59***
	TA	0,30***	0,40***	0,58***	0,69***

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.  
 \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . § No significativo tras aplicar la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples ( $P_B = 0,0125$ ).

### Análisis genético-cuantitativo

Se realizaron análisis de varianza para cuantificar el efecto del genotipo y de la interacción entre el genotipo y el sexo en la variación de los caracteres vinculados al tamaño corporal. Los resultados de los ANOVAs indican que hay varianza genética para todos los caracteres ya que las fuentes de variación genéticas (línea y/o línea por sexo) fueron significativas (Tabla 2.2). En este aspecto, ambas fuentes de variación genéticas explican entre un 25% (DO y AC) y un 42% (LT) de la varianza fenotípica total (Tabla 2.2). Estos resultados sugieren que un gran número de genes controla la expresión de dichos caracteres. Además, la interacción línea por sexo siempre fue significativa, indicando que la mutación afectó diferencialmente a ambos sexos.

A fin de identificar las líneas que contribuyeron a las diferencias significativas observadas en los ANOVAs, se realizaron los contrastes de Dunnett para carácter y sexo por separado. Los análisis mostraron que el 59% de las líneas (113 de las 191 líneas estudiadas) difirió significativamente de la línea control, al menos para un carácter en un sexo (Tabla 2.3). Asimismo, casi la mitad de las líneas (el 45% en machos y el 49% en hembras) mostró diferencias significativas con respecto al control sólo para un carácter cuando los sexos fueron analizados en forma separada (Tabla 2.3, Figura 2.1).

**Tabla 2.2:** Principales resultados de los ANOVAs para los caracteres vinculados al tamaño corporal. Se realizó un ANOVA utilizando los valores transformados correspondientes a cada variable de acuerdo con un modelo con los factores línea (aleatorio) y sexo (fijo). Se muestra el valor de *F* y su significancia para cada fuente de variación correspondiente a cada ANOVA. Asimismo, se indica el porcentaje de la varianza explicado por cada fuente de variación aleatoria correspondiente a cada ANOVA entre paréntesis.

Fuente de variación	DO	AC	LT	TA
Línea	3,30*** (16)	1,24	0,90	5,52*** (28)
Sexo	98,48***	12,27**	54,44***	24,33***
Línea x Sexo	2,73*** (9)	6,11*** (25)	11,22*** (42)	2,68*** (8)

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . En todos los casos, los machos mostraron valores medios mayores que las hembras.

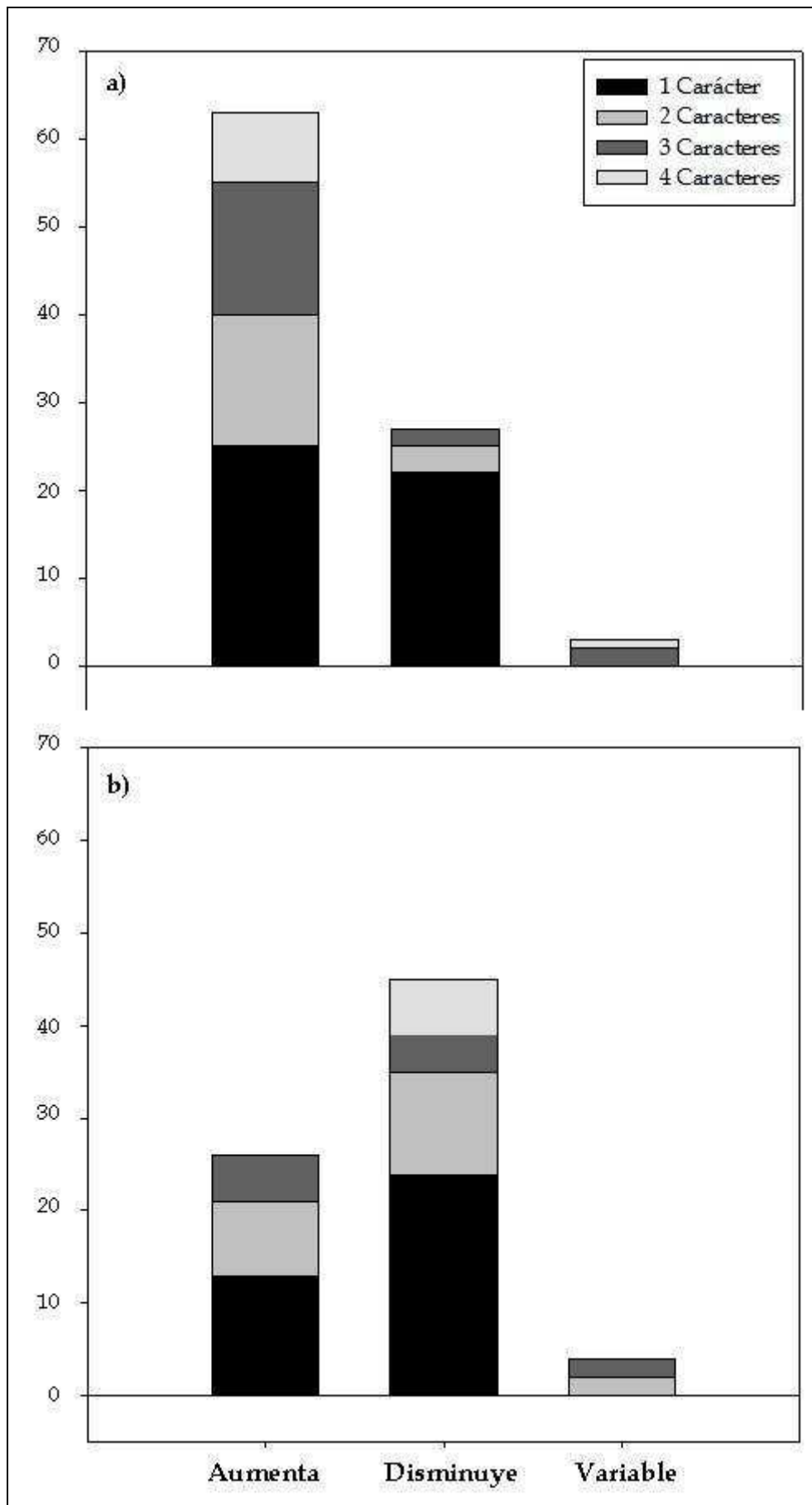
Machos	DO	AC	LT	TA	Hembras
10					7
3					16
6					6
21 (3)					8 (3)
3 (1)					5 (1)
1					1
2					2
4					5
2					6
6					3
9					2
2					0
1					2
11 (3)					6 (3)
7					6

**Figura 2.1:** Número de líneas en las que el elemento *P* afectó a uno, dos, tres ó cuatro caracteres vinculados al tamaño corporal en cada sexo. Los números entre paréntesis indican la cantidad de líneas compartidas entre sexos en las que los caracteres vinculados al tamaño corporal se vieron afectados de manera similar. Los caracteres afectados por la mutación se indican en gris oscuro. DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.

En ese sentido, el carácter afectado con mayor frecuencia en los machos fue TA mientras que en las hembras fue AC (Tabla 2.3, Figura 2.1). Por otro lado, 18, 23 y 7 líneas mostraron diferencias con respecto a la línea control para dos, tres, y cuatro caracteres en los machos mientras que 22, 10 y 6 líneas mostraron dichas diferencias en las hembras, indicando que los genes mutados presentan importantes efectos pleiotrópicos en los caracteres de tamaño corporal (Tabla 2.3, Figura 2.1). Resulta interesante destacar que sólo siete líneas mostraron un efecto fenotípico similar (aumentando o disminuyendo el tamaño) en ambos sexos (números entre paréntesis en la Figura 2.1). De hecho, el efecto fenotípico de la mayoría de las mutaciones fue diferente en machos y en hembras (Tabla 2.3, Figura 2.1) confirmando entonces, que el efecto significativo de la interacción entre la línea y el sexo (Tabla 2.2) fue la consecuencia de un efecto fenotípico sexo-dependiente de las inserciones que ocurrió de manera generalizada (Tabla 2.3). Finalmente, sorprende encontrar que generalmente, como consecuencia de la inserción del elemento *P*, los machos mostraron un aumento significativo de los caracteres mientras que, en las hembras, los valores de los caracteres disminuyeron con respecto a los de la línea control (Tabla 2.2). Es más, este patrón de efectos opuestos entre sexos no puede atribuirse a unas pocas líneas con efectos fenotípicos mayores (Figura 2.2, Tabla 2.3).

Un análisis de frecuencias considerando todos los caracteres juntos mostró que el número de casos en los que el tamaño aumenta o disminuye difiere entre sexos ( $\chi^2_1 = 79,7$ ;  $p < 0,0001$ ) lo que sugiere que la mayoría de las líneas significativas presentaron efectos opuestos entre sexos. Al analizar los datos de cada carácter por separado, esta tendencia fue altamente significativa para DO ( $\chi^2_1 = 23,2$ ;  $p < 0,0001$ ); AC ( $\chi^2_1 = 35,4$ ;  $p < 0,0001$ ) y LT ( $\chi^2_1 = 43,2$ ;  $p < 0,0001$ ) pero no resultó significativa para TA ( $\chi^2_1 = 0,4$ ;  $p = 0,5286$ ) de lo que se desprende que la inserción del elemento *P* podría conducir a una disminución del dimorfismo sexual.





**Figura 2.2:** Número de líneas en las que la mutación aumentó, disminuyó o aumentó y disminuyó el valor de uno, dos, tres ó cuatro caracteres vinculados al tamaño corporal en a) machos y b) hembras.

**Tabla 2.3:** Líneas en las que la inserción del elemento *P* afectó a uno o más caracteres vinculados al tamaño corporal en uno o ambos sexos.

Línea	Gen candidato	Sitio de inserción del elemento <i>p[GT1]</i>	Ubicación citogenética	Efecto fenotípico de la inserción del elemento <i>P</i>							
				DO		AC		LT		TA	
				♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
BG00177	<i>CG9894</i>	En el gen	22A3	ns	ns	ns	ns	ns	▼*	ns	ns
BG00372 <sup>b</sup>	<i>CG1678</i>	A 1498 pb del extremo 3'	20A1	ns	▼*	ns	ns	▼*	ns	ns	ns
BG00386 <sup>c</sup>	<i>NMDA receptor 1 (Nmdar1)</i>	A 302 pb del extremo 3'	83A6-A7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▼**	ns
BG00429	No existe secuencia			ns	ns	ns	▼***	ns	ns	ns	ns
BG00737	<i>Heat shock protein 27 (Hsp 27)</i>	En el gen	67B1	▲*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BG00767	<i>Guanine nucleotide exchange factor GEF64C</i>	A 1004 pb del extremo 5'	64B13-B17	ns	ns	▲**	▲**	▲*	ns	▲*	▲**
BG00846	<i>invected (inv)</i>	En el gen	47F15-7F17	ns	▼**	▼***	▼***	▼***	▼***	▼***	▼***
BG01010	<i>Karl</i>	En el gen	10E3	ns	ns	ns	▼***	ns	ns	▼***	▼*
BG01011	<i>misshapen (msn)</i>	A 1402 pb del extremo 3'	62E6-E7	ns	▼**	ns	▼***	ns	▼**	▼***	▼***
BG01018	<i>forkhead box, sub-group O (foxo)</i>	A 104 pb del extremo 3'	88A5-A7	ns	ns	ns	▼***	ns	▼*	ns	ns
BG01019	No se halló similitud de secuencia significativa			ns	ns	ns	ns	ns	ns	▼**	ns
BG01037 <sup>c</sup>	<i>βv integrin (βInt-v)</i>	En el gen	39A1	ns	ns	ns	ns	ns	▼**	ns	ns
BG01047 <sup>b,c</sup>	<i>frizzled (fz)</i>	En el gen	70D4-D5	▲*	ns	▲*	ns	ns	ns	▲**	ns
BG01062	<i>brother of iHog (boi)</i>	En el gen	3A3	ns	ns	ns	ns	▲*	ns	ns	ns
BG01065	<i>visgun (vsg)</i>	En el gen	67C5	ns	ns	ns	▼***	ns	ns	ns	ns
BG01228 <sup>b</sup>	<i>derailed (drl)</i>	A 22728 pb del extremo 5'	37C7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▲***	▲*
BG01247	<i>SRY interacting protein 1 (Sip1)</i>	En el gen	54B16	ns	ns	ns	▼***	ns	ns	ns	ns
BG01279 <sup>c</sup>	<i>CG17836</i>	En el gen	91D4-D5	ns	▼***	ns	▼**	ns	▼***	ns	▼***

(continúa en la próxima página)

Continuación de la Tabla 2.3

BG01297	CG33691	A 291 pb del extremo 3'	6E2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▲**	▲**
BG01314	CG6540	En el gen	17C7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▲*
BG01329	CG4400	En el gen	11D1	ns	ns	ns	▲***	ns	ns	▲***	▲**
BG01361	CG6854	En el gen	71B4-B5	ns	ns	ns	▲**	ns	ns	ns	▲***
BG01380	<i>Oseg4 / draper (drpr)</i>	En los genes	62B1	▲*	ns	▲***	ns	▲**	ns	ns	ns
BG01385	No existe secuencia			ns	ns	ns	ns	▲**	ns	▲*	ns
BG01433	CG13791	A 1596 pb del extremo 3'	28B1	ns	▼*	ns	ns	ns	ns	▼**	ns
BG01491 <sup>a,b</sup>	<i>tramtrack (ttk)</i>	A 1637 pb del extremo 3'	100F3	▲***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BG01498	<i>Casein kinase Ia (CKIa)</i>	En el gen	11B11	ns	▼***	▲***	ns	▲***	▼***	ns	ns
BG01520	<i>E2F transcription factor (E2f)</i>	En el gen	93E9-F1	ns	ns	ns	▼**	ns	ns	ns	ns
BG01538	No existe secuencia			▲*	ns	▲***	ns	▲***	▼***	▲*	▲*
BG01548	<i>α-Esterase-10 (α-Est10)</i>	A 2624 pb del extremo 5'	84D9	ns	ns	ns	▼*	ns	ns	ns	ns
BG01556	CG12078	A 5755 pb del extremo 5'	63B14	ns	ns	ns	▲*	ns	ns	ns	ns
BG01562 <sup>a</sup>	<i>headcase (hdc)</i>	A 4750 pb del extremo 3'	99E4	ns	ns	▲*	ns	ns	ns	ns	ns
BG01563 <sup>c</sup>	CG16708	A 51 pb del extremo 3'	82F11-83A1	▲**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BG01566	<i>arrest (aret)</i>	En el gen	33D3-D5	▼*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BG01573	<i>forkhead box, sub-group O (foxo)</i>	A 6088 pb del extremo 3'	88A5-A7	ns	ns	ns	ns	ns	▲*	ns	▲*
BG01597	<i>l(3)82Fd</i>	En el gen	82F8-F9	ns	ns	ns	▼*	ns	ns	ns	ns
BG01607	<i>Gliotactin (Gli)</i>	En el gen	35D4	ns	ns	ns	▲**	ns	ns	▲**	ns
BG01608	No se halló similitud de secuencia significativa			▲***	ns	▲*	ns	▲**	ns	▲*	ns
BG01613 <sup>b</sup>	CG12161	A 1553 pb del extremo 3'	82F4	ns	▲**	ns	ns	ns	ns	ns	▲*
BG01633	<i>scalloped (sd)</i>	En el gen	13F1	ns	ns	▲***	▲**	▲***	▲***	▲***	▲***

(continúa en la próxima página)

Continuación de la Tabla 2.3

BG01635 <sup>a</sup>	No se halló similitud de secuencia significativa			ns	ns	ns	ns	▲**	ns	ns	ns
BG01637	<i>tropomodulin (tmod)</i>	En el gen	99F7-F8	▲*	ns	▲**	ns	▲**	ns	▲*	▲**
BG01655	CG32038	En el gen	67B7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▲*	ns
BG01662	<i>Laminin A (LanA)</i>	A 64 pb del extremo 5'	65A8-A9	ns	▲**	ns	ns	ns	ns	▼***	ns
BG01689	No se halló similitud de secuencia significativa			ns	▼**	ns	▼***	ns	ns	ns	ns
BG01709	<i>kermit</i>	En el gen	44B5	ns	ns	ns	ns	▲**	ns	▲***	ns
BG01713	CG10694 / CG18428	A 374 pb del extremo 5' / A 520 pb del extremo 3'	95E1	ns	ns	ns	▼*	ns	ns	ns	ns
BG01717	No se halló similitud de secuencia significativa			ns	ns	ns	ns	ns	ns	▲*	ns
BG01726	CG11382	A 197 pb del extremo 3'	1E4	ns	ns	▲*	ns	▲*	ns	▲**	ns
BG01733	CG6175	A 2725 pb del extremo 5'	68C1-C2	▲*	▲**	ns	ns	▲***	ns	▲**	ns
BG01735	CG13130 / <i>big brain (bib)</i>	En los genes	30F5	▲***	ns	▲*	ns	▲*	ns	ns	ns
BG01736	CG5966	A 29 pb del extremo 3'	5D1	ns	ns	ns	▼***	ns	ns	▼**	ns
BG01780	CG11226	En el gen	80A4	▲*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BG01784	<i>bunched (bun)</i>	En el gen	33E5-E9	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▼*	ns
BG01839	No existe secuencia			ns	ns	ns	ns	ns	ns	▲**	ns
BG01880	<i>cookie monster (comr)</i>	A 4921 pb del extremo 5'	58B1	ns	ns	ns	▼*	ns	ns	ns	ns
BG01892	No se halló similitud de secuencia significativa			ns	▼*	ns	▼**	ns	ns	ns	ns
BG01898	No existe secuencia			▲**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BG01902	<i>mastermind (mam)</i>	En el gen	50C23-D3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▼**	ns
BG01912 <sup>a</sup>	<i>pxb</i>	En el gen	89A1-A2	ns	ns	▲*	ns	ns	ns	▲*	ns

(continúa en la próxima página)

Continuación de la Tabla 2.3

BG01990	CG30492	A 501 pb del extremo 3'	43E5-E7	ns	ns	ns	▼*	ns	ns	ns	ns
BG02019	CG9171	En el gen	25F4-F5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▲***	ns
BG02023	<i>Fasciclin 3 (Fas3)</i>	En el gen	36F2-F4	▲**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▼*
BG02034	<i>lilliputian (lilli)</i>	En el gen	23C1-C3	ns	ns	ns	ns	▲**	ns	▲*	ns
BG02042	<i>easily shocked (eas)</i>	En el gen	14B7	ns	ns	ns	▼*	ns	ns	ns	ns
BG02056	<i>longitudinals lacking (lola)</i>	En el gen	47A11-A13	▲**	▲*	▲**	▲*	▲*	ns	▲*	ns
BG02058 <sup>b</sup>	No existe secuencia			▲**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BG02063 <sup>b</sup>	CG32685	En el gen	9B1	ns	ns	ns	ns	▲*	ns	ns	ns
BG02065	<i>toucan (toc)</i>	En el gen	23D1-D2	ns	▼***	▲***	ns	▲***	▼***	ns	▲**
BG02081 <sup>c</sup>	<i>Rtnl1</i>	En el gen	25B9-C1	ns	ns	ns	ns	▲***	ns	▲***	ns
BG02095	<i>echinoid (ed)</i>	A 2888 pb del extremo 3'	24D4-D6	▲**	ns	▲*	ns	▲**	ns	ns	ns
BG02108	<i>Doughnut on 2 (dnt) / CG13086</i>	A 546 pb del extremo 5' / A 326 pb del extremo 3'	37D2	▲***	▼*	▲***	ns	▲***	▼***	ns	▲**
BG02118	<i>Protein kinase 61C (Pk61C)</i>	A 35 pb del extremo 3'	61B1	ns	ns	ns	▼*	ns	▼*	ns	▼***
BG02128	<i>lethal (1) G0007 (l(1)G0007)</i>	En el gen	12E3-E5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▼***	▼***
BG02131 <sup>b</sup>	CG31886	A 2236 pb del extremo 3'	29F5-29F5	ns	ns	ns	ns	▲***	ns	▲**	ns
BG02132	No se halló similitud de secuencia significativa			ns	ns	ns	ns	▲*	ns	ns	ns
BG02157	CG8177	A 2746 pb del extremo 3'	67C7-C8	▲**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BG02159	CG32666	En el gen	10C1-C5	▲**	ns	▲*	ns	ns	ns	ns	ns
BG02173	<i>NFAT</i>	En el gen	12A9-B2	ns	▲***	ns	▲*	ns	ns	ns	ns
BG02180 <sup>a</sup>	<i>nuclear fallout (nuf)</i>	En el gen	70D3-D4	ns	ns	▲**	▲**	ns	▲*	ns	▲**
BG02192	<i>boule (bol)</i>	En el gen	66F5-67A1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▲*	ns
BG02199 <sup>a</sup>	<i>division abnormally delayed (dally)</i>	A 22 pb del extremo 3'	66E1-E3	ns	ns	▲*	ns	ns	ns	▲**	▲**

(continúa en la próxima página)

Continuación de la Tabla 2.3

BG02210	<i>lamina ancestor (lama)</i>	En el gen	64C12-C13	ns	▼***	▲**	▼***	▲***	▼***	▼***	▼***
BG02219	<i>Smrter (Smr)</i>	A 375 pb del extremo 3'	11B10-B14	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▲**	ns
BG02239	<i>CG11550</i>	A 9536 pb del extremo 5'	100D1	▲*	▼*	▲***	▼***	▲***	▼***	▼*	ns
BG02240	<i>bip1</i>	A 4666 pb del extremo 5'	66B3	ns	▼*	▲***	▼***	▲***	▼***	ns	ns
BG02241	<i>bifocal (bif)</i>	En el gen	10D4-D5	▲***	▲**	▲***	ns	▲***	ns	▲**	▲**
BG02262	<i>Smrter (Smr)</i>	En el gen	11B10-B14	ns	ns	ns	▼***	ns	▼*	▼**	▼**
BG02286	<i>CG32529 / amnesiac (amn)</i>	En los genes	18F4-19A2	▼*	▼***	ns	▼***	ns	▼***	▼***	▼***
BG02306	<i>CG10641</i>	En el gen	37B8	ns	ns	▲**	▲**	▲**	ns	▲**	ns
BG02314 <sup>c</sup>	<i>jing</i>	A 289 pb del extremo 3'	42B3	▲*	ns	▲***	▼**	▲***	▼*	ns	ns
BG02327 <sup>c</sup>	<i>pipsqueak (psq)</i>	En el gen	47A13-B1	ns	▲**	ns	ns	▲**	ns	ns	ns
BG02358	<i>βv integrin (βInt-v)</i>	A 699 pb del extremo 5'	39A1	▲**	ns	▲***	▼***	▲***	▼**	ns	ns
BG02359	<i>innexin 7 (inx7)</i>	En el gen	6E4	ns	ns	▲*	▼***	▲***	ns	▲*	ns
BG02380	<i>Laminin A (LanA)</i>	A 151 pb del extremo 5'	65A8-A9	ns	ns	ns	ns	▲***	ns	▲**	ns
BG02386 <sup>a,c</sup>	<i>Sema-5c</i>	A 171 pb del extremo 5'	68F2	▲*	ns	ns	ns	▲***	ns	ns	ns
BG02391 <sup>c</sup>	<i>neuralized (neur)</i>	En el gen	85C2-C3	ns	ns	ns	▼*	ns	ns	ns	ns
BG02395	<i>CG3587</i>	A 9070 pb del extremo 5'	2B16	▲*	ns	▲***	▼***	▲***	▼***	ns	ns
BG02398	<i>CG41475</i>	En el gen	20D2-E1	▲***	ns	▲***	ns	▲***	▼***	ns	▲***
BG02412	<i>CG8062</i>	A 351 pb del extremo 5'	18C2	▲***	ns	▲***	ns	▲***	▼***	▲*	ns
BG02415 <sup>a</sup>	<i>capricious (caps)</i>	A 184 pb del extremo 3'	70A3-A4	▲*	ns	▲***	ns	▲***	▼***	ns	ns
BG02435 <sup>a</sup>	<i>Tollo</i>	A 4583 pb del extremo 5'	71C1	ns	ns	▲***	▼***	▲***	▼***	▼**	ns
BG02441	<i>CG32781</i>	A 7908 pb del extremo 5'	3E7-E8	▲*	ns	▲**	▲**	ns	ns	ns	▲*
BG02462	<i>CG6301</i>	A 1398 pb del extremo 5'	53D11	▼*	▼*	▼***	▼***	ns	ns	ns	ns
BG02469	<i>Laminin A (LanA)</i>	A 170 pb del extremo 5'	65A8-A9	ns	ns	▲***	▲***	▲*	▲**	▲*	▲*

(continúa en la próxima página)

Continuación de la Tabla 2.3

BG02529	No existe secuencia			ns	ns	▼*	ns	ns	▼**	ns	ns
BG02546	No se halló similitud de secuencia significativa			▲***	ns	▲*	ns	ns	▲*	▲*	ns
BG02566 <sup>a,c</sup>	<i>Calreticulin (Crc)</i>	En el gen	85E1	ns	▼**	▲***	ns	▲*	ns	ns	ns
BG02601 <sup>c</sup>	<i>CG14782</i>	En el gen	2B1	ns	ns	▲***	▲***	▲***	▲*	▲***	▲***
BG02605 <sup>a,b</sup>	<i>scalloped (sd)</i>	En el gen	13F1-F4	▲*	▲**	ns	ns	ns	ns	▲***	ns
BG02690	<i>CG14478</i>	En el gen	54B16	▲*	ns	ns	▼***	ns	ns	ns	▼***
BG02727 <sup>a</sup>	<i>escargot (esg)</i>	A 110 pb del extremo 3'	35D2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	▼*
BG02830	<i>Lipid storage droplet-2 (Lsd-2)</i>	A 61 pb del extremo 5'	13A8-A9	ns	▼*	▼*	▼***	▼**	▼***	▼*	▼**

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. <sup>a</sup> Línea significativa para el carácter “Número de quetas” (Norga *et al.*, 2003); <sup>b</sup> Línea significativa para el carácter “Resistencia a la inanición” (Harbison *et al.*, 2004); <sup>c</sup> Línea significativa para el carácter “Comportamiento olfatorio” (Sambandan *et al.*, 2006). ns: no significativo, \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001. Líneas ns para todo los caracteres (gen/es candidato/s): BG00369 (*CG13334/CG13333*), BG00373 (*CG11226*), BG00489 (*Osiris 9*), BG00524 (RNA no codificante 001:3R), BG00528 (*Osiris 9*), BG00664 (No existe secuencia), BG00683 (*Furin 1/CG5127*), BG00735 (*schizo/CG10581*), BG00930 (No existe secuencia), BG00985 (No existe secuencia), BG00990 (*wing blister*), BG00992 (*CG17574*), BG01007 (*CG8776*), BG01009 (*CG17025*), BG01014 (*spichthyin*), BG01017 (No se halló similitud de secuencia significativa), BG01028 (*Trithorax-like*), BG01045 (No se halló similitud de secuencia significativa), BG01066 (No existe secuencia), BG01081 (*Glutamate oxaloacetate transaminase 1*), BG01127 (*muscleblind*), BG01214 (*sugarless/CG10064*), BG01218 (*CG6767*), BG01257 (*1.28*), BG01290 (*Btk family kinase at 29A*), BG01339 (*cricketlet*), BG01354 (*CG30492*), BG01412 (No existe secuencia), BG01488 (*musashi*), BG01515 (*female sterile (1) homeotic*), BG01543 (*Merlin*), BG01565 (*Defense repressor 1*), BG01568 (*CG32560*), BG01600 (*CG31666*), BG01618 (*CG6398*), BG01628 (*Malic enzyme*), BG01645 (*faint sausage*), BG01649 (*cricketlet*), BG01659 (*desert*), BG01660 (No existe secuencia), BG01672 (*CG14591*), BG01674 (*Neuroglian*), BG01683 (*CG32572*), BG01705 (*CG9650*), BG01714 (*CG11940*), BG01716 (*PAPS synthetase*), BG01725 (*lethal (3) neo 38*), BG01763 (No se halló similitud de secuencia significativa), BG01769 (No existe secuencia), BG01822 (*IGF-II mRNA-binding protein*), BG01828 (No existe secuencia), BG01835 (No existe secuencia), BG01858 (No se halló similitud de secuencia significativa), BG01859 (No existe secuencia), BG01893 (*lethal (3) 07882/Splicing factor 1*), BG01947 (*Id14*), BG01949 (*ade5/CG12717*), BG02003 (*6-phosphofructo-2-kinase/CG14199*), BG02067 (*Isoleucyl-tRNA synthetase*), BG02088 (*CG15309*), BG02102 (*Nnf1a*), BG02106 (*CG31145*), BG02107 (No se halló similitud de secuencia significativa), BG02109 (*tartan*), BG02113 (*Laminin A*), BG02130 (*Thor*), BG02175 (No se halló similitud de secuencia significativa), BG02292 (No se halló similitud de secuencia significativa), BG02439 (*CG32556/CG8188*), BG02480 (No existe secuencia), BG02520 (*Vacuolar H+ ATPase 16kD subunit*), BG02524 (*CG12418*), BG02560 (*CG9674/nudC*), BG02563 (*capricious*), BG02612 (*CG31531*), BG02631 (No se halló similitud de secuencia significativa), BG02747 (*rutabaga*), BG02823 (*scylla*).

## Identificación y análisis funcional de genes

Se identificaron 92 genes candidatos que afectan a los caracteres vinculados al tamaño corporal estudiados considerando aquellos en los que la inserción del elemento *P* se encuentra a una distancia no mayor a 5 Kb del sitio de inicio de la transcripción del gen (sólo se seleccionó como candidato al gen más cercano a la inserción excepto en aquellos casos en los que dos genes están a una distancia menor a 1 Kb de la mutación y la inserción no ocurrió en ninguno de los genes; Tabla 2.3). Por un lado, en cinco de las 113 líneas significativas, la inserción del elemento *P* se encuentra en la vecindad de dos genes (Tabla 2.3). Este es el caso de las líneas BG01380 (genes *Oseg4* y *draper (drpr)*), BG01713 (genes *CG10694* y *CG18428*), BG01735 (genes *CG13130* y *big brain (bib)*), BG02108 (genes *Doughnut on 2 (dnt)* y *CG13086*) y BG02286 (genes *CG32529* y *amnesiac (amn)*; Tabla 2.3). Por otro lado, se registró la inserción del elemento *P* en el mismo gen candidato en dos o más líneas diferentes. Este es el caso del gen *scalloped (sd)*; líneas BG01633 y BG02605), *Smrter (Smr)*; BG02219 y BG02262),  $\beta v$  *integrin ( $\beta Int-v$ )*; BG01037 y BG02358), y *Laminin A (LanA)*; BG01662, BG02380 y BG02469; Tabla 2.3). Una observación interesante es que distintos sitios de inserción en el mismo gen (es decir, distintas líneas) mostraron resultados diferentes, indicando que el sitio exacto del transposón determina el efecto fenotípico de la mutación, como fue observado previamente para otros caracteres (Rollmann *et al.*, 2006). La inserción del elemento *P* en distintos sitios del primer intrón de *sd* provocó un incremento del tamaño en todos los caracteres estudiados excepto por DO en ambos sexos de la línea BG01633 así como un aumento en DO en ambos sexos y en TA en machos de la línea BG02605 (Tabla 2.3). Las mutaciones que afectaron a *Smr* produjeron un incremento de tamaño en TA en machos de la línea BG02219 y una disminución en AC y LT en hembras así como en TA en ambos sexos de la línea BG02262 (Tabla 2.3). Estas inserciones ocurrieron a 375 pb del extremo 3' del gen y en el primer intrón de *Smr* respectivamente (Tabla 2.3). Las mutaciones que afectaron a  $\beta Int-v$  causaron una disminución de tamaño en LT en hembras de la línea BG01037 y un aumento en todos los caracteres excepto por TA en machos así como una disminución en AC y LT en hembras de la línea BG02358 (Tabla 2.3). Estas inserciones ocurrieron en el primer exón y a 699 pb del extremo 5' de  $\beta Int-v$  respectivamente (Tabla 2.3). Finalmente, tres inserciones afectaron a *LanA*: una aumentó DO en hembras y disminuyó TA en machos de la línea BG01662; la segunda aumentó LT y TA en machos de la línea BG02380 y la tercera causó el incremento de todos los caracteres estudiados excepto por DO en ambos sexos de la línea BG02469 (Tabla 2.3). Estas inserciones se ubicaron a 64, 151 y 170 pb del extremo 5' de *LanA* respectivamente (Tabla 2.3).

Como se mencionó en el capítulo anterior, el camino de señalización del factor de crecimiento de tipo insulínico es el sistema principal que regula la proliferación y el crecimiento celular y juega un rol fundamental en la determinación del metabolismo y el almacenaje de



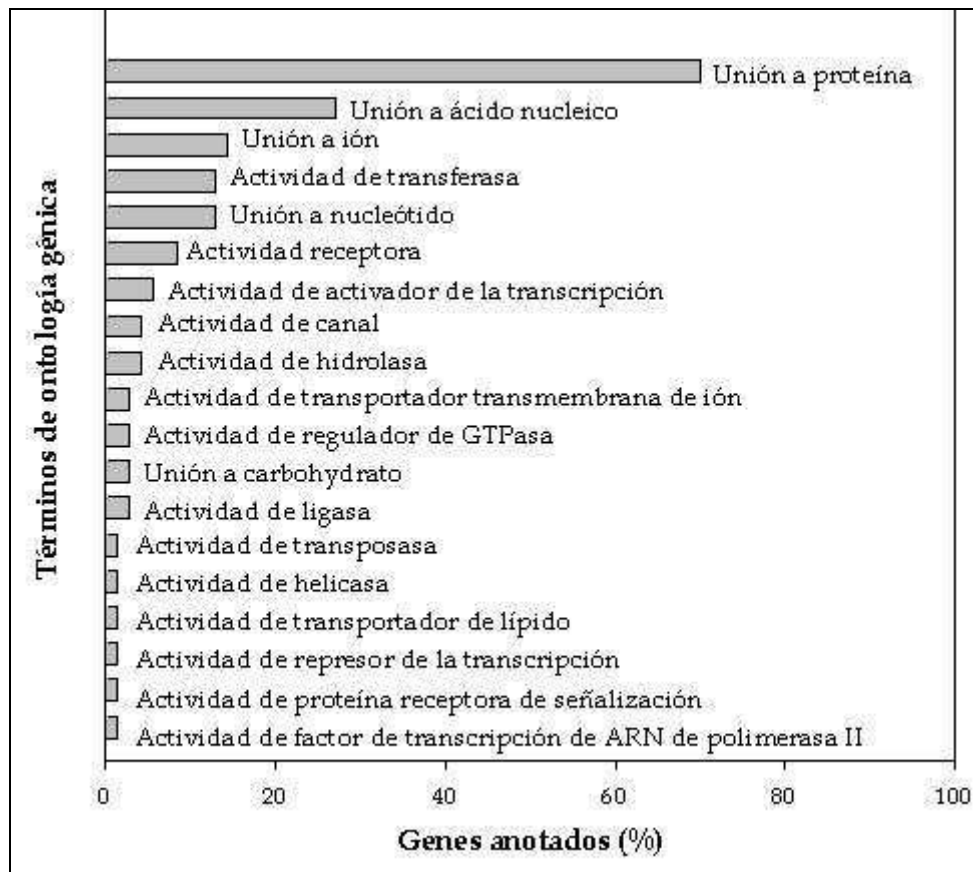
nutrientes (Edgar, 2006). Asimismo, el circuito denominado TOR juega un rol más prominente en la regulación del crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Cardenas *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Únicamente dos de los 92 genes candidatos identificados que afectan al tamaño corporal, *forkhead box, sub-group O (foxo)* y *Protein kinase 61C (Pk61C)* (Tabla 2.3), están directamente relacionados con estos caminos metabólicos (por ejemplo, de Jong & Bochdanovits, 2003; Oldham & Hafen, 2003). Las inserciones del elemento *P* en estos genes causaron una reducción del tamaño de dos o tres caracteres de tamaño corporal sólo en las hembras (Tabla 2.3). *foxo* es un elemento regulatorio clave del camino de señalización de la insulina y activa tanto “río abajo” como “río arriba” blancos de esta cascada de señalización por un mecanismo de retroalimentación transcripcional que regula el crecimiento y la proliferación celular (Junger *et al.*, 2003; Puig *et al.*, 2003). Particularmente está relacionado con la regulación negativa de la proliferación y el tamaño celular y, como se espera, a la regulación negativa del tamaño corporal (Hwangbo *et al.*, 2004; Kramer *et al.*, 2003). Entonces, nuestra hipótesis *a priori* era que la mutación de *foxo* generara una supresión de su expresión produciendo moscas más grandes. Sin embargo, la inserción del elemento *P* a 104 pb del extremo 3' de este gen produjo hembras con menor AC y LT (Tabla 2.3). Por lo tanto, los resultados parecen indicar que las moscas portadoras de dos copias inactivadas de *foxo* presentan una regulación negativa del tamaño corporal dependiente del sexo sugiriendo que la reducción del tamaño corporal en los machos podría estar bajo restricciones más intensas. El segundo gen directamente relacionado con los caminos de señalización de la insulina y TOR que afectó al tamaño corporal, *Pk61C*, es un mediador central del camino metabólico entre *Pi3K* y varias kinasas serina/treonina intracelulares que regulan el crecimiento celular, el tamaño de los órganos y la apoptosis durante el desarrollo de *Drosophila* (Cho *et al.*, 2001). Contrariamente a la actividad de *foxo*, *Pk61C* media la regulación positiva del tamaño corporal (Cho *et al.*, 2001). Como la inserción del elemento *P* a 35 pb del extremo 3' de este gen generó hembras con menores AC, LT y TA (Tabla 2.3), esta podría ser una mutación de pérdida de función que presenta un efecto específico en las hembras. Nuevamente, estos resultados parecen reflejar restricciones en la dirección del efecto de la mutación.

Los genes con efectos significativos en caracteres de tamaño corporal fueron distribuidos automáticamente en términos de ontología génica correspondientes a las categorías *Proceso biológico*, *Función molecular* y *Componente celular*, de acuerdo con sus anotaciones, usando FatiGO+ (Al-Shahrour *et al.*, 2005, 2006). En el análisis correspondiente a la categoría *Proceso biológico*, se consideraron 485 términos de ontología génica. Los 56 genes candidatos con anotación se distribuyeron en 37 términos de manera no excluyente (es decir, un gen determinado puede estar asociado a más de un término, Tabla 2.4). Cada uno de los primeros 15

términos engloba más del 10% de los genes. En general, estos términos están relacionados con el desarrollo, procesos metabólicos, la localización, la reproducción sexual, la organización y la biogénesis de la célula, la comunicación y la adhesión celular y el ciclo de la célula (Tabla 2.4). Una gran proporción de estos genes están involucrados en el desarrollo (un 64% en *Desarrollo de organismo multicelular*, un 57% en *Desarrollo de estructura anatómica* y un 50% en *Proceso de desarrollo celular*) y/o en procesos metabólicos (un 50% en *Proceso metabólico primario*, un 50% en *Proceso metabólico celular* y un 43% en *Proceso metabólico macromolecular*; Tabla 2.4). El análisis de la *Función molecular* consideró 111 descriptores y los 71 genes candidatos con anotación en esta categoría se distribuyeron, de manera no excluyente, en 19 términos de ontología génica (Figura 2.3). Los términos que presentaron un mayor porcentaje de genes son: *Unión a proteína* (70%), *Unión a ácido nucleico* (27%), *Unión a ión* (14%), *Actividad de transferasa* (13%) y *Unión a nucleótido* (13%; Figura 2.3). Finalmente, en el análisis correspondiente al *Componente celular* se incluyeron 54 descriptores y los 47 genes con anotación en esta categoría se distribuyeron, de manera no excluyente, en 7 categorías. La gran mayoría de los genes (98%) codifican alguna *Parte de la célula* y un 51% codifica algún *Producto unido a la membrana de una organela*. Los términos restantes (*Producto no unido a la membrana de una organela*, *Parte de la región extracelular*, *Parte de una organela*, *Complejo receptor* y *Parte de la matriz extracelular*) engloban menos del 10% de los genes candidatos que tienen alguna anotación en esta categoría.

**Tabla 2.4:** Distribución de los genes candidatos con anotación en términos de ontología génica correspondientes a la categoría *Proceso biológico* usando FatiGO+. Los genes son distribuidos de manera no excluyente (es decir, un determinado gen puede estar asociado a más de un término de ontología génica). Los valores corresponden al porcentaje de genes relacionado con cada término.

Términos de ontología génica ( <i>Proceso biológico</i> )	% de genes
Desarrollo de organismo multicelular	64,29
Desarrollo de estructura anatómica	57,14
Proceso metabólico primario	50,00
Proceso de desarrollo celular	50,00
Proceso metabólico celular	48,21
Regulación de proceso biológico	44,64
Proceso metabólico macromolecular	42,86
Biogénesis y organización celular	33,93
Comunicación celular	26,79
Reproducción sexual	23,21
Establecimiento de localización	14,29
Ciclo celular	12,50
Localización de la célula	12,50
Adhesión celular	12,50
División celular	10,71
Comportamiento	8,93
Respuesta a estímulo químico	7,14
Regulación de calidad biológica	7,14
Proceso biosintético	7,14
Muerte	7,14
Respuesta a estrés	7,14
Segregación cromosómica	5,36
Proceso catabólico	5,36
Proliferación celular	5,36
Respuesta a estímulo externo	3,57
Respuesta a estímulo endógeno	3,57
Proceso reproductivo	3,57
Reconocimiento celular	3,57
Envejecimiento	3,57
Regulación de función molecular	3,57
Interacción comportamental entre organismos	1,79
Respuesta a estímulo abiótico	1,79
Crecimiento de órgano	1,79
Crecimiento de organismo multicelular	1,79
Localización de proteína	1,79
Circulación	1,79
Respuesta a estímulo biótico	1,79



**Figura 2.3:** Distribución de los genes candidatos con anotación en términos de ontología génica correspondientes a la categoría *Función molecular* usando FatiGO+. Los genes son distribuidos de manera no excluyente (es decir, un determinado gen puede estar asociado a más de un término de ontología génica). Estos resultados corresponden al tercer nivel de análisis (el nivel que contiene la información más general de los productos de los genes analizados).

Dado que la metodología empleada permitió cuantificar los cambios fenotípicos producto de las inserciones, se identificaron los genes cuya mutación originó los mayores cambios de tamaño en DO, AC, LT y TA en el panel de genes con efectos significativos en alguno de los caracteres estudiados (Tabla 2.5). En las hembras se detectó que las variaciones fenotípicas más importantes corresponden a disminuciones de los tamaños mientras que el incremento del tamaño fue el cambio más significativo detectado en los caracteres analizados en los machos. El cambio en el valor fenotípico comparado con la línea control varió, en las hembras, entre el 11,6% de aumento en DO y el 15,4% de disminución en LT y, en los machos, entre el 12,2% y el 16,7% de disminución e incremento de LT respectivamente (Tabla 2.5). No se registró ningún caso en el que una única mutación causara los mayores cambios fenotípicos en todos los caracteres analizados. Sin embargo, la inserción del elemento *P* en *invected* (*inv*) fue responsable de cinco de las ocho disminuciones de tamaño más extremas considerando los cuatro caracteres en ambos sexos por separado (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5:** Líneas que mostraron el cambio más extremo para cada carácter vinculado al tamaño corporal en machos y en hembras. Se muestran el/los gen/es afectado/s por la inserción del elemento *P* en cada caso así como el cambio (aumento o disminución) del tamaño para cada carácter.

Carácter	Hembras			Machos		
	Gen	Efecto	% de cambio	Gen	Efecto	% de cambio
DO	<i>lama</i>	▼	13,59	<i>CG6301</i>	▼	7,20
	<i>CG12161</i>	▲	11,57	<i>CG13130 / bib</i>	▲	15,59
AC	<i>inv</i>	▼	12,88	<i>inv</i>	▼	10,31
	BG01635 §	▲	1,86	<i>CG41475</i>	▲	12,91
LT	<i>inv</i>	▼	15,41	<i>inv</i>	▼	12,15
	<i>sd</i>	▲	6,13	<i>dnt / CG13086</i>	▲	16,66
TA	<i>inv</i>	▼	9,88	<i>l(1)G0007</i>	▼	7,57
	<i>sd</i>	▲	8,56	<i>kermit</i>	▲	9,19

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. El porcentaje de cambio es con respecto de la línea control. § Ningún gen pudo ser identificado.

### Efectos pleiotrópicos en los caracteres de tamaño corporal

En ocho de las 191 líneas analizadas, la inserción del elemento *P* afectó significativamente a tres o cuatro caracteres en ambos sexos. En todos estos casos, se identificó al menos un gen como posible blanco de la mutación: *inv*, *sd*, *dnt* y *CG13086*, *lamina ancestor* (*lama*), *CG11550* (aunque, en este caso, el elemento *P* está a 9,6 Kb del sitio de comienzo de la transcripción del gen), *LanA*, *CG14782* y *Lipid storage droplet-2* (*Lsd-2*; Tabla 2.3). Cuando todas las líneas fueron ordenadas de acuerdo con la magnitud del cambio para cada carácter y sexo por separado, estas ocho líneas estuvieron entre aquellas que exhibieron la mayor disminución (*inv*, *lama*, *dnt / CG13086*, *CG11550* y *Lsd-2*) o el mayor incremento (*sd*, *dnt / CG13086*, *LanA* y *CG14782*) en los valores de la mayoría de los caracteres estudiados.

Los principales resultados de los ANOVAs realizados para conocer la magnitud del efecto mutacional inducido por la inserción del elemento *P* en los caracteres morfológicos en aquellas líneas que resultaron ser las más pleiotrópicas (es decir, aquellas en las que se vieron afectados más caracteres, los cuatro en un sexo y tres en el otro) se muestran en la Tabla 2.6. En algunas líneas, la inserción del elemento *P* no tuvo un efecto homogéneo en el tamaño de los distintos caracteres ni entre sexos. Por ejemplo, la mutación de *lama* afectó a los caracteres de manera desigual, aumentando algunas partes y disminuyendo otras en los machos y disminuyendo todas en las hembras (Tablas 2.3 y 2.6). La inserción del elemento *P* que podría afectar a *CG11550* produjo un efecto fenotípico similar al mencionado antes (Tablas 2.3 y 2.6). La

inserción cercana a *Lsd-2* causó un efecto diferente ya que todos los caracteres disminuyeron de manera similar en ambos sexos (Tablas 2.3 y 2.6). Esta mutación provocó un decremento medio del tamaño de los distintos caracteres del 5,6%, lo que ubica a esta línea dentro de las 19 de tamaño corporal más pequeño. De manera similar, la inserción del elemento *P* en *inv* disminuyó el tamaño de todos los caracteres aunque el cambio fue significativamente mayor en las hembras que en los machos (Tablas 2.3 y 2.6). Esta mutación causó una disminución media del tamaño de los distintos caracteres del 9% en los machos y del 12% en las hembras (Tablas 2.3 y 2.6), lo que ubica a esta línea dentro de las 10 de tamaño corporal más pequeño.

Los principales resultados de los ANOVAs realizados para conocer la magnitud del efecto mutacional inducido por la inserción del elemento *P* en las líneas que mostraron diferencias significativas con respecto al control para todos los caracteres morfológicos en un sexo (seis en machos y tres en hembras) se muestran en la Tabla 2.7. La inserción del elemento *P* en *tropomodulin* (*tmod*; Tabla 2.3) es la única que aumentó el tamaño de todos los caracteres de manera similar en los machos (Tabla 2.7). Las mutaciones en las líneas BG01608 y BG01538, en las que no se pudo identificar ningún gen cerca de los sitios de inserción del elemento *P* (Tabla 2.3) y las mutaciones que afectan a *bifocal* (*bif*; Tabla 2.3), *longitudinals lacking* (*lola*; Tabla 2.3) y CG8062 (Tabla 2.3) aumentaron todos los caracteres analizados de manera desigual en los machos (Tabla 2.7). En las hembras, la mutación que afecta a *misshapen* (*msn*; Tabla 2.3) disminuyó el tamaño de todos los caracteres de la misma manera y las inserciones que afectaron a CG17836, *amn* y CG32529 (Tabla 2.3) causaron una disminución mayor en DO que en ningún otro carácter (Tabla 2.8). La mayoría de estas líneas de efecto sexo-específico estuvieron entre las líneas que mostraron el mayor aumento o disminución de tamaño en algún carácter y sexo. Particularmente, la inserción que afecta a CG32529 y *amn* causó una disminución media del 5% en los machos y del 7% en las hembras.

**Tabla 2.6:** Principales resultados de los ANOVAs realizados para conocer la magnitud del efecto mutacional inducido por la inserción del elemento *P* en los caracteres morfológicos en las líneas más pleiotrópicas (aquellas en las que se vieron afectados más caracteres). Cada ANOVA se realizó utilizando los valores transformados de las cuatro variables en cada línea por separado de acuerdo con un modelo con los factores fijos carácter y sexo. Se muestran el valor de *F* y su significancia para las fuentes de variación correspondientes a los distintos ANOVAs. Los valores medios corresponden al promedio de los valores transformados de cada carácter.

Línea	BG00846	BG02210	BG02239	BG02830
Gen candidato	<i>inv</i>	<i>lama</i>	<i>CG11550</i>	<i>Lsd-2</i>
<u>Fuente de variación</u>				
Carácter	18,07***	6,39***	3,13*	0,64
Sexo	17,57***	328,85***	225,02***	2,80
Carácter x Sexo	0,12	42,07***	32,37***	0,06
<u>Valor medio</u>				
<i>Machos</i>				
DO	-0,05 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	-0,06
AC	-0,10 <sup>b</sup>	0,04 <sup>ab</sup>	0,05 <sup>a</sup>	-0,05
LT	-0,12 <sup>b</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,10 <sup>a</sup>	-0,06
TA	-0,07 <sup>a</sup>	-0,05 <sup>c</sup>	-0,03 <sup>b</sup>	-0,04
<i>Hembras</i>				
DO	-0,09 <sup>a</sup>	-0,14 <sup>a</sup>	-0,07 <sup>a</sup>	-0,07
AC	-0,13 <sup>b</sup>	-0,10 <sup>a</sup>	-0,09 <sup>ab</sup>	-0,07
LT	-0,15 <sup>b</sup>	-0,13 <sup>a</sup>	-0,14 <sup>b</sup>	-0,07
TA	-0,10 <sup>a</sup>	-0,05 <sup>b</sup>	-0,02 <sup>ac</sup>	-0,05

Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los valores medios en cada sexo. DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Tabla 2.7:** Principales resultados de los ANOVAs realizados para conocer la magnitud del efecto mutacional inducido por la inserción del elemento *P* en las líneas que mostraron diferencias significativas con respecto al control para todos los caracteres morfológicos en un sexo. Cada ANOVA se realizó utilizando los valores transformados de las cuatro variables en cada línea por separado de acuerdo con un modelo con el factor fijo carácter. Se muestran el valor de *F* y su significancia para las fuentes de variación correspondientes a los distintos ANOVAs. Los valores medios corresponden al promedio de los valores transformados de cada carácter.

Línea (Gen candidato)	<i>F</i> (carácter)	Valor medio			
		DO	AC	LT	TA
<i>Machos</i>					
BG01538 §	9,86***	0,08 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>
BG01608 §	8,17***	0,09 <sup>a</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b</sup>
BG01637 ( <i>tmod</i> )	1,46	0,06	0,04	0,05	0,03
BG02056 ( <i>lola</i> )	3,17*	0,08 <sup>a</sup>	0,05 <sup>ab</sup>	0,05 <sup>ab</sup>	0,04 <sup>b</sup>
BG02241 ( <i>bif</i> )	13,55***	0,11 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b</sup>
BG02412 ( <i>CG8062</i> )	21,84***	0,10 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>
<i>Hembras</i>					
BG01011 ( <i>msn</i> )	0,61	-0,07	-0,07	-0,05	-0,08
BG01279 ( <i>CG17836</i> )	7,06***	-0,10 <sup>a</sup>	-0,04 <sup>b</sup>	-0,06 <sup>b</sup>	-0,06 <sup>b</sup>
BG02286 ( <i>amn/CG32529</i> )	4,72**	-0,11 <sup>a</sup>	-0,06 <sup>b</sup>	-0,06 <sup>b</sup>	-0,06 <sup>b</sup>

Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los valores medios en cada sexo. DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . § Ningún gen pudo ser identificado.

Es importante notar que sólo *inv*, *lama*, *CG11550* y *Lsd-2* parecen ser genes con efectos altamente pleiotrópicos en ambos sexos y, aún cuando las mutaciones que afectan a estos genes generalmente causaron una disminución del tamaño, no hay un patrón evidente en su efecto relativo en diferentes caracteres de tamaño corporal. Asimismo, es interesante notar que las mutaciones que afectaron a todos los caracteres en los machos causaron un aumento del tamaño en este sexo mientras que las inserciones que afectaron a todas las variables en las hembras produjeron una disminución del tamaño en este sexo. Este patrón ya fue mencionado anteriormente para todas las líneas. En estos casos de *alta pleiotropía sexo-específica*, DO fue el carácter que mostró los mayores cambios fenotípicos en ambos sexos. De hecho, este carácter presentó un aumento medio del 8,7% en los machos con respecto al control (los aumentos medios en AC, LT y TA fueron del 6,8%, 7,8% y 3,4% respectivamente) mientras que en las hembras DO disminuyó, en promedio, un 9,3% con respecto al control (las disminuciones medias en AC, LT y TA fueron del 5,6%, 5,8% y 6,2% respectivamente).



## Discusión

Se utilizaron líneas obtenidas por mutagénesis por inserción de elementos *P* (Lukacsovich *et al.*, 2001) para identificar genes candidatos involucrados en la determinación de cuatro caracteres de tamaño corporal: la distancia interocular (DO), el ancho de la cabeza (AC), el largo del tórax (LT) y el tamaño del ala (TA). El número de genes afectados por las mutaciones representa entre el 1 y el 1,5% de todos los genes del genoma de *Drosophila*. Sin embargo, se debe considerar que alrededor del 60% de las líneas mostró diferencias con respecto al control para algún carácter en un sexo y que cerca del 35% mostró tales diferencias para un sólo carácter en un sexo. Estos resultados reflejan la complejidad de la arquitectura genética de estos caracteres cuya expresión aparentemente involucra una gran proporción del genoma.

Una característica interesante de estos resultados es que, en promedio, los efectos de las inserciones del elemento *P* tendieron a disminuir el dimorfismo sexual en el tamaño corporal. De hecho, la mayoría de las mutaciones con efectos significativos aumentaron el tamaño en los machos y lo disminuyeron en las hembras. Los resultados indican que las mutaciones que redujeron las diferencias de tamaño entre los sexos estuvieron localizadas en los cromosomas autosómicos más frecuentemente que aquellas que afectaron a ambos sexos por igual o que aumentaron el dimorfismo sexual, las cuales se estuvieron predominantemente ligadas al X. Entre los 92 genes identificados, la mayoría está involucrada en el desarrollo y/o en procesos metabólicos y sus funciones moleculares incluyen principalmente las de unión a proteínas y a ácidos nucleicos. Aunque varios genes mostraron efectos pleiotrópicos en relación con el tamaño corporal, pocos estuvieron involucrados en la expresión de todos los caracteres en uno o ambos sexos. Estos genes parecen ser importantes para diferentes aspectos relacionados con el funcionamiento general del organismo. Algunos de estos genes que orquestan la expresión de casi todos los caracteres de tamaño corporal en uno o ambos sexos, también contribuyen a la expresión de otros caracteres importantes como el número de quetas abdominales y esternopleurales (Norga *et al.*, 2003), la resistencia a la inanición (Harbison *et al.*, 2004) y el comportamiento olfativo (Sambandan *et al.*, 2006; Tabla 2.3). En general, los resultados indican que la arquitectura genética de los caracteres de tamaño corporal involucra una gran fracción del genoma y es en gran medida carácter y sexo-específica.

### Análisis de correlación genética

Las correlaciones genéticas entre caracteres de tamaño corporal han sido bien documentadas en Diptera (por ejemplo, Barker & Krebs, 1995; Cowley & Atchley, 1988, 1990; David *et al.*, 2006a, b; De Moed *et al.*, 1997; Fernández Iriarte *et al.*, 2003; Loeschcke *et al.*, 1999;

Misra, 1966; Moreteau *et al.*, 2003; Norry *et al.*, 1997a, b, c, 2000; Partridge *et al.*, 1999; Rohlf & Sokal, 1972; Scheiner *et al.*, 1991; Sisodia & Singh, 2001; Wilkinson *et al.*, 1990). La mayoría de los estudios mostraron que las correlaciones positivas entre las mediciones de diferentes partes del cuerpo lo que indicaría que las tasas de proliferación y crecimiento celular de distintos discos imaginales son proporcionales durante el crecimiento larval. Esto, a su vez, permitiría explicar la existencia de ciertas restricciones que limitarían la divergencia del plan corporal fundamental de las moscas. Sin embargo, de acuerdo con los resultados de este experimento, el porcentaje de la varianza total explicado por las correlaciones entre los caracteres fue generalmente más bajo que lo informado previamente para *D. melanogaster* (por ejemplo, Cowley & Atchley, 1988, 1990; De Moed *et al.*, 1997; Scheiner *et al.*, 1991). Es más, los resultados comentados anteriormente no apoyan completamente la hipótesis de que caracteres derivados del mismo disco imaginal están mejor correlacionados entre sí que aquellos que provienen de precursores diferentes como fue discutido con anterioridad (Cowley & Atchley, 1990). Ciertamente, ni los caracteres derivados del disco alar (los caracteres de tórax y ala) ni los provenientes del disco óculo-antenal (los caracteres de la cabeza) mostraron coeficientes de correlación mayores entre ellos que con caracteres derivados de precursores embrionarios diferentes. Por ejemplo, DO y AC estuvieron mejor correlacionados con LT que entre ellos mismos y, aún cuando TA mostró una correlación significativa con LT, el coeficiente de correlación entre AC y LT fue mayor. Por lo tanto, estos resultados concuerdan mejor con un modelo de crecimiento autónomo para distintas partes del cuerpo, como el propuesto por Stern y Emlen (1999). Estos autores argumentaron que el crecimiento de diferentes estructuras podría estar parcialmente regulado por mecanismos que involucran un sistema centralizado para la traducción del tamaño corporal en una señal de crecimiento y/o por la comunicación entre tejidos imaginales y el resto del cuerpo. Sin embargo, si distintos órganos mostraran diferencias en la densidad de receptores para tal *señal de tamaño corporal*, esto llevaría a diferencias de *sensibilidad* entre órganos lo que podría conducir a alometrías órgano-específicas. Un mecanismo de esta índole explicaría la existencia de variación genética intrapoblacional así como el dimorfismo sexual (Stern & Emlen, 1999). En ese sentido, DO y TA fueron los únicos caracteres que estuvieron correlacionados positivamente entre sexos. Estos resultados sugieren la existencia de dimorfismo sexual en la arquitectura genética de algunos caracteres de tamaño corporal, lo que podría ser una característica común con otros caracteres como la resistencia a la inanición (Harbison *et al.*, 2004), el número de quetas abdominales y esternopleurales (Norga *et al.*, 2003) y el comportamiento olfativo (Anholt *et al.*, 2003; Sambandan *et al.*, 2006).

## Análisis genético-cuantitativo

Los análisis genético-cuantitativos revelaron la existencia de una importante variación genética para todos los caracteres de tamaño corporal estudiados, aunque en dos de ellos se encuentra enmascarada por fuertes interacciones entre la línea y el sexo. Los porcentajes de la varianza fenotípica total explicados por el genotipo (la línea) y la interacción entre el genotipo y el sexo (línea x sexo) en relación a cada carácter de tamaño corporal también revelaron aspectos importantes de la arquitectura genética de los caracteres morfológicos. Primero, dichos porcentajes (del 25% al 42%) sugieren que un número importante de genes contribuye a la expresión de estos caracteres. Es más, el efecto de estos genes depende del sexo ya que un porcentaje sustancial de la varianza fenotípica total fue explicado por la interacción entre la línea y el sexo (del 8% al 42%). Segundo, y quizás más sorprendente, el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por ambos componentes genéticos para cada uno de los distintos caracteres de tamaño corporal están entre los valores más bajos que se han registrado hasta el momento para otros caracteres cuantitativos estudiados utilizando el mismo grupo de líneas. Este valor conjunto fue del 81% para la resistencia a la inanición (Harbison *et al.*, 2004), del 64% para el tiempo de desarrollo (Mensch *et al.*, 2008), del 57% para el número de quetas esternopleurales (Norga *et al.*, 2003), del 56% para el número de quetas abdominales (Norga *et al.*, 2003) y del 31% para el comportamiento olfativo (Sambandan *et al.*, 2006). Sin embargo, se debe considerar que estos resultados se obtuvieron usando un fondo genético particular. Es más, los caracteres vinculados al tamaño corporal analizados tienen un cierto error de medición asociado el cual, en combinación con la varianza interindividual, podría reducir en gran medida la proporción de la varianza fenotípica explicada por los componentes genéticos.

A su vez, cuando se analizaron los sexos por separado, se observó que la mitad de las líneas mostró diferencias con respecto al control para un único carácter, lo que explica el bajo porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por la correlación entre distintos caracteres dentro de cada sexo. Excepto por siete líneas en las cuales la mutación afectó a los caracteres de tamaño corporal de manera similar en ambos sexos, la inserción del elemento *P* generalmente aumentó el tamaño de uno o más caracteres en los machos mientras que lo disminuyó en las hembras. Este efecto opuesto entre sexos, que reduce el dimorfismo sexual en caracteres vinculados al tamaño corporal, explica el bajo porcentaje de la varianza fenotípica total explicada por la correlación entre sexos para cada variable. Sin embargo, estos efectos opuestos entre sexos causados por las inserciones fueron significativos para los caracteres vinculados a la cabeza (DO y AC) y para LT pero no para TA. Estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis de que la arquitectura genética de distintos caracteres de tamaño corporal (al menos para DO, AC y LT) difiere entre machos y hembras y pueden reflejar limitaciones para la divergencia de

estos caracteres entre los sexos. Particularmente, la reducción del dimorfismo sexual como consecuencia de la mutagénesis por inserción de elementos *P* sugiere que el tamaño corporal podría estar sujeto a distintos tipos de selección en cada sexo lo cual, a su vez, podría explicar las diferencias existentes entre sexos en la naturaleza.

Estudios previos (Fisher, 1958; Lande 1980) relacionados con la evolución del dimorfismo sexual establecieron que, por defecto, los genes se expresarían en ambos sexos (es decir, los valores de los caracteres estarían correlacionados genéticamente). De esta manera, cuando machos y las hembras fueran seleccionados para diferentes valores de los caracteres, el movimiento en un sexo hacia su óptimo alejaría al otro sexo de su óptimo. En este caso, las mutaciones serían “sexualmente antagónicas” porque su efecto positivo en un sexo estaría asociado a un efecto negativo en el otro. El hecho de que en una población segreguen alelos sexualmente antagónicos, podría llevar a que se seleccionen variantes que lleven a la ruptura de la correlación genética entre sexos, por ejemplo, a través de modificadores (Rice, 1984). En ese sentido, Rice (1984) determinó que los genes codificando para caracteres sexualmente dimórficos deberían estar localizados desproporcionadamente en el cromosoma X. Sin embargo, estos datos indican que los genes que serían responsables del dimorfismo sexual (es decir, aquellos en los que la mutación redujo las diferencias de tamaño entre sexos) se distribuyeron desproporcionadamente en los cromosomas autosómicos respecto de aquellos que no afectarían al dimorfismo o lo reducirían (los genes en los que la mutación afectó a ambos sexos de forma similar o aumentó el dimorfismo sexual), los cuales estuvieron predominantemente ligados al cromosoma X ( $\chi^2_1=12,22$ ;  $p=0,0005$ ). Es interesante notar que la distribución de los genes que afectaron a los caracteres de tamaño corporal a lo largo del genoma no se apartó de la esperada por azar ( $\chi^2_2=0,05$ ;  $p=0,9753$ ). Este resultado aparentemente contradice estudios previos que informaron una contribución mayor del cromosoma X a la varianza genética asociada a caracteres vinculados al tamaño corporal en *D. melanogaster* (Cowley & Atchley, 1988; Kearsley & Kojima, 1967). Finalmente, los efectos sexo-específicos en los caracteres relacionados con el tamaño corporal podrían implicar la existencia de fuertes interacciones entre genes involucrados en la cascada genética responsable del sexo y muchos otros genes (genes directamente implicados en la morfogénesis y otro tipo de genes) distribuidos en todo el genoma. Esto, a su vez, sugiere que la arquitectura genética del dimorfismo sexual para caracteres de tamaño corporal es muy compleja e involucra interacciones entre distintas redes génicas.

### **Identificación y análisis funcional de genes**

El análisis funcional de los 92 genes candidatos reveló que la mitad de ellos están

involucrados en el desarrollo y/ó en procesos metabólicos. Es más, el análisis de ontología génica mostró que casi todos los productos de estos genes forman parte de la célula y que más de la mitad de ellos están unidos a la membrana de una organela. Finalmente, el 70% presenta actividad de unión a proteínas y más del 27% se une a ácidos nucleicos.

Ocho de los 92 genes candidatos afectan tres o cuatro caracteres vinculados al tamaño corporal en ambos sexos (*dnt*, *inv*, *LanA*, *lama*, *CG13086*, *sd*, *CG14782* y *Lsd-2*); al menos cuatro contribuyen a la expresión de todos los caracteres en los machos (*lola*, *tmod*, *bif* y *CG8062*) mientras que otros cuatro afectan la expresión de todos los caracteres en las hembras (*msn*, *CG17836*, *CG32529* y *amn*). Las mutaciones en cuatro de estos genes candidatos (*inv*, *Lsd-2*, *amn* y *CG32529*) resultó en la disminución de casi todos los caracteres de tamaño corporal en ambos sexos. En cambio, sólo se observó un aumento del tamaño en todos los caracteres cuando el gen mutado fue *sd*, tomando en cuenta los cambios fenotípicos causados por las dos inserciones independientes del elemento *P* en este gen (Tabla 2.3).

Aparentemente, hasta el momento de realizar este trabajo, no hubo registros relacionados con el efecto fenotípico de *dnt*, *CG13086*, *CG14782*, *CG8062*, *CG17836* y *CG32529* (Flybase, quinta publicación). Con respecto a *LanA*, *lama*, *bif*, *lola*, *tmod* y *msn*, la base de datos de Flybase (Flybase, quinta publicación) presenta una cantidad considerable de información; sin embargo, no hay referencias en relación con los efectos de estos genes en el tamaño de los órganos o del cuerpo. Algo similar ocurre en relación a otros genes tales como *inv*, el cual está cercanamente emparentado con *engrailed* (un gen de polaridad segmental; Coleman *et al.*, 1987) en cuanto a la posición en el genoma (de hecho, están uno a continuación del otro), la secuencia y el patrón de expresión. Sin embargo, hasta este estudio, no se habían registrado los efectos fenotípicos de este gen, al menos con respecto al tamaño corporal. *Lsd-2* es un gen vinculado al transporte de partículas lipídicas a lo largo de los microtúbulos y a la regulación de dicho transporte (Welte *et al.*, 2005) así como al secuestro de lípidos (Gronke *et al.*, 2003) y de triacilglicerol (Teixeira *et al.*, 2003). En general, los estudios del efecto de las mutaciones de pérdida o ganancia de función de *Lsd-2* han mostrado que este gen es esencial para el ajuste del nivel de almacenamiento de lípidos en el organismo. Sin embargo, como en los casos mencionados anteriormente, no se había vinculado las mutaciones de pérdida de función de *Lsd-2* con aspectos fenotípicos de la mosca adulta hasta ahora. Contrariamente, *amn*, que se encuentra contenido en el gen *CG32529*, ha sido vinculado a la regulación del tamaño corporal. Estudios recientes en *Drosophila* mostraron que la actividad del camino de señalización de la insulina en la glándula protorácica modula la liberación de ecdisona regulando tanto la duración como la tasa del crecimiento larvario (Caldwell *et al.*, 2005; Colombani *et al.*, 2005; Mirth *et al.*, 2005). En este contexto, cierta evidencia experimental planteó la posibilidad de que

un neuropéptido como el codificado por *amn* podría participar activamente regulando la síntesis de ecdisona (Caldwell *et al.*, 2005). De acuerdo con esta hipótesis, la mutación de *amn* podría llevar a la liberación prematura de ecdisona lo que conduciría al desarrollo de adultos pequeños. Los resultados aquí presentados están de acuerdo con esto ya que la mutación de *amn* causó una reducción significativa de los caracteres de tamaño corporal. Finalmente, *sd* ha sido relacionado mayormente a la morfogénesis del ala derivada del disco imaginal de ala (Curtiss *et al.*, 2002; Dworkin & Gibson, 2006). Los mutantes viables de *sd* exhiben defectos que pueden incluir la falta de zonas del margen alar y la formación ectópica de quetas en el ala (Campbell *et al.*, 1991). Sin embargo, esta es la primera vez que se relaciona a este gen con la regulación del tamaño de otras estructuras además de las alas. Pero, contrariamente a los casos mencionados anteriormente, la mutación de *sd* aumentó el tamaño de los caracteres estudiados. Es más, este gen tiene efectos pleiotrópicos importantes ya que el hecho de que su mutación haya afectado a todos los caracteres vinculados al tamaño corporal proviene de considerar el efecto fenotípico correspondiente cada una de las dos mutaciones independientes de este gen. Aparentemente, la inserción en diferentes sitios del gen afectó a los caracteres de tamaño corporal de distinta manera, sugiriendo que la ubicación exacta del transposón determina el efecto fenotípico, tal y como fue observado para otros caracteres (Rollamnn *et al.*, 2006).

Por lo tanto, aun cuando estos genes pleiotrópicos aparentemente juegan un rol en la determinación del tamaño corporal, parece que raramente han sido asociados a la morfogénesis. La Tabla 2.8 muestra los términos de ontología génica correspondientes a las categorías *Proceso biológico* y *Función molecular* relacionados a estos genes que mostraron los efectos más pleiotrópicos en ambos sexos. Esta información sugiere que estos genes son importantes para distintos aspectos relacionados con el funcionamiento general del organismo. Esto, a su vez, implica que la mutación de estos genes podría causar un efecto adverso general en el crecimiento. Sin embargo, este efecto no fue observado en el caso de las mutaciones de *sd*. De acuerdo con esta idea, las inserciones del elemento *P* que afectaron a *inv*, *Lsd-2* y *amn* causaron un aumento del tiempo de desarrollo entre el huevo y el adulto pero este carácter no sufrió modificaciones cuando el gen mutado fue *sd* (Mensch *et al.*, 2008).

**Tabla 2.8:** Términos de ontología génica correspondientes a las categorías *Proceso biológico* y *Función molecular* relacionados a los genes que mostraron los efectos más pleiotrópicos en los caracteres de tamaño corporal en ambos sexos. Este análisis fue realizado automáticamente utilizando el programa FatiGO+.

	<i>Inv</i>	<i>Lsd-2</i>	<i>amn</i>	<i>sd</i>
Función molecular	Unión a ADN específica de secuencia	Unión a proteína Actividad transportadora de lípidos	Actividad de hormona neuropeptídica	Unión a ion de zinc
Proceso biológico	Desarrollo de órgano Regulación de proceso metabólico celular Proceso metabólico de ARN Transcripción Regionalización	Secuestro de lípidos Transporte de lípidos Establecimiento de localización celular Organización del citoesqueleto y biogénesis	Receptor de superficie celular ligado a transducción de señales Cascada de señalización intracelular Proceso metabólico de nucleótido Comportamiento olfatorio Memoria Respuesta a etanol Regulación de la contracción cardíaca Aprendizaje Comportamiento de apareamiento	Desarrollo de órgano Regulación de proceso metabólico celular Proceso metabólico de ARN Transcripción Desarrollo en estadio larvario y pupal Metamorfosis Morfogénesis de apéndices Desarrollo de apéndices derivados de discos imaginales

En términos generales, estos resultados apoyan la idea de que la arquitectura genética del tamaño corporal es compleja y que está constituida por distintos genes que contribuyen a la expresión de diferentes caracteres morfológicos de manera sexo-específica. Particularmente, su base genética, que es en gran medida poligénica, está compuesta por genes relacionados con el desarrollo del organismo y sus funciones metabólicas así como por genes asociados a funciones más específicas vinculadas a la expresión de los distintos caracteres de tamaño corporal. Otros estudios que analicen la/s etapa/s del desarrollo y/o el/los lugar/es del cuerpo en los que se expresan estos genes candidatos ayudarían a dilucidar la relevancia de los mismos en la regulación del tamaño de distintas estructuras corporales.



---

## **Capítulo III**

### Identificación y caracterización de genes asociados a la conformación del ala en *D. melanogaster*.

---

#### **Resumen**

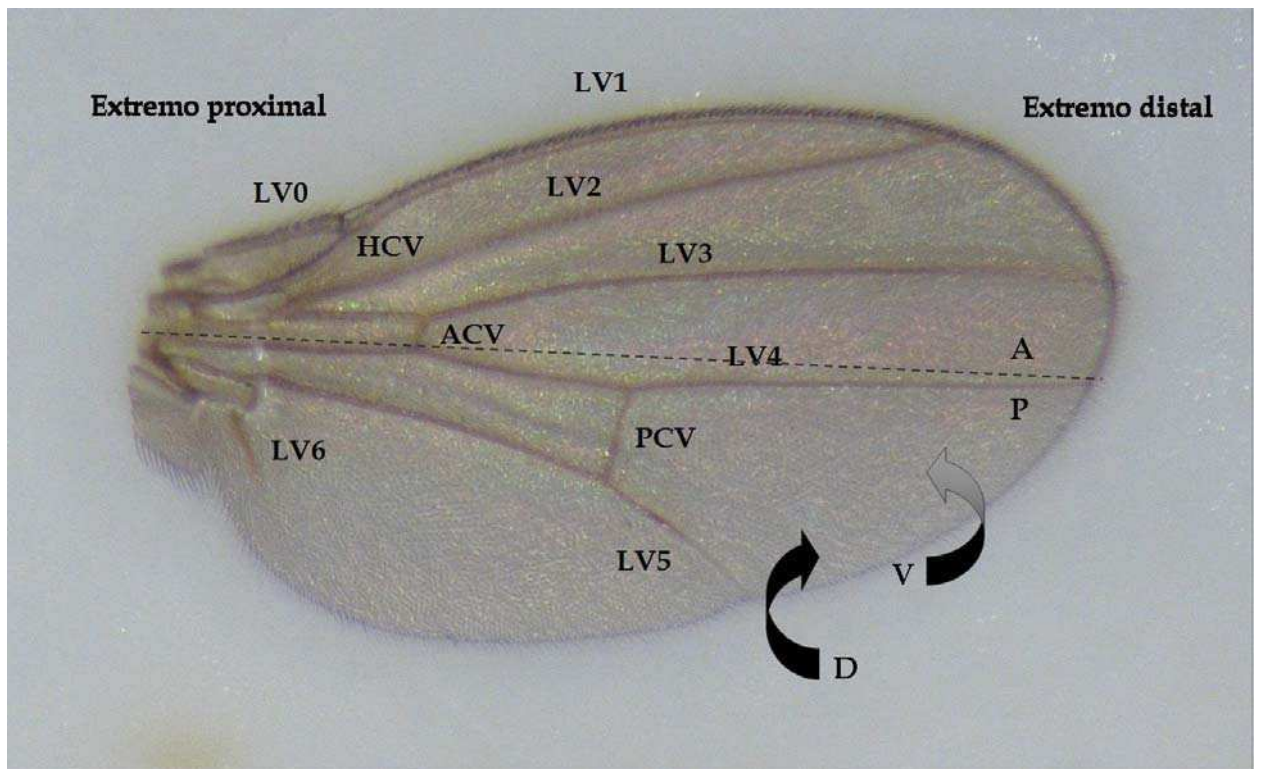
A pesar de que se conoce bastante acerca del rol de distintos genes en relación al desarrollo del ala, existe poca información con respecto a la variación genética vinculada a la forma del ala. De esta manera, se analizaron las 191 líneas BDGP empleadas en el Capítulo 2, de forma tal de determinar el efecto de las mutaciones en la conformación del ala. Más del 63% de las líneas analizadas mostró diferencias significativas con respecto al control, al menos en un sexo; lo cual está de acuerdo con estimaciones previas. Sin embargo, sólo el 33% de las líneas mostró dichas diferencias en ambos sexos simultáneamente. Entre los 98 genes identificados, la mayoría está involucrada en el desarrollo y/o en procesos metabólicos y sus funciones moleculares incluyen principalmente las de unión a proteínas y a ácidos nucleicos. Sin embargo, 76 de ellos no han sido relacionados previamente con el desarrollo del ala ni con su conformación. Se identificaron 16 genes como los responsables de los cambios más extremos, de los cuales 13 no habían sido vinculados al carácter analizado (*ade5*, *CG12418*, *CG12717*, *CG32038*, *CG32685*, *CG6175*, *CG6540*, *Crc*, *dally*, *Fas3*, *inx7*, *Karl* y *l(3)82Fd*). A diferencia de estos últimos genes, existe abundante información relacionando a *jing*, *LanA* y *sd* con modificaciones del ala. Si bien la mayoría de las mutaciones afectaron diferencialmente a machos y a hembras, las mutaciones que afectaron a *CG6175* y a *sd* causaron las mayores modificaciones en la conformación del ala en ambos sexos simultáneamente. Las mutaciones afectaron mayormente a todos los puntos homólogos considerados en el análisis y, si bien en algunos casos se registró un desplazamiento mayor de algunos puntos en relación a los demás, las diferentes mutaciones causaron distintos cambios generalmente pequeños. Estos resultados muestran que la variación conformacional presenta, simultáneamente, un alto grado de integración a través del ala y cierta especificidad local, lo cual podría ser un resultado natural de la compleja sucesión de eventos que ocurren durante el desarrollo de este órgano. En general, los resultados indican que la arquitectura genética de la conformación del ala es compleja y está constituida por muchos genes que contribuyen a su expresión principalmente de manera sexo-específica.

## Introducción

El ala *Drosophila melanogaster* es una estructura ectodérmica formada por dos láminas epiteliales opuestas, la dorsal y la ventral, cada una de las cuales secreta un exoesqueleto cuticular. Las venas del ala son tubos reforzados que sirven como soporte estructural para las tráqueas, los nervios y la hemolinfa. Las células de las venas secretan una cutícula pigmentada más gruesa y más densamente empaquetada que la de las células de las regiones intervenosas las cuales, a su vez, se pierden poco después de que la mosca emerge del pupario (Kiger *et al.*, 2007).

La disposición de las venas está muy conservada en la familia Drosophilidae pero, a lo largo de los años, se han aislado mutaciones que afectan a su formación (para revisiones del tema ver, por ejemplo, Bier, 2000; de Celis & Diaz-Benjumea, 2003; García-Bellido y de Celis, 1992). Gran parte de los genes implicados codifican componentes de rutas metabólicas intercelulares ampliamente utilizadas. Al menos cinco caminos de señalización contribuyen al posicionamiento y al mantenimiento de las venas y de las regiones entre ellas: el de Hedhehog (Hh), el de la “proteína morfogenética del hueso” (BMP), el del receptor del factor de crecimiento epidérmico de *Drosophila* (Egfr), el mediado por la señalización de Wingless (Wg) y el de Notch mediado por sus ligandos Delta y Serrate (para una revisión reciente del tema ver Blair, 2007).

*Drosophila* presenta cinco venas longitudinales principales o LVs (por su sigla en inglés: *Longitudinal Veins*; L1 a L5), que corren en forma próximo-distal; dos venas longitudinales más pequeñas (L0 y L6), dos venas transversales o CVs (por su sigla en inglés: *Cross Veins*) que unen L3 con L4 y L4 con L5 respectivamente (ACV y PCV, por sus siglas en inglés: *Anterior Cross Vein* y *Posterior Cross Vein*, respectivamente) y la humeral o HCV (por su sigla en inglés: *Humeral Cross Vein*), que une el margen anterior con L0 (Figura 3.1). El ala ancestral aparentemente contenía otras venas que se perdieron o fusionaron de forma tal de formar el patrón visto en este género. Debido a esto, se supone que el ancestro poseía mecanismos que especificaban venas adicionales (para una revisión del tema ver de Celis & Díaz-Benjumea, 2003). Es posible que *Drosophila* retenga parte de esta información ya que algunas moscas mutantes muestran patrones de venación similares al ancestral (Biehs *et al.*, 1998; Palsson & Gibson, 2000).



**Figura 3.1:** Fotografía del ala de *Drosophila* mostrando la ubicación de las distintas venas y los nombres más utilizados para denominarlas. LV: vena longitudinal (L0 a L6), ACV: vena transversal anterior, PCV: vena transversal posterior, HCV: vena transversal humeral. La línea punteada separa la parte anterior del ala (A) de la posterior (P). La superficie del ala que se muestra es la dorsal (D) y la que no se observa (la cara opuesta) es la ventral (V). Además se indican los extremos del eje próximo-distal.

### El disco del ala y el desarrollo temprano de las venas

El primordio del disco imaginal del ala se forma a partir de un grupo de 20-30 células que se invaginan desde el epitelio durante el desarrollo embrionario (Cohen *et al.*, 1991). En el transcurso de los tres estadios larvales, las células se dividen formando un disco de alrededor de 50000 células. El disco maduro de la última parte del tercer estadio es un saco aplanado con dos superficies distintas: la membrana peripodial más delgada y el epitelio del disco que es más grueso y está plegado. Este epitelio es el que formará la mayor parte del ala. Durante el desarrollo pupal, dicho epitelio se evierte alargándose y doblándose sobre si mismo para formar el epitelio dorsal y ventral del ala (ver, por ejemplo, Blair, 2007). Morfológicamente, las venas aparecen dos veces; primero como provenas y luego como venas maduras (ver, por ejemplo, Fristrom *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 1995). El disco del ala se divide tempranamente en el desarrollo por dos límites que separan linajes celulares diferentes, uno antero-posterior (A-P) y otro dorso-ventral (D-V; Figura 3.1; por ejemplo, Blair, 2003; Irvine & Rauskolb, 2001). Las señales producidas por las células de los compartimientos y las de los límites juegan un rol muy importante en el posicionamiento de las venas (para una revisión reciente del tema ver Blair, 2007).

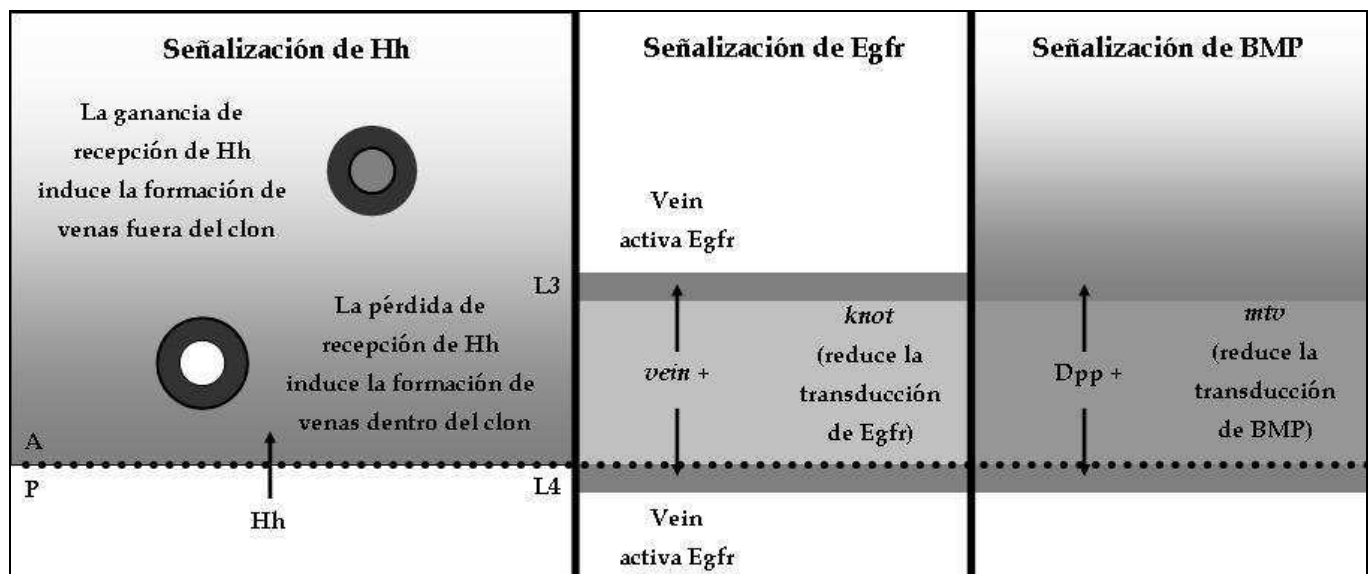
El desarrollo temprano de las provenas longitudinales depende en gran medida de la señalización de Egfr ya que las células que las conforman expresan varios receptores de su señal como *rhomboid*, *Star* y *argos* (por ejemplo, Guichard *et al.*, 1999; Schweitzer *et al.*, 1995; Sturtevant & Bier, 1995). Asimismo, esta señalización suprime la expresión de *blistered* únicamente en las provenas (por ejemplo, Montagne *et al.*, 1996). Egfr puede actuar a través de los ligandos Spitz y Keren y de la regulación de los mismos vía Rhomboid y Star (por ejemplo, Reich & Shilo 2002). Vein es otra fuente posible de señalización de Egfr que no precisa ser activada por Rhomboid y Star (Schnepp *et al.*, 1996). Al mismo tiempo, la señalización de BMP puede posicionar la expresión de genes específicos en las LVs (Tanimoto *et al.*, 2000). Aunque habitualmente se piensa que estos genes actúan estimulando la expresión de *rhomboid* y *Star*, es posible que provean de información independiente de la señalización de Egfr (Blair, 2007). Finalmente, la señalización de BMP precede la de Egfr durante la aparición de las CVs en estadios pupales tardíos (Blair, 2007).

### **El posicionamiento de las venas longitudinales**

La separación temprana del disco en los compartimientos anterior y posterior se debe a la expresión de los factores de transcripción Engrailed (En) e Invested (Inv) en la región posterior (Blair, 2003; Irvine & Rauskolb, 2001). El compartimiento posterior expresa el morfogen Hh cuya señalización es recibida sólo en el lado anterior debido a la expresión del factor de transcripción Cubitus interruptus (Ci) de ese lado del límite (por ejemplo, Sanicola *et al.*, 1995). La respuesta incluye la expresión de *Decapentaplegic (Dpp)* que aparentemente aumenta la actividad de *Glass bottom boat (Gbb)*, que se expresa uniformemente en el ala (Bangi & Wharton, 2006a, b). Dpp y Gbb generan gradientes de señalización de BMP centrados en el límite A-P lo que les permite regular la expresión de genes que especifican dominios a lo largo de este eje (Tanimoto *et al.*, 2000).

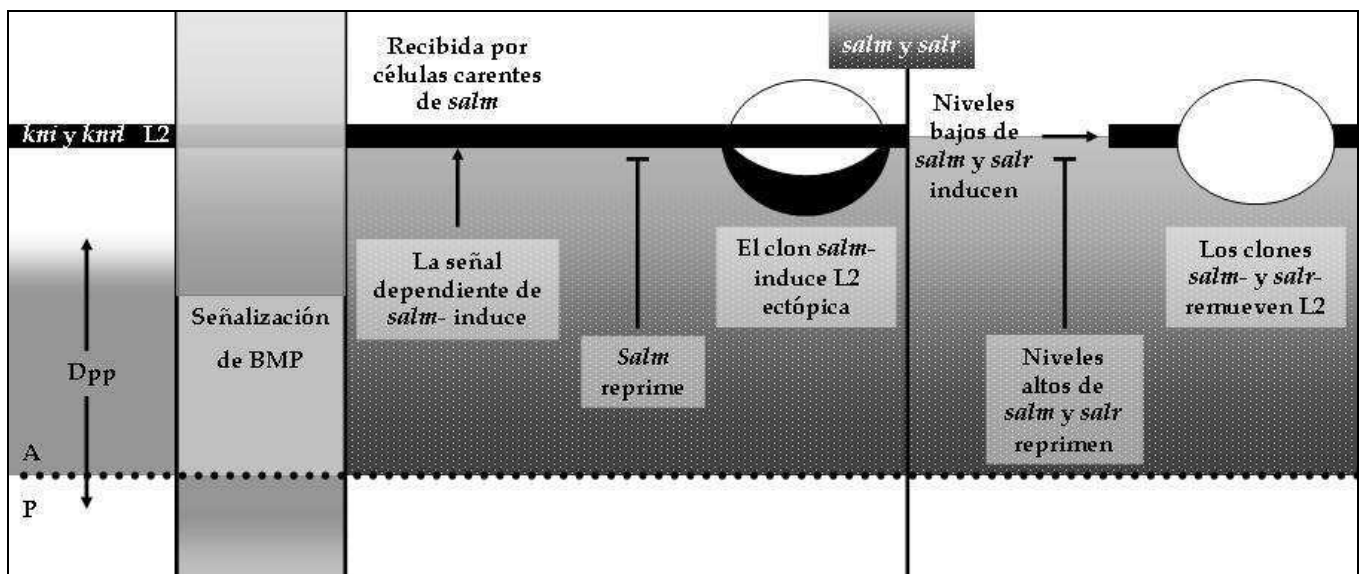
Las provenas L3 y L4 se forman en la parte anterior y posterior del límite A-P respectivamente, según la recepción de Hh: el aumento de la señal incrementa la distancia entre las provenas mientras que su pérdida la disminuye (Biehs *et al.*, 1998). Los niveles altos de Hh inducen a las células de las regiones intervenosas a producir una señal que le indica a las células adyacentes que formen las provenas (Chen & Struhl, 1996; Figura 3.2). Vein es al menos un elemento de la señal dependiente de Hh que se expresa en la región entre L3 y L4 (Martin-Blanco *et al.*, 1999; Figura 3.2). Inicialmente los blancos de Egfr se expresan en esa región y, hacia el final del tercer estadio larval, sólo en la zona central debido a la presencia de Knot en la región, cuya expresión también fue inducida por la señalización de Hh, y es necesario y suficiente para suprimir la formación de venas (Guichard *et al.*, 1999; Molher *et al.*, 2000;

Wessells *et al.*, 1999). La expresión del represor de Egfr *kekkon 1* también es elevada en esta región, aunque su remoción no afecta al desarrollo de las venas por lo que su acción debe ser redundante (Wessells *et al.*, 1999). Asimismo, la señalización de BMP podría actuar de manera redundante con Vein. Los niveles de esta señalización en la región entre L3 y L4 es disminuida por la señalización de Hh que induce la expresión de Master of Thickveins (Mtv) en esa zona que, a su vez, reprime la expresión del receptor Thickveins (Tkv; Funakoshi *et al.*, 2001). El rol de Dpp en la inducción de L3 y L4 no está claro pero parecería no ser indispensable siempre que se exprese *vein* (Bangi & Wharton, 2006a; Chen & Struhl, 1996). La señalización de Hh también podría jugar un rol directo en la determinación de la identidad de L3 ya que la provena L3 recibe una pequeña cantidad de dicha señal mientras que L4 no recibe nada (Mullor & Guerrero, 2000). Este efecto podría estar mediado por la acción de uno de los tres factores de transcripción del Complejo Iroquois (Iro-C) que normalmente se observan en la provena L3 y cuya ausencia allí induce características similares a las de L4 (Gomez-Skarmeta *et al.*, 1996).



**Figura 3.2:** El rol de la señalización de Hedgehog (Hh), del factor de crecimiento epidérmico (Egfr) y de la familia de la proteína morfogénica del hueso (BMP) en el posicionamiento de L3 y L4 en los discos imaginales del ala del tercer estadio larval. Panel izquierdo: La señalización de Hh pasa desde el lado posterior (P) del límite antero-posterior (•••) a las células del lado anterior (A) de dicho límite, entre L3 y L4. Se forman venas ectópicas dentro de los clones que carecen de recepción de Hh o fuera de aquellos que ganan tal recepción. Panel central: La expresión del ligando de Egfr codificado por *vein* es inducida en A por la señalización de Hh la cual también induce la expresión del factor de transcripción codificado por *knot* en esta región el que reprime la recepción de Egfr. Entonces, la señalización de Vein es recibida en las células que poseen poca recepción de Hh, induciendo L3 en A y L4 en P. Panel derecho: La expresión de la proteína BMP Decapentaplegic (Dpp) es inducida en A por la señalización de Hh la cual también induce la expresión del factor de transcripción codificado por *master of thickveins* (*mtv*) en esta región el que reduce la transducción de BMP. Por lo tanto, la señalización de Dpp es más fuerte en las células que poseen poca recepción de Hh, promoviendo también la formación de L3 en A y L4 en P. Figura modificada de Blair (2007).

La reducción de la señalización de Dpp disminuye la distancia entre L2 y L5 sin afectar la existente entre L3 y L4 (Segal & Gelbart, 1985). Esto podría deberse a que Dpp induce la expresión de los factores de transcripción Spalt mayor (Salm) y Spalt-related (Salr) alrededor del límite A-P lo que de alguna manera induciría la expresión de los factores de transcripción Knirps (Kni) y Knirps-like (Knrl) a lo largo de la provena L2 (de Celis & Barrio, 2000; Figura 3.3). Aparentemente, esto activaría la señalización de Egrf a lo largo de L2 estimulando la expresión de *rhomboid*. La provena L5 se forma en el límite posterior del dominio de expresión de *salm/salr* (de Celis & Barrio, 2000) y requiere de la expresión del factor de transcripción Optomotor blind (Omb) que se expresa en respuesta a bajos niveles de señalización de BMP (Cook *et al.*, 2004). Sin embargo, la situación podría ser más complicada dado que Dpp reprime a *brinker* que a su vez reprime a blancos como *salm* y *omb* (Minami *et al.*, 1999). Asimismo, la provena L5 del final del tercer estadio expresa altos niveles de Iro-C y Abrupt, ambos necesarios para su desarrollo (Cook *et al.*, 2004; Gomez-Skarmeta *et al.*, 1996; Guichard *et al.*, 1999).

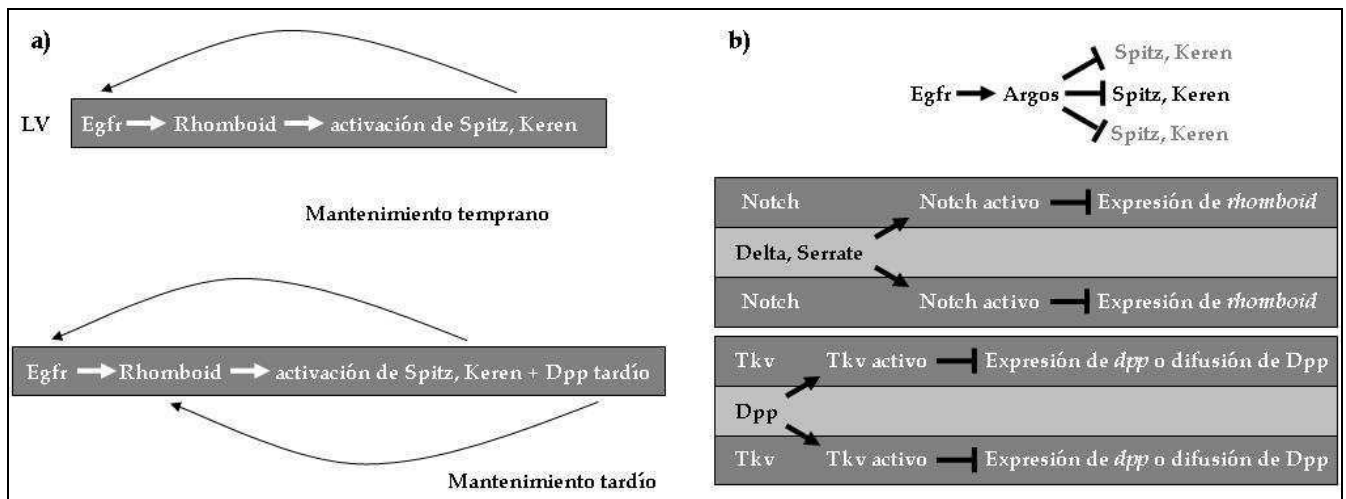


**Figura 3.3:** El posicionamiento de L2 debido a la señalización de BMP. Dpp se expresa en el lado anterior (A) del límite antero-posterior (•••) induciendo el gradiente de señalización de BMP y una región que expresa los factores de transcripción codificados por *spalt major* (*salm*) y *spalt-related* (*salr*). Se muestran dos modelos alternativos para la acción de *salm* y *salr*. En el modelo mostrado a la izquierda, las células que expresan *salm* no pueden formar L2 y producen una señal desconocida que induce la formación de L2 en las células adyacentes que no expresan *salm*. Entonces, L2 se forma anteriormente con respecto a la región en la que se expresa *salm* y se forma una L2 ectópica dentro de un clon que carece de *salm*. En el modelo de la derecha, las células que expresan altos niveles de *salm* y *salr* no pueden formar L2 pero las células anteriores al límite de expresión, que tiene bajos niveles de *salm* y *salr*, sí forman L2. Entonces, las células normales y los clones mutantes que carecen de la expresión de *salm* y de *salr*, no pueden formar L2. Una vez que ha sido especificada, L2 expresa los factores de transcripción codificados por *knirps* (*kni*) y *knirps-like* (*knrl*). Figura modificada de Blair (2007).

## El mantenimiento y refinamiento de las venas

Luego de que las provenas se han posicionado, existe un periodo prolongado en el que estas se mantienen y refinan a fin de formar las venas adultas. Las provenas se forman en ambas superficies, la dorsal y la ventral y, cuando ambas se juntan, existe una transferencia de señales de una a otra resultando en una unión adecuada (Blair, 2007). La señalización de *Egfr* es necesaria y suficiente para lograr el desarrollo de las venas desde la mitad del tercer estadio hasta el primer día de la pupa (Guichard *et al.*, 1999; Sturtevant & Bier, 1995). Aparentemente, *rhomboid* y *Star* estimulan la señalización de Spitz y Keren en las venas, quizás con una señalización adicional de *Egfr* a través de *Vein* en las células intervenosas que, a su vez, continúan reprimiendo la expresión de *blistered* (Sturtevant & Bier, 1995; Figura 3.4a). *Ventral veinless* es otro factor de transcripción que se expresa en las venas y es necesario para su desarrollo en etapas más tardías de la pupa (de Celis *et al.*, 1995). Por lo tanto, la elección entre venas y regiones intravenosas puede realizarse de manera tardía en el desarrollo y depende críticamente de la expresión de genes de ambas zonas (Blair, 2007).

La expresión de *Dpp*, inicialmente limitada a la región anterior al límite A-P, aumenta a lo largo de las venas en los primeros estadios pupales (de Celis, 1997; Ralston & Blair, 2005) lo que sería necesario, al menos, para mantener el desarrollo de la parte distal de las mismas (Bangi & Wharton, 2006a, b; Ray & Wharton, 2001; Figura 3.4a). *Dpp* y *Gbb* actúan a través de los receptores *Saxophone* (*Sax*) y *Tkv* pero, aparentemente, sólo *Tkv* es absolutamente necesario para el desarrollo continuado del tejido de las venas (Bangi & Wharton, 2006b; de Celis, 1997; Ray & Wharton, 2001). En la segunda mitad del tercer estadio larval, *Argos* se expresa en las provenas, aparentemente en respuesta a la señalización de *Egfr* (Martin-Blanco *et al.*, 1999; Figura 3.4b). *Argos* reduce la actividad de *Egfr* uniéndose a Spitz (Schweitzer *et al.*, 1995; Figura 3.4b). Durante los estadios larvales y pupales, la expresión de los ligandos de Notch, *Delta* y *Serrate*, es mayor en las provenas debido a la señalización de *Egfr*; mientras que *Notch* y sus blancos se expresan más en las células lindantes (de Celis *et al.*, 1997; Figura 3.4b). La expresión de *Delta* y *Notch* allí sería necesaria para que el refinamiento de las venas ocurra correctamente (Crozatier *et al.*, 2003; de Celis *et al.*, 1997; Sturtevant & Bier, 1995). *Notch* también controla la expresión de *Knot* y, de esta manera, la distancia entre L3 y L4 (Crozatier *et al.*, 2003). Finalmente, durante los estadios pupales tardíos, la expresión de *tkv* se reduce en las venas debido a la señalización de BMP y se incrementa en sus límites (Figura 3.4b). Según de Celis (1997), esta señalización reprimiría la expresión de *dpp* lo que contribuiría a refinar las venas.



**Figura 3.4:** a) Mantenimiento temprano de las provenas debida a la señalización de Egfr mediada por Rhomboid y mantenimiento tardío debido a la señalización de Egfr y a la de BMP mediada por Dpp. b) Refinamiento de las provenas por (arriba) Argos, una proteína que se expresa a lo largo de las venas y se une a los ligandos de Egfr inhibiendo su señalización; (medio) Señalización de Notch, mediada por sus ligandos Delta y Serrate, que se expresan a lo largo de las venas, y por Notch en las células lindantes con las venas; (abajo) Thickveins (Tkv), el receptor BMP que se expresa mayormente en las células lindantes a las venas. LV: vena longitudinal. Figura modificada de Blair (2007).

### Algunos casos especiales

El desarrollo de ACV y PCV comparte muchas características con el de las LVs aunque también presenta rasgos distintivos debido a que las CVs deben posicionarse correctamente a lo largo de ambos ejes, el proximo-distal y el antero-posterior. El desarrollo inicial de PCV requiere de la señalización de BMP pero no de Egfr (Ralston & Blair, 2005). Esta señalización comienza en un momento en el que *Dpp* se expresa en las LVs y *Gbb* se expresa globalmente (Ralston & Blair, 2005; Ray & Wharton, 2001). El movimiento de Dpp y Gbb hacia la región en cuestión requeriría del transporte mediante un complejo de dos moléculas extracelulares: Short gastrulation (Sog) y Crossveinless (Serpe *et al.*, 2005). Dpp y Gbb serían liberadas del complejo por la proteasa Tolloid-related (Trl; Serpe *et al.*, 2005). Finalmente, al comienzo del tercer estadio, *wg* se expresa en una franja angosta alrededor del límite D-V debido a la señalización recíproca entre compartimientos de Notch (Irvine & Rauskolb, 2001). Hacia el final de este estadio, Rhomboid, Argos y los ligandos de Notch se disponen en dos franjas adyacentes (Micchelli *et al.*, 1997). *wg* también se expresa a lo largo del margen del ala y puede inducir el desarrollo de la región vecina en la zona distal (Irving & Rauskolb, 2001).

Por último, se debe considerar que la actividad de MAPK (por su sigla en inglés: *Mitogen Activated Protein Kinase*) mediada por Egfr puede regular la formación de las venas así como la división y el crecimiento celular (Diaz-Benjumea & Garcia-Bellido, 1990; Diaz-Benjumea & Hafen, 1994). Estudios recientes sugieren que estos efectos estarían mediados por la forma citoplasmática y nuclear respectivamente (Marenda *et al.*, 2006). Neuralized (Neur), que se



expresa en las venas, se une a Delta y a Serrate para colaborar con su internalización, necesaria para activar a Notch (Lai *et al.*, 2001; Pavlopoulos *et al.*, 2001). En las provenas, la regulación del tráfico de ambos se ve afectado por Mib-1 (por su sigla en inglés: *Drosophila Mind bomb 1*) cuya pérdida hace que se ensanchen las venas (Le Borgne *et al.*, 2005). Aparentemente, Notch se encuentra en la membrana como un dímero intramolecular que consiste en un fragmento extracelular, que es creado por un clivaje debido a Furin y se une de manera no covalente al otro fragmento que está unido a la membrana. La unión de este dímero al ligando conduciría a dos clivajes, el primero mediado por la proteasa ADAM y el segundo por la  $\gamma$ -secretasa que liberaría el dominio intracelular para su translocación dentro del núcleo (Le Borgne, 2006). Parks (2000) hipotetizó que la endocitosis de Delta ayudaría realizar esta separación, la cual sería necesaria para convertir el fragmento unido a la membrana en un sustrato activo para ser clivado por ADAM (Nichols *et al.*, 2007).

### **Estudios acerca de la forma del ala de *Drosophila***

Tradicionalmente, se ha utilizado el posicionamiento de las venas del ala para realizar estimaciones de la forma (del tamaño y/o de la conformación) de este órgano. A pesar de que se conoce bastante acerca del rol de los genes mencionados en relación al desarrollo del ala; existe poca información con respecto a la variación genética vinculada a la forma del ala. Con respecto a *D. melanogaster*, algunos trabajos han demostrado que este carácter complejo posee una heredabilidad entre moderada y alta (Birdsall *et al.*, 2000; Gilchrist & Partridge, 2001; Mezey & Houle, 2005; Palsson & Gibson, 2004; Weber, 1990). Asimismo, distintos estudios demostraron que la base genética responsable de la variación asociada a la forma del ala en esta especie está constituida por numerosos factores de efecto principalmente pequeño y aditivo (Birdsall *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2005; Weber, 1990; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2008; Zimmerman *et al.*, 2000). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Mezey y Houle (2005) quienes estimaron que el número de dimensiones del ala en las que existe varianza genética aditiva es igual o mayor a 20 lo que implica que la cantidad de genes de efecto aditivo debería ser 20 como mínimo. Sin embargo, los alelos naturales comunes pueden ser diferentes de las mutaciones nuevas y puede que no representen loci cuya variación pueda contribuir a grandes cambios evolutivos (Weber *et al.*, 2005). Según Weber y colaboradores (2005), el estudio de los efectos fenotípicos de nuevas mutaciones debería completar el panorama existente acerca de la base genética de la conformación del ala y su potencial para evolucionar. Partiendo de esta premisa, mostraron que 11 de las 50 líneas isogénicas analizadas, cada una de las cuales portaba un elemento *P* en un lugar distinto, presentaron efectos significativos para la forma del ala (Weber *et al.*, 2005). El análisis de los genes candidatos involucrados mostró que los mismos están

implicados en procesos del desarrollo y fisiológicos variados (Weber *et al.*, 2005). A pesar de que el método utilizado (cuatro medidas univariadas de alometría) tiende a subestimar la variación fenotípica del ala, estos resultados están de acuerdo con la existencia de un blanco mutacional amplio para la conformación del ala. Posteriormente, Dworkin y Gibson (2006) investigaron el rol potencial de genes pertenecientes a caminos de señalización vinculados a la conformación del ala en *D. melanogaster*. Con ese objetivo, utilizaron 50 líneas en las que el elemento *P* afecta a genes de interés pero considerando dos fondos isogénicos distintos (Dworkin & Gibson, 2006). De esta manera, estudiaron la forma del ala en individuos heterocigotas para cada mutación comparativamente con sus congéneres salvajes, utilizando técnicas derivadas de la morfometría geométrica (Dworkin & Gibson, 2006). Sus resultados mostraron que la mayoría de las mutaciones tienen efectos profundos en la conformación pero no en el tamaño del ala cuando son estudiadas en estado heterocigota (Dworkin & Gibson, 2006). Asimismo, su estudio mostró que el fondo genético juega un rol importante en la determinación de la forma del ala (Dworkin & Gibson, 2006). Por último, estos autores demostraron que los efectos de las mutaciones no se agrupan de acuerdo a la pertenencia de los genes a uno u otro camino de señalización lo cual está de acuerdo con la existencia de interacciones entre rutas metabólicas (Blair, 2007; Dworkin & Gibson, 2006).

Esta parte de la tesis tiene como objetivo realizar un análisis genómico funcional en *D. melanogaster* con el fin de caracterizar parte de la arquitectura genética de la conformación del ala. En particular, se identificaron loci que contribuyen a la expresión de este carácter complejo y se realizó un análisis genómico-funcional de los mismos. Asimismo, se estudió el efecto de dichos genes en ambos sexos lo que permitió conocer la existencia de efectos dependientes del sexo. Por último, se realizó un análisis comparativo entre estos resultados y los derivados del análisis del tamaño del ala (Capítulo 2) de forma tal de determinar si ambos caracteres comparten la misma la arquitectura genética.

## **Materiales y métodos**

### ***Stocks de Drosophila***

Las mismas 191 líneas BDGP mencionadas en el Capítulo 2, utilizadas para estudiar las bases genéticas de caracteres vinculados al tamaño corporal, fueron empleadas en otros análisis destinados a identificar genes candidatos a integrar la base genética de la conformación del ala.

### **Diseño Experimental**

El análisis de las líneas se realizó, tal y como se explicó en el Capítulo 2, en distintos bloques que contenían al control. En cada bloque se aplicó el diseño experimental detallado en el Anexo Metodológico I de forma tal de obtener las moscas adultas utilizadas para estimar la

conformación del ala. Asimismo, los individuos fueron disecados y fotografiados de la manera mencionada en el Capítulo 2.

### **Conformación del ala**

La conformación del ala de las moscas adultas fue analizada a partir de la estimación de dos variables distintas debido a que cada una de ellas permite realizar análisis diferentes (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II). Por un lado, se utilizó una variable, denominada *Distancia de Procrustes* (DP), para realizar un análisis genético-cuantitativo como el realizado en el Capítulo 2 (ver más abajo). Por otro lado, se utilizó una variable multivariada, denominada *Deformaciones Relativas* (DR), para realizar un análisis detallado del cambio en la conformación del ala causado por la inserción del elemento *P* en cada gen (ver más abajo). Ambos tipos de variables fueron obtenidas a partir de la implementación de una técnica perteneciente a un conjunto de metodologías que conforman lo que se conoce como *Morfometría geométrica* (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II). Los datos correspondientes a los machos y a las hembras se analizaron por separado debido a que se sabe que los sexos difieren en la conformación del ala y, de acuerdo con la técnica utilizada, deben ser estudiados de manera independiente (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II).

### **Análisis Estadísticos**

*Análisis genético-cuantitativo.* Para poder realizar un análisis con todas las líneas medidas en distintos bloques, los valores de DP fueron transformados de la manera detallada en el Capítulo 2: al valor de cada individuo se le restó el valor medio de la línea control del sexo y bloque respectivo y se dividió al resultado por ese mismo valor. Los valores transformados fueron analizados de acuerdo al siguiente modelo de ANOVA:

$$Y = \mu + L + S + L \times S + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media general de DP; L es el factor Línea (aleatorio), con tantos niveles como líneas se utilizaron, que permitió analizar la existencia de varianza genética; S es el factor sexo (fijo), con dos niveles, que permitió estudiar las diferencias entre las medias de machos y hembras; y  $\epsilon$  representa al error. Asimismo se estimaron los componentes de la varianza para las fuentes de variación aleatorias, lo que permitió conocer la proporción de la varianza asociada a la conformación del ala explicada por dichas fuentes de variación.

*Identificación de mutantes divergentes mediante el análisis de DP.* Los valores de DP fueron analizados, en cada sexo y bloque por separado, de acuerdo al siguiente modelo de ANOVA:

$$Y = \mu + L + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media general del carácter analizado en cada caso; L es el factor Línea (fijo), con tantos niveles como líneas se estudiaron en el bloque correspondiente y  $\epsilon$  representa al error. En los casos en los que el factor Línea resultó significativo, se determinó qué líneas son las

responsables de dicho efecto mediante comparaciones con el control del bloque respectivo (contrastes de Dunnett). Aquellas líneas que mostraron diferencias significativas con respecto al control correspondiente fueron consideradas líneas portadoras de una inserción que afecta a un gen candidato para DP. Sin embargo, como DP estima en forma menos exacta la conformación del ala que DR (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II), las comparaciones con el control se realizaron únicamente para contrastar estos resultados con los del análisis multivariado que se describe más abajo. Debido a esto, a continuación se explican más detalladamente los análisis multivariados realizados con las DR.

*Identificación de mutantes divergentes mediante el análisis de DR.* Los valores de DR correspondientes a cada línea fueron analizados de acuerdo al siguiente modelo de análisis de varianza multivariado (MANOVA):

$$Y = \mu + L + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media general de la conformación del ala; L es el factor Línea (fijo), con dos niveles, la línea BDGP y la línea control del bloque respectivo, que permitió estudiar la existencia de diferencias entre ambas líneas; y  $\epsilon$  representa al error. Dado que se realizaron múltiples MANOVAs por bloque, comparando los valores de cada línea BDGP con los de la línea control del bloque respectivo; se aplicó la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples en cada bloque. Aquellas líneas que mostraron diferencias significativas con respecto al control correspondiente fueron consideradas portadoras de una inserción que afecta a un gen candidato para la conformación del ala.

El número de líneas en las que la inserción del elemento *P* afectó a la conformación del ala y/o al tamaño del ala (Capítulo 2) en machos y en hembras se analizó mediante un análisis de frecuencias en cada sexo por separado.

Estos análisis estadísticos se realizaron usando el paquete STATISTICA (StatSoft Inc., 2001; 2004).

*Identificación de los genes candidatos.* Para identificar los genes potencialmente afectados por la inserción del elemento *P* en las líneas significativas, se realizó una búsqueda bioinformática en el genoma de *D. melanogaster* tal y como fue explicado en el Capítulo 2. De este modo, se individualizaron los genes que intervienen de alguna manera en la expresión de la conformación del ala y se determinó si dicha expresión es sexo-específica.

*Análisis funcional de los genes candidatos.* Los genes candidatos fueron distribuidos en distintos términos de ontología génica correspondientes a las categorías *Proceso biológico*, *Función molecular* y *Componente celular* de acuerdo con sus anotaciones (The Gene Ontology Consortium, 2000). Este análisis fue hecho automáticamente con la ayuda del programa FatiGO+ (Al-Shahrour *et al.*, 2005, 2006) de la manera ya explicada en el Capítulo 2.

*Visualización de los efectos fenotípicos de los genes candidatos.* Se graficó el cambio conformacional para las líneas que presentaron los valores más extremos con respecto a las dos primeras DR (que son aquellas que explican el mayor porcentaje de la varianza fenotípica total). Particularmente, se mostró el cambio conformacional de cada una de esas líneas en relación con la línea control del sexo y bloque respectivo mediante diagramas de vectores, obtenidos utilizando el programa tpsSpln (Rohlf, 2004). Estas figuras muestran el desplazamiento de cada punto homólogo en la línea de interés (la línea BDGP asociada al extremo en cuestión) con respecto a la línea control correspondiente, mediante flechas que indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II).

## **Resultados**

### **Análisis genético-cuantitativo**

Se realizó un ANOVA para cuantificar el efecto el aporte de las fuentes de variación aleatorias a la varianza total de la conformación del ala. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas para la conformación del ala entre los sexos (Tabla 3.1). Sin embargo, el análisis reveló que el factor línea fue altamente significativo y explicó un 23% de la varianza fenotípica total (Tabla 3.1). Asimismo, la interacción entre la línea y el sexo también fue significativa aunque el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por esta fuente de variación fue sólo del 4% (Tabla 3.1). De estos resultados se desprende que existe abundante variabilidad genética para la conformación ala. La ausencia de diferencias entre los sexos llama la atención debido a que se sabe que existe dimorfismo sexual para la conformación del ala. Sin embargo, el resultado negativo puede deberse a que DP estima la conformación del ala en forma menos exacta que DR, variable que no permite un análisis de esta características (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II).

**Tabla 3.1:** Principales resultados del ANOVA para la conformación del ala. Se realizó un ANOVA de un factor (línea, aleatorio) utilizando los valores transformados de DP de acuerdo con un modelo con los factores línea (aleatorio) y sexo (fijo). Para cada fuente de variación se muestra el valor de los cuadrados medios (CM), el de  $F$  y su significancia. Asimismo, se indica el porcentaje de la varianza explicado por las fuentes de variación aleatorias (CV).

Fuente de variación	CM	$F$	CV (%)
Línea	1,091	5,674***	22,7
Sexo	0,002	0,011	-
Línea x Sexo	0,192	1,818***	4,4

\*\*\* $p < 0,001$ .

### Identificación de mutantes divergentes

Los resultados de los MANOVAs realizados para comparar los valores de DR de cada línea BDGP con los de la línea control del bloque respectivo (tras haber aplicado la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples en cada bloque) mostraron que el 63,4% de las líneas (121 de las 191 líneas estudiadas) mostró diferencias significativas para la conformación del ala, en al menos un sexo (Tabla 3.2). Casi la mitad de las líneas (el 49,7% en los machos y el 46,6% en las hembras) mostró diferencias significativas con respecto al control para la conformación del ala cuando los sexos fueron analizados en forma separada (Tabla 3.2). Sin embargo, resulta interesante destacar que sólo el 33% de las líneas (63 de las 191 líneas estudiadas) mostró diferencias significativas con respecto al control para la conformación del ala en ambos sexos simultáneamente (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2:** Líneas en las que la inserción del elemento *P* afectó a la conformación del ala en uno o ambos sexos.

Línea	Gen candidato	Sitio de inserción del elemento <i>p[GT1]</i>	Ubicación citogenética	Efecto fenotípico	
				Machos	Hembras
BG00177	<i>CG9894</i>	En el gen	22A3	*** (ns)	ns (ns)
BG00372	<i>CG1678</i>	A 1498 pb del extremo 3'	20A1	*** (ns)	*** (ns)
BG00373	<i>CG11226</i>	A 1500 pb del extremo 5'	80A4	*** (ns)	*** (**)
BG00386 <sup>m</sup>	<i>NMDA receptor 1 (Nmdar1)</i>	A 302 pb del extremo 3'	83A6-A7	*** (ns)	ns (ns)
BG00429	No existe secuencia			*** (***)	*** (***)
BG00489	<i>Osiris 9 (Osi9)</i>	A 200 pb del extremo 5'	83E2	ns (ns)	*** (ns)
BG00524	ARN no codificante 001:3R	A 430 pb del extremo 5'	87F14	*** (ns)	** (ns)
BG00664	No existe secuencia			*** (ns)	*** (ns)
BG00683	<i>Furin 1 (Fur1) / CG5127</i>	A 50 / A 400 pb del extremo 5'	96E1	* (ns)	ns (ns)
BG00735 <sup>m</sup>	<i>schizo (siz) / CG10581</i>	A 10 / A 300 pb del extremo 5'	78A5	*** (ns)	ns (ns)
BG00737	<i>Heat shock protein 27 (Hsp 27)</i>	En el gen	67B1	** (ns)	ns (ns)
BG00846 <sup>m,h</sup>	<i>invected (inv)<sup>a</sup></i>	En el gen	47F15-7F17	*** (***)	*** (***)
BG00930	No existe secuencia			ns (ns)	** (ns)
BG00985	No existe secuencia			** (ns)	*** (ns)
BG00990	<i>Wing blister (wb)<sup>a</sup></i>	A 500pb del extremo 5'	35A3	ns (ns)	** (ns)
BG01007	<i>CG8776</i>	En el gen	49B9	*** (ns)	*** (ns)
BG01010 <sup>m,h</sup>	<i>Karl</i>	En el gen	10E3	*** (ns)	*** (ns)
BG01011 <sup>m,h</sup>	<i>misshapen (msn)<sup>b</sup></i>	A 1402 pb del extremo 3'	62E6-E7	*** (ns)	*** (ns)
BG01014	<i>Spichthyin (spict)<sup>a</sup></i>	En el gen	33F3	*** (ns)	** (ns)
BG01017 <sup>m</sup>	No se halló similitud de secuencia significativa			ns (ns)	** (ns)
BG01018	<i>forkhead box, sub-group O (foxo)<sup>c</sup></i>	A 104 pb del extremo 3'	88A5-A7	*** (ns)	ns (ns)

(continúa en la próxima página)

Continuación de la Tabla 3.2

BG01019 <sup>m</sup>	No se halló similitud de secuencia significativa			*** (ns)	* (ns)
BG01028	<i>Trithorax-like (Trl)</i> <sup>d</sup>	En el gen	70F4	*** (ns)	*** (ns)
BG01037	<i>βv integrin (βInt-v)</i>	En el gen	39A1	*** (ns)	*** (**)
BG01045 <sup>m</sup>	No se halló similitud de secuencia significativa			** (ns)	** (ns)
BG01047 <sup>m</sup>	<i>frizzled (fz)</i>	En el gen	70D4-D5	* (ns)	*** (ns)
BG01062	<i>brother of iHog (boi)</i>	En el gen	3A3	*** (ns)	** (ns)
BG01065	<i>visgun (vsg)</i>	En el gen	67C5	*** (ns)	*** (ns)
BG01066	No existe secuencia			** (ns)	ns (ns)
BG01081 <sup>m</sup>	<i>Glutamate oxaloacetate transaminase 1 (Got1)</i>	En el gen	52E7	*** (ns)	ns (ns)
BG01127 <sup>m</sup>	<i>Muscleblind (mbl)</i> <sup>a</sup>	En el gen	54B1	** (ns)	*** (ns)
BG01214	<i>sugarless (sgl)</i> <sup>a,c</sup> / CG10064	A 100pb del extremo 5' / A 350 pb del extremo 3'	65D5	** (ns)	ns (ns)
BG01218	CG6767	En el gen	67C5	** (ns)	*** (ns)
BG01228 <sup>m,h</sup>	<i>derailed (drl)</i>	A 22728 pb del extremo 5'	37C7	ns (ns)	* (ns)
BG01247	<i>SRY interacting protein 1 (Sip1)</i>	En el gen	54B16	*** (ns)	ns (ns)
BG01279 <sup>m,h</sup>	CG17836	En el gen	91D4-D5	ns (ns)	* (ns)
BG01290	<i>Btk family kinase at 29A (Btk29A)</i>	En el gen	29A2	*** (ns)	ns (ns)
BG01297 <sup>m</sup>	CG33691	A 291 pb del extremo 3'	6E2	ns (ns)	* (ns)
BG01314 <sup>h</sup>	CG6540	En el gen	17C7	ns (ns)	* (ns)
BG01354	CG30492	A 400 pb del extremo 5'	43E5	** (ns)	** (ns)
BG01491	<i>tramtrack (ttk)</i> <sup>a</sup>	A 1637 pb del extremo 3'	100F3	* (ns)	*** (ns)
BG01515	<i>female sterile (1) homeotic (fs(1)h)</i>	En el gen	7D5	*** (ns)	*** (ns)
BG01520	<i>E2F transcription factor (E2f)</i>	En el gen	93E893E9-F1	* (ns)	** (ns)
BG01543	<i>Merlin (Mer)</i> <sup>a</sup>	En el gen	18 E1	** (ns)	*** (ns)

(continúa en la próxima página)



Continuación de la Tabla 3.2

BG01548	<i>a-Esterase-10 (a-Est10)</i>	A 2624 pb del extremo 5'	84D9	* (ns)	** (ns)
BG01562	<i>headcase (hdc)<sup>a</sup></i>	A 4750 pb del extremo 3'	99E4	*** (**)	ns (ns)
BG01563	<i>CG16708</i>	A 51 pb del extremo 3'	82F11-83A1	ns (ns)	*** (ns)
BG01565	<i>Defense represor 1(Dnr1)</i>	En el gen	58E9	*** (ns)	*** (ns)
BG01566 <sup>m</sup>	<i>arrest (aret)</i>	En el gen	33D3-D5	*** (ns)	*** (ns)
BG01568	<i>CG32560</i>	En el gen	16C1	** (ns)	* (ns)
BG01597	<i>l(3)82Fd</i>	En el gen	82F8-F9	** (ns)	ns (ns)
BG01600	<i>CG31666</i>	A 1200 pb del extremo 5'	22A5	*** (ns)	ns (ns)
BG01608 <sup>m</sup>	No se halló similitud de secuencia significativa			* (ns)	ns (ns)
BG01618	<i>CG6398</i>	A 250 pb del extremo 5'	16D5	*** (ns)	ns (ns)
BG01633 <sup>m,h</sup>	<i>scalloped (sd)<sup>a,b,d</sup></i>	En el gen	13F1	*** (***)	*** (***)
BG01637 <sup>m,h</sup>	<i>Tropomodulin (tmod)</i>	En el gen	99F7-F8	** (ns)	*** (ns)
BG01649	<i>cricket (clt)</i>	En el gen	57F4	** (ns)	ns (ns)
BG01655 <sup>m</sup>	<i>CG32038</i>	En el gen	67B7	ns (ns)	** (ns)
BG01660	No existe secuencia			*** (ns)	** (ns)
BG01683	<i>CG32572</i>	En el gen	15A3	*** (ns)	ns (ns)
BG01689 <sup>m</sup>	No se halló similitud de secuencia significativa			* (ns)	** (ns)
BG01713	<i>CG10694 / CG18428</i>	A 374 pb del extremo 5' / A 520 pb del extremo 3'	95E1	*** (ns)	Ns
BG01716	<i>PAPS synthetase (Paps)<sup>a</sup></i>	A 800 pb del extremo 3'	76D1-2	*** (ns)	** (ns)
BG01725	<i>Letal (3) neo 38 (l(3)neo38)</i>	A 700 pb del extremo 5'	86E18	ns (ns)	** (ns)
BG01726 <sup>m</sup>	<i>CG11382</i>	A 197 pb del extremo 3'	1E4	ns (ns)	** (ns)
BG01733 <sup>m</sup>	<i>CG6175</i>	A 2725 pb del extremo 5'	68C1-C2	** (***)	** (ns)
BG01736 <sup>m</sup>	<i>CG5966</i>	A 29 pb del extremo 3'	5D1	*** (ns)	*** (ns)

(continúa en la próxima página)

Continuación de la Tabla 3.2

BG01763	No se halló similitud de secuencia significativa			** (ns)	** (ns)
BG01769	No existe secuencia			*** (ns)	** (ns)
BG01784 <sup>m</sup>	<i>bunched (bun)</i>	En el gen	33E5-E9	ns (ns)	*** (*)
BG01828	No existe secuencia			*** (ns)	*** (ns)
BG01835	No existe secuencia			* (ns)	*** (ns)
BG01839 <sup>m</sup>	No existe secuencia			ns (ns)	* (ns)
BG01858	No se halló similitud de secuencia significativa			*** (ns)	*** (ns)
BG01859	No existe secuencia			*** (ns)	*** (ns)
BG01880	<i>cookie monster (comr)</i>	A 4921 pb del extremo 5'	58B1	* (ns)	ns (ns)
BG01892	No se halló similitud de secuencia significativa			** (ns)	* (ns)
BG01893	<i>lethal (3) 07882 (l(3)07882) / Splicing factor 1 (SF1)</i>	A 30 / A 400 pb del extremo 5'	90B4	** (ns)	*** (ns)
BG01902 <sup>m</sup>	<i>mastermind (mam)<sup>a,d</sup></i>	En el gen	50C23-D3	*** (***)	ns (***)
BG01949	<i>ade5 / CG12717</i>	A 130 / A 550 pb del extremo 5'	11B16	ns (ns)	* (ns)
BG01990	<i>CG30492</i>	A 501 pb del extremo 3'	43E5-E7	ns (ns)	** (ns)
BG02003	<i>6-phosphofructo-2-kinase (Pfrx)</i>	En el gen	18C8	*** (ns)	ns (ns)
BG02023 <sup>h</sup>	<i>Fasciclin 3 (Fas3)</i>	En el gen	36F2-F4	ns (ns)	*** (ns)
BG02058	No existe secuencia			ns (ns)	* (ns)
BG02063	<i>CG32685</i>	En el gen	9B1	* (ns)	ns (ns)
BG02065 <sup>h</sup>	<i>toucan (toc)</i>	En el gen	23D1-D2	* (ns)	* (ns)
BG02088	<i>CG15309</i>	En el gen	9B4	ns (ns)	*** (ns)
BG02095	<i>echinoid (ed)<sup>a,d,e</sup></i>	A 2888 pb del extremo 3'	24D4-D6	*** (ns)	*** (ns)
BG02106	<i>CG31145</i>	En el gen	95A7	ns (ns)	** (ns)
BG02107	No se halló similitud de secuencia significativa			* (ns)	** (ns)
BG02109	<i>tartan (trn)<sup>a</sup></i>	En el gen	70A1	** (ns)	** (ns)

(continúa en la próxima página)

Continuación de la Tabla 3.2

BG02113	<i>Laminin A (LanA)</i> <sup>a</sup>	A 680 pb del extremo 5'	65A9	** (ns)	** (ns)
BG02118 <sup>h</sup>	<i>Protein kinase 61C (Pk61C)</i> <sup>a</sup>	A 35 pb del extremo 3'	61B1	* (ns)	ns (ns)
BG02128 <sup>m,h</sup>	<i>Lethal (1) G0007 (l(1)G0007)</i>	En el gen	12E3-E5	** (ns)	ns (ns)
BG02157	CG8177	A 2746 pb del extremo 3'	67C7-C8	** (ns)	ns (ns)
BG02173	NFAT <sup>a</sup>	En el gen	12A9-B2	§ (ns)	* (ns)
BG02175	No se halló similitud de secuencia significativa			*** (ns)	*** (ns)
BG02180 <sup>h</sup>	<i>nuclear fallout (nuf)</i>	En el gen	70D3-D4	ns (ns)	** (ns)
BG02192	<i>boule (bol)</i> <sup>a</sup>	En el gen	66F5-67A1	** (ns)	*** (ns)
BG02199	<i>Division abnormally delayed (dally)</i>	A 22 pb del extremo 3'	66E1-E3	* (ns)	** (ns)
BG02219 <sup>m</sup>	<i>Smrter (Smr)</i>	A 375 pb del extremo 3'	11B10-B14	** (ns)	ns (ns)
BG02241 <sup>m,h</sup>	<i>bifocal (bif)</i>	En el gen	10D4-D5	* (ns)	ns (ns)
BG02262 <sup>m,h</sup>	<i>Smrter (Smr)</i>	En el gen	11B10-B14	** (ns)	*** (ns)
BG02286 <sup>m,h</sup>	CG32529 / <i>amnesiac (amn)</i> <sup>a</sup>	En los genes	18F4-19A2	*** (ns)	*** (ns)
BG02292	No se halló similitud de secuencia significativa			*** (ns)	** (ns)
BG02314	<i>jing</i> <sup>a</sup>	A 289 pb del extremo 3'	42C1	ns (ns)	** (ns)
BG02359	<i>innexin 7 (inx7)</i>	En el gen	6E4	ns (ns)	* (ns)
BG02380 <sup>m</sup>	<i>Laminin A (LanA)</i> <sup>a</sup>	A 151 pb del extremo 5'	65A8-A9	** (ns)	ns (ns)
BG02439 <sup>m</sup>	CG32556 / CG8188	A 300 pb del extremo 5' / A 950 pb del extremo 3'	16C1	*** (ns)	* (ns)
BG02462	CG6301	A 1398 pb del extremo 5'	53D11	*** (ns)	*** (ns)
BG02469 <sup>m</sup>	<i>Laminin A (LanA)</i> <sup>a</sup>	A 170 pb del extremo 5'	65A8-A9	*** (ns)	ns (ns)
BG02480	No existe secuencia			*** (ns)	*** (ns)
BG02520	<i>Vacuolar H<sup>+</sup> ATPase 16kD subunit (Vha16)</i>	En el gen	42C1	ns (ns)	** (ns)
BG02524	CG12418	A 500 pb del extremo 5'	85E14	*** (ns)	ns (ns)

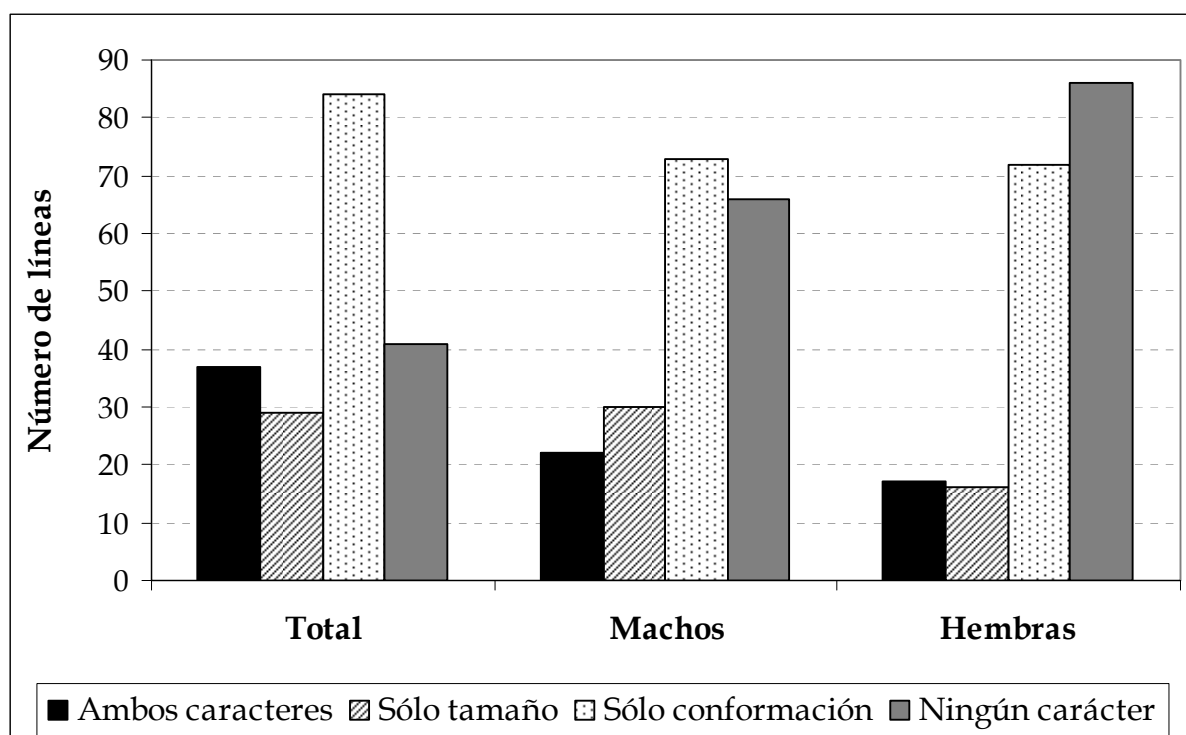
(continúa en la próxima página)

Continuación de la Tabla 3.2

BG02546 <sup>m</sup>	No se halló similitud de secuencia significativa			ns (ns)	** (*)
BG02563	<i>Capricious (caps)</i>	A 200 pb del extremo 5'	70A3	*** (ns)	ns (ns)
BG02566	<i>Calreticulin (Crc)</i>	En el gen	85E1	** (***)	*** (***)
BG02612	<i>CG31531</i>	A 2 pb del extremo 5'	82D1-2	*** (***)	*** (***)
BG02631	No se halló similitud de secuencia significativa			ns (ns)	* (ns)
BG02690 <sup>h</sup>	<i>CG14478</i>	En el gen	54B16	*** (ns)	*** (ns)
BG02830 <sup>m,h</sup>	<i>Lipid storage droplet-2 (Lsd-2)</i>	A 61 pb del extremo 5'	13A8-A9	*** (ns)	*** (ns)

<sup>m</sup> Línea significativa para el tamaño del ala (TA) en machos; <sup>h</sup> Línea significativa para TA en hembras (ver Tabla 2.3 para más detalles). <sup>a</sup> Gen relacionado con el desarrollo del ala (GDA) en Flybase (quinta publicación); <sup>b</sup> GDA según Rørth y colaboradores (1998); <sup>c</sup> Gen relacionado con la conformación del ala (GCA) según Weber (2005); <sup>d</sup> GCA según Dworkin y Gibson (2006); <sup>e</sup> GDA según Butler y colaboradores (2003). ns: no significativo; § P<0,03; \*P<0,01; \*\*P<0,001; \*\*\*P<0,0001. Entre paréntesis se indica la significación asociada a los análisis realizados utilizando DP. Líneas ns para la conformación del ala pero significativas para TA en algún sexo: BG00767, BG01329, BG01361, BG01380, BG01385, BG01433, BG01498, BG01538, BG01556, BG01573, BG01607, BG01613, BG01635, BG01662, BG01709, BG01717, BG01735, BG01780, BG01898, BG01912, BG02019, BG02034, BG02042, BG02056, BG02081, BG02108, BG02131, BG02132, BG02159, BG02210, BG02239, BG02240, BG02306, BG02327, BG02358, BG02386, BG02391, BG02395, BG02398, BG02412, BG02415, BG02435, BG02441, BG02529, BG02601, BG02605 y BG02727; Líneas ns para ninguno de los dos caracteres vinculados al ala en ambos sexos: BG00369, BG00528, BG00992, BG01009, BG01257, G01339, BG01412, BG01488, BG01628, BG01645, BG01659, BG01672, BG01674, BG01705, BG01714, BG01822, BG01947, BG02067, BG02102, BG02130, BG02560, BG02747 y BG02823. Todas estas líneas fueron ns según los análisis de DP excepto BG00528 (\*\*\*) en machos), BG02415 (\*) en hembras), BG02601 (\*) en hembras) y BG02727 (\*\*) en hembras).

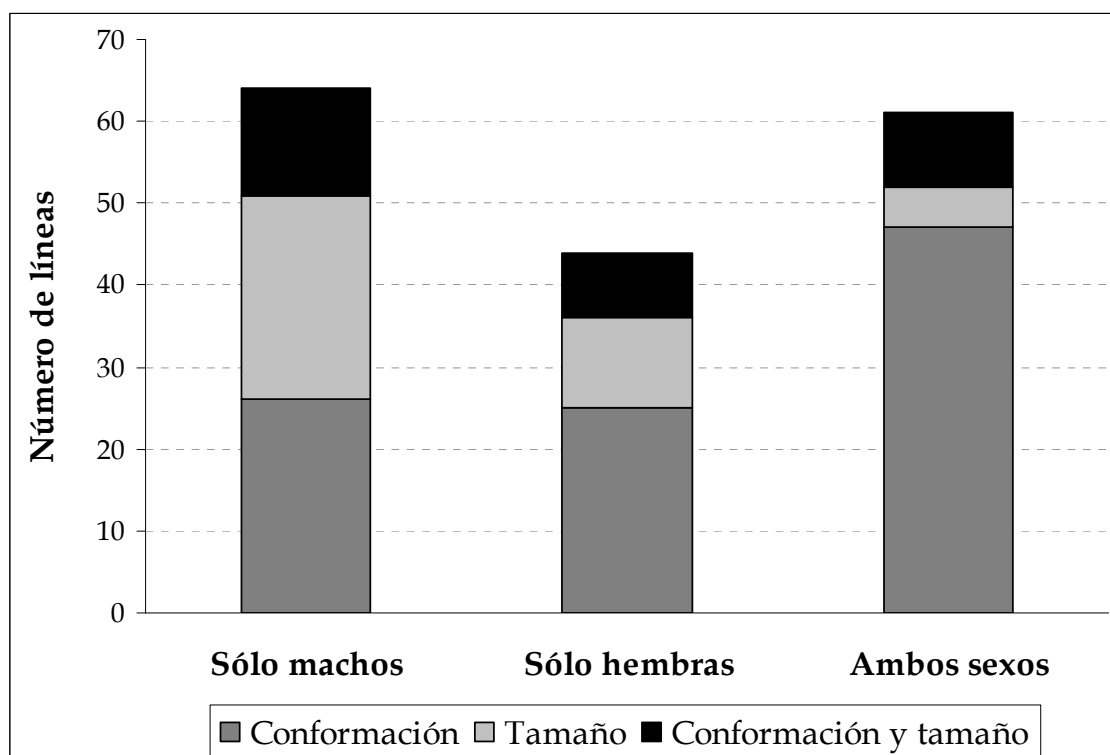
Tomando en consideración tanto a la conformación como al tamaño del ala (carácter analizado más detalladamente en el Capítulo 2), los resultados indican que 150 de las 191 líneas analizadas (el 78,5%) mostraron diferencias significativas con respecto a la línea control para alguno de los dos caracteres en uno o ambos sexos (Figura 3.5, Tabla 3.2). Más de la mitad de las líneas (el 65,4% en machos y el 55,0% en hembras) mostró diferencias significativas con respecto al control para alguno de los caracteres relacionados con el ala cuando los sexos fueron analizados en forma separada (Figura 3.5, Tabla 3.2). Sin embargo, sólo el 19,4% de las líneas (37 de las 191 líneas estudiadas) mostró diferencias con respecto al control para ambos caracteres a la vez en uno o ambos sexos (Figura 3.5, Tabla 3.2). Este porcentaje disminuye aproximadamente a la mitad (al 11,5% en machos y al 8,9% en hembras) cuando se observan los resultados en cada sexo por separado (Figura 3.5, Tabla 3.2). En general, el porcentaje de las líneas en las que la inserción del elemento *P* afectó sólo a la conformación del ala (44,0%) es mayor que el de las líneas en las que la mutación modificó el tamaño del órgano únicamente (15,2%; Figura 3.5, Tabla 3.2). Los resultados muestran que esta relación se mantiene, de manera aproximada, cuando se analizan los machos, por un lado (38,2% versus 15,7%) y las hembras, por el otro (37,7% versus 8,4%).



**Figura 3.5:** Número de líneas en las que la mutación afectó sólo a uno de los dos caracteres del ala analizados (conformación o tamaño), a ambos a la vez o a ninguno de ellos; considerando a machos y hembras juntos (total) y separadamente.

Los análisis de frecuencias mostraron que el número de casos en los que la mutación afectó sólo al tamaño, sólo a la conformación del ala o a ambos caracteres a la vez se encuentran dentro de los valores esperados de acuerdo con un comportamiento independiente de ambos caracteres tanto en los machos ( $\chi^2_1=1,578$ ;  $p=0,209$ ) como en las hembras ( $\chi^2_1=0,388$ ;  $p=0,533$ ).

Por último, al considerar la identidad de las líneas en las que se vio afectado el tamaño y/o la conformación del ala en machos y en hembras simultáneamente, se pudo notar que la mutación causó un efecto similar (afectando uno y/u otro carácter) en ambos sexos sólo en 61 líneas (31,9%; Figura 3.6, Tabla 3.2). Este valor es levemente inferior al asociado a las líneas que presentaron dichos efectos únicamente en los machos (33,5%) pero supera ampliamente al correspondiente a las líneas significativas específicas de las hembras (23,0%; Figura 3.6, Tabla 3.2).



**Figura 3.6:** Número de líneas en las que la mutación afectó sólo a uno de los dos caracteres del ala analizados (conformación o tamaño) o a ambos a la vez, de manera sexo-específica (únicamente en machos o en hembras) o en ambos sexos simultáneamente.

Los resultados de los contrastes de Dunnett, realizados para comparar los valores de DP de cada línea BDGP con los de la línea control del bloque respectivo, mostraron que sólo el 8,4% de las líneas (16 de las 191 líneas estudiadas) mostraron diferencias significativas para la conformación del ala, al menos en un sexo (Tabla 3.2). Al analizar los sexos en forma separada, puede notarse que sólo 13 (el 6,8%) y 9 líneas (el 4,7%) mostraron diferencias significativas con

respecto al control en hembras y machos respectivamente (Tabla 3.2). 6 de las líneas significativas (el 3,1%) mostraron diferencias con respecto al control en ambos sexos simultáneamente mientras que 3 (el 1,6%) y 7 (el 3,7%) presentaron efectos específicos en machos y hembras respectivamente (Tabla 3.2). Tal y como se esperaba debido a que DP estima la conformación del ala en forma menos exacta que DR; la cantidad de líneas que presentaron diferencias significativas con respecto al control fue considerablemente menor que en el análisis multivariado mencionado anteriormente (Tabla 3.2). Sin embargo, aún cuando la mayoría de los casos no significativos de acuerdo con el análisis multivariado tampoco lo fueron según el análisis univariado, existen algunos casos que resultaron ser no significativos en el primer análisis y significativos en el segundo. Este es el caso de las líneas BG00528 ( $p < 0,001$ ), que mostró diferencias con respecto al control sólo en los machos; y las líneas BG02415 ( $p = 0,047$ ), BG02601 ( $p = 0,039$ ) y BG02727 ( $p = 0,003$ ) que mostraron dichas diferencias únicamente en las hembras. Si bien se deben considerar estas discrepancias, hay que tomar en cuenta que dos de las líneas fueron marginalmente significativas (BG02415 y BG02601). Asimismo, hay que considerar que en el análisis multivariado se utilizó un criterio bastante estricto, debido a la corrección aplicada, para considerar a una línea significativamente diferente del control. A pesar de esto, el análisis multivariado mostró ser mucho más sensible que el univariado para detectar diferencias en relación con la conformación del ala, lo cual es concebible para análisis que emplean variables que estiman la variación en más dimensiones. Todo esto está de acuerdo con la observación de que la mayoría de las líneas significativas según al análisis univariado (las 6 significativas en ambos sexos, 2 de las 3 significativas sólo en machos y 2 de las 7 significativas únicamente en hembras) está entre las líneas que presentaron los valores más extremos para las dos primeras DR (DR1 y DR2) que son aquellas que explican el mayor porcentaje de la varianza fenotípica total (ver más abajo). Por lo tanto, se priorizaron los resultados obtenidos a partir del análisis multivariado.

### **Identificación de los genes candidatos**

Se identificaron 98 genes candidatos que afectan a la conformación del ala considerando aquellos en los que la inserción del elemento *P* se encuentra a una distancia no mayor a 5 Kb del sitio de inicio de la transcripción del gen (sólo se seleccionó como candidato al gen más cercano a la inserción excepto en aquellos casos en los que dos genes están a una distancia no mayor a 1 Kb de la mutación y la inserción no ocurrió en ninguno de los genes; Tabla 3.2). Por un lado, en ocho de las 121 líneas significativas, la inserción del elemento *P* se encuentra en la vecindad de dos genes (Tabla 3.2). Este es el caso de las líneas BG00683 (genes *Furin 1* (*Fur1*) y *CG5127*), BG00735 (genes *schizo* (*siz*) y *CG10581*), BG01214 (genes *sugarless* (*sgl*) y *CG10064*), BG01713

(genes *CG10694* y *CG18428*), *BG01893* (genes *lethal (3) 07882 (l(3)07882)* y *Splicing factor 1 (SF1)*), *BG01949* (genes *ade5* y *CG12717*), *BG02286* (genes *CG32529* y *amnesiac (amn)*) y *BG02439* (genes *CG32556* y *CG8188*; Tabla 3.2). Por otro lado, se registró la inserción del elemento *P* en el mismo gen candidato en dos o más líneas diferentes. Este es el caso del gen *Laminin A (LanA)*; líneas *BG02113*, *BG02380* y *BG02469*), *CG30492* (*BG01354* y *BG01990*) y *Smrter (Smr)*; líneas *BG02219* y *BG02262*; Tabla 3.2). Una observación interesante es que distintos sitios de inserción en el mismo gen (es decir, distintas líneas) mostraron resultados diferentes, indicando que el sitio exacto del transposón determina el efecto fenotípico de la mutación, como fue observado para los caracteres de tamaño corporal estudiados en el Capítulo 2 así como para otros caracteres (Rollmann *et al.*, 2006). Por un lado, tres inserciones afectaron a *LanA* (Tabla 3.2). La mutación de la línea *BG02113* afectó la conformación del ala tanto en machos como en hembras pero no afectó el tamaño del ala en ninguno de los dos sexos (Tabla 3.2). Las otras dos inserciones, correspondientes a las líneas *BG02380* y *BG02469*, causaron una modificación en la conformación y el tamaño del ala de los machos únicamente (Tabla 3.2). Estas inserciones se ubicaron a 680, 151 y 170 pb del extremo 5' de *LanA* respectivamente (Tabla 3.2). Por otro lado, la inserción del elemento *P* a 400 pb del extremo 5' de *CG30492* en la línea *BG01354*, afectó la conformación del ala tanto en machos como en hembras pero no afectó el tamaño del ala en ninguno de los dos sexos (Tabla 3.1). Sin embargo, otra mutación ubicada a 501 pb del extremo 3' del mismo gen en la línea *BG01990*, sólo causó una modificación de la conformación del ala en las hembras (Tabla 3.2). Finalmente, las mutaciones que afectaron a *Smr* causaron una modificación tanto de la conformación como del tamaño del ala en ambos sexos en la línea *BG02262*; mientras que, en la línea *BG02219*, afectó a ambos caracteres en los machos solamente (Tabla 3.2). Estas inserciones ocurrieron en el primer intrón y a 375 pb del extremo 3' de *Smr* respectivamente (Tabla 3.2).

### **Análisis funcional de los genes candidatos**

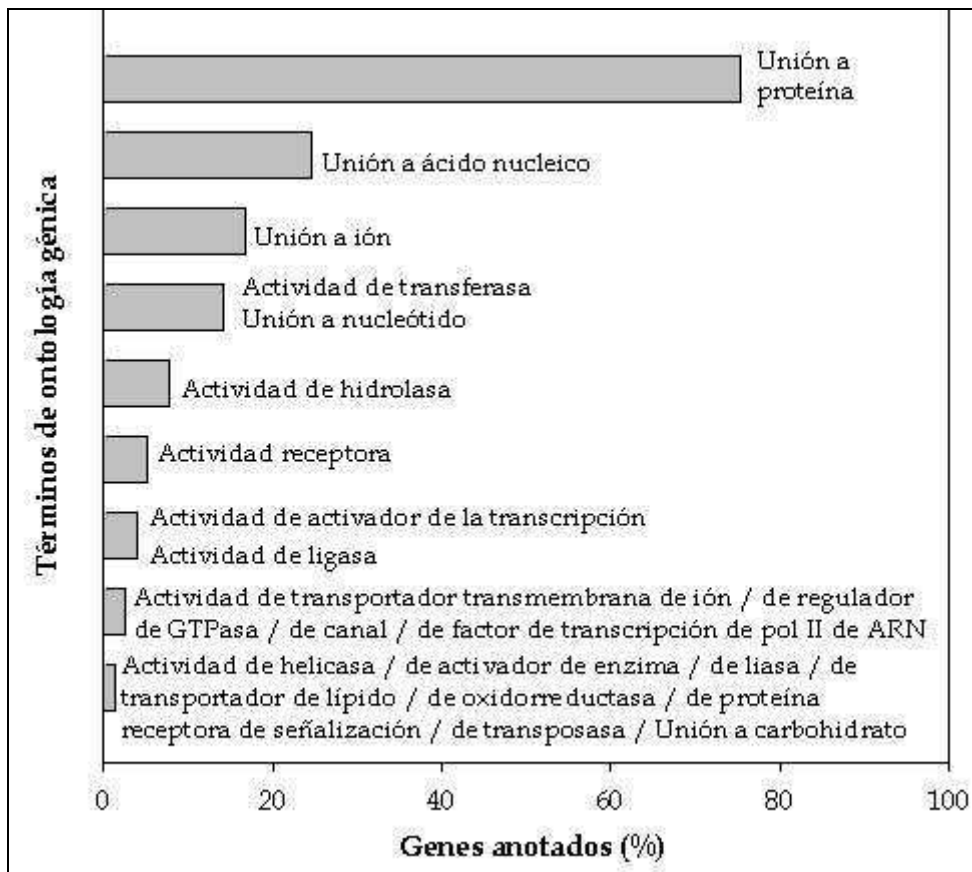
Los genes con efectos significativos en la conformación del ala fueron distribuidos en términos de ontología génica correspondientes a las categorías *Proceso biológico*, *Función molecular* y *Componente celular*, de la misma manera que los analizados en el Capítulo 2, usando FatiGO+ (Al-Shahrour *et al.*, 2005, 2006). En el análisis correspondiente a la categoría *Proceso biológico*, se consideraron 580 términos de ontología génica. Los 60 genes candidatos con anotación se distribuyeron en 45 términos de manera no excluyente (Tabla 3.3). Cada uno de los primeros 15 términos engloba más del 10% de los genes. En general, estos términos están relacionados con el desarrollo, procesos metabólicos, la organización y la biogénesis de la célula, la reproducción sexual, la localización, la comunicación y la adhesión celular y el ciclo de



la célula (Tabla 3.3). Una gran proporción de estos genes están implicados en el desarrollo (un 55% en *Desarrollo de organismo multicelular*, un 45% en *Desarrollo de estructura anatómica* y un 40% en *Proceso de desarrollo celular*) y/o en procesos metabólicos (un 55% en *Proceso metabólico celular*, un 52% en *Proceso metabólico primario* y un 40% en *Proceso metabólico macromolecular*; Tabla 3.3). El análisis de la *Función molecular* consideró 138 descriptores y los 78 genes candidatos con anotación en esta categoría se distribuyeron, de manera no excluyente, en 21 términos de ontología génica (Figura 3.7). Los términos que presentaron un mayor porcentaje de genes son: *Unión a proteína* (75%), *Unión a ácido nucleico* (25%), *Unión a ión* (17%), *Actividad de transferasa* (14%) y *Unión a nucleótido* (14%; Figura 3.7). Finalmente, en el análisis correspondiente al *Componente celular* se incluyeron 61 descriptores y los 49 genes con anotación en esta categoría se distribuyeron, de manera no excluyente, en 8 categorías. La gran mayoría de los genes (94%) codifican alguna *Parte de la célula*, un 49% codifica algún *Producto unido a la membrana de una organela* y un 12% alguno *No unido a la membrana de una organela*. Los términos restantes (*Parte de la región extracelular*, *Parte de una organela*, *Parte de la matriz extracelular*, *Complejo receptor* y *Complejo proteico no localizado*) engloban menos del 10% de los genes candidatos que tienen alguna anotación en esta categoría.

**Tabla 3.3:** Distribución de los genes candidatos con anotación en términos de ontología génica correspondientes a la categoría *Proceso biológico* usando FatiGO+. Los genes son distribuidos de manera no excluyente (cada gen puede estar relacionado con más de un término de ontología génica). Los valores corresponden al porcentaje de genes relacionado con cada término. “/” separa términos de ontología génica diferentes, cada uno de ellos con el porcentaje de genes indicado.

Términos de ontología génica ( <i>Proceso biológico</i> )	% de genes
Proceso metabólico celular / Desarrollo de organismo multicelular	55,00
Proceso metabólico primario	51,67
Desarrollo de estructura anatómica	45,00
Proceso metabólico macromolecular / Proceso de desarrollo celular	40,00
Regulación de proceso biológico	38,33
Comunicación celular	26,67
Organización y biogénesis del componente celular	23,33
Reproducción sexual	21,67
Establecimiento de localización	15,00
Proceso biosintético / Adhesión celular	13,33
Ciclo celular / Localización de la célula	11,67
Respuesta a estímulo químico / Comportamiento	8,33
División celular / Muerte / Proliferación celular	6,67
Proceso reproductivo / Regulación de calidad biológica / Envejecimiento / Respuesta a estrés	5,00
Proceso metabólico de compuesto de nitrógeno / Interacción comportamental entre organismos / Crecimiento de órgano / Segregación cromosómica / Regulación de función molecular	3,33
Respuesta a estímulo externo / Maduración del desarrollo / Respuesta a estímulo endógeno / Localización de ARN / Proceso metabólico secundario / Crecimiento de organismo multicelular / Localización de proteína / <i>Docking</i> de membrana / Circulación / Reconocimiento celular / División celular / Organización y biogénesis del puente intercelular / Proceso catabólico / Respuesta a estímulo biótico / Crecimiento de desarrollo / Proceso neurológico	1,67



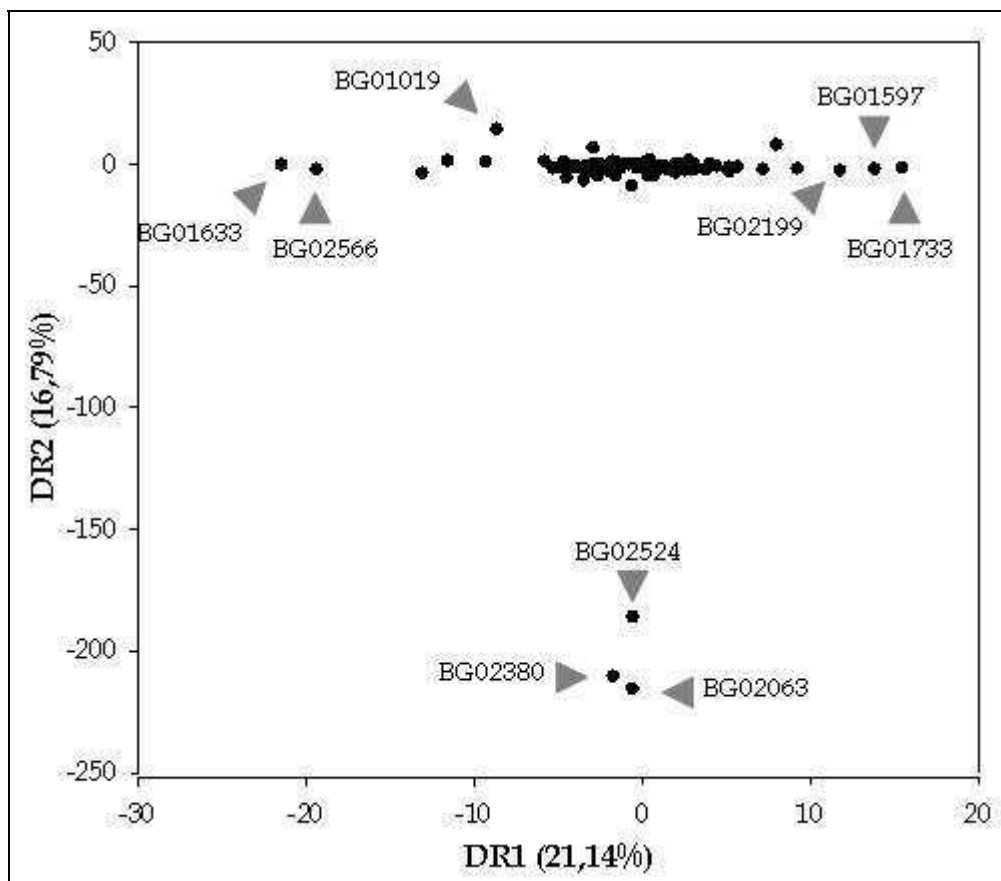
**Figura 3.7:** Distribución de los genes candidatos con anotación en términos de ontología génica correspondientes a la categoría *Función molecular* usando FatiGO+. Los genes son distribuidos de manera no excluyente (cada gen puede estar relacionado con más de un término de ontología génica). "/" separa términos de ontología génica diferentes, cada uno de ellos con el porcentaje de genes indicado.

### Visualización de los efectos fenotípicos de los genes candidatos

A continuación, se buscó identificar los genes cuya mutación originó los mayores cambios en la conformación del ala y visualizar dichas modificaciones. Debido a que las líneas en las que la inserción del elemento *P* afectó significativamente la conformación del ala pertenecen a bloques diferentes, los valores de cada DR fueron transformados de manera similar a la explicada anteriormente: al valor de cada individuo se le restó el valor medio de la línea control del sexo y bloque respectivo y se dividió al resultado por ese mismo valor. Luego se calculó el valor medio de cada DR para todas las líneas significativas y se las ordenó de acuerdo a dichos valores. Dado que se pretende visualizar los mayores cambios asociados a la conformación del ala, se decidió tomar en consideración los resultados obtenidos de DR1 y DR2 que son aquellas que explican el mayor porcentaje de la varianza fenotípica total (para más detalles, ver el Anexo metodológico II). De esta manera, las Figuras 3.8 y 3.9 muestran los valores mencionados para machos y hembras respectivamente. Asimismo, en cada eje se indica el porcentaje de la varianza fenotípica explicado por cada DR, calculado como la media de los

valores correspondientes a los distintos bloques ponderada por la cantidad de líneas analizadas en cada uno.

Una breve inspección de la figura correspondiente a los machos permite notar que la línea que presentó los mayores valores respecto de DR1, en comparación con la línea control del bloque respectivo, fue BG01733, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió a 2725 pb del extremo 5' de *CG6175* (Figura 3.8, Tabla 3.2). Sin embargo, hay que destacar que otras dos líneas presentaron valores cercanos a los de BG01733 en este eje, BG01597 y BG02199; en las que los genes afectados por la mutación fueron *l(3)82Fd* y *division abnormally delayed (dally)* respectivamente (Figura 3.8, Tabla 3.2). La línea que presentó los menores valores respecto de DR1 en este sexo fue BG01633, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió en el primer intrón de *scalloped (sd)* (Figura 3.8, Tabla 3.2). Nuevamente, hay que considerar que otra línea presentó valores cercanos a los de BG01633 en este eje, BG02566, en las que el gen afectado por la mutación fue *Calreticulin (Crc)* (Figura 3.8, Tabla 3.2).

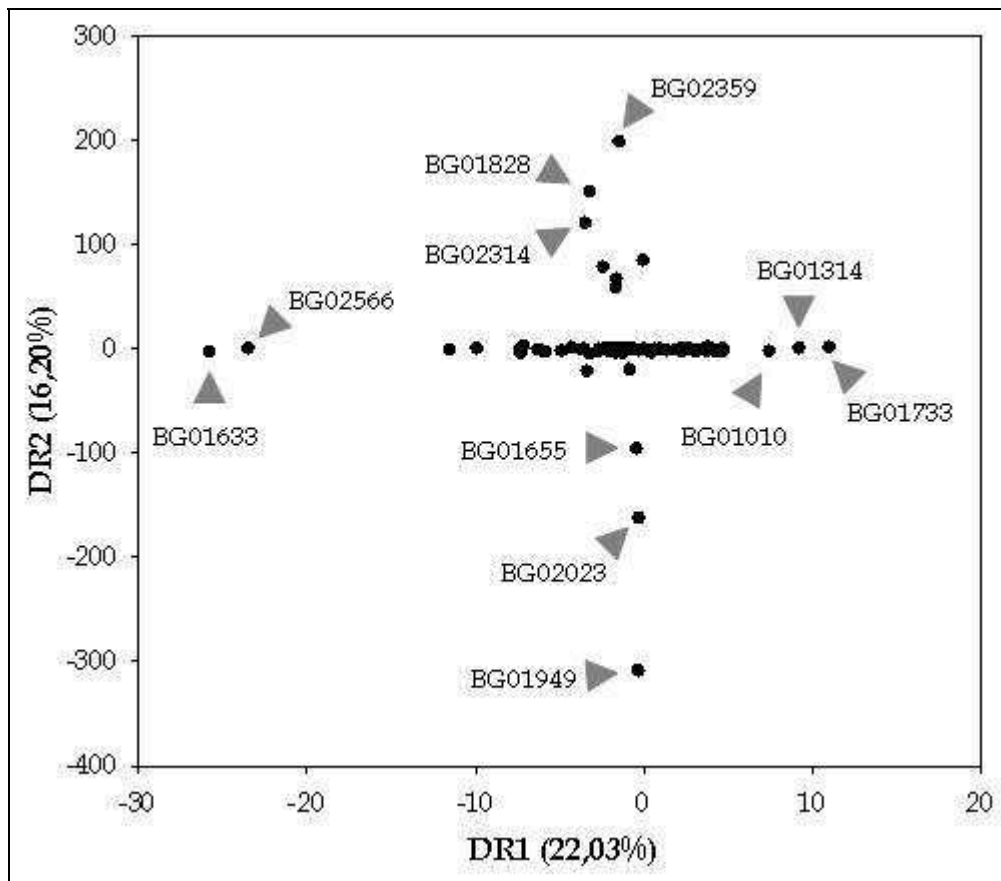


**Figura 3.8:** Valor medio de las dos primeras DR de cada línea significativa relativizado con respecto al control del bloque correspondiente en los machos. El porcentaje de la varianza fenotípica explicado por cada DR es la media de los valores correspondientes a los distintos bloques ponderada por la cantidad de líneas analizadas en cada uno.

En relación con DR2, la línea que presentó los mayores valores en los machos, en comparación con la línea control del bloque respectivo, fue BG01019; en la que no se pudo identificar un gen afectado por la inserción del elemento *P* (Figura 3.8, Tabla 3.2). A su vez, hay que considerar que el valor de DR2 de esta línea está muy cerca del valor correspondiente a casi todas las demás líneas (Figura 3.8). En cambio, los menores valores respecto de este eje muestran una gran diferencia con todos los demás. La línea que presentó los menores valores en este eje fue BG02063, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió en el gen *CG32685* (Figura 3.8, Tabla 3.2). Asimismo, otras dos líneas presentaron valores cercanos a los de BG02063, BG02380 y BG02524; en las que los genes afectados por la mutación fueron *LanA* y *CG12418* respectivamente (Figura 3.8, Tabla 3.2).

Al observar la figura correspondiente a las hembras se puede ver que las líneas que presentaron los valores mayores y menores respecto de DR1, en comparación con la línea control del bloque respectivo; fueron las mismas que en los machos, BG01733 y BG01633 respectivamente (Figura 3.9, Tabla 3.2). De la misma manera que en el caso de los machos, hay que destacar que otras dos líneas presentaron valores cercanos a los de BG01733 en este eje, BG01314 y BG01010; en las que los genes afectados por la mutación fueron *CG6540* y *Karl* respectivamente (Figura 3.9, Tabla 3.2). En las hembras, al igual que en los machos, los individuos de la línea BG02566 presentaron valores de DR1 cercanos a los de BG01633 (Figura 3.9, Tabla 3.2).

En relación con DR2, línea que presentó los mayores valores en las hembras, en comparación con la línea control del bloque respectivo, fue BG02359; en la que el gen afectado por la inserción del elemento *P* fue *innexin 7 (inx7)*; (Figura 3.9, Tabla 3.2). Nuevamente, hay que considerar que otras líneas presentaron valores cercanos a los de BG02359 en este eje. Una fue BG01828, en la que no se pudo identificar un gen afectado por la inserción del elemento *P*. Otra fue BG02314, en la que el gen afectado por la mutación fue *jing* (Figura 3.9, Tabla 3.2). Los menores valores respecto de DR2 muestran una gran diferencia con los de las demás líneas aunque también presentan diferencias importantes entre si. La línea que presentó los menores valores en este eje fue BG01949, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió antes del inicio de la transcripción de los genes *ade5* y *CG12717* (Figura 3.9, Tabla 3.2). Asimismo, otras dos líneas presentaron valores sustancialmente menores a los de las demás líneas, BG02023 y BG01655; en las que los genes afectados por la mutación fueron *Fasciclin 3 (Fas3)* y *CG32038* respectivamente (Figura 3.9, Tabla 3.2).

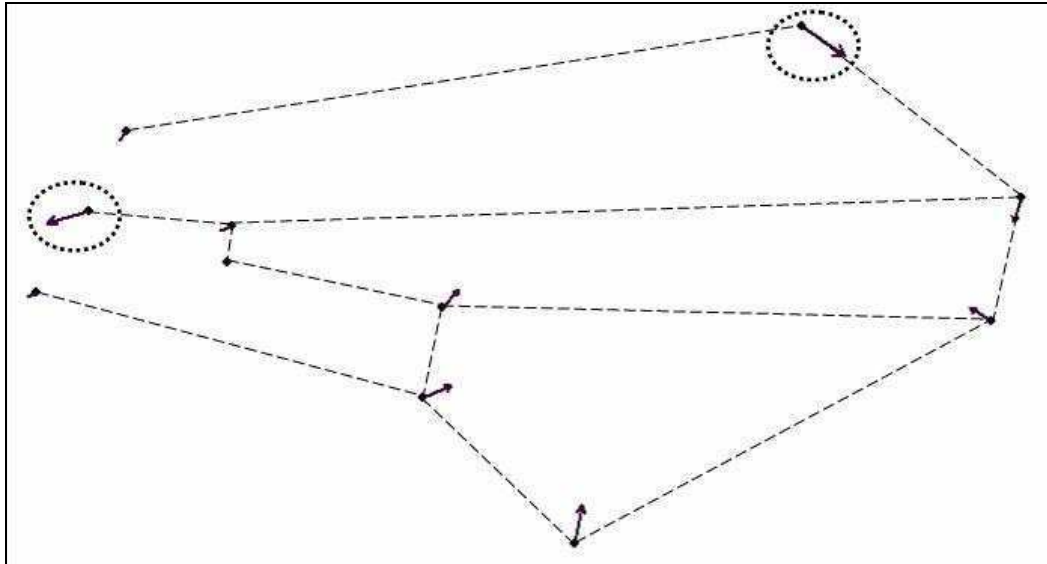


**Figura 3.9:** Valor medio de las dos primeras DR de cada línea significativa relativizado con respecto al control del bloque correspondiente en las hembras. El porcentaje de la varianza fenotípica explicado por cada DR es la media de los valores correspondientes a los distintos bloques ponderada por la cantidad de líneas analizadas en cada uno.

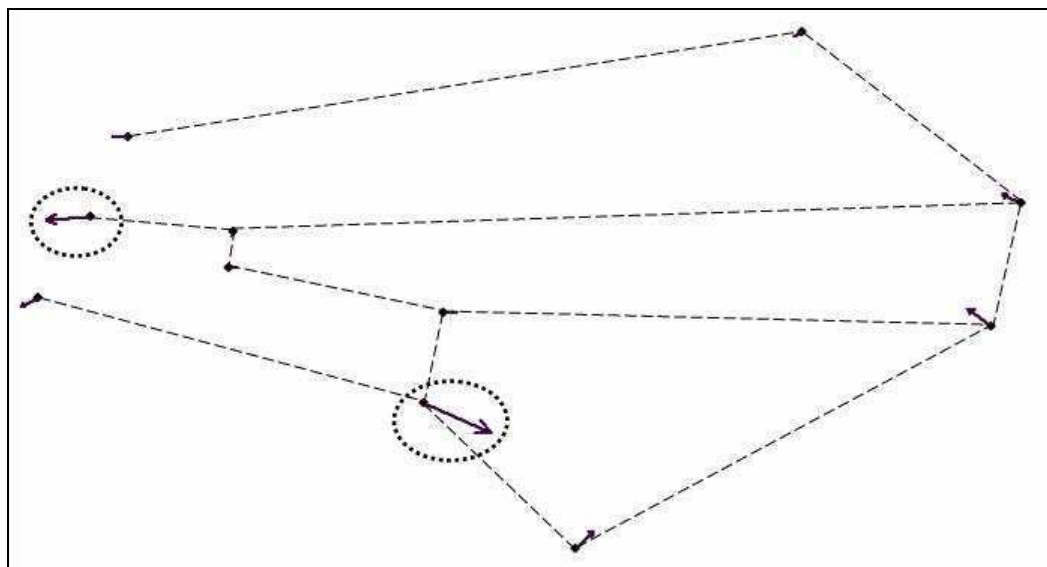
Debido a que las líneas que presentaron los cambios más extremos en la conformación del ala pertenecen, generalmente, a bloques diferentes, no sería adecuado mostrar las modificaciones asociadas a cada eje como parte de un continuo. Sin embargo, se puede mostrar el cambio en la conformación del ala entre cada una de las líneas que presentaron los valores más extremos y el control del bloque respectivo para cada sexo (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II). De esta manera, las siguientes figuras muestran diagramas del ala (uno por cada extremo de DR1 y DR2 que está asociado a una línea diferente), para los machos y las hembras por separado; cuya observación permite inferir las regiones del ala que se vieron más afectadas en cada caso.

En los machos, el cambio en la conformación del ala debido a la mutación de *CG6175*, asociado a los mayores valores de DR1, involucró a los puntos homólogos 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 (ver el Anexo Metodológico II), es decir, casi toda el ala (Figura 3.10). Sin embargo, el desplazamiento fue aparentemente mayor en el caso de los puntos 2 y 7 (Figura 3.10). El cambio conformacional causado por la mutación de *sd*, vinculado al otro extremo de los valores de DR1,

implicó a los puntos homólogos 2, 6, 8, 9, 10 y 11, es decir, a la región posterior del ala (Figura 3.11). En este caso, también puede verse que el desplazamiento fue desigual, siendo mayor en el caso de los puntos 2 y 6 (Figura 3.11).



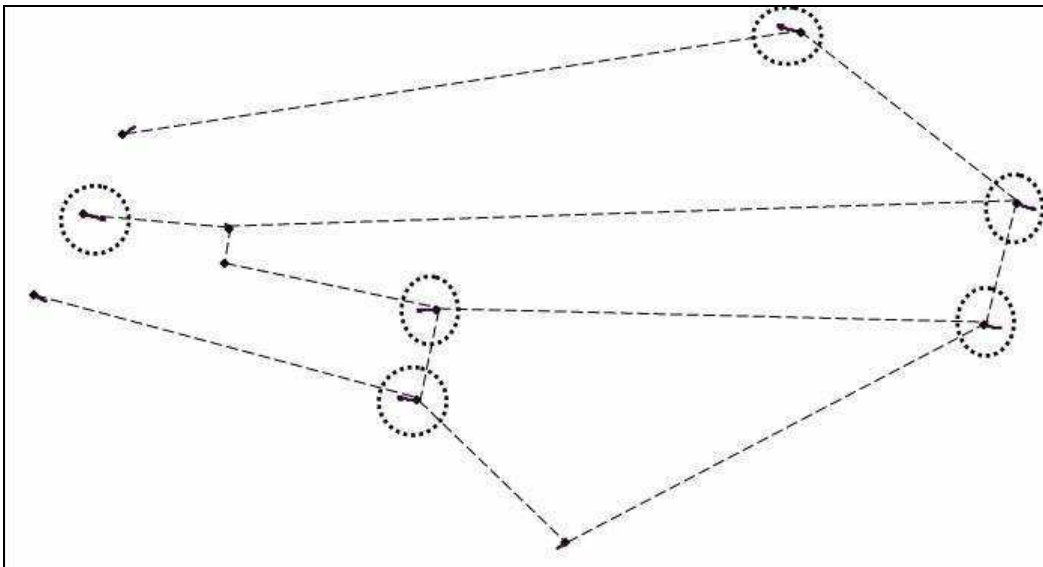
**Figura 3.10:** Cambios en la conformación del ala en los machos de la línea BG01733 (gen candidato: *CG6175*). Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto de la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.



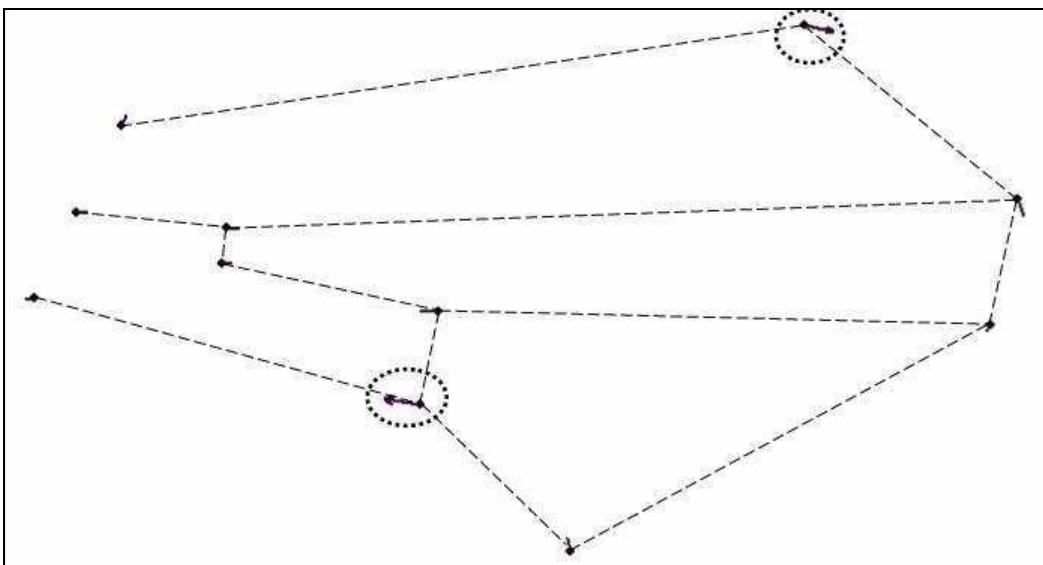
**Figura 3.11:** Cambios en la conformación del ala en los machos de la línea BG01633 (gen candidato: *scalloped*). Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.

En relación con DR2, el cambio en la conformación del ala de los machos de la línea que

presentó los mayores valores, BG01019, involucró a los puntos 2, 5, 6, 7, 8 y 9, es decir, casi toda el ala nuevamente (Figura 3.12). Sin embargo, en este caso el desplazamiento de los puntos fue similar (Figura 3.12). Por último, el cambio conformacional causado por la mutación de CG32685, vinculado al otro extremo de los valores de DR2, implicó a los puntos homólogos 5, 6, 7 y 8 (Figura 3.13). En este caso, los puntos 6 y 7 aparentemente se desplazaron más que los otros (Figura 3.13).



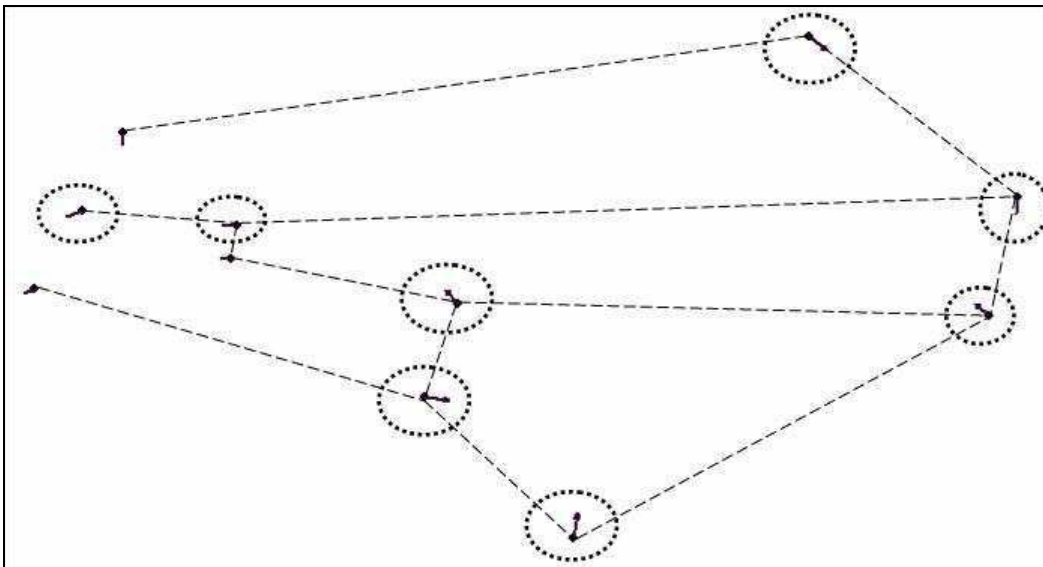
**Figura 3.12:** Cambios en la conformación del ala en los machos de la línea BG01019 (gen candidato desconocido). Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.



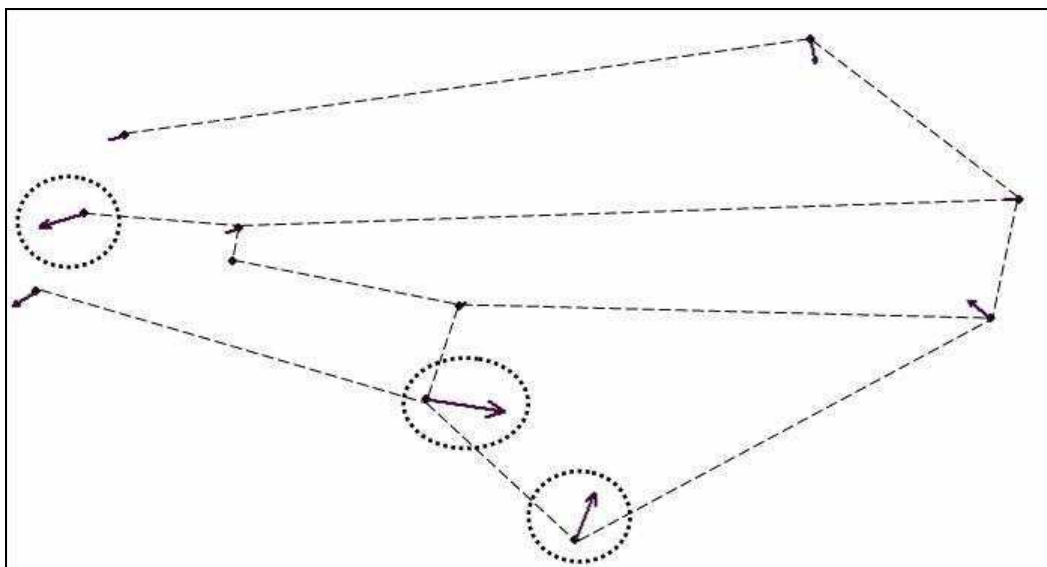
**Figura 3.13:** Cambios en la conformación del ala en los machos de la línea BG02063 (gen candidato: CG32685). Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.



En las hembras, el cambio en la conformación del ala debido a la mutación de *CG6175*, asociado a los mayores valores de ambas DR, afectó similarmente a casi toda el ala (puntos homólogos 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; Figura 3.14). El cambio conformacional causado por la mutación de *sd*, vinculado al otro extremo de los valores de DR1, implicó a los puntos todos los puntos excepto al 4 y el 5 (Figura 3.15). Sin embargo, en este caso puede verse que el desplazamiento fue desigual, siendo mayor en el caso de los puntos 2, 6 y 10 (Figura 3.15).



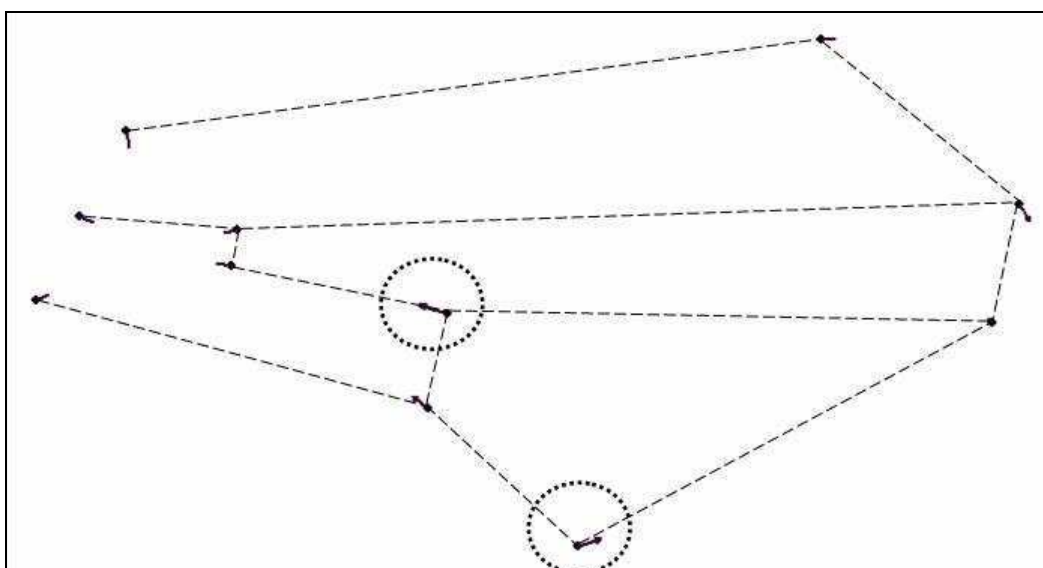
**Figura 3.14:** Cambios en la conformación del ala en las hembras de la línea BG01733 (gen candidato: *CG6175*). Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.



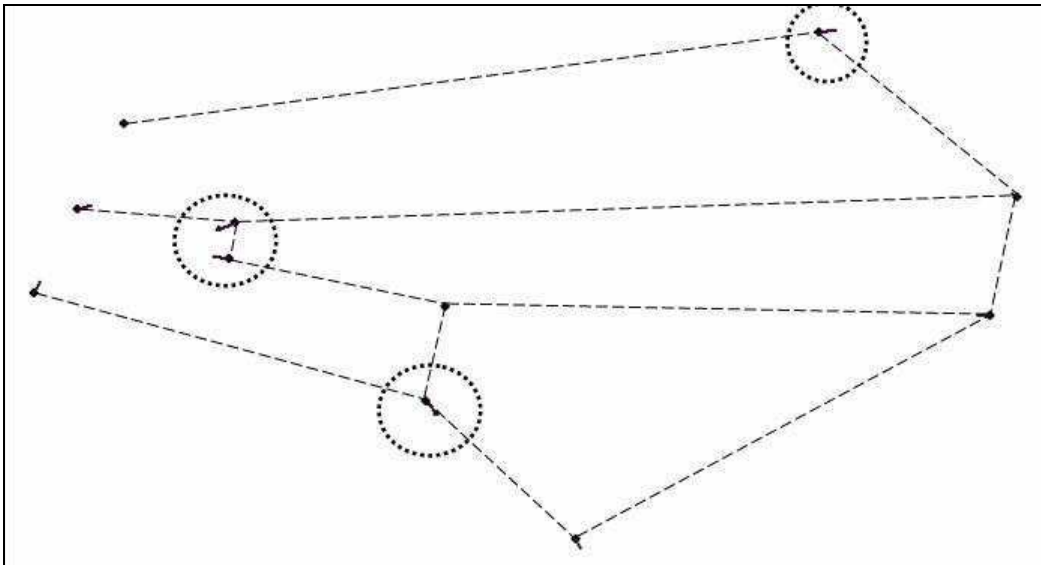
**Figura 3.15:** Cambios en la conformación del ala en las hembras de la línea BG01633 (gen candidato: *scalloped*). Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.

Con respecto a DR2, el cambio en la conformación del ala debido a la mutación de *inx7*, asociado al extremo positivo de DR2; afectó moderada y similarmente a todos los puntos menos al 9 (Figura 3.16). Sin embargo, los puntos 5 y 10 aparentemente se desplazaron un poco más que los otros (Figura 3.16). El cambio conformacional causado por la mutación de *ade5* y *CG12717*, vinculado al otro extremo de los valores de DR2; implicó prácticamente a toda el ala otra vez (puntos 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10 y 11; Figura 3.17). En este caso el desplazamiento de los puntos 3, 4, 6 y 7 fue levemente mayor que el de los otros (Figura 3.17).

Si bien no se registraron exactamente las mismas líneas para ambos sexos en cada uno de los extremos analizados, vale la pena resaltar que hubo coincidencia en relación con DR1, que es la que explica un porcentaje mayor de la varianza fenotípica total (Figuras 3.8 y 3.9). Por un lado, el cambio en la conformación del ala observado en la línea que presentó los valores mayores en esta DR, BG01733, fue similar en ambos sexos aunque fue más pronunciado en los machos (Figuras 3.10 y 3.14). Por otro lado, el cambio conformacional observado en la línea que mostró los valores menores en esta DR, BG01633, también fue similar en ambos sexos aunque fue más pronunciado en las hembras (Figuras 3.11 y 3.15). Como ya fue mencionado, la inserción del elemento *P* que afectó a *CG6175* sería la responsable del aumento en los valores de DR1 en ambos sexos (Figuras 3.8 y 3.9, Tabla 3.2); mientras que la mutación de *sd*, que ya había sido mencionada en el Capítulo 2 por haber causado el aumento de distintos caracteres vinculados al tamaño corporal (entre los que se encuentra el tamaño del ala en ambos sexos), sería la responsable de la disminución en los valores de DR1, también en ambos sexos (Figuras 3.8 y 3.9, Tabla 3.2).



**Figura 3.16:** Cambios en la conformación del ala en las hembras de la línea BG02359 (gen candidato: *innexin 7*). Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.



**Figura 3.17:** Cambios en la conformación del ala en las hembras de la línea BG01949 (gen candidato: CG12717). Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.

## Discusión

A pesar de que recientemente se han llevado a cabo numerosos estudios con el objetivo de profundizar el conocimiento de la arquitectura genética de la forma del ala en *D. melanogaster* (Birdsall *et al.*, 2000; Dworkin *et al.*, 2005; Dworkin & Gibson, 2006; Mezey *et al.*, 2005; Mezey & Houle, 2005; Palsson & Gibson, 2000; 2004; Weber, 1990; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2005; 2008; Zimmerman *et al.*, 2000) el análisis genético-cuantitativo de este carácter complejo aún se encuentra en sus comienzos. Debido a esto, las líneas utilizadas en el Capítulo 2 para estudiar la arquitectura genética de distintos caracteres de tamaño corporal y empleadas aquí para identificar genes candidatos a formar parte de la base genética de la conformación del ala, constituyen una herramienta de gran valor para profundizar las investigaciones en este tema. Como fue mencionado anteriormente, estas líneas fueron obtenidas por mutagénesis por inserción de elementos *P* (Lukacsovich *et al.*, 2001), una técnica que ha sido ampliamente utilizada para identificar genes candidatos a integrar la base genética de diferentes caracteres cuantitativos en distintos organismos modelo (Mackay, 2004). En particular, esta metodología ha sido utilizada recientemente con el objetivo de analizar la variación en la forma del ala de *D. melanogaster* (Dworkin & Gibson, 2006; Weber *et al.*, 2005). La principal diferencia entre esos trabajos y el que se muestra en este capítulo es que en el presente estudio prácticamente se cuadruplica la cantidad de líneas analizadas. Además, estos resultados representan una contribución sustancial al conocimiento en otro sentido, ya que existe poca superposición entre los genes analizados en este estudio y los analizados previamente.

## **Análisis genético-cuantitativo e identificación de mutantes divergentes**

En primera instancia, los análisis genético-cuantitativos revelaron la existencia de una importante variación genética para la conformación del ala, que explica un porcentaje de la varianza fenotípica total comparable al vinculado al tamaño del ala (Capítulo 2). Este porcentaje sugiere que un número importante de genes contribuye a la expresión de la conformación del ala, lo cual está de acuerdo con las estimaciones hechas previamente para este carácter (Birdsall *et al.*, 2000; Dworkin & Gibson, 2006; Mezey *et al.*, 2005; Mezey & Houle, 2005; Weber, 1990; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2005; 2008; Zimmerman *et al.*, 2000). Esto se debe a que más del 63% de las líneas analizadas (utilizando la aproximación multivariada) mostró diferencias significativas para la conformación del ala con respecto al control, al menos en un sexo. Sin embargo, resulta interesante destacar que sólo el 33% de las líneas mostró dichas diferencias en ambos sexos simultáneamente. Estos resultados indican que la base genética de la conformación del ala es en gran medida sexo-específica, a diferencia de estudios previos que mostraron una expresión de los genes implicados mayormente independiente del sexo (Birdsall *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2000). Algunos autores, que han llevado a cabo trabajos relacionados con este tema desde hace casi dos décadas (Weber, 1990; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2005), han analizado siempre un único sexo argumentando que la expresión de los genes relacionados con la conformación del ala es, en gran medida, independiente del sexo; por lo que, oportunamente, citaron (Weber *et al.*, 2005) los estudios que avalarían dicha afirmación (Birdsall *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2000). Otros autores que habían afirmado en un primer trabajo que los sexos difieren en cuanto a la conformación del ala (Mezey & Houle, 2005), utilizaron sólo un sexo para buscar QTLs implicados en su expresión en un trabajo posterior (Mezey *et al.*, 2005). Finalmente, Dworkin y Gibson (2006) analizaron ambos sexos utilizando la misma metodología usada en este estudio y, a pesar de que obtuvieron diferencias significativas entre sexos, no hicieron una referencia especial a dicho resultado ni a las discrepancias derivadas de su comparación con los correspondientes a análisis previos. Los resultados detallados en este capítulo, que fueron obtenidos a partir del análisis de un número de líneas/genes muy superior al empleado en los estudios previos, sustentan la idea de que la base genética de la conformación del ala depende en gran medida del sexo. Por lo tanto, los estudios futuros relacionados con este tema deberían incorporar a ambos sexos en los análisis.

Tomando en consideración tanto a la conformación como al tamaño del ala (carácter analizado más detalladamente en el Capítulo 2), los resultados indican que el 78,5% de las líneas mostró diferencias con respecto al control para alguno de los dos caracteres en uno o ambos sexos. Sin embargo, sólo el 19,4% de las líneas mostró dichas diferencias para ambos caracteres a la vez en uno o ambos sexos. En general, el porcentaje de las líneas en las que la

inserción del elemento *P* afectó sólo a la conformación del ala (44,0%) es mayor que el de las líneas en las que la mutación modificó el tamaño del órgano únicamente (15,2%). Finalmente, los resultados de los análisis de frecuencias sugieren que estos caracteres se comportan de manera independiente en relación con los genes que constituyen su base genética. Estos resultados indican que la base genética de la conformación del ala es en gran medida independiente de la de su tamaño y es consistente con los resultados obtenidos por los estudios previos (Birdsall *et al.*, 2000; Dworkin & Gibson, 2006; Mezey *et al.*, 2005; Mezey & Houle, 2005; Weber, 1990; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2005; 2008; Zimmerman *et al.*, 2000). Por último, al considerar las líneas en las que se vio afectado el tamaño y/o la conformación del ala en machos y en hembras simultáneamente, se notó que la mutación causó un efecto similar en ambos sexos únicamente en el 31,9%. Este valor es levemente inferior al asociado a las líneas que presentaron dichos efectos únicamente en los machos (33,5%) pero supera ampliamente al correspondiente a las líneas específicas de las hembras (23,0%).

Estos resultados reflejan la complejidad de la arquitectura genética de los componentes de la forma del ala; es decir, de su conformación, por un lado, y de su tamaño, por el otro. Aparentemente, la expresión de cada uno de estos caracteres involucraría a gran parte del genoma aunque muchos de los genes implicados serían distintos en cada caso. Asimismo, la expresión de ambos caracteres dependería en gran medida del sexo, tal y como se vio que ocurre con otros caracteres, tanto morfológicos (ver el Capítulo 2; Norga *et al.*, 2003) como fisiológicos (Harbison *et al.*, 2004) y comportamentales (Anholt *et al.*, 2003; Sambandan *et al.*, 2006). En general, los resultados sugieren que la arquitectura genética del tamaño de ala difiere de la de su conformación; tal y como ha sido observado por otros autores en poblaciones naturales de *D. melanogaster* (Gilchrist & Partridge, 2001).

### **Identificación y análisis funcional de los genes candidatos**

El análisis funcional de los 98 genes candidatos identificados para la conformación del ala reveló que casi la mitad de los que presentan alguna anotación está involucrada en el desarrollo y/o en procesos metabólicos, aspecto que coincide con lo detectado por Weber y colaboradores (2005). Asimismo, el análisis de ontología génica mostró que casi todos los productos de los genes anotados forman parte de la célula y que la mitad de ellos está unida a la membrana de una organela. Finalmente, el 75% de los genes con anotación presenta actividad de unión a proteínas y el 27% se une a ácidos nucleicos.

Para la mayoría de los genes candidatos involucrados en el cambio de conformación del ala en *D. melanogaster*, este es el primer registro de dicha función biológica. En efecto, de los 98 genes identificados sólo dos se encuentran en la lista de Weber y colaboradores (2005), *forkhead*

*box*, subgrupo O (*foxo*) y *sgl*; mientras que cuatro están entre los genes identificados por Dworkin y Gibson (2006), *echinoid (ed)*, *mastermind (mam)*, *Trithorax-like (Trl)* y *sd* (Tabla 3.2). Al ampliar la búsqueda de los 98 genes a trabajos más generales relacionados con el desarrollo del ala de *Drosophila* (Butler *et al.*, 2003; Rørth *et al.*, 1998), se encontraron algunos de los genes mencionados (*sd*, *ed*) así como a *misshapen (msn)* (Tabla 3.2). Vale la pena mencionar que, en uno de estos trabajos, en el que se identificaron genes involucrados en el desarrollo del ala en general (Rørth *et al.*, 1998), se utilizaron mutaciones de “ganancia de función”; mientras que en el otro se llevó a cabo un estudio acerca de los patrones de expresión génica en el ala utilizando microarreglos de ADN (Butler *et al.*, 2003). Finalmente, los resultados de una búsqueda de los 98 genes en Flybase (quinta publicación) reveló una posible asociación entre otros 15 y algún fenotipo relacionado con el desarrollo del ala y/o la disposición de sus venas: *tartan (trn)*, *tramtrack (ttk)*, *Spichthyin (spict)*, *PAPS synthetase (Paps)*, *Protein kinase 61C (Pk61C)*, *Merlin (Mer)*, *Muscleblind (mbl)*, *NFAT*, *jing*, *boule (bol)*, *amn*, *headcase (hdc)*, *wing blister (wb)*, *inv*, *LanA* (Tabla 3.2).

Dada la gran cantidad de genes que aparentemente afectan a la conformación del ala, el análisis se centró en las mutaciones que generaron las modificaciones más extremas con respecto al control considerando las dos primeras dimensiones analizadas. Sólo dos de estas mutaciones causaron cambios conformacionales extremos en ambos sexos simultáneamente, la que afectó a *CG6175* y la producida en *sd*. El resto de las mutaciones, que afectaron diferencialmente a machos y a hembras, están asociadas a otros 14 genes. Sólo tres de los 16 genes cuya mutación generó las modificaciones conformacionales más extremas se encuentran dentro de los mencionados anteriormente (*jing*, *LanA* y *sd*). Los 13 genes restantes aparentemente no han sido vinculados con la conformación del ala ni al desarrollo de este órgano (*ade5*, *CG12418*, *CG12717*, *CG32038*, *CG32685*, *CG6175*, *CG6540*, *Calreticulin (Crc)*, *division abnormally delayed (dally)*, *Fas3*, *innexin 7 (inx7)*, *Karl* y *l(3)82Fd*). Sin embargo, una revisión de bibliografía relacionada con estos genes (aunque no directamente con los temas mencionados) sugirió posibles nexos entre algunos de ellos y los fenotipos producidos por su mutación. Por un lado, según distintos autores, los proteoglicanos heparan-sulfato ó HSPGs (por su sigla en inglés: *Heparan Sulfate Proteoglycans*) *Dally* y *Dally-like (dlp)* pueden contribuir a la dispersión de Hh en el disco del ala (Bornemann *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005; Takei *et al.*, 2004; Takeo *et al.*, 2005). Aparentemente, la expresión de *dally* en este disco está controlada por los mismos caminos de señalización que regulan la expresión de *Tkv* por lo que podría ser un co-receptor de Dpp que contribuya a darle forma al gradiente de Dpp (Fujise, *et al.*, 2003). Finalmente, *Dally* podría ser importante para la señalización de corto alcance de Wg (Eaton, 2006). Por lo tanto, la mutación de *dally* podría haber afectado el posicionamiento de las venas del ala a través de un

cambio en alguna de estas rutas de señalización lo que habría llevado a una modificación en la conformación del ala que resultó ser más extrema (en relación con el efecto de otras mutaciones) en los machos. Por otro lado, existe abundante información relacionando a los genes *jing*, *LanA* y *sd* con modificaciones del ala.

*jing* codifica un factor de transcripción requerido para el desarrollo del álula y de las venas del ala (Culi *et al.*, 2006). La mutación de *jing* está generalmente asociada a una disminución o ausencia de diferenciación de las venas aunque la penetrancia es baja y varía con la vena afectada (Culi *et al.*, 2006). Por ejemplo, la parte distal de L4 y L5 así como ACV y PCV son muy sensibles a la pérdida de *jing* (Culi *et al.*, 2006). Además, *jing* es indispensable para la diferenciación del álula ya que su mutación causa una reducción en su tamaño y su fusión con la parte principal del ala (Culi *et al.*, 2006). Entonces, la mutación de *jing* podría haber afectado el desarrollo de las venas del ala y, de esta manera, podría haber generado cambios en su conformación, aunque este efecto fue observado específicamente en las hembras.

*LanA* (igual que *wb*, otro gen cuya mutación afectó la conformación del ala, aunque no de forma tan extrema como *LanA*) codifica una de las cadenas que conforman el heterodímero de laminina, un ligando de la matriz extracelular que se une a las integrinas de posicionamiento específico (Brown *et al.*, 2000). La pérdida de función de estas integrinas en el ala causa la pérdida de adhesión entre las dos caras que la conforman lo que genera una burbuja (*blister*) llena de líquido (Brown *et al.*, 2000; Fristrom *et al.*, 1993). De esta manera, la mutación de *LanA* podría interferir con el funcionamiento normal de estas integrinas causando una modificación en el desarrollo y, por lo tanto, en la conformación del ala, que resultó ser más extrema (en relación con el efecto de otras mutaciones) en los machos.

Finalmente, tal y como se ha adelantado en el Capítulo 2, *sd* ha sido relacionado ampliamente con la morfogénesis del ala (por ejemplo, Legent *et al.*, 2006). Los mutantes de *sd* suelen exhibir defectos que incluyen la falta de zonas del margen del ala (Campbell, 1991). *sd* es un gen efector en el camino de señalización de Wg, requerido para la expresión temprana de *vestigial* (*vg*) el cual, a su vez, es necesario para el mantenimiento posterior de *sd* (Varadarajan & VijayRaghavan, 1999). Como la expresión temprana de ambos genes no requiere de la de Wg, *sd* y *vg* son los genes específicos del desarrollo del ala que se expresan primero reflejando el inicio de la especificación del ala (Williams, 1993). La identidad y la proliferación celular en el ala requieren del factor de transcripción dimérico formado por Vg y Sd. Sd es una proteína que se une a ADN de manera específica a través de su dominio TEA (por su sigla en inglés: *Transcriptional Enhancer Activator*) mientras que Vg funciona como un activador de la transcripción (Halder *et al.*, 1998; Simmonds *et al.*, 1998). La relación cuantitativa entre ambas proteínas es crítica para el desarrollo correcto del ala y está regulada por genes vinculados al

ciclo celular lo que permitiría asegurar la proliferación celular normal (Legent *et al.*, 2006). El rol tan importante de *sd* en la morfogénesis del ala podría explicar el efecto tan pronunciado de la mutación de este gen tanto en el tamaño como en la conformación de este órgano en ambos sexos (Tabla 3.2). Sin embargo, hay que tener en cuenta que otra mutación, que se produjo aparentemente en una región muy cercana del mismo gen (BG02605), sólo causó un aumento en el tamaño del ala de los machos (Tabla 3.2). Estas diferencias podrían deberse a que las mutaciones afectaron a distintos sitios de *sd* lo que, a su vez, generó un efecto fenotípico diferente en cada línea mutante. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, las mutaciones podrían haber afectado determinados sitios de *sd* de forma tal de que el producto resultante (en el caso de existir) no pueda unirse adecuadamente al ADN y/ó a Vg. Otros estudios más específicos podrían ayudar a dilucidar la causa de los cambios fenotípicos en cada caso.

En conclusión, los resultados presentados en este capítulo apoyan la idea de que la arquitectura genética de la conformación del ala es compleja y está constituida por muchos genes que contribuyen a su expresión principalmente de manera sexo-específica. Particularmente, su base genética, que es relativamente independiente de la del tamaño del ala, está compuesta por genes relacionados con el desarrollo del organismo y sus funciones metabólicas así como por genes asociados a funciones más específicas vinculadas a la morfogénesis. Otros estudios más específicos podrían ayudar a confirmar la participación de estos genes en el posicionamiento de las venas del ala de forma tal de determinar su conformación. Particularmente, estos trabajos quizás permitan asignar a cada uno de los distintos genes a un determinado camino de señalización de los mencionados anteriormente de forma tal de profundizar el conocimiento actual acerca del desarrollo del ala de *Drosophila*.



---

## **Capítulo IV**

Análisis de la plasticidad fenotípica de un grupo de genes en relación a distintos caracteres morfológicos en *D. melanogaster*.

---

### **Resumen**

Los estudios destinados a conocer la arquitectura genética de un carácter cuantitativo requieren saber si los genes implicados en su expresión tienen efectos diferenciales sobre el fenotipo analizado bajo distintas condiciones ambientales. Debido a esto, se utilizaron 42 de las 191 líneas BDGP estudiadas a 25°C analizar su expresión en relación a los caracteres de tamaño corporal y la conformación del ala a 17°C. En general, los resultados de los distintos análisis fueron similares a los obtenidos a mayor temperatura. El análisis general de todas las líneas criadas en ambas temperaturas, realizado separadamente para cada carácter, reveló diferencias significativas entre los sexos y las temperaturas prácticamente en todos los casos. Los resultados indican que, tanto los caracteres estudiados como el efecto fenotípico de las distintas mutaciones mostraron cierta plasticidad con el cambio de temperatura. Los análisis realizados para cada carácter, en machos y hembras por separado, revelaron la existencia de una importante variación genética que mostró una fuerte dependencia de la temperatura en todos los casos. Los resultados de la correlación genética entre las mediciones de cada carácter en distintos ambientes indican que un número de genes moderado, que parece ser algo mayor en el caso de la conformación del ala que en el de los caracteres vinculados al tamaño corporal, controla la expresión de los distintos caracteres en ambas temperaturas. La interacción entre el genotipo y el ambiente pudo ser explicada predominantemente por las desviaciones de la correlación perfecta entre temperaturas (el cambio de rango) en todos los casos. En términos generales, los resultados de este capítulo resaltan la necesidad de estudiar la expresión de los genes que conforman la base genética de un carácter en distintos ambientes cuando se pretende profundizar en el conocimiento de la arquitectura genética de dicho carácter. Particularmente, los resultados sugieren que determinados genes parecen tener alguna relación con el tamaño y/o la forma de los órganos en distintas temperaturas, por lo que sería interesante realizar más estudios que permitan comprender su rol en la regulación del crecimiento.

## Introducción

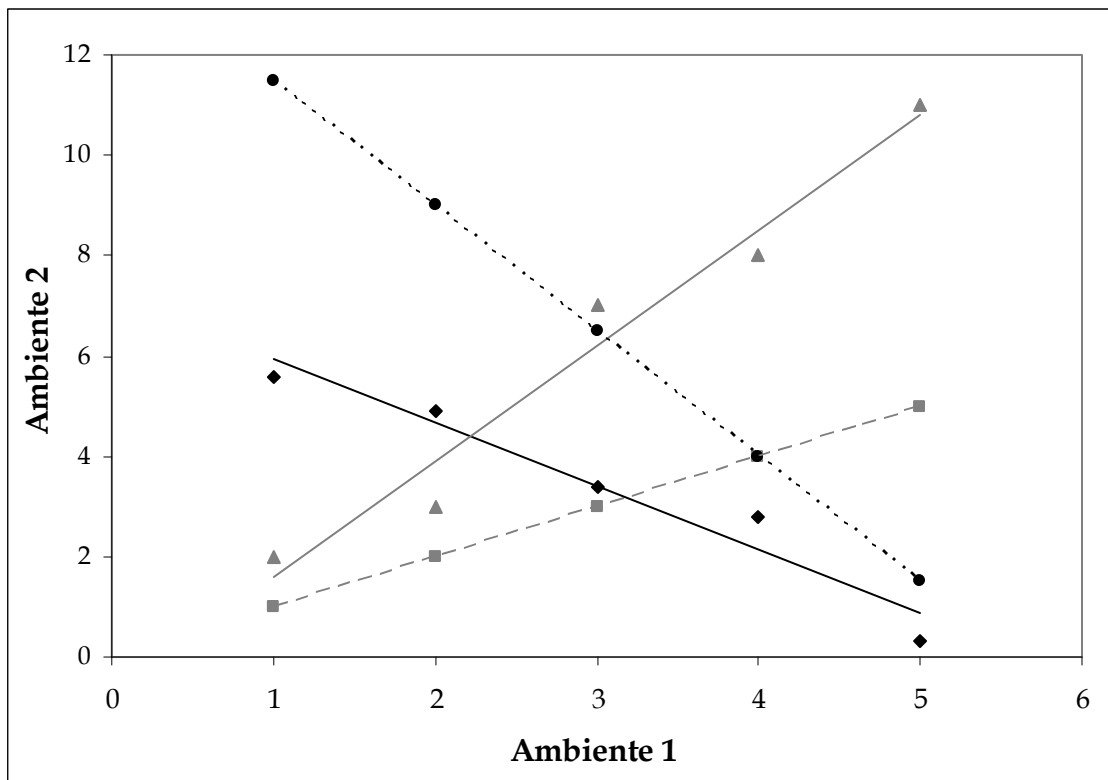
Desde los albores de la genética cuantitativa se sabe que el valor fenotípico de un carácter habitualmente se ve influenciado tanto por el genotipo como por el ambiente en el que este se expresa. Es por esto que, tal y como fue anticipado en el Capítulo 1, los estudios destinados a conocer la arquitectura genética de un carácter cuantitativo requieren saber si los genes implicados en su expresión tienen efectos diferenciales sobre el fenotipo analizado bajo distintas condiciones ambientales (Anholt & Mackay, 2004).

El conjunto de fenotipos que puede producir un único genotipo al ser expuesto a diferentes condiciones ambientales se denomina *norma de reacción* desde que Schmalhausen utilizó dicho término con su sentido actual en el libro *Factors of Evolution* en 1949 (Schlichting & Pigliucci, 1998). De manera formal se lo podría definir como el cambio sistemático en la expresión media de un carácter fenotípico que ocurre como consecuencia del cambio sistemático de una determinada variable ambiental (de Jong, 1990). El término *plasticidad fenotípica* se refiere a la existencia de dicha variación y puede definirse formalmente como el cambio del fenotipo medio expresado por un determinado genotipo en diferentes macroambientes (Via, 1987). La existencia de tal variabilidad ha sido demostrada en innumerables estudios (ver ejemplos en Roff, 1997, págs. 197-198) y a veces puede ser tan grande que se llega a clasificar a individuos de una misma especie como de especies distintas por sus espectaculares diferencias debidas a respuestas plásticas extremas (Schlichting & Pigliucci, 1998). Las normas de reacción pueden ser más o menos plásticas, es decir, el fenotipo puede cambiar en mayor o menor medida en consonancia con el ambiente. Debido a esto se puede decir que, aunque los términos *plasticidad fenotípica* y *norma de reacción* suelen utilizarse como sinónimos, la plasticidad siempre se refiere a una norma de reacción, pero una norma de reacción no es necesariamente plástica.

En ese sentido, un genotipo puede producir un mismo fenotipo independientemente del ambiente. Este fenómeno se denomina *canalización* y fue propuesto originalmente por Waddington (1942). Un concepto que suele ser confundido con el anterior es el de *homeostasis*, que es la propiedad de un organismo de mantener un estado estable ante condiciones variables a través de la coordinación de procesos fisiológicos complejos (Lerner, 1954). Sin embargo, cuando la selección natural actúa sobre mecanismos fisiológicos que pueden alterar la estabilidad del fenotipo a lo largo de su ontogenia, la canalización es el proceso evolutivo que altera el desarrollo del organismo (Schlichting & Pigliucci, 1998). Por lo tanto, sólo cuando el término canalización es definido como el producto de un proceso tiene el mismo significado que la homeostasis (Schlichting & Pigliucci, 1998).

Schlichting y Pigliucci (1998) distinguen dos formas de control genético de las respuestas plásticas. Por un lado, *la sensibilidad alélica*, que tiene que ver con la respuesta de un locus en particular ante un cambio en las condiciones ambientales. Esta respuesta podría deberse a un cambio en la cantidad o actividad del producto del gen y podría variar entre diferentes alelos. Por otro lado, *el control regulador*, que está vinculado a la regulación de la actividad génica por la acción de un interruptor génico. Esta actividad dependería del ambiente y resultaría en una respuesta fenotípica de tipo “umbral”. Según estos autores la sensibilidad alélica sería una forma pasiva de respuesta plástica que puede ser adaptativa o no y que puede resultar en una variedad de efectos pleiotrópicos en los fenotipos (Schlichting & Pigliucci, 1998). La plasticidad reguladora, en cambio, representaría una respuesta plástica activa por parte del organismo, preferentemente adaptativa, que se debería a la acción epistática de genes relacionados con la plasticidad (Schlichting & Pigliucci, 1998). Sin embargo, Roff (1997) plantea que los dos tipos de control genético planteados por Schlichting y Pigliucci (1998) no representan necesariamente la base de las respuestas discretas y continuas y que no se puede determinar el tipo de regulación genética a partir de la expresión fenotípica del carácter.

Las normas de reacción pueden ser representadas de distintas maneras (Schlichting & Pigliucci, 1998). En la forma más familiar, el valor fenotípico de un carácter se grafica en función de un conjunto de condiciones ambientales. De manera alternativa, los valores de un carácter en un ambiente dado pueden ser graficados en función de sus valores en un segundo ambiente. Sin embargo, la visualización gráfica de las normas de reacción depende de la aproximación al concepto de norma de reacción que se utilice. La aproximación *del estado de carácter*, que fue propuesta inicialmente por Falconer, está completamente formulada como un modelo genético-cuantitativo (Falconer, 1952; Via, 1987; Via & Lande, 1985). Según esta visión un carácter medido en dos ambientes diferentes puede ser considerado como dos caracteres genéticamente correlacionados. Gráficamente, si los valores fenotípicos de los genotipos estimados en dos ambientes diferentes muestran una correlación perfecta y positiva ( $r=1$ ), los caracteres presentan una base genética idéntica (Figura 4.1). En cambio, si dicha correlación es perfecta y negativa ( $r=-1$ ) los caracteres tienen bases genéticas totalmente independientes entre si (Figura 4.1). Por último, el coeficiente de correlación estará entre  $-1$  y  $1$  si los caracteres en cuestión poseen una base genética compartida pero no idéntica (Figura 4.1).



**Figura 4.1:** Representación gráfica de las normas de reacción según la aproximación del *estado de carácter*, la cual considera que un carácter medido en dos ambientes diferentes puede ser considerado como dos caracteres genéticamente correlacionados. Si la correlación es perfecta y positiva ( $r=1$ ), la base genética de los caracteres es la misma (■); si es perfecta y negativa ( $r=-1$ ), los caracteres tienen bases genéticas totalmente independientes entre sí (●); y si el coeficiente de correlación está entre  $-1$  y  $1$ , los caracteres poseen una base genética compartida pero no idéntica (▲ y ◆).

A todo lo anterior se debe agregar que distintos genotipos pueden responder de manera diferente ante las mismas variaciones ambientales. La variación en las respuestas, es decir, la variación en las normas de reacción, se manifiesta en la interacción entre el genotipo y el ambiente. En principio, la relación entre la norma de reacción de diferentes genotipos ante cierta variación en las condiciones ambientales puede darse de las siguientes cinco maneras que se representan en la Figura 4.2:

a) Hay diferencias significativas entre los genotipos en cada ambiente (el factor genotipo,  $G$ , es significativo), pero los efectos son idénticos en los dos ambientes (el factor ambiente,  $A$ , no es significativo). Las normas de reacción no son idénticas pero son paralelas y su pendiente es nula (no son plásticas). En este caso no existe interacción entre el genotipo y el ambiente (la interacción entre ambos factores,  $G \times E$ , no es significativa).

b) Hay diferencias significativas entre los genotipos en cada ambiente ( $G$  es significativo) y existen diferencias entre las medias de los valores fenotípicos en los distintos ambientes ( $A$  es significativo) pero los diferentes genotipos reaccionan de la misma manera ante el cambio

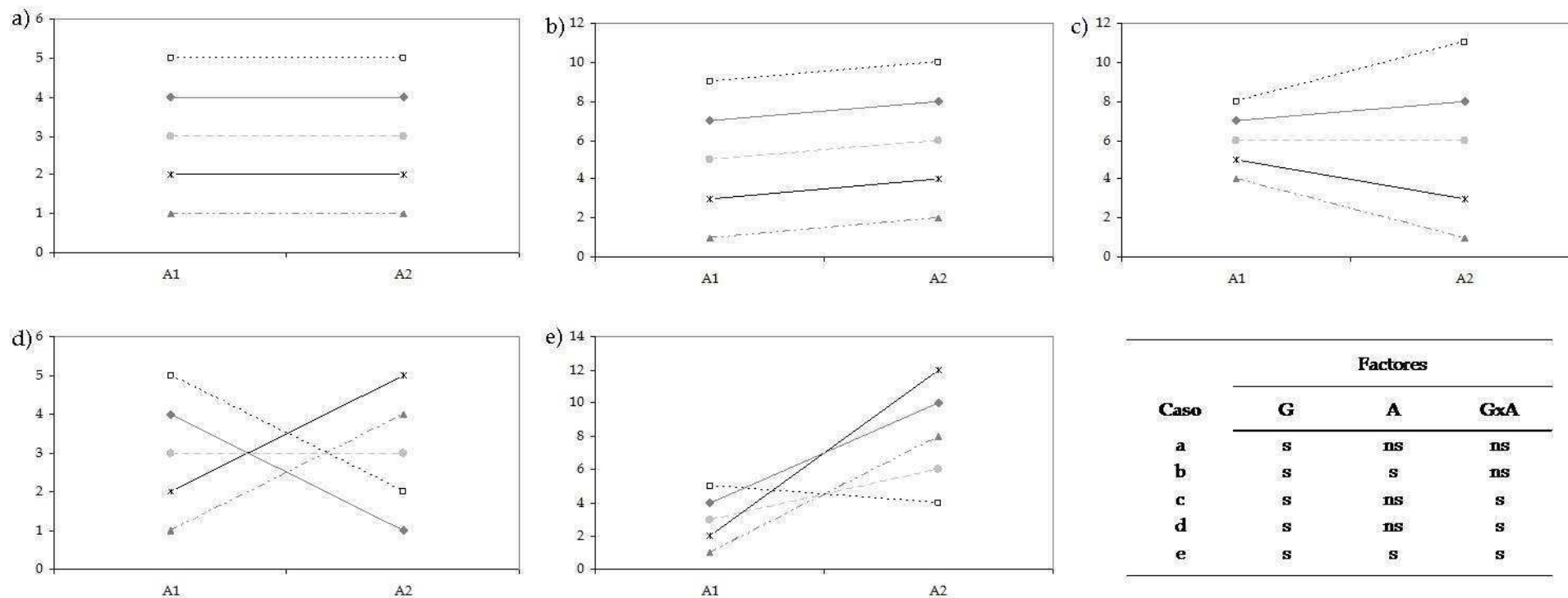
ambiental. Las normas de reacción no son idénticas pero son paralelas y su pendiente no es nula (son plásticas). En este caso tampoco existe interacción genotipo ambiente ( $G \times E$  no es significativo).

c) Hay diferencias significativas entre los genotipos en cada ambiente ( $G$  es significativo) pero no existen diferencias entre las medias de los valores fenotípicos en los distintos ambientes ( $A$  no es significativo) debido a que existen diferencias en la varianza fenotípica entre los ambientes: en el ambiente 1, la diferencia entre los valores fenotípicos medios de los genotipos es mucho menor que en el ambiente 2. En este caso, las normas de reacción no son paralelas lo que indica que existe interacción genotipo ambiente ( $G \times E$  es significativo). Esta situación se denomina comúnmente *cambio de escala*.

d) Hay diferencias significativas entre los genotipos en cada ambiente ( $G$  es significativo) pero no existen diferencias entre las medias de los valores fenotípicos en los distintos ambientes ( $A$  no es significativo). Sin embargo, en este caso no existen diferencias en la varianza fenotípica entre los ambientes aunque los genotipos alternativos tienen efectos fenotípicos diferentes en distintos ambientes. En este caso, las normas de reacción tampoco son paralelas por lo que existe interacción genotipo ambiente ( $G \times E$  significativo). Esta situación se denomina comúnmente *cambio de rango*.

e) Hay diferencias significativas entre los genotipos en cada ambiente ( $G$  es significativo) y existen diferencias entre las medias de los valores fenotípicos en los distintos ambientes ( $A$  es significativo). Asimismo, los genotipos alternativos tienen efectos fenotípicos diferentes en ambientes distintos y existen diferencias en la varianza fenotípica entre los ambientes: en el ambiente 1, la diferencia entre los valores fenotípicos medios de los genotipos es menor que en el ambiente 2. Dado que las normas de reacción no son paralelas, existe interacción genotipo ambiente ( $G \times E$  significativo) pero, en este caso, existe tanto un *cambio de escala* como un *cambio de rango*.

Suponiendo que el carácter analizado presenta alguna relación con el *fitness*, los casos d) y e) son los únicos en los que ningún genotipo presenta un valor adaptativo máximo en los dos ambientes. En este tipo de casos, en los que el orden de los valores de eficacia biológica de los genotipos puede ser muy diferente en distintas condiciones ambientales, la selección podría favorecer a distintos genotipos en ambientes diferentes (Thomas & Barker, 1993). De esta manera la plasticidad podría ser adaptativa en poblaciones que regularmente experimentan ambientes heterogéneos debido a que distintos genotipos podrían expresarse en ambientes diferentes (Ungerer *et al.*, 2003). Esto, a su vez, permitiría mantener la variabilidad genética intrapoblacional dado que distintos genotipos presentarían el mejor fenotipo en relación con cada ambiente (Ungerer *et al.*, 2003).



Uno de los factores ambientales más importantes que afecta al tamaño corporal en los animales ectotermos es la temperatura (Atkinson & Sibly, 1997). Como fue adelantado en el Capítulo 1, los insectos criados a temperaturas menores muestran tamaños corporales mayores (Atkinson, 1994). Davidowitz y Nijhout (2004) mostraron que, en *Manduca sexta*, las tasas de crecimiento aumentan linealmente con la temperatura y propusieron una explicación simple para la disminución simultánea del tamaño corporal. Estos autores mostraron que el intervalo hasta el cese del crecimiento (ICG; ver el Capítulo 1) decrece marcadamente a medida que aumenta la temperatura y el efecto negativo que esto genera sobre el tamaño corporal hace más que contrarrestar el aumento de tamaño debido a una mayor tasa de crecimiento. Por lo tanto, se supone que un ICG más largo a temperaturas más bajas permite un crecimiento neto mayor, aún cuando la tasa de crecimiento es menor.

El efecto de la temperatura sobre el tamaño corporal, estimado a partir de la medición de distintos caracteres, ha sido ampliamente estudiado en *Drosophila* (por ejemplo, Barker & Krebs, 1995; David *et al.*, 2006c; Gebhardt & Stearns, 1993; Gilchrist & Huey, 2004; Loeschcke *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 1997; Noach *et al.*, 1996; Nunney & Cheung, 1997; Scheiner *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 2000). El aumento del tamaño con la disminución de la temperatura ha sido generalmente atribuido al incremento del tamaño celular más que al de la cantidad de células (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 2002; Delcour & Lints, 1966; de Moed *et al.*, 1997; French *et al.*, 1998; Partridge *et al.*, 1994; Robertson, 1959; Stevenson *et al.*, 1995). Varios de estos trabajos se llevaron a cabo utilizando el ala de *Drosophila* como modelo y, mientras en algunos de ellos se observó que el cambio conformacional implica predominantemente al compartimiento posterior; casi todos han demostrado que las alas se alargan en forma desproporcionada a medida que la temperatura disminuye (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 1998; Birdsall *et al.*, 2000; Bitner-Mathé & Kaczko, 1999; Debat *et al.*, 2003; Imasheva *et al.*, 2000; Kjærsgaard *et al.*, 2007; Matta & Bitner-Mathé, 2004; Moreteau *et al.*, 1998).

En este contexto, los objetivos de este capítulo son:

- Realizar un análisis genómico funcional similar a los que formaron parte de los Capítulos 2 y 3 pero a una temperatura diferente. En particular, una parte de las líneas estudiadas a 25°C fueron analizadas a 17°C. De esta manera, se identificaron los loci asociados a ese conjunto de líneas que contribuyen a la expresión de los caracteres vinculados al tamaño corporal y a la conformación del ala a menor temperatura en *D. melanogaster*.
- Analizar la expresión de dichas líneas y de los loci correspondientes en ambos ambientes simultáneamente considerando tanto los caracteres vinculados al tamaño corporal como la conformación del ala. De esta manera, se estudió la norma de reacción

de esos genes de forma tal de establecer si muestran plasticidad fenotípica al criar a los individuos de las respectivas BDGPs a dos temperaturas diferentes. Además, este análisis permitió caracterizar a la interacción entre el genotipo y el ambiente cuantificando el cambio de escala y el cambio de rango.

## **Materiales y métodos**

### ***Stocks de Drosophila***

Se seleccionaron al azar 42 de las 191 líneas BDGP mencionadas en los Capítulos 2 y 3 para estudiar las bases genéticas de caracteres vinculados al tamaño corporal y a la conformación del ala en individuos criados a 17°C (cabe recordar que en ese caso las moscas se criaron a 25°C). El estudio relacionado con los caracteres vinculados al tamaño corporal, similar al del Capítulo 2 de esta tesis, conformó la tesis de licenciatura de Marcos Imberti (2008). Sin embargo, el análisis asociado a la conformación del ala, análogo al del Capítulo 3 de esta tesis, formará parte de este capítulo. Además, las estimaciones de los caracteres analizados por Imberti (2008) fueron hechas utilizando morfometría clásica. Por lo tanto, este capítulo también incorporará los análisis del tamaño del ala realizados con del estimador obtenido al emplear morfometría geométrica (el tamaño de centroide, TC). Esto permitirá comparar la totalidad de los resultados derivados de los análisis de las 42 líneas criadas a 17°C, por un lado, y a 25°C, por el otro. Asimismo, esto permitirá realizar un análisis conjunto de los datos de forma tal de estudiar la plasticidad fenotípica asociada a los genes vinculados a esas 42 líneas.

### **Diseño Experimental**

Las 42 líneas fueron criadas en un mismo bloque que contenía al control, aplicando el diseño experimental empleado en el Capítulo 2 (para más detalles ver el Anexo Metodológico I) sólo que a 17°C. De esta forma se obtuvieron las moscas adultas utilizadas para estimar los caracteres vinculados al tamaño corporal y a la conformación del ala. Estos individuos fueron disecados y fotografiados por Marcos Imberti en el transcurso de su tesis de licenciatura (2008) de la manera detallada en el Capítulo 2.

### **Caracteres vinculados al tamaño corporal**

Los caracteres vinculados al tamaño corporal medidos en los individuos que se desarrollaron a 17°C son los mismos que en el Capítulo 2: la distancia interocular (DO), el ancho de la cabeza (AC), el largo del tórax (LT) y el tamaño del ala (TA). Las mediciones derivadas de la cabeza y el tórax fueron obtenidas por Marcos Imberti para su tesis de licenciatura (2008). Sin embargo, el tamaño del ala, estimado a partir de TC, se obtuvo en el transcurso de esta tesis utilizando las mismas fotos. La manera en la que se fotografiaron los individuos y se realizaron las mediciones se detalla en el Anexo Metodológico II.



## **Conformación del ala**

La conformación del ala de las moscas adultas se analizó a partir de la estimación de dos variables distintas, similarmente a lo realizado en el Capítulo 3. Por un lado, se utilizó la variable univariada *Distancia de Procrustes* (DP) para realizar un análisis genético-cuantitativo similar al del Capítulo 3, así como un estudio de la plasticidad fenotípica de las líneas (ver más abajo). Por otro lado, se utilizaron las *Deformaciones Relativas* (DR), para realizar un análisis multivariado del cambio en la conformación del ala causado por la inserción del elemento *P*, análogo al del Capítulo 3 (ver más abajo). Ambos tipos de variables fueron obtenidas, igual que las analizadas en el Capítulo 3, a partir de la implementación de una técnica de *Morfometría geométrica* (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II). Nuevamente, los valores de DR correspondientes a los machos y a las hembras se analizaron por separado debido a que se sabe que los sexos difieren en relación con la conformación del ala y, de acuerdo con la técnica utilizada, deben estudiarse por separado (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II).

### **Análisis Estadísticos**

#### Análisis de las líneas criadas a 17°C

En general, los caracteres vinculados al tamaño corporal fueron analizados de la manera detallada en el Capítulo 2 y la conformación del ala fue estudiada como se explicó en el Capítulo 3. Como se mencionó anteriormente, la mayor parte de los análisis relacionados con los caracteres vinculados a la cabeza y el tórax fueron realizados por Marcos Imberti para su tesis de licenciatura (2008). Sin embargo, algunos análisis de los detallados en el Capítulo 2 no fueron incorporados en ese trabajo. Dichos análisis fueron hechos en el marco de esta tesis utilizando las mediciones obtenidas por Imberti (2008) de forma tal de poder comparar sus resultados con los obtenidos en el Capítulo 2. Finalmente, los análisis asociados a los caracteres vinculados al ala fueron hechos utilizando las estimaciones de los caracteres correspondientes obtenidos en el marco de esta tesis para poder comparar sus resultados con los obtenidos en los Capítulos 2 y 3. A continuación se mencionan brevemente todos los análisis hechos en el marco de este capítulo.

#### Análisis de los caracteres de tamaño corporal

*Análisis de correlación genética.* Dado que el estimador del tamaño del ala utilizado a lo largo de esta tesis (TC) presenta valores que difieren en varios ordenes de magnitud con respecto a los demás caracteres, se realizaron nuevamente todas las correlaciones utilizando los valores transformados de las variables de la manera detallada en el Capítulo 2.

*Análisis genético-cuantitativo.* Tal y como se explicó en el Capítulo 2, este análisis se realizó con los valores correspondientes a cada variable por separado. Dado que todos los datos provienen del mismo bloque, no fue necesario transformar los valores como en el Capítulo 2.

Por lo tanto, este análisis se realizó únicamente con la variable estimadora del tamaño del ala, ya que el análisis de los demás caracteres del tamaño corporal se hizo de la misma manera en la tesis de licenciatura mencionada (Imberti, 2008).

*Identificación de las líneas divergentes y de los genes asociados.* Similarmente a lo mencionado en el ítem anterior, este análisis se realizó únicamente con la variable estimadora del tamaño del ala, ya que el análisis de los demás caracteres del tamaño corporal se llevó a cabo, de la manera que ha sido detallada en el Capítulo 2, en la tesis de licenciatura de Imberti (2008).

*Efectos pleiotrópicos de las mutaciones en los distintos caracteres.* Las líneas fueron clasificadas de acuerdo con la cantidad de caracteres que mostraron diferencias significativas con respecto al control, considerando los resultados de los análisis de DO, AC y LT obtenidos por Imberti (2008) y los de TA derivados del ítem anterior. A diferencia del Capítulo 2, no se encontraron líneas que hayan mostrado diferencias con respecto al control en la mayor parte de los caracteres en ambos sexos (tres o cuatro caracteres en cada sexo). Sólo se encontraron líneas que mostraron dichas diferencias en un sexo. Por lo tanto, los valores transformados de las cuatro variables fueron analizados, en cada una de esas líneas por separado, mediante un ANOVA con el factor carácter, tal y como fue explicado en el Capítulo 2.

#### Análisis de la conformación del ala

*Análisis genético-cuantitativo.* Los valores de DP fueron analizados de la misma manera que en el Capítulo 3. Como ya fue explicado en ese capítulo, esta variable es un estimador menos exacto de la conformación del ala (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II), pero permite realizar un análisis conjunto de ambos sexos así como estimar los componentes de la varianza para las fuentes de variación aleatorias.

*Identificación de mutantes divergentes mediante el análisis de DR.* Los valores de DR correspondientes a cada línea fueron comparados con respecto a los del control utilizando un MANOVA, tal y como se explicó en el Capítulo 3. De la misma manera, se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples ( $P_B = 0,0012$ ).

*Identificación de los genes candidatos.* Para identificar los genes potencialmente afectados por la inserción del elemento *P* en las líneas significativas, se realizó una búsqueda bioinformática en el genoma de *D. melanogaster* tal y como fue explicado en el Capítulo 2.

*Visualización de los efectos fenotípicos de los genes candidatos.* Se graficó el cambio conformacional para las líneas que presentaron los valores más extremos con respecto a las dos primeras DR (que son aquellas que explican el mayor porcentaje de la varianza fenotípica total) de la misma manera que en el Capítulo 3.

## Análisis conjunto de las líneas criadas a ambas temperaturas

### Análisis de los caracteres de tamaño corporal

*Análisis de correlación genética.* Para poder realizar un análisis con todas las líneas medidas a distintas temperaturas, los valores correspondientes a cada variable morfológica se transformaron tal y como se explicó en el Capítulo 2. Utilizando estos valores, se realizó un análisis de correlación entre temperaturas para cada variable en cada sexo por separado. En estos análisis se utilizaron, al igual que en los demás, los valores medios de las 42 líneas.

*Efectos pleiotrópicos de las mutaciones en los distintos caracteres.* Las líneas se clasificaron de acuerdo con la cantidad de caracteres que mostraron diferencias significativas con respecto al control, considerando los resultados de los análisis de los cuatro caracteres de tamaño corporal estudiados a ambas temperaturas. Nuevamente, no se encontraron líneas que hayan mostrado diferencias con respecto al control en la mayor parte de los caracteres en ambos sexos y temperaturas. Sólo se encontraron líneas que mostraron dichas diferencias en ambas temperaturas en un sexo. Por lo tanto, los valores transformados de las cuatro variables se analizaron, en cada una de esas líneas por separado, mediante el siguiente modelo de ANOVA:

$$Y = \mu + C + T + C \times T + \epsilon$$

donde C es el efecto del carácter (fijo), con cuatro niveles, que permitió estudiar la existencia de diferencias en la magnitud del cambio entre caracteres; T es el factor temperatura (fijo), con dos niveles y  $\epsilon$  representa al error. Cuando las fuentes de variación C y/o C x T fueron significativos en el análisis de una línea, se identificaron las medias de los caracteres que mostraron diferencias significativas mediante comparaciones a posteriori (contrastes de Tukey HSD).

*Análisis genético-cuantitativo.* Los valores correspondientes a cada variable, transformados como se mencionó anteriormente, fueron analizados de acuerdo al siguiente modelo de ANOVA:

$$Y = \mu + L + T + S + L \times T + L \times S + T \times S + L \times T \times S + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media general del carácter analizado en cada caso; L es el factor línea (aleatorio), con tantos niveles como líneas se utilizaron, que permitió analizar la existencia de varianza genética; S es el factor sexo (fijo), con dos niveles, que permitió estudiar la existencia de diferencias entre sexos; T es el factor temperatura (fijo), con dos niveles, que permitió estudiar la existencia de plasticidad fenotípica definida, en este caso, a partir de las diferencias de expresión de los caracteres investigados a 17°C y a 25°C; y  $\epsilon$  representa al error. Asimismo, para cada variable morfológica se estimó el componente de la varianza fenotípica total explicado por cada fuente de variación aleatoria.

Este modelo es muy complejo ya que incluye una interacción triple aleatoria cuyos cuadrados medios son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a las otras interacciones. A su vez, los cuadrados medios de las interacciones aleatorias de menor orden son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a los factores principales. Dado que la interacción triple y algunas de las interacciones aleatorias de menor orden resultaron significativas, se realizaron ANOVAs separados para cada sexo. Estos ANOVAs de dos factores también presentan una interacción aleatoria cuyos cuadrados medios son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a cada una de las fuentes de variación principales. Por lo tanto, en los casos en los que esta interacción resultó significativa y el efecto de la temperatura no fue aparentemente significativo, se realizaron contrastes para estudiar el efecto real de dicho factor. De esta manera, se pudo estudiar la existencia de plasticidad fenotípica para los caracteres respectivos. Asimismo, para evaluar el efecto del factor línea en dichos casos, se realizaron ANOVAs con los datos correspondientes a cada temperatura por separado. De este modo, se pudo establecer la existencia de variabilidad genética para los caracteres en cuestión. Finalmente, una interacción significativa entre la línea y la temperatura se puede interpretar como una estimación de la interacción genotipo-ambiente ( $G \times A$ ). Esta interacción puede surgir como consecuencia de la existencia de diferencias en la varianza entre líneas en cada ambiente (es decir, en cada temperatura; cambio de escala) y/o como desviaciones de la correlación genética perfecta entre ambientes (es decir,  $r_{GxA} < 1$ ; cambio de rango). La contribución de estas dos fuentes de variación a la interacción  $G \times A$  fue analizada según la ecuación obtenida por Robertson (1959):

$$V_{GxA} = [(\sigma_{A1} - \sigma_{A2})^2 + 2 \times \sigma_{A1} \times \sigma_{A2} \times (1 - r_{GxA})]/2$$

donde  $V_{GxA}$  es el componente de la varianza genotipo  $\times$  ambiente,  $r_{GxA}$  es la correlación genética entre ambientes y  $\sigma_{A1}$  y  $\sigma_{A2}$  corresponden a la raíz cuadrada del componente de la varianza entre líneas en ambos ambientes (17°C y 25°C). El primer término corresponde a las diferencias en la varianza entre líneas entre ambientes y el segundo a desviaciones de la correlación perfecta entre ambientes. Esta correlación es la correlación genética entre las mediciones del mismo carácter en distintos ambientes y, en este caso, refleja el grado en el que los mismos genes controlan la expresión del carácter analizado a distintas temperaturas. El coeficiente de esta correlación se estimó, para cada carácter, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$r_{GxA} = \text{COV}_{A1A2} / \sigma_{A1} \times \sigma_{A2}$$

donde  $\text{COV}_{A1A2}$  es la covarianza de las medias de las líneas medidas a distinta temperatura. Los valores de  $\sigma_{A1}$  y  $\sigma_{A2}$  se obtuvieron a partir de los ANOVAs realizados para cada combinación de sexo y temperatura.

Dado que se emplearon los mismos datos en distintos análisis, se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples ( $P_B = 0,0167$ ).

#### Análisis de la conformación del ala

*Análisis genético-cuantitativo.* Los valores correspondientes a DP, transformados como se explicó en reiteradas oportunidades, fueron analizados de la manera explicada en el apartado anterior, correspondiente a los caracteres de tamaño corporal.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el paquete STATISTICA (StatSoft Inc., 2004).

## **Resultados**

### **Análisis de las líneas criadas a 17°C**

#### Análisis de los caracteres de tamaño corporal

##### Análisis de correlación genética

Se realizaron análisis de correlación para estudiar la relación entre cada par de variables en cada sexo por separado y entre machos y hembras para cada carácter. La correlación genética entre cada par de variables fue positiva y altamente significativa en ambos sexos (Tabla 4.1). El porcentaje de la varianza total explicado por la correlación varió entre el 60% (DO-TA) y el 77% (AC-TA) en hembras y entre el 32% (DO-TA) y el 74% (AC-LT) en machos (Tabla 4.1). El ordenamiento de los pares de variables de acuerdo a dichos porcentajes difiere bastante entre sexos (Tabla 4.1).

En general, estos resultados difieren de los obtenidos para las 191 líneas BDGP estudiadas a 25°C (Tabla 2.1 del Capítulo 2). En primera instancia, los valores del coeficiente de correlación son bastante más altos en el caso de las líneas criadas a 17°C. La única excepción parece ser AC-LT en los machos, que mostró valores similares en ambas temperaturas. Además, el ordenamiento de los pares de variables de acuerdo a dichos valores difiere bastante entre temperaturas considerando a cada sexo por separado. Sin embargo, existen algunas similitudes: la correlación DO-TA presentó los porcentajes más bajos en todos los casos, la correlación AC-LT mostró los mayores valores en los machos a ambas temperaturas y las correlaciones LT-TA y DO-LT ocuparon el segundo y el tercer lugar, respectivamente, en las hembras. Finalmente, el porcentaje de la varianza explicado por la correlación entre caracteres derivados del mismo disco imaginal aumenta un poco en el caso de DO-AC y disminuye en el de LT-TA y ninguno ocupa el primer lugar en el ordenamiento general (Tablas 2.1 del Capítulo 2 y 4.1 de este capítulo).

La correlación genética entre los sexos para cada variable fue positiva y altamente significativa en todos los casos y el porcentaje de la varianza total explicado por la correlación

estuvo entre el 40% y el 50% (Tabla 4.1). En general, cada uno de estos caracteres mostró una correlación menor entre sexos que con los demás caracteres dentro del mismo sexo. La única excepción parece ser DO-TA en los machos, que presentó el coeficiente de correlación más bajo (Tabla 4.1). Esto también constituye una diferencia con respecto a los resultados obtenidos a 25°C, en los que se observó que las únicas correlaciones significativas entre sexos (DO y TA), explicaron un porcentaje de la varianza mayor que con ningún otro carácter dentro del mismo sexo (Tablas 2.1 del Capítulo 2 y 4.1 de este capítulo).

Por último, los resultados en relación a DO, AC y LT son ligeramente diferentes de los obtenidos por Imberti (2008). Como fue mencionado anteriormente, estas pequeñas diferencias probablemente se deben a que en este caso se utilizaron los valores transformados correspondientes a cada una de las variables. En relación con TA, los resultados también presentan ciertas diferencias. En este caso, Imberti (2008), utilizó dos estimadores diferentes, el ancho del ala (AA) y el largo del ala (LA). Los resultados expuestos en este capítulo, derivados del análisis de TC, son generalmente más parecidos a los de LA que a los de AA en las hembras. Sin embargo, el porcentaje de la varianza explicado por la correlación en los distintos casos correspondientes a los machos fue menor para TC en comparación con AA y LA. Similarmente, el coeficiente de la correlación de TC entre los sexos fue un poco menor que el correspondiente a AA y LA.

**Tabla 4.1:** Principales resultados de los análisis de correlación genética de los caracteres vinculados al tamaño corporal (valor de  $r$  y su significancia). Se realizó un análisis de correlación entre cada par de variables en los machos (sobre la diagonal), en las hembras (bajo la diagonal) y entre sexos para cada variable (sobre la diagonal). Los análisis se realizaron utilizando el valor medio de cada línea para cada carácter y sexo.

		Machos			
		DO	AC	LT	TA
Hembras	DO	0,65	0,74	0,72	0,56
	AC	0,81	0,69	0,86	0,78
	LT	0,81	0,80	0,71	0,74
	TA	0,77	0,88	0,84	0,63

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.  
 $p < 0,001$  en todos los casos.

### Análisis genético-cuantitativo

Se realizó un análisis de varianza para determinar si hay variabilidad genética (medido a través del factor línea) para TA, de las diferentes líneas es sexo-dependiente (estimado por la

interacción línea x sexo) y si los sexos presentan variación del tamaño del ala estimado a través de TC. Los resultados del ANOVA mostraron que las tres fuentes de variación fueron altamente significativas y que las fuentes de variación genéticas (línea y línea x sexo) juntas explicaron el 21% de la varianza fenotípica total (Tabla 4.2). Como era de esperar, las hembras mostraron valores significativamente mayores que los machos. Si bien, estos resultados son similares a los obtenidos por Imberti (2008) para AA y LA, los componentes de varianza de las fuentes de variación aleatorias fueron algo menores.

Al considerar los resultados de todos los caracteres estudiados a 17°C y a 25°C, se notaron pequeñas diferencias relacionadas, sobretudo, con el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por las fuentes de variación genéticas (Tabla 2.2 del Capítulo 2 y Tabla 4.2 de este capítulo). La suma de estos porcentajes es mayor en el caso de DO y es menor en el de los demás caracteres considerando los resultados obtenidos a 17°C en relación a los derivados del análisis de los datos de 25°C (Tablas 2.2 del Capítulo 2 y 4.2 de este capítulo). Estos resultados sugieren que la arquitectura genética de los caracteres vinculados al tamaño corporal difiere entre las distintas temperaturas de cría. Sin embargo, las diferencias también estar relacionadas con que el análisis realizado a 25°C implicó un número mucho mayor de líneas lo cual conllevó la necesidad de unificar los datos provenientes de distintos bloques lo que, a su vez, obligó a transformar los datos.

**Tabla 4.2:** Principales resultados de los ANOVAs con valores de cada carácter vinculado al tamaño corporal de acuerdo con un modelo con los factores línea (aleatorio) y sexo (fijo). Se muestra el valor de  $F$  y su significancia para cada fuente de variación correspondiente a cada ANOVA así como el porcentaje de la varianza explicado por cada fuente de variación aleatoria entre paréntesis.

Fuente de variación	DO §	AC §	LT §	TA
Línea	3,52 (8)	5,01 (9)	5,32 (8)	3,92 (15)
Sexo	100,07	343,95	636,35	463,81
Línea x Sexo	2,57 (16)	3,11 (26)	2,87 (26)	2,30 (6)

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. § Datos de Imberti (2008).  $p < 0,001$  en todos los casos. En todos los casos, los machos mostraron valores medios mayores que las hembras.

#### Identificación de las líneas divergentes y de los genes asociados

El análisis mostró que el 24% de las líneas (10 de las 42 líneas estudiadas) difirieron significativamente de la línea control para TA (Tabla 4.3). Ninguna de estas líneas mostró diferencias con respecto al control en ambos sexos simultáneamente (Tabla 4.3). Cuatro de ellas

mostraron dichas diferencias en las hembras y seis en los machos (Tabla 4.3). Resulta interesante destacar que ninguna línea mostró un efecto fenotípico similar en ambos sexos (Tabla 4.3). De hecho, el efecto fenotípico de todas las mutaciones fue diferente entre sexos, aumentando TA en los machos y disminuyéndolo en las hembras (Tabla 4.3). Esto está de acuerdo con el efecto significativo de la interacción entre la línea y el sexo mencionado anteriormente, que ya sugería que el efecto fenotípico de las inserciones depende del sexo (Tabla 4.3). Asimismo, este resultado es consistente con los resultados relacionados con los demás caracteres obtenidos tanto a 17°C (Imberti, 2008) como a 25°C (Capítulo 2). De todos modos vale la pena mencionar que la cantidad de líneas que mostraron diferencias significativas con respecto al control utilizando el estimador TC es sensiblemente menor que al emplear los otros estimadores del tamaño del ala. Sin embargo, se debe resaltar que las cuatro líneas que mostraron dichas diferencias en las hembras son las únicas que disminuyeron LA en ese sexo (sólo BG00373 mostró simultáneamente una disminución en AA). Asimismo, las líneas que mostraron esas diferencias en los machos aumentaron en casi todos los casos tanto AA como LA (la única excepción la constituye BG01822 en la que sólo aumentó AA). Por un lado, en tres de las líneas significativas para las hembras se pudo identificar un gen asociado a la inserción del elemento *P*; *CG11226* en BG00373, *Spichthyin (spict)* en BG01014 y *Btk family kinase at 29A (Btk29A)* en BG01290 (Tabla 4.3). Por otro lado, en las seis líneas significativas para los machos se pudo identificar al menos un gen asociado a la mutación; *CG13333* y *CG13334* en BG00369, *CG17574* en BG00992, *CG13130* y *big brain (bib)* en BG01735, *CG11226* en BG01780, *IGF-II mRNA-binding protein (Imp)* en BG01822 y *easily shocked (eas)* en BG02042 (Tabla 4.3).

Por último, al comparar los resultados de estos análisis con los de aquellos realizados a 25°C, se pudo observar que ninguna de las líneas significativas a 17°C mostró diferencias significativas con respecto al control cuando fue estudiada a mayor temperatura (Tabla 4.3). En cambio, muchas de las líneas que no presentaron diferencias significativas en relación al control a menor temperatura sí lo hicieron cuando fueron estudiadas a 25°C; ya sea sólo en las hembras (BG01573 y BG02690), únicamente en los machos (BG00386, BG01726, BG01902, BG01912 Y BG02239) o en ambos sexos (BG01011 Y BG02830; Tabla 4.3).



**Tabla 4.3:** Líneas en las que la inserción del elemento *P* afectó a uno o más caracteres vinculados a la morfología del ala en uno o ambos sexos.

Línea	Gen candidato	Sitio de inserción del elemento <i>p[GT1]</i>	Ubicación citogenética	Tamaño		Conformación	
				♂	♀	♂	♀
BG00369	<i>CG13333 / CG13334</i>	A 856 pb del extremo 5' / A 484 pb del extremo 3'	50B1	▲*	ns	***	***
BG00373	<i>CG11226</i>	A 1500 pb del extremo 5'	80A4	ns	▼***	***§	***§
BG00386	<i>NMDA receptor 1 (Nmdar1)</i>	A 302 pb del extremo 3'	83A6-A7	ns§	ns	***§	***
BG00524	RNA no codificante 001:3R	A 430 pb del extremo 5'	87F14	ns	ns	ns§	***§
BG00737	<i>Heat shock protein 27 (Hsp 27)</i>	En el gen	67B1	ns	ns	***§	***
BG00930	No existe secuencia			ns	▼**	ns	***§
BG00992	<i>CG17574</i>	En el gen	49D4-49D6	▲*	ns	ns	***
BG01011	<i>misshapen (msn)</i>	A 1402 pb del extremo 3'	62E6-E7	ns§	ns§	ns§	***§
BG01014	<i>Spichthyin (spict)</i>	En el gen	33F3	ns	▼*	**§	***§
BG01028	<i>Trithorax-like (Trl)</i>	En el gen	70F4	ns	ns	***§	***§
BG01081	<i>Glutamate oxaloacetate transaminase 1 (Got1)</i>	En el gen	52E7	ns§	ns	***§	***
BG01214	<i>sugarless (sgl) / CG10064</i>	A 100pb del extremo 5' / A 350 pb del extremo 3'	65D5	ns	ns	***§	***
BG01218	<i>CG6767</i>	En el gen	67C5	ns	ns	ns§	***§
BG01290	<i>Btk family kinase at 29A (Btk29A)</i>	En el gen	29A2	ns	▼**	ns§	***
BG01339	<i>cricketlet (clt)</i>	En el gen	57F4	ns	ns	***	***
BG01354	<i>CG30492</i>	A 400 pb del extremo 5'	43E5	ns	ns	***§	***§
BG01488	<i>Musashi (msi)</i>	En el gen	96E2-96E4	ns	ns	***	***
BG01548	<i>A-Esterase-10 (a-Est10)</i>	A 2624 pb del extremo 5'	84D9	ns	ns	***§	***§
BG01573	<i>forkhead box, sub-group O (foxo)</i>	A 6088 pb del extremo 3'	88A5-A7	ns	ns§	ns	***
BG01672	<i>CG14591</i>	En el gen	42A8	ns	ns	***	***
BG01683	<i>CG32572</i>	En el gen	15A3	ns	ns	***§	***
BG01716	<i>PAPS synthetase (Paps)</i>	A 800 pb del extremo 3'	76D1-2	ns	ns	ns§	***§

(continúa en la próxima página)

Continuación de la Tabla 4.3

BG01726	CG11382	A 197 pb del extremo 3'	1E4	ns§	ns	***	***§
BG01735	CG13130 / <i>big brain (bib)</i>	En los genes	30F5	▲ **	ns	***	***
BG01780	CG11226	En el gen	80A4	▲ *	ns	***	***
BG01822	<i>IGF-II mRNA-binding protein (Imp)</i>	En el gen	9F2-9F4	▲ ***	ns	***	***
BG01902	<i>mastermind (mam)</i>	En el gen	50C23-D3	ns§	ns	***§	***
BG01912	<i>Pxb</i>	En el gen	89A1-A2	ns§	ns	***	***
BG01990	CG30492	A 501 pb del extremo 3'	43E5-E7	ns	ns	ns	***§
BG02042	<i>easily shocked (eas)</i>	En el gen	14B7	▲ *	ns	ns	***
BG02088	CG15309	En el gen	9B4	ns	ns	ns	***§
BG02102	<i>Nnfla</i>	A 1670 pb del extremo 5'	57A6	ns	ns	ns	***
BG02106	CG31145	En el gen	95A7	ns	ns	ns	***§
BG02157	CG8177	A 2746 pb del extremo 3'	67C7-C8	ns	ns	ns§	***
BG02159	CG32666	En el gen	10C1-C5	ns	ns	ns	***
BG02239	CG11550	A 9536 pb del extremo 5'	100D1	ns§	ns	***	***
BG02462	CG6301	A 1398 pb del extremo 5'	53D11	ns	ns	***§	***§
BG02563	<i>Capricious (caps)</i>	A 200 pb del extremo 5'	70A3	ns	ns	ns§	ns
BG02690	CG14478	En el gen	54B16	ns	ns§	***§	***§
BG02747	<i>rutabaga (rut)</i>	A 100 pb del extremo 5'	12F4	ns	ns	***	***
BG02823	<i>scylla (scyl)</i>	A 278 pb del extremo 5'	68B4-68C1	ns	ns	***	***
BG02830	<i>Lipid storage droplet-2 (Lsd-2)</i>	A 61 pb del extremo 5'	13A8-A9	ns§	ns§	***§	***§

ns: no significativo, \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001. Para conformación p=ns si: p>P<sub>B</sub>=0,0012. § significativo a 25°C.

### Efectos pleiotrópicos de las mutaciones en los distintos caracteres

Como ya fue anticipado, ninguna de las 42 líneas analizadas mostró diferencias significativas con respecto al control en la mayor parte de los caracteres en ambos sexos (tres o cuatro caracteres en cada sexo). Sólo se encontraron líneas que mostraron dichas diferencias en un solo sexo; particularmente, cuatro líneas en las hembras (Tabla 4.3). Estas líneas son las que han sido mencionadas anteriormente (BG00373, BG00930, BG01014 y BG01290), en las que las mutaciones afectaron a TA (Tabla 4.3). Los principales resultados de los ANOVAs realizados para conocer la magnitud del efecto mutacional inducido por la inserción del elemento *P* en estas líneas se muestran en la Tabla 4.4.

Por un lado, la inserción del elemento *P* en *CG11226* y en *spict* (BG00373 y BG01014; Tabla 4.3) disminuyó el tamaño de todos los caracteres de manera similar (Tabla 4.4). Por otro lado, BG00930, en la que no se pudo identificar un gen afectado por la mutación; y BG01290, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió en *Btk29A* (Tabla 4.3); mostraron una disminución desigual de todos los caracteres (Tabla 4.4). En el caso de BG00930, DO y AC mostraron una disminución más pronunciada que TA, mientras que LT no se diferenció de ningún carácter. En cambio, BG01290 presentó valores de DO y LT significativamente menores que los de TA, a la vez que los de AC no se distinguieron de los de los demás caracteres (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4:** Principales resultados de los ANOVAs realizados para conocer la magnitud del efecto mutacional inducido por la inserción del elemento *P* en las líneas que mostraron diferencias significativas con respecto al control para todos los caracteres morfológicos en las hembras. Se muestran el valor de *F* y su significancia para las distintas fuentes de variación. Cada ANOVA se realizó utilizando la media de cada línea estimada con los valores transformados de cada carácter.

Línea (Gen candidato)	<i>F</i> (carácter)	Valor medio			
		DO	AC	LT	TA
BG00373 ( <i>CG11226</i> )	0,59	-0,12	-0,11	-0,13	-0,11
BG00930 §	3,97*	-0,10 <sup>a</sup>	-0,09 <sup>a</sup>	-0,08 <sup>ab</sup>	-0,05 <sup>b</sup>
BG01014 ( <i>spict</i> )	0,30	-0,08	-0,07	-0,08	-0,05
BG01290 ( <i>Btk29A</i> )	7,16***	-0,10 <sup>a</sup>	-0,07 <sup>ab</sup>	-0,09 <sup>a</sup>	-0,05 <sup>b</sup>

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los valores medios. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . § Ningún gen pudo ser identificado.

## Análisis de la conformación del ala

### Análisis genético-cuantitativo

Se realizó un análisis de varianza univariado utilizando DP para analizar el aporte de las fuentes de variación aleatorias a la varianza total de la conformación del ala. El análisis no reveló diferencias significativas para la conformación del ala entre los sexos. Sin embargo, los resultados revelaron que el factor línea fue altamente significativo ( $F=4,12$ ;  $p<0,00001$ ) y explicó el 16% de la varianza fenotípica total. Asimismo, la interacción entre la línea y el sexo fue significativa ( $F=2,32$ ;  $p<0,00001$ ) y el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por esta fuente de variación fue del 6%. De estos resultados se desprende que existe abundante variabilidad genética para la conformación ala.

Al considerar conjuntamente los análisis de DP a 17°C y a 25°C, se observaron diferencias muy pequeñas relacionadas, sobretodo, con el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por las fuentes de variación genéticas. Mientras el componente de la varianza del factor línea fue mayor a 25°C (23%), el de la interacción línea x sexo fue menor a dicha temperatura (4%). Como ya se explicó con anterioridad, estas diferencias podrían deberse, principalmente, a que el análisis realizado a 25°C implicó un número mucho mayor de líneas provenientes de distintos bloques lo cual pudo haber incrementado el error estadístico.

### Identificación de mutantes divergentes mediante el análisis de DR

Los resultados de los MANOVAs realizados para comparar los valores de DR de cada línea BDGP con los de la línea control del sexo respectivo (tras haber aplicado la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples) mostraron que todas las líneas estudiadas excepto BG02563 mostraron diferencias significativas para la conformación del ala, en al menos un sexo (Tabla 4.3). Los análisis revelaron que 26 de las 41 líneas significativas (el 63,4%) mostraron diferencias con respecto al control en ambos sexos simultáneamente mientras que 15 (el 36,6%) presentaron modificaciones únicamente en las hembras (Tabla 4.3).

Al comparar los resultados de estos análisis con los derivados del estudio hecho a 25°C, se observó que 25 de las 41 líneas significativas para algún sexo a 17°C, también mostraron diferencias significativas con respecto al control en algún sexo cuando fueron estudiadas a mayor temperatura (Tabla 4.3). Sólo 12 de estas líneas mostraron resultados similares en ambas temperaturas; ocho se diferenciaron del control en ambos sexos (BG00373, BG01014, BG01028, BG01354, BG01548, BG02462, BG02690 y BG02830) mientras que cuatro mostraron tales diferencias únicamente en las hembras (BG00930, BG01990, BG02088 y BG02106; Tabla 4.3). Siete de las otras 13 líneas mostraron diferencias significativas con respecto al control en ambos sexos a 17°C pero, cuando fueron estudiadas a 25°C, seis de ellas presentaron dichas diferencias

únicamente en los machos (BG00386, BG00737, BG01081, BG01214, BG01683 y BG01902) mientras que una mostró esas diferencias sólo en las hembras (BG01726; Tabla 4.3). Las seis líneas restantes mostraron diferencias significativas con respecto al control en las hembras a 17°C pero, cuando fueron estudiadas a 25°C, cuatro de ellas presentaron dichas diferencias en ambos sexos (BG00524, BG01011, BG01218 y BG01716) mientras que dos mostraron esas diferencias sólo en los machos (BG001290 y BG02157; Tabla 4.3). Finalmente, la única línea que no se diferenció significativamente del control a 17°C, si lo hizo en los machos a 25 °C (BG02563; Tabla 4.3).

#### Identificación de los genes candidatos

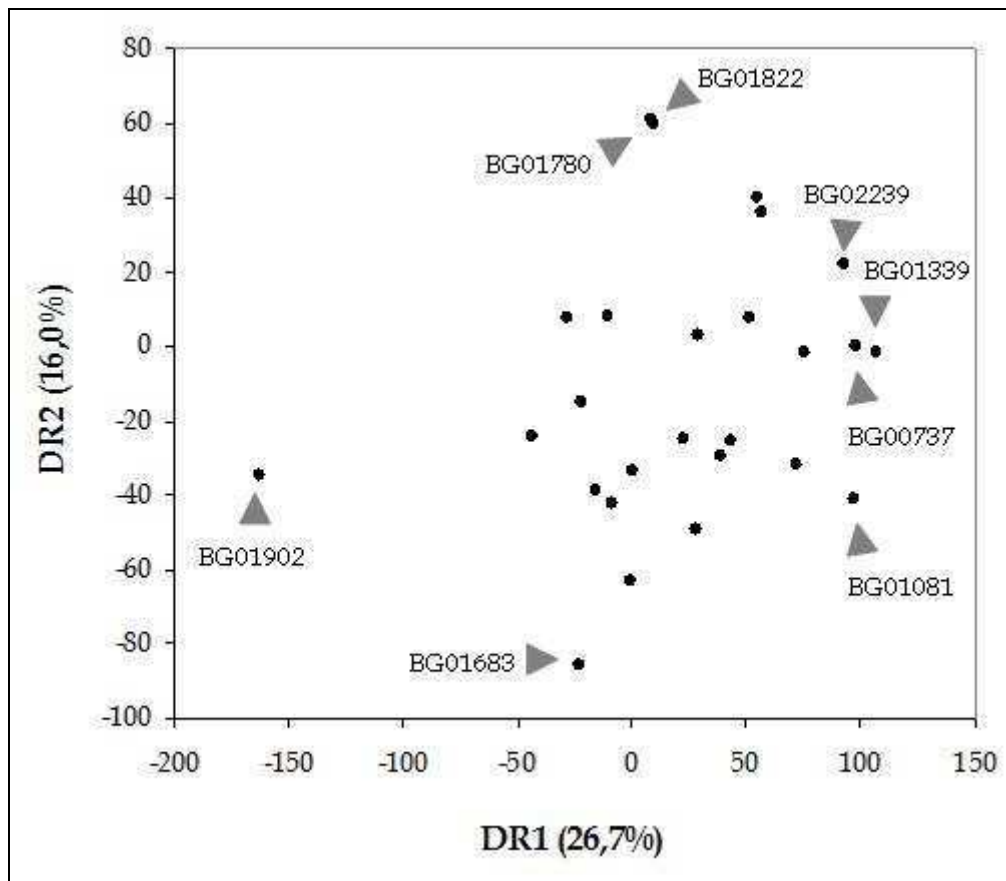
Como se mencionó anteriormente, sólo una línea no mostró diferencias significativas con respecto al control para la conformación del ala. En tres de las otras 41 líneas no se pudo identificar un gen candidato que afecte a la conformación del ala a 17°C (considerando el mismo criterio empleado en los dos capítulos anteriores, es decir, tomando como genes candidatos únicamente a aquellos en los que la inserción del elemento *P* se encuentra a una distancia no mayor a 5 Kb del sitio de inicio de la transcripción del gen; Tabla 4.3). Con respecto a las otras 38 líneas, se identificaron 39 genes candidatos (Tabla 4.3). Por un lado, en dos de esas líneas, la inserción del elemento *P* se encuentra en la vecindad de dos genes (Tabla 4.3). Este es el caso de las líneas BG01214 (*sugarless*, *sgl*, y *CG10064*) y BG01735 (*CG13130* y *bib*; Tabla 4.3). Por otro lado, se registró la inserción del elemento *P* en el mismo gen candidato en dos líneas diferentes. Este es el caso del gen *CG11226* (líneas BG00373 y BG01780) y *CG30492* (líneas BG01354 y BG01990). Nuevamente se pudo observar que distintos sitios de inserción en el mismo gen (es decir, distintas líneas) mostraron resultados diferentes, indicando que el sitio exacto del transposón determina el efecto fenotípico de la mutación. Algo similar fue observado para los distintos caracteres morfológicos estudiados a 25°C (Capítulos 2 y 3) así como para otros caracteres (Rollmann *et al.*, 2006). Por un lado, la mutación de la línea BG00373 afectó la conformación del ala tanto en machos como en hembras aunque sólo afectó a las hembras al considerar el análisis de TA (Tabla 4.3). La otra inserción, correspondiente a la línea BG01780, causó una modificación de la conformación del ala en ambos sexos pero modificó TA en los machos únicamente (Tabla 4.3). Estas inserciones se ubicaron a 1500 pb del extremo 5' y en el gen respectivamente (Tabla 4.3). Por otro lado, la inserción del elemento *P* a 400 pb del extremo 5' de *CG30492* en la línea BG01354, afectó la conformación del ala tanto en los machos como en las hembras pero no afectó a TA en ninguno de los dos sexos (Tabla 4.3). Sin embargo, otra mutación ubicada a 501 pb del extremo 3' del mismo gen en la línea BG01990, modificó la conformación del ala en las hembras únicamente (Tabla 4.3).

13 de las 41 líneas significativas para algún carácter vinculado a la morfología del ala a 17°C no difirieron significativamente de la línea control para estos caracteres a 25°C y, para cada una de ellas, se pudo identificar al menos un gen candidato (Tabla 4.3). Nueve de estos genes no estaban en ninguna de las listas correspondientes a los estudios hechos a 25°C: *CG13333/CG13334* (BG00369), *CG17574* (BG00992), *Musashi* (*msi*, BG01488), *CG14591* (BG01672), *Imp* (BG01822), *Nnf1a* (BG02102), *rutabaga* (*rut*, BG02747) y *scylla* (*scyl*, BG02823). Dada la limitación del espacio, no se hará un repaso de todas las funciones conocidas de estos genes (ver Flybase). Sin embargo, se puede decir que seis presentan funciones conocidas que involucran glicólisis (*CG13334*), determinación del destino celular y regulación de la traducción (*msi*), desarrollo del sistema nervioso y espermatogénesis (*Imp*), segregación cromosómica (*Nnf1a*), procesos de señalización, aprendizaje y apareamiento (*rut*) y regulación negativa del crecimiento (*scyl*).

#### Visualización de los efectos fenotípicos de los genes candidatos

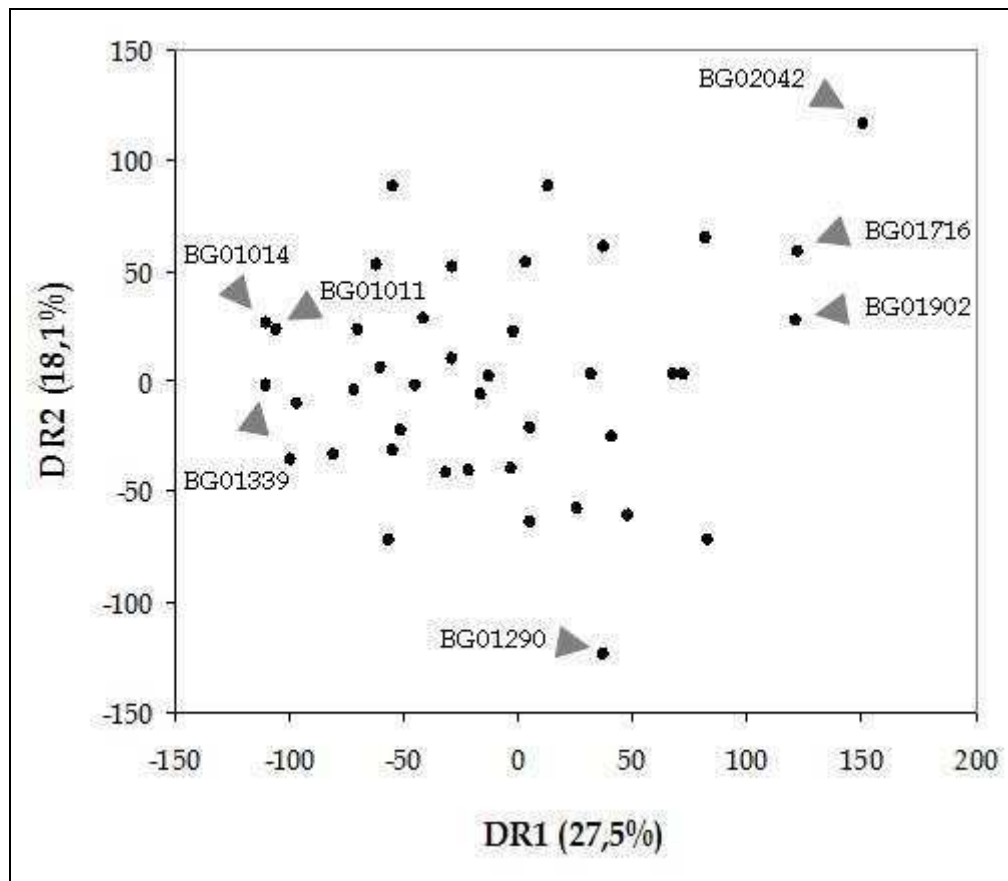
A continuación, se buscó identificar los genes cuya mutación originó los mayores cambios en la conformación del ala y visualizar dichas modificaciones. Como en el Capítulo 3, se decidió tomar en consideración los resultados obtenidos para DR1 y DR2 que son las que explican el mayor porcentaje de la varianza fenotípica total (para más detalles, ver el Anexo metodológico II). De esta manera, las Figuras 4.3 y 4.4 muestran los valores mencionados para machos y hembras respectivamente. Asimismo, en cada eje se indica el porcentaje de la varianza fenotípica explicado por cada DR.

Una breve inspección de la figura correspondiente a los machos permite notar que la línea que presentó los mayores valores respecto de DR1, en comparación con la línea control del bloque respectivo, fue BG01339, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió en *cricket* (*clt*; Figura 4.3, Tabla 4.3). Sin embargo, hay que destacar que otras tres líneas presentaron valores cercanos a los de BG01339 en este eje, BG00737, BG01081 y BG02239; en las que los genes aparentemente afectados por la mutación fueron *Heat shock protein 27* (*Hsp 27*), *Glutamate oxaloacetate transaminase 1* (*Got1*) y *CG11550* respectivamente (Figura 4.3, Tabla 4.3). La línea que presentó los menores valores respecto de DR1 en este sexo fue BG01902, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió en *mastermind* (*mam*; Figura 4.3, Tabla 4.3). En relación con DR2, la línea que presentó los mayores valores en los machos, en comparación con la línea control, fue BG01822, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió en *Imp* (Figura 4.3, Tabla 4.3). A su vez hay que considerar que el valor de DR2 de esta línea está muy cerca del valor correspondiente a BG01780, en la que el gen afectado por la mutación fue *CG11226*. La línea que presentó los menores valores en este eje fue BG01683, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió en *CG32572* (Figura 4.3, Tabla 4.3).



**Figura 4.3:** Valor medio de las dos primeras DR de cada línea significativa en los machos (xe10). El porcentaje de la varianza fenotípica explicado por cada DR se indica entre paréntesis.

Al observar la figura correspondiente a las hembras se puede ver que la línea que presentó los mayores valores respecto de DR1, en comparación con la línea control del bloque respectivo, fue BG02042, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió en *eas* (Figura 4.4, Tabla 4.3). Otras dos líneas presentaron valores relativamente cercanos a los de BG02042 en este eje, BG01716 y BG01902; en las que los genes afectados por la mutación fueron *PAPS synthetase (Paps)* y *mam* (Figura 4.4, Tabla 4.3). La línea que presentó los menores valores respecto de DR1 en este sexo fue BG01014, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió en *spict* (Figura 4.4, Tabla 4.3). Asimismo, otras dos líneas mostraron valores medios muy similares a los de BG01014, BG1339 y BG1011; en las que los genes afectados fueron *clt* y *misshapen (msn)* (Figura 4.4, Tabla 4.3). En relación con DR2, la línea que presentó los mayores valores en las hembras, en comparación con la línea control, fue la ya mencionada BG02042 (Figura 4.4, Tabla 4.3). La línea que presentó los menores valores en este eje fue BG01290, en la que la inserción del elemento *P* ocurrió en el *Btk29A* (Figura 4.4, Tabla 4.3).



**Figura 4.4:** Valor medio de las dos primeras DR de cada línea significativa en las hembras ( $\times 10$ ). El porcentaje de la varianza fenotípica explicado por cada DR se indica entre paréntesis.

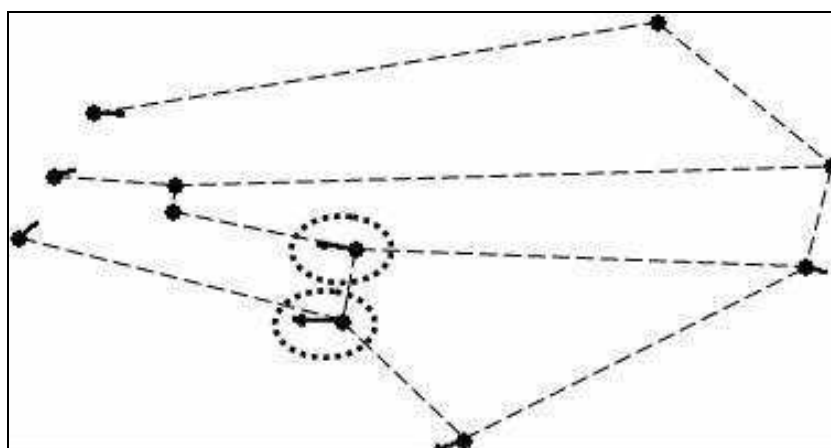
Si bien no se registraron exactamente las mismas líneas para ambos sexos en cada uno de los extremos analizados, vale la pena resaltar que hubo cierta coincidencia en relación con DR1, que es la que explica un porcentaje mayor de la varianza fenotípica total (Figuras 4.3 y 4.4). La línea que presentó los valores más pequeños en los machos fue una de las mostraron los mayores valores en las hembras (BG01902) mientras que aquella que presentó los valores más grandes en los machos fue una de las que mostraron los menores valores en las hembras (BG01339). Esto puede deberse a que los valores de DR de cada sexo se estimaron de manera independiente. Por lo tanto, puede haber ocurrido que un cambio similar en ambos sexos se haya codificado con valores absolutos similares pero con un signo opuesto entre ellos (para más detalles, ver el Anexo metodológico II). Esto no hace más que resaltar el hecho de que la conformación de todos los valores de DR de los especímenes de una misma muestra se estiman con respecto al consenso del grupo y, por lo tanto, son independientes de los de otros grupos.



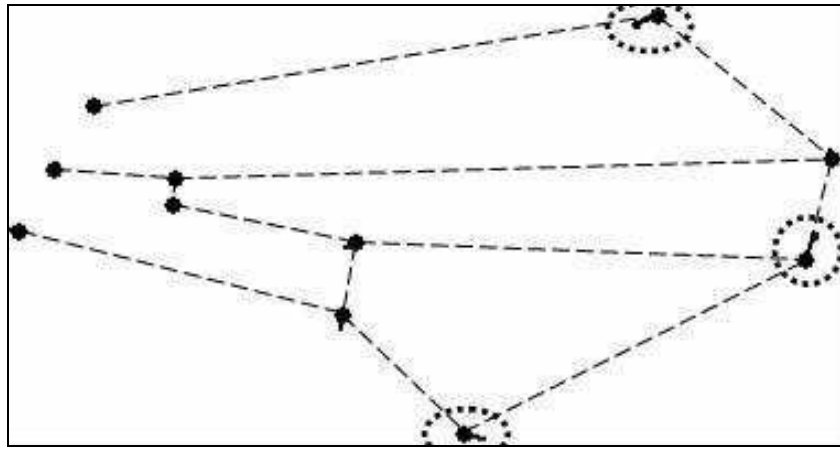
### Visualización de los efectos fenotípicos de los genes candidatos

Al igual que en el Capítulo 3, lo más conveniente para el sistema analizado sería mostrar el cambio en la conformación del ala entre cada una de las líneas que presentaron los valores más extremos y el control para cada sexo (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II). De esta manera, las siguientes figuras muestran diagramas del ala (uno por cada extremo de DR1 y DR2 que está asociado a una línea diferente), para los machos y las hembras por separado y su observación permite inferir las regiones del ala que se vieron más afectadas en cada caso.

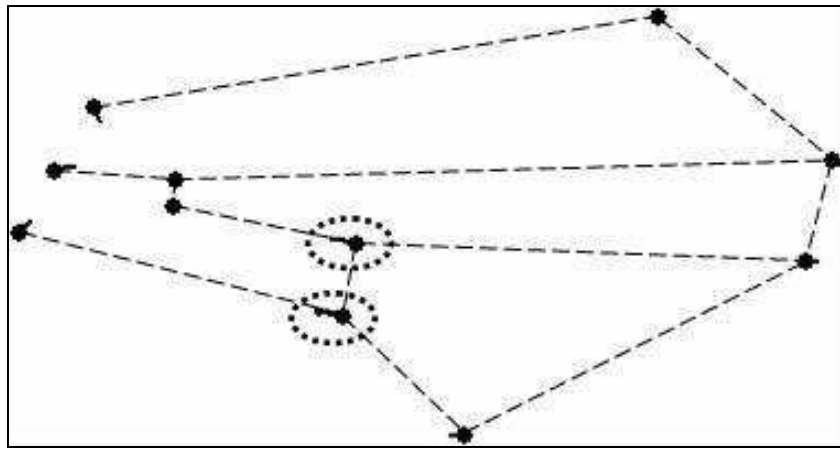
En los machos, el cambio en la conformación del ala debido a la mutación de *clt*, asociado a los mayores valores de DR1, involucró a los puntos homólogos 1, 2, 5, 6, 9, 10 y 11 (ver el Anexo Metodológico II), es decir, casi toda el ala (Figura 4.5). Sin embargo, el desplazamiento fue aparentemente mayor en el caso de los puntos 5 y 6 (Figura 4.5). El cambio conformacional causado por la mutación de *mam*, vinculado al otro extremo de los valores de DR1, implicó a los puntos homólogos 5, 6, 7, 9 y 10, es decir, a la región posterior del ala (Figura 4.6). En este caso, el desplazamiento fue levemente desigual, siendo mayor en el caso de los puntos 7, 9 y 10 (Figura 4.6). El cambio en la conformación del ala debido a la mutación de *Imp*, asociado al extremo positivo de DR2, involucró a los puntos homólogos 1, 2, 5, 6, 9, 10 y 11, es decir, casi toda el ala (Figura 4.7). Sin embargo, el desplazamiento fue aparentemente mayor en el caso de los puntos 5 y 6 (Figura 4.7). El cambio conformacional causado por la mutación de *CG32572*, vinculado al otro extremo de los valores de DR2, implicó a los puntos homólogos 1, 5, 6 y 7, es decir, a la región anterior del ala (Figura 4.8). En este caso, el desplazamiento parece haber sido mayor en el caso de los puntos 1, 5 y 6 (Figura 4.8).



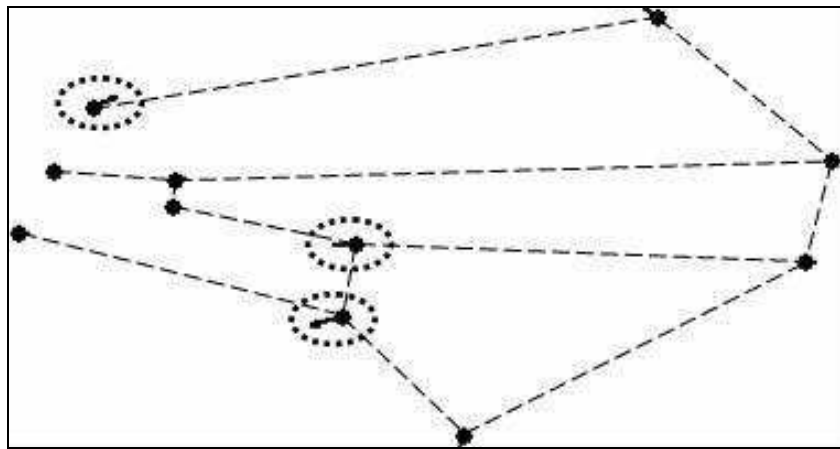
**Figura 4.5:** Cambios en la conformación del ala de los machos vinculados a la mutación de *clt*. Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.



**Figura 4.6:** Cambios en la conformación del ala de los machos vinculados a la mutación de *mam*. Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.

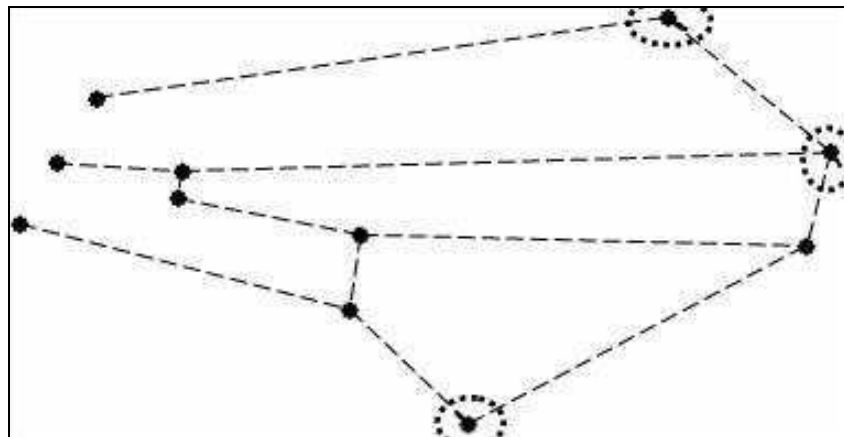


**Figura 4.7:** Cambios en la conformación del ala de los machos vinculados a la mutación de *Imp*. Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.

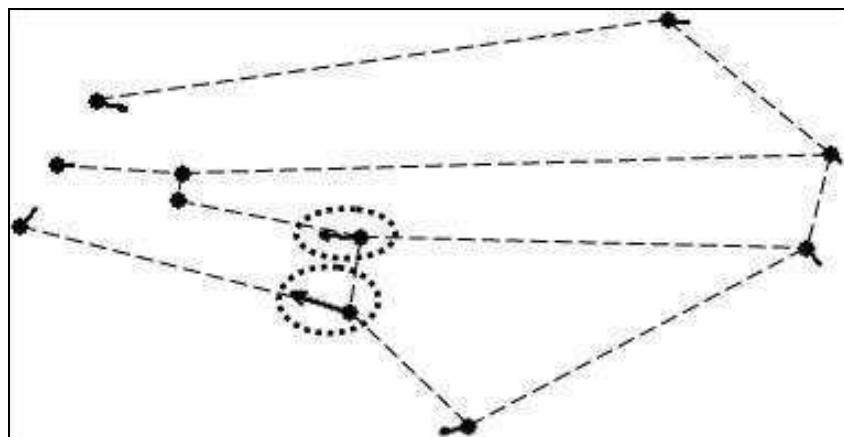


**Figura 4.8:** Cambios en la conformación del ala de los machos vinculados a la mutación de *CG32572*. Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.

En las hembras, el cambio en la conformación del ala debido a la mutación de *eas*, asociado a los mayores valores de ambas DR, involucró a los puntos homólogos 7, 8 y 10 (ver el Anexo Metodológico II), es decir, la parte distal del ala (Figura 4.9). Sin embargo, el desplazamiento fue aparentemente pequeño (Figura 4.9). El cambio conformacional causado por la mutación de *spict*, vinculado al otro extremo de los valores de DR1, implicó a los puntos homólogos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, es decir, prácticamente toda el ala (Figura 4.10). En este caso, el desplazamiento fue evidentemente desigual, siendo bastante mayor en el caso de los puntos 5 y 6 (Figura 4.10).



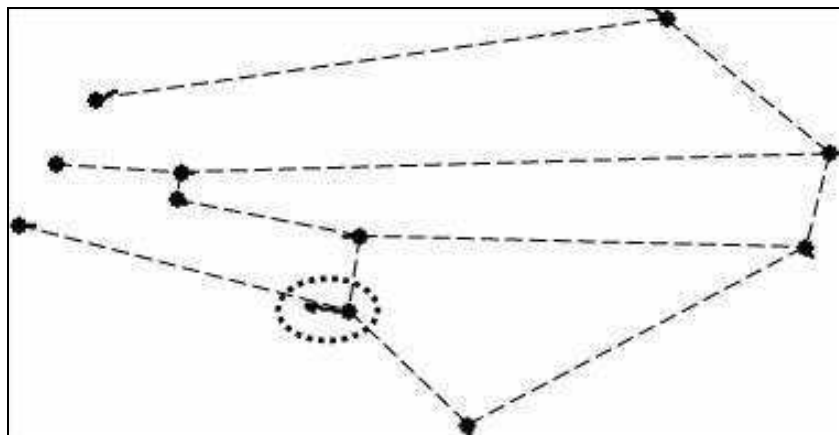
**Figura 4.9:** Cambios en la conformación del ala de las hembras vinculados a la mutación de *eas*. Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.



**Figura 4.10:** Cambios en la conformación del ala de las hembras vinculados a la mutación de *spict*. Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.

El cambio en la conformación del ala debido a la mutación de *Btk29A*, asociado al extremo negativo de DR2, involucró a los puntos homólogos 1, 5, 6, 7 y 11, es decir, casi toda el ala (Figura

4.11). Sin embargo, el desplazamiento fue muy desigual siendo mucho mayor en el caso del punto 6 (Figura 4.11).



**Figura 4.11:** Cambios en la conformación del ala de las hembras vinculados a la mutación de *Btk29A*. Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio respecto a la línea control. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.

## **Análisis conjunto de las líneas criadas a ambas temperaturas**

### Análisis de los caracteres de tamaño corporal

#### Análisis de correlación genética

Se realizaron análisis de correlación para estudiar la relación entre los valores de cada variable entre temperaturas en cada sexo por separado. En las hembras, la correlación fue positiva y significativa sólo para TA y la relación explicó el 10% de la varianza fenotípica total (Tabla 4.5). En los machos, la correlación fue positiva y significativa para todos los caracteres excepto TA y la relación explicó entre 10% (DO y AC) y el 19% (LT) de la varianza fenotípica total (Tabla 4.5). Por lo tanto, existen diferencias obvias entre los sexos en cuanto a la relación que guardan los valores de cada variable entre temperaturas.

**Tabla 4.5:** Principales resultados de los análisis de correlación genética de los caracteres vinculados al tamaño corporal (valor de  $r$  y su significancia) entre temperaturas en cada sexo. Los análisis se realizaron utilizando el valor medio de cada línea.

	DO-DO	AC-AC	LT-LT	TA-TA
Hembras	0,15	0,15	0,21	0,31*
Machos	0,31*	0,32*	0,44**	0,29

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

*Efectos pleiotrópicos de las mutaciones en los distintos caracteres*

Nuevamente, ninguna de las 42 líneas analizadas mostró diferencias significativas con respecto al control en la mayor parte de los caracteres en ambos sexos y temperaturas (Resultados no mostrados aquí; ver el Capítulo 2 de esta tesis y la tesis de Imberti, 2008). Sólo se encontraron líneas que mostraron dichas diferencias en un solo sexo; particularmente, BG01011 y BG02830 en las hembras (Tabla 4.3). Las hembras de estas líneas mostraron valores significativamente menores que los del control para todos los caracteres a 25°C (Tabla 2.3 del Capítulo 2) y para DO, AC y LT a 17°C (Tabla 3.2 de Imberti, 2008). Los principales resultados de los ANOVAs realizados para conocer la magnitud del efecto mutacional inducido por la inserción del elemento *P* en estas líneas en cada temperatura se muestran en la Tabla 4.6.

Por un lado, la inserción del elemento *P* en *msn* (BG01011; Tabla 4.3) disminuyó el tamaño de todos los caracteres de manera similar pero lo hizo de manera más pronunciada a 17°C que a 25°C (Tabla 4.6). Por otro lado, la mutación que afectó a *Lsd-2* (BG02830; Tabla 4.3) causó una disminución de todos los caracteres que fue mayor a 25°C que a 17°C (Tabla 4.6). Asimismo, los caracteres disminuyeron de manera desigual, ya que DO y LT mostraron una disminución más pronunciada que TA, mientras que AC no se diferenció de ningún carácter (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6:** Principales resultados de los ANOVAs realizados para conocer la magnitud del efecto mutacional en las líneas que mostraron diferencias significativas con respecto al control para casi todos los caracteres morfológicos en las hembras criadas en ambas temperaturas. Cada ANOVA se realizó utilizando los valores transformados de las cuatro variables en cada línea por separado de acuerdo con un modelo con los factores fijos carácter y temperatura. Se muestran el valor de *F* y su significancia para las fuentes de variación correspondientes a ambos ANOVAs. Los valores medios corresponden al promedio de los valores de cada carácter.

Línea (Gen candidato)	Fuente de variación	<i>F</i>	T	Valor medio				
				DO	AC	LT	TA	Todos
<u>BG01011 (<i>msn</i>)</u>								
	Carácter (C)	1,15	17°C	-0,118	-0,083	-0,121	-0,056	<b>-0,095</b>
	<b>Temperatura (T)</b>	<b>5,13*</b>	25°C	-0,073	-0,069	-0,053	-0,076	<b>-0,067</b>
	C x T	2,53	Ambas	-0,085	-0,073	-0,071	-0,070	
<u>BG02830 (<i>Lsd-2</i>)</u>								
	Carácter (C)	<b>3,09*</b>	17°C	-0,055	-0,046	-0,069	-0,005	<b>-0,044</b>
	<b>Temperatura (T)</b>	<b>4,18*</b>	25°C	-0,073	-0,069	-0,053	-0,054	<b>-0,062</b>
	C x T	2,18	Ambas	<b>-0,064<sup>a</sup></b>	<b>-0,057<sup>ab</sup></b>	<b>-0,061<sup>a</sup></b>	<b>-0,028<sup>b</sup></b>	

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. Las fuentes de variación significativas y las medias responsables de dicha significación se muestran en negrita. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los valores medios de los caracteres. \**p*<0,05.

### Análisis genético-cuantitativo

Se realizaron ANOVAs generales para analizar las diferencias entre las temperaturas y los sexos para los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal así como para cuantificar el efecto del factor genético, debido a la inserción del elemento *P*, y de la interacción entre el genotipo y ambos factores fijos en la variación de dichos caracteres. Los resultados de los ANOVAs mostraron que los factores fijos fueron significativos en casi todos los casos (Tabla 4.7). Particularmente, la media de los valores transformados de los individuos criados a 25°C fue significativamente mayor que la de las moscas crecidas a 17°C excepto en el caso de TA en el que el efecto de la temperatura no fue significativo. Asimismo, los machos mostraron valores transformados mayores que las hembras. Vale la pena destacar que estos resultados se obtuvieron debido a que se analizaron los datos transformados. Cuando se observan los datos se puede notar fácilmente que las hembras y las moscas criadas a 17°C son más grandes que los machos y los individuos crecidos a 25°C respectivamente. Por lo tanto, estos resultados indican que el efecto de la inserción del elemento *P* fue generalmente opuesto entre sexos, aumentando el tamaño en los machos y disminuyéndolo en las hembras. Este resultado ya había sido observado en los análisis de las líneas a 25°C y a 17°C (Capítulo 2 de esta tesis; tesis de Imberti, 2008; análisis previos en este capítulo). Asimismo, el cambio de tamaño con la temperatura fue, en promedio, mayor en la línea control que en las líneas mutantes. De esta manera, la línea control tendió a aumentar su tamaño más que las líneas mutantes a 17°C mientras que a 25°C ocurrió lo opuesto. Sin embargo, dicho patrón se observó en el caso de DO, AC y LT pero no en el de TA, ya que el efecto de la temperatura aparentemente no fue significativo para dicho carácter (Tabla 4.7). Además, los análisis revelaron la existencia de una interacción significativa entre ambos factores fijos para DO y TA. En el caso de DO, esta interacción se debe a una mayor diferencia de tamaño de las hembras entre temperaturas (es decir, una disminución del tamaño con respecto al control que fue más importante a 17°C). En cambio, en el caso de TA, se debe a la existencia de un patrón opuesto entre sexos. Particularmente, los machos mostraron un incremento del tamaño con respecto a la IsoB que fue mayor a 17°C; mientras que las hembras mantuvieron el patrón mencionado anteriormente, en el que la disminución del tamaño con respecto a la línea control fue más importante a 17°C.

Al mismo tiempo, los análisis indicaron que el factor genético no hizo un aporte significativo a la varianza fenotípica total, como tampoco lo hizo la interacción entre dicho factor y el sexo (Tabla 4.7). Sin embargo, los resultados mostraron un aporte significativo de la interacción entre el genotipo y la temperatura en todos los casos excepto LT (Tabla 4.7). Por último, la interacción triple fue significativa en todos los casos (Tabla 4.7). Estos resultados son muy importantes dado que en este modelo complejo, los cuadrados medios de la interacción

triple son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a las otras interacciones. A su vez, los cuadrados medios de las interacciones aleatorias de menor orden son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a los factores principales. Por lo tanto, tal y como se adelantó previamente, se realizaron ANOVAs separados para cada sexo para tener una idea más cabal del aporte del factor genético (la línea), del ambiental (la temperatura) y de la interacción genotipo x ambiente.

**Tabla 4.7:** Principales resultados de los ANOVAs para los caracteres vinculados al tamaño corporal realizados con los valores transformados de cada variable de acuerdo con un modelo con los factores temperatura (fijo), sexo (fijo) y línea (aleatorio). Se muestra el valor de *F* y su significancia para cada fuente de variación así como el porcentaje de la varianza explicado por cada fuente de variación aleatoria entre paréntesis.

Fuente de variación	DO	AC	LT	TA
Línea	1,87* (6)§	1,67	1,74	1,79* (7)§
Temperatura <sup>a</sup>	42,67***	14,91 ***	65,87***	6,87*§
Sexo <sup>b</sup>	263,93***	118,18***	51,50***	94,69***
Línea x Temperatura	2,92*** (11)	2,55** (10)	1,67	3,83*** (12)
Línea x Sexo	0,70	1,18	1,18	1,21
Temperatura x Sexo	15,15***	3,80	1,71	56,22***
Línea x Temperatura x Sexo	2,24*** (6)	2,70*** (8)	3,68*** (13)	1,75** (4)

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . § No significativo tras aplicar la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples ( $P_B = 0,0167$ ). <sup>a</sup> Los valores transformados de los individuos criados a 25°C fueron más grandes que los de 17°C. <sup>b</sup> Los machos mostraron valores medios mayores que las hembras.

Los principales resultados de los ANOVAs realizados para cada carácter vinculado al tamaño corporal en cada sexo se muestran en la Tabla 4.8. Estos análisis revelaron que el efecto de la temperatura fue significativo en todos los casos excepto TA en las hembras y AC en los machos (Tabla 4.8). Para todos los casos en los que el factor temperatura fue significativo excepto TA en los machos, los valores transformados de las moscas criadas a 25°C mostraron valores mayores que los de aquellas crecidas a 17°C. En cambio, los valores transformados de TA en los machos mostraron el patrón opuesto. El patrón observado en DO, AC y LT ya había sido notado en el análisis más general. Sin embargo, en ese análisis, el efecto de la temperatura no había resultado significativo para TA. Este análisis permitió notar que dicho factor no afectó a TA en las hembras mientras que si lo hizo en los machos, causando un efecto contrario al observado en los demás caracteres. Por lo tanto, este patrón es consistente con lo observado al analizar la interacción temperatura x sexo en el análisis previo, que fue significativa para TA (Tabla 4.7).

**Tabla 4.8:** Principales resultados de los ANOVAs para los caracteres vinculados al tamaño corporal realizados con los valores transformados de cada variable de acuerdo con un modelo con los factores línea (aleatorio) y temperatura (fijo) en cada sexo. Se muestra el valor de *F* y su significancia para cada fuente de variación así como el porcentaje de la varianza explicado por cada fuente de variación aleatoria entre paréntesis.

Fuente de Variación	Hembras				Machos			
	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA
Línea (L)	1,25	1,29	1,12	1,74* (9)§	1,59	2,02* (10)	2,63** (13)	1,77* (7)§
Temperatura (T)	65,38***	18,43***	41,71***	1,29	12,09**	5,15*§	43,62***	31,76***†
L x T	4,38*** (18)	5,37*** (22)	6,82*** (27)	4,92*** (19)	4,42*** (17)	4,23*** (16)	3,26*** (11)	3,72*** (14)

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . § No significativo tras aplicar la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples ( $P_B = 0,0167$ ). En todos los casos en los que el factor temperatura fue significativo excepto †, los valores transformados de las moscas criadas a 25°C mostraron valores mayores que los de aquellas criadas a 17°C.

El factor línea fue significativo sólo en el caso de AC y LT en los machos (Tabla 4.8). Sin embargo, la interacción entre la línea y la temperatura fue altamente significativa en todos los casos (Tabla 4.8). El aporte de los factores genéticos (línea y línea x temperatura) varió entre el 18% (DO) y el 27% (LT) en las hembras y entre el 14% (TA) y el 26% (AC) en los machos (Tabla 4.8). Como se mencionó anteriormente, los cuadrados medios de la interacción aleatoria son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a cada una de las fuentes de variación principales. Por lo tanto, en el caso en el que el factor fijo no resultó significativo (TA en las hembras y AC en los machos) se realizaron contrastes para analizar el efecto de la temperatura. Estos análisis dieron resultados no significativos en el caso de las hembras ( $p > 0,05$ ) y significativos en el caso de los machos ( $p < 0,0001$ ), por lo que se puede decir que todos los caracteres en ambos sexos excepto TA en las hembras mostraron un comportamiento plástico con el cambio de temperatura. Asimismo, para evaluar el efecto del factor línea en todos los casos, se realizaron ANOVAs con los datos correspondientes a cada temperatura por separado. Estos análisis revelaron la existencia de abundante variabilidad genética para todos los caracteres en ambos sexos y temperaturas (Tabla 4.9).

Finalmente, se estudió el aporte del cambio de escala y el cambio de rango a la interacción genotipo-ambiente (G x A), significativa en todos los casos. La correlación genética entre las mediciones del mismo carácter en distintos ambientes fue relativamente baja en todos los casos (Tabla 4.9). El porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por la correlación



varió entre el 1% (LT) y el 14% (TA) en las hembras y entre el 12% (TA) y el 28% (LT) en los machos (Tabla 4.9). Estos valores indican que una modesta proporción los genes estudiados controla la expresión de los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal en ambas temperaturas. En todos los casos, las diferencias en la varianza genética (variación entre líneas) entre temperaturas (el cambio de escala) explicó un porcentaje mucho menor de la correlación que las desviaciones de la correlación perfecta entre temperaturas (cambio de rango), ya que los valores de esta última fuente fueron superiores al 98% en las hembras y al 80% en los machos (Tabla 4.9).

**Tabla 4.9:** Principales resultados de los ANOVAs realizados con los valores transformados de los caracteres vinculados al tamaño corporal en cada sexo y temperatura. Se muestra el valor de  $F$  y su significancia así como el porcentaje de la varianza explicado por el factor línea entre paréntesis. Además, se muestra el coeficiente de correlación entre ambientes ( $r_{G \times A}$ ) y el porcentaje de la varianza de la interacción genotipo x ambiente ( $V_{G \times A}$ ) explicado por el cambio de escala (E) y por el cambio de rango (R).

Carácter	$F$ Línea <sub>25°C</sub>	$F$ Línea <sub>17°C</sub>	$r_{G \times A}$	$V_{G \times A}$ (E-R)
<u>Hembras</u>				
DO	4,16 (18)	6,32 (24)	0,19	1,13-98,87
AC	5,68 (24)	7,23 (27)	0,18	0,07-99,93
LT	6,44 (27)	7,92 (29)	0,10	0,42-99,58
TA	6,44 (28)	7,69 (28)	0,37	0,06-99,94
<u>Machos</u>				
DO	5,91 (25)	4,48 (17)	0,40	19,01-80,99
AC	4,15 (18)	12,22 (40)	0,37	0,13-99,87
LT	3,94 (17)	10,10 (35)	0,52	0,00-100,00
TA	10,01 (38)	4,49 (17)	0,34	0,66-99,34

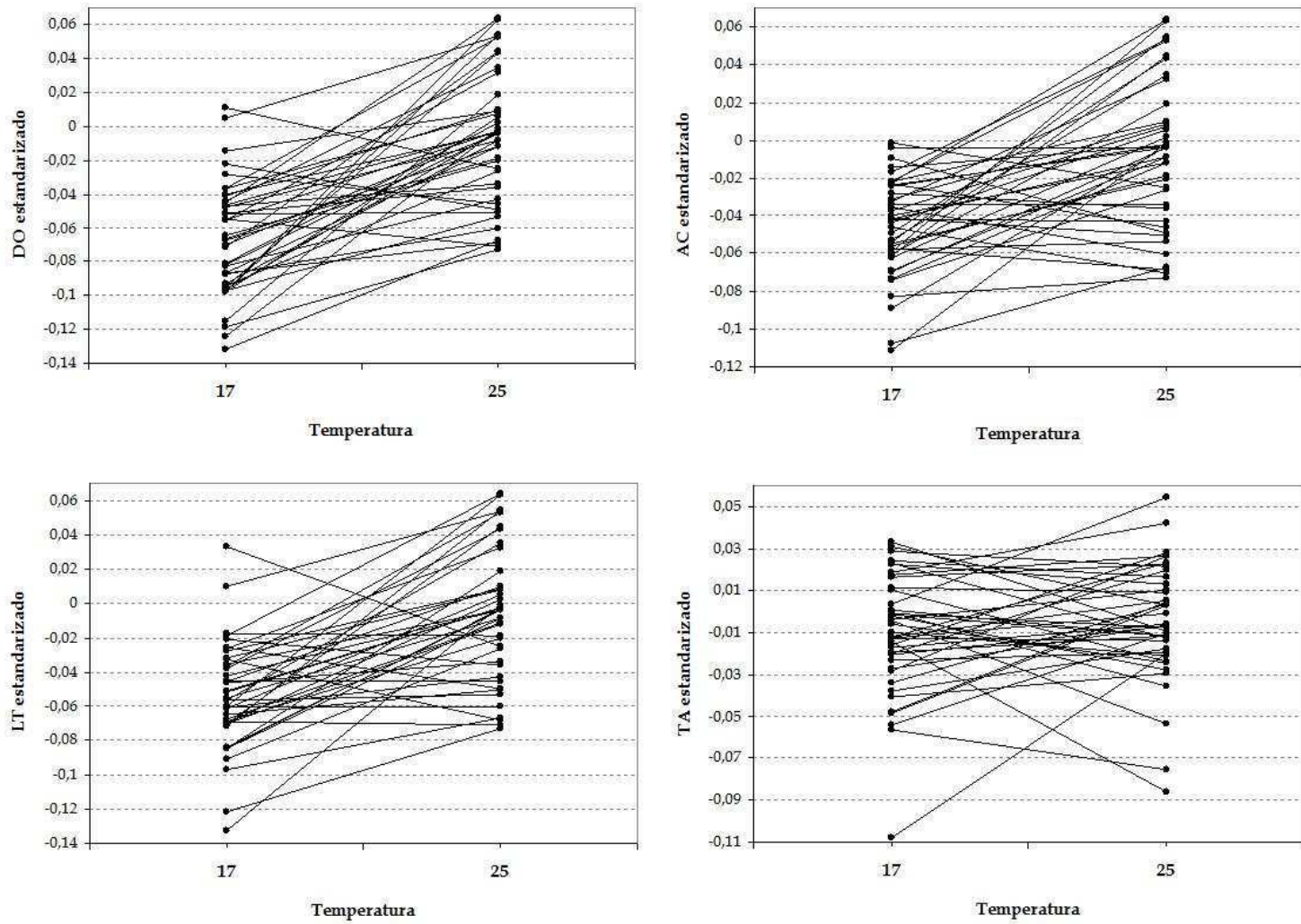
DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.  $p < 0,000001$  para todos los valores de  $F$ .

Esto se puede ver claramente en las Figuras 4.12 y 4.13 que muestran el valor medio de cada línea a 17°C y a 25°C para los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal en hembras y machos respectivamente. Como fue adelantado al analizar los resultados del ANOVA general y de los ANOVAs realizados para cada sexo por separado; los valores transformados de DO, AC y LT correspondientes a las moscas criadas a 25°C muestran valores mayores que los de aquellas crecidas a 17°C. En cambio, la media de los valores transformados de TA no parece

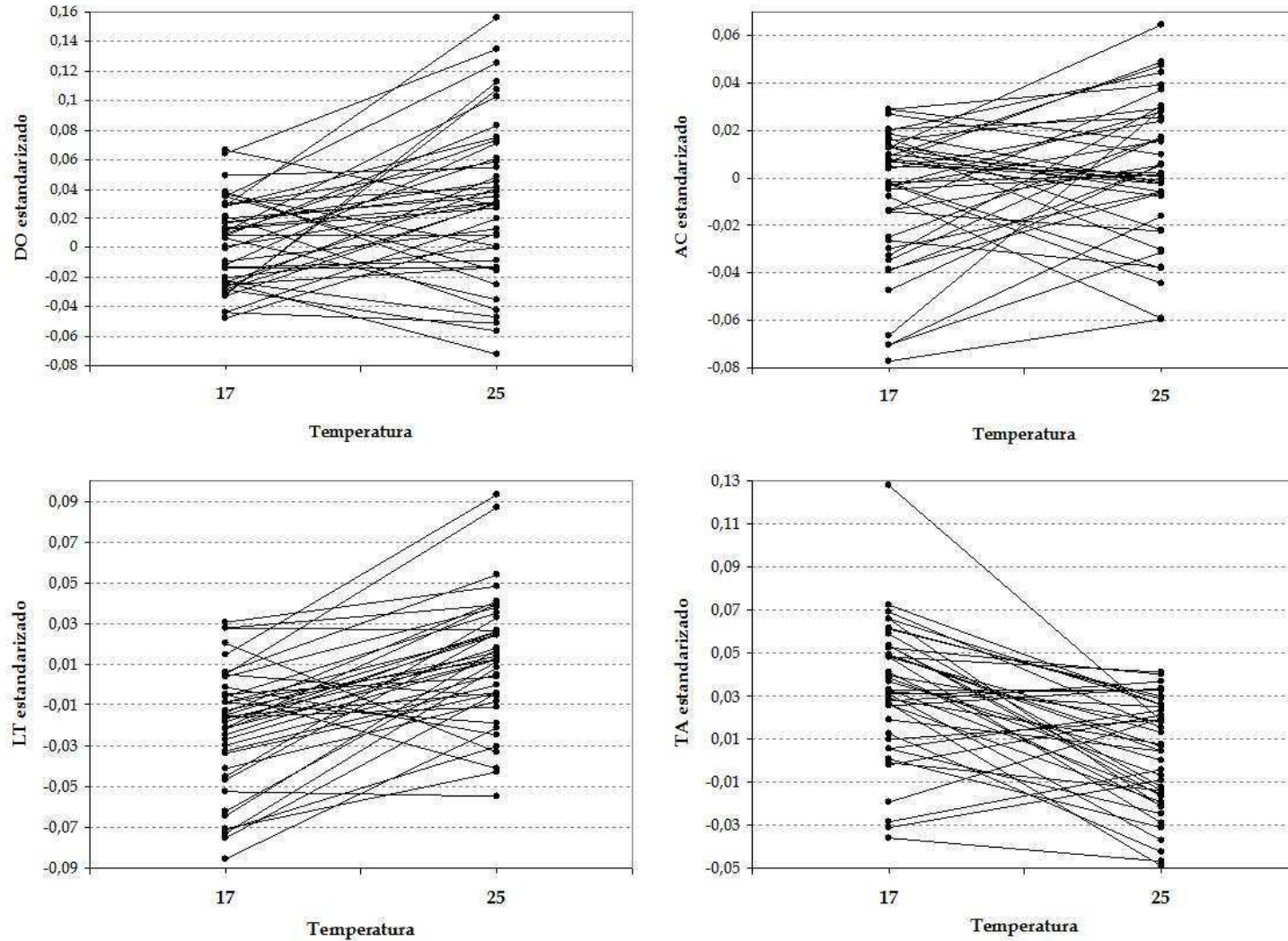
diferenciarse entre temperaturas en las hembras mientras que presentan el patrón opuesto en los machos.

Por un lado, al observar la figura de las hembras más detenidamente se puede ver que, en el caso de TA, una línea en particular presenta un valor medio mucho menor que el de las demás incrementando la varianza entre líneas a 17°C (Figura 4.12). Esta línea, BG00373, ha sido anteriormente mencionada ya que el gen afectado por la mutación en este caso, *CG11226*, afectó a todos los caracteres en las hembras criadas a 17°C (Tablas 4.3 y 4.4). En los machos crecidos a menor temperatura, la inserción del elemento *P* que afectó a este gen disminuyó el tamaño de AC y LT y afectó a la conformación del ala estimada a partir de DR (Tabla 4.3; Imberti, 2008). En cambio, BG00373 no mostró diferencias significativas con respecto al control para ninguno de los caracteres vinculados al tamaño corporal en moscas criadas a 25°C (Tabla 2.3 del Capítulo 2) aunque si mostró dichas diferencias con respecto a ambas variables estimadoras de la conformación del ala en las hembras y en relación a DP en los machos crecidos a esa temperatura (Tabla 4.3).

Por otro lado, la observación de la figura de los machos permite inferir que, nuevamente en el caso de TA, el valor medio de una línea en particular es mucho mayor que el de las demás incrementando en la varianza entre líneas (Figura 4.13). Esta línea, BG01822, ha sido reiteradamente mencionada a lo largo de este capítulo ya que el gen mutado en este caso, *Imp*, parece afectar a la mayoría de los caracteres vinculados a la morfología del ala a 17°C (todos excepto TA en las hembras; Tabla 4.3). En relación a los otros caracteres analizados a 17°C, la inserción del elemento *P* en *Imp* disminuyó el tamaño de los tres en las hembras y no afectó a los machos (Imberti, 2008). Finalmente, la mutación de este gen sólo aumentó DO en los machos a 25°C (Tabla 2.3 del Capítulo 2).



**Figura 4.12:** Interacción genotipo x ambiente (línea x temperatura) para cada carácter vinculado al tamaño corporal en hembras. DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.



**Figura 4.13:** Interacción genotipo x ambiente (línea x temperatura) para cada carácter vinculado al tamaño corporal en machos. DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.

## Análisis de la conformación del ala

### Análisis genético-cuantitativo

Similarmente a lo hecho en el apartado anterior, se realizó un ANOVA general para analizar las diferencias entre las temperaturas y los sexos para la variable estimadora de la conformación del ala univariada, DP. Como ya se explicó antes, este análisis también permite cuantificar el efecto del factor genético, debido a la inserción del elemento *P*, y de la interacción entre el genotipo y ambos factores fijos en la variación de dichos caracteres. Los resultados mostraron que los factores fijos fueron significativos de lo que se desprende que existen diferencias significativas en la conformación del ala entre sexos y temperaturas (Tabla 4.10). Además, los análisis revelaron la existencia de una interacción significativa entre ambos factores fijos, la cual se puede explicar por un cambio de la conformación del ala con la temperatura que es mayor en las hembras que en los machos. Al mismo tiempo, los resultados mostraron un aporte significativo del factor genético y de la interacción entre este factor y la temperatura a la varianza fenotípica total (Tabla 4.10). Sin embargo, el análisis mostró que la interacción entre el genotipo y el sexo no fue significativa, de manera análoga a lo observado en los análisis de los demás caracteres (Tabla 4.7).

**Tabla 4.10:** Principales resultados del ANOVA realizado con los valores transformados de DP de acuerdo con un modelo con los factores temperatura (fijo), sexo (fijo) y línea (aleatorio). Se muestra el valor de *F* y su significancia para cada fuente de variación así como el porcentaje de la varianza explicado por cada fuente de variación aleatoria (CV).

Fuente de variación	<i>F</i>	CV(%)
Línea	2,52**	8,3
Temperatura	184,28***	-
Sexo	14,95***	-
Línea x Temperatura	2,60**	6,6
Línea x Sexo	1,07	-
Temperatura x Sexo	14,40***	-
Línea x Temperatura x Sexo	1,55*	2,9

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Por último, la interacción triple fue significativa, similarmente a lo observado en los análisis de los caracteres vinculados al tamaño corporal (Tabla 4.10). Igual que antes, este resultado es muy importante dado que en este modelo, los cuadrados medios de la interacción triple son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a las otras interacciones. Del

mismo modo, los cuadrados medios de las interacciones aleatorias de menor orden (una de las cuales fue significativa) son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a los factores principales. Por lo tanto, en este caso también se realizaron ANOVAs separados para cada sexo para tener una idea más cabal del aporte del factor genético, del ambiental y de la interacción genotipo x ambiente. Estos análisis revelaron que el efecto de la temperatura fue significativo en ambos casos (Tabla 4.11). A pesar de que el factor línea fue significativo sólo en el caso de los machos, la interacción entre la línea y la temperatura fue altamente significativa en ambos sexos (Tabla 4.11). El aporte de los factores genéticos (línea y línea x temperatura) fue del 12% en las hembras y del 19% en los machos (Tabla 4.11).

**Tabla 4.11:** Principales resultados de los ANOVAs realizados con los valores transformados de DP de acuerdo con un modelo con los factores línea (aleatorio) y temperatura (fijo) en cada sexo. Se muestra el valor de *F* y su significancia para cada fuente de variación así como el porcentaje de la varianza explicado por cada fuente de variación aleatoria (CV).

Fuente de variación	Hembras		Machos	
	<i>F</i>	CV (%)	<i>F</i>	CV (%)
Línea	1,69*§	5,8	2,88***	11,7
Temperatura	149,99***	-	114,78***	-
Línea x Temperatura	3,15***	11,6	2,38***	7,2

\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . § No significativo tras aplicar la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples ( $P_B = 0,0167$ ).

Como ya se explicó, los cuadrados medios de la interacción aleatoria son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a cada una de las fuentes de variación principales. Por lo tanto, para evaluar el efecto del factor línea en ambos casos, se realizaron ANOVAs con los datos correspondientes a cada temperatura por separado. Estos análisis revelaron la existencia de abundante variabilidad genética para la conformación del ala en ambos sexos y temperaturas (Tabla 4.12).

Finalmente, se estudió el aporte del cambio de escala y el cambio de rango a la interacción genotipo-ambiente ( $G \times A$ ), significativa en ambos sexos. La correlación genética entre las mediciones del mismo carácter en distintos ambientes fue mayor que la observada para los caracteres vinculados al tamaño corporal en ambos sexos (Tabla 4.12). El porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por la correlación fue del 14% en las hembras y del 41% en los machos (Tabla 4.12). Estos valores indican que un número de genes que parece ser algo mayor que en el caso de los caracteres vinculados al tamaño corporal, controla la

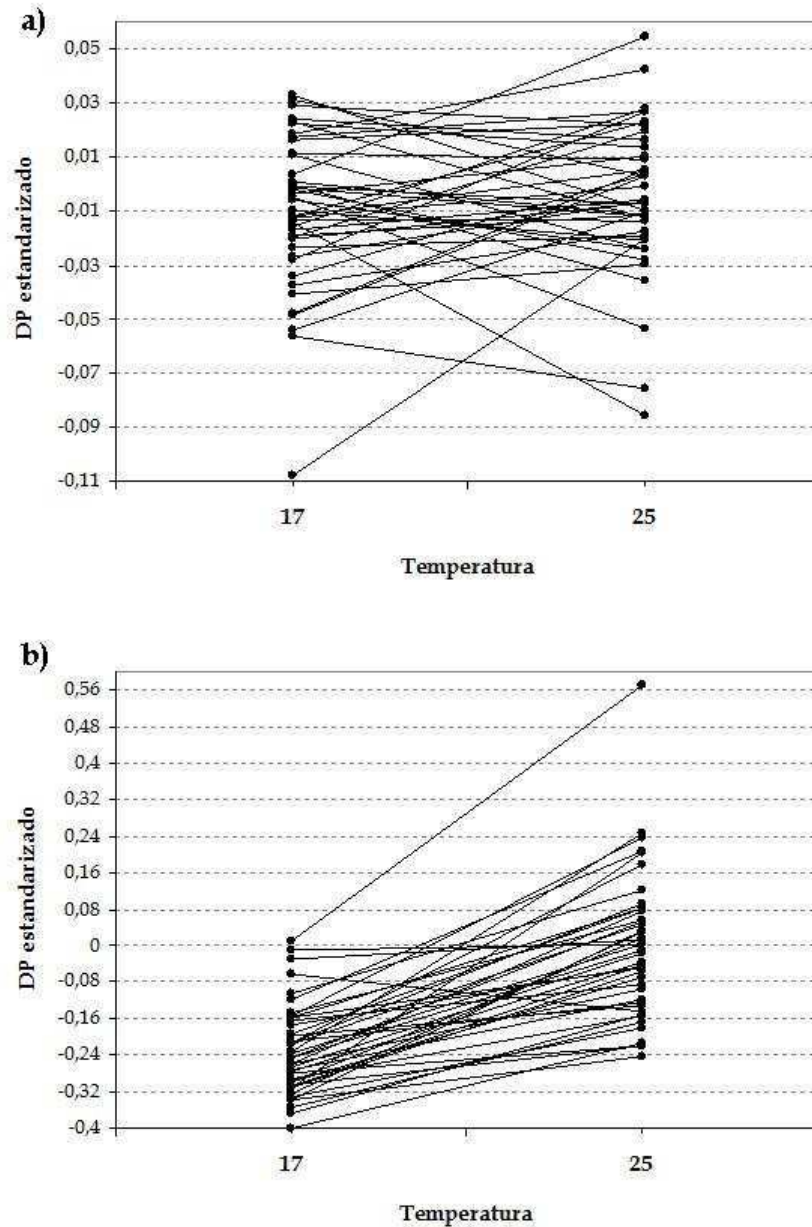
expresión de la conformación del ala en ambas temperaturas. Tanto en machos como en hembras, las diferencias en la varianza genética (variación entre líneas) entre temperaturas (el cambio de escala) explicó un porcentaje menor de la correlación que las desviaciones de la correlación perfecta entre temperaturas (cambio de rango) ya que los valores de esta última fuente fueron superiores al 90% en ambos sexos (Tabla 4.12). Esto se puede ver claramente en la Figura 4.12 que muestra el valor medio de DP para cada línea a 17°C y a 25°C en ambos sexos.

**Tabla 4.12:** Principales resultados de los ANOVAs realizados con los valores transformados de DP en cada sexo y temperatura. Se muestra el valor de  $F$  y su significancia así como el porcentaje de la varianza explicado por el factor línea. Además, se muestra el coeficiente de correlación entre ambientes ( $r_{GxA}$ ) y el porcentaje de la varianza de la interacción genotipo  $\times$  ambiente ( $V_{GxA}$ ) explicado por el cambio de escala (E) y por el cambio de rango (R).

	Línea <sub>25°C</sub>	Línea <sub>17°C</sub>	$r_{GxA}$	$V_{GxA}$ (E-R)
<u>Hembras</u>				
$F$	3,21	5,43	0,37	5,16-94,84
CV (%)	13,4	20,2		
<u>Machos</u>				
$F$	4,30	4,40	0,64	8,96-91,04
CV (%)	18,5	16,4		

$p < 0,000001$  para ambos valores de  $F$ .

Los resultados del ANOVA general así como los de los ANOVAs realizados en cada sexo ya habían mostrado que los valores transformados de DP correspondientes a las moscas criadas a 25°C fueron diferentes de los de aquellas crecidas a 17°C (Tablas 4.10 y 4.11). Asimismo, la interacción entre la temperatura y el sexo había permitido observar que el cambio en dichos valores fue mayor en las hembras que en los machos (Tabla 4.10). Este patrón general puede notarse al observar la Figura 4.14. Sin embargo, la observación detenida de esta figura también permite ver que una línea en particular aumentó la varianza entre líneas a 17°C en las hembras (Figura 4.14a). Esta línea, que presentó los menores valores de DP a 17°C así como valores bastante bajos para dicha variable a 25°C, es BG00373 y ha sido reiteradamente mencionada a lo largo de este capítulo (ver sección anterior). Vale la pena recordar que el gen afectado por la mutación en este caso fue CG11226 (Tabla 4.3).



**Figura 4.14:** Interacción genotipo x ambiente (línea x temperatura) para DP en las hembras (a) y en los machos (b).

Una breve inspección de la misma figura permite notar que una línea en particular presentó los mayores valores de DP a ambas temperaturas en los machos y aumentó dramáticamente la varianza entre líneas a 25°C (Figura 4.14b). Esta línea, BG01902, también ha sido mencionada anteriormente en este capítulo ya que el gen afectado por la mutación en este caso, *mam*, modificó la conformación del ala (según los valores de DR) en las moscas de ambos sexos criadas a 17°C (Tablas 4.3). En relación con los demás caracteres analizados a dicha temperatura, esta línea sólo disminuyó AC en las hembras (Imberti, 2008). En cambio, esta línea mostró una disminución de TA con respecto al control en los machos criados a 25°C así



como una modificación de la conformación del ala (de acuerdo con los valores de ambas variables estimadoras, DP y DR) en las moscas de ambos sexos crecidas a esa temperatura (Tabla 4.3).

## **Discusión**

Se utilizaron 42 de las 191 líneas BDGP estudiadas a 25°C (Capítulos 2 y 3) para identificar genes candidatos involucrados en la determinación de los cuatro caracteres de tamaño corporal analizados (la distancia interocular, DO; el ancho de la cabeza, AC; el largo del tórax, LT y el tamaño del ala, TA) y de la conformación del ala (estimada a partir de la distancia de procrustes, DP y las deformaciones relativas, DR) a 17°C. Dado que Marcos Imberti (2008) realizó un estudio bastante exhaustivo de DO, AC y LT; sólo se discutirán los resultados de los análisis nuevos llevados a cabo con los datos obtenidos en el marco de su tesis de licenciatura. Además, este capítulo incorporó el análisis de la morfología del ala realizado mediante la utilización de morfometría geométrica, por lo que la primera parte estará relacionada, predominantemente, con la discusión de dichos resultados. Asimismo, este análisis permitió comparar la totalidad de los resultados derivados de los análisis de las 42 líneas criadas a ambas temperaturas. De esta manera, la segunda parte se centrará en la discusión del análisis de la plasticidad fenotípica asociada a los genes vinculados a esas líneas.

### **Análisis de las líneas criadas a 17°C**

#### Análisis de los caracteres de tamaño corporal

La correlación genética entre cada par de variables fue positiva y altamente significativa en ambos sexos. El porcentaje de la varianza total explicado por la correlación varió entre el 60% y el 77% en las hembras y entre el 32% y el 74% en los machos. El ordenamiento de los pares de variables de acuerdo a dichos porcentajes difiere bastante entre sexos. En general, estos resultados difieren de los obtenidos para las 191 líneas BDGP estudiadas a 25°C. Por un lado, los valores del coeficiente de correlación son bastante más altos en el caso de las líneas criadas a 17°C. Por otro lado, el ordenamiento de los pares de variables de acuerdo a dichos valores muestra diferencias entre temperaturas considerando a cada sexo por separado. Finalmente, el porcentaje de la varianza explicado por la correlación entre caracteres derivados del mismo disco imaginal aumenta un poco en el caso de DO-AC y disminuye en el de LT-TA y ninguno ocupa el primer lugar en el ordenamiento general. La correlación genética entre los sexos para cada variable fue positiva y altamente significativa en todos los casos y el porcentaje de la varianza total explicado por la correlación estuvo entre el 40% y el 50%. En general, cada uno de estos caracteres mostró una correlación menor entre sexos que con los demás caracteres dentro

del mismo sexo. Esto también constituye una diferencia con respecto a los resultados obtenidos a 25°C, en los que se observó que las únicas correlaciones significativas entre sexos explicaron un porcentaje de la varianza mayor que con ningún otro carácter dentro del mismo sexo.

Las diferencias observadas entre temperaturas podrían deberse a que el análisis realizado a 25°C incorporó un número mucho mayor de líneas que debieron ser criadas en distintos bloques. Sin embargo, los análisis realizados con 42 líneas criadas en un mismo bloque a 25°C revelaron resultados similares a los obtenidos a partir del estudio de todas las líneas crecidas a 25°C. De esto se deduce que las diferencias observadas entre temperaturas probablemente no se deben a la corrección empleada para unificar todos los datos correspondientes al experimento realizado a 25°C. Asimismo, los análisis realizados con las 42 líneas estudiadas a 17°C pero criadas en distintos bloques a 25°C también mostraron resultados similares a los obtenidos a partir del estudio de todas las líneas criadas a 25°C. A partir de esto se infiere que las diferencias observadas entre temperaturas aparentemente tampoco se deben a las líneas particulares incluidas en el análisis de los datos obtenidos a 25°C. De esta manera, los resultados sugieren que las correlaciones son simplemente mayores a menor temperatura.

Si bien los coeficientes de correlación obtenidos en los análisis hechos a 17°C parecen ser más consistentes con los derivados de estudios previos (ver el Capítulo 2 para más detalles); algunos autores no mencionan la temperatura a la que criaron a las moscas (Cowley & Atchley, 1988, 1990) y los que lo hacen no emplearon la misma temperatura que aquí (De Moed *et al.*, 1997; Scheiner *et al.*, 1991). Además, los resultados de los análisis realizados a 17°C continúan sin dar mayor apoyo a la hipótesis de que los caracteres derivados del mismo disco imaginal están mejor correlacionados entre sí que aquellos que provienen de precursores diferentes (Capítulos 1 y 2; Cowley & Atchley, 1990). Finalmente, los resultados de las correlaciones entre sexos a 17°C también sugieren la existencia de cierto dimorfismo sexual en la arquitectura genética de los caracteres de tamaño corporal.

Los resultados de los análisis genético-cuantitativos de todos los caracteres estudiados a 17°C (Imberti, 2008; este capítulo) y a 25°C (Capítulo 2) mostraron pequeñas diferencias relacionadas con el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por las fuentes de variación genéticas, que tiende a ser mayor a 25°C. Las diferencias podrían deberse, como se dijo anteriormente, a que el análisis realizado a 25°C implicó un número mayor de líneas criadas en diferentes bloques. Sin embargo, los análisis realizados con los grupos de líneas mencionados anteriormente (las 42 líneas criadas en un mismo bloque a 25°C, por un lado, y las 42 líneas estudiadas a 17°C pero crecidas en distintos bloques a 25°C, por otro lado) revelaron que dicho porcentaje tiende a aumentar con la disminución de la temperatura. De todos modos, el patrón observado en ambos casos sugiere que un número importante de genes contribuye, de

manera sexo-específica, a la expresión de los caracteres vinculados al tamaño corporal en ambas temperaturas.

Los análisis de TA, estimado a partir del tamaño de centroide, revelaron que 10 de las 42 líneas estudiadas difirieron significativamente de la línea control y que ninguna de ellas mostró tales diferencias en ambos sexos simultáneamente. Es más, las mutaciones aumentaron TA en los machos y lo disminuyeron en las hembras. Esto está de acuerdo con el efecto significativo de la interacción entre la línea y el sexo mencionado anteriormente y con los resultados relacionados con los demás caracteres obtenidos tanto a 17°C (Imberti, 2008) como a 25°C (Capítulo 2). Por un lado, en tres de las cuatro líneas significativas para las hembras se pudo identificar un gen asociado a la inserción del elemento *P* (*CG11226*, *spict* y *Btk29A*). Por otro lado, en las seis líneas significativas para los machos se pudo identificar al menos un gen asociado a la mutación (*CG13333*, *CG13334*, *CG17574*, *CG13130*, *bib*, *CG11226*, *Imp* y *eas*). Por último, ninguna de las líneas significativas a 17°C resultó significativa a 25°C. En cambio, muchas de las líneas que no presentaron diferencias significativas en relación al control a menor temperatura si lo hicieron cuando fueron estudiadas a 25°C. De estas observaciones se concluye que las bases genéticas y consecuentemente la arquitectura genética del TA difiere no sólo entre sexos sino también entre moscas desarrolladas a 17°C y aquellas criadas a 25°C.

En términos más generales, ninguna de las 42 líneas analizadas mostró diferencias significativas con respecto al control en la mayor parte de los caracteres en ambos sexos. Sólo se encontraron cuatro líneas que mostraron dichas diferencias en las hembras que son las mencionadas anteriormente por haber afectado a TA en ese sexo. La inserción del elemento *P* en *CG11226* y en *spict* disminuyó el tamaño de todos los caracteres de manera similar. En cambio, BG00930 (en la que no se pudo identificar un gen afectado por la mutación) y BG01290 (en la que *Btk29A* fue el gen mutado) mostraron una disminución desigual de todos los caracteres. Aparentemente, hasta el momento de realizar este trabajo, no hubo registros relacionados con el efecto fenotípico de *CG11226*. Con respecto a *spict* y *Btk29A*, la base de datos de Flybase (Flybase, quinta publicación) presenta una cantidad considerable de información; sin embargo, no hay referencias en relación con los efectos de estos genes en el tamaño de los órganos o del cuerpo. Por lo tanto, aun cuando estos genes pleiotrópicos aparentemente juegan un rol en la determinación del tamaño corporal, parece que raramente han sido asociados al control del crecimiento.

#### Análisis de la conformación del ala

El análisis genético-cuantitativo de la conformación del ala, estimada a través de DP, reveló la existencia de una importante variación genética a 17°C que explicó un porcentaje de la

varianza fenotípica total comparable al de TA estudiado a la misma temperatura. Algo similar ocurrió con la dependencia que mostró dicha variación con el sexo. Sin embargo, al comparar los resultados de los análisis de DP realizados a ambas temperaturas, se observaron pequeñas diferencias relacionadas con el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por las fuentes de variación genéticas, que tiende a ser mayor a 25°C. Estas diferencias podrían deberse, similarmente a lo mencionado con anterioridad, a que el análisis realizado a 25°C implicó un número mucho mayor de líneas provenientes de distintos bloques. En ese sentido, el análisis realizado con las 42 líneas estudiadas a 17°C pero crecidas en distintos bloques a 25°C reveló que el porcentaje mencionado parece ser algo mayor a menor temperatura. De todos modos, el patrón observado a 17°C fue similar al obtenido a mayor temperatura y sugiere que un número importante de genes contribuye, de manera sexo-específica, a la expresión de la conformación del ala. En general, estos resultados están de acuerdo con las estimaciones hechas previamente para este carácter (Birdsall *et al.*, 2000; Dworkin & Gibson, 2006; Mezey *et al.*, 2005; Mezey & Houle, 2005; Weber, 1990; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2005; 2008; Zimmerman *et al.*, 2000). Sin embargo, tal y como se mencionó en el Capítulo 3, estos resultados difieren de los de algunos de esos estudios (Birdsall *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2000) en relación a la fuerte dependencia que mostró la base genética de la conformación del ala con respecto al sexo. Por lo tanto, estos resultados refuerzan la idea acerca de que los estudios futuros relacionados con este tema, a diferencia de varios análisis previos (Mezey *et al.*, 2005; Weber, 1990; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2005), deberían incorporar a ambos sexos en los análisis. Finalmente, al comparar los resultados de los análisis de DP realizados a ambas temperaturas se pudo notar que sólo una línea se diferenció del control en ambos casos y lo hizo únicamente en las hembras. El gen mutado en esta línea, que es una de las que mostraron diferencias con respecto al control para TA en este sexo, es *CG11226*.

El análisis de la conformación del ala mostró que 41 líneas mostraron diferencias significativas con respecto al control en al menos un sexo. Asimismo, estos análisis revelaron que 26 de las líneas significativas mostraron dichas diferencias en ambos sexos simultáneamente mientras que 15 presentaron cambios únicamente en las hembras. Al comparar los resultados de estos análisis con los derivados del estudio hecho a 25°C, se observó que 25 de las líneas significativas para algún sexo a 17°C, también mostraron diferencias significativas con respecto al control en algún sexo cuando fueron estudiadas a mayor temperatura pero sólo 12 mostraron resultados similares en ambas temperaturas.

En relación con las 41 líneas significativas, se pudo identificar un total de 39 genes candidatos. Para la mayoría de ellos, este es el primer registro de dicha función biológica. Sólo tres de los genes identificados figuran en las listas publicadas en los trabajos previos

mencionados en el Capítulo 3 (Butler *et al.*, 2003; Dworkin & Gibson, 2006; Rørth *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2005). Este es el caso de *sgl*, que fue identificado por Weber y colaboradores (2005) y el de *mam* y *Trithorax-like (Trl)*, que figuran en el trabajo de Dworkin y Gibson (2006). Los resultados de una búsqueda de los otros 37 genes en Flybase (quinta publicación) revelaron una posible asociación entre sólo tres de ellos y algún fenotipo relacionado con el desarrollo del ala y/o la disposición de sus venas. Estos genes (*bib*, *spict* y *Paps*), igual que los anteriores, también afectaron a la conformación del ala a 25°C (Capítulo 3).

Al considerar únicamente los genes cuya mutación causó los cambios más extremos en cada una de las dos primeras dimensiones analizadas, se pudo notar que la mayoría de las mutaciones afectaron diferencialmente a machos y a hembras. En el caso de los machos, el cambio en la conformación del ala debido a la mutación de *clt*, *Imp* y *CG32572* generó un desplazamiento de PCV (vena transversal posterior; ver Anexo metodológico II) que provocó un alargamiento de la región distal del ala y un acortamiento de la proximal. En cambio, la mutación de *mam* afectó predominantemente a la región posterior del ala y generó un desplazamiento levemente desigual de las venas que causó un achatamiento en el sentido antero-posterior. En el caso de las hembras, el cambio conformacional causado por la mutación de *spict* generó un desplazamiento de PCV que provocó un alargamiento de la región distal del ala y un acortamiento de la proximal; similarmente al efecto de las primeras mutaciones mencionadas. En cambio, la mutación de *eas* generó un desplazamiento leve de las venas que resultó en cierto achatamiento antero-posterior. Por último, la inserción en *Btk29A* causó un desplazamiento importante del extremo posterior de PCV hacia la parte anterior del ala. De acuerdo con lo mencionado hasta aquí, no parece existir información previa que relacione a *clt*, *Imp*, *CG32572*, *eas* y *Btk29A* con la morfología del ala. En cambio, se ha registrado en Flybase (quinta publicación) un fenotipo relacionados con PCV, producido por un alelo en particular de *spict*. Asimismo, en Flybase (quinta publicación) existen registros de varios fenotipos particulares relacionados con las alas, producidos por distintos alelos de *mam*. Aparentemente, este gen ha sido implicado, en general, en la morfogénesis del margen del ala y en la aposición de las superficies dorsal y ventral del ala a través de distintos trabajos que analizaron diferentes mutantes (Alexander *et al.*, 2006; Prout *et al.*, 1997). En particular, Dworkin y Gibson (2006), quienes estudiaron el fenotipo asociado a dos alelos diferentes del gen utilizando morfometría geométrica (ver el Capítulo 3); encontraron modificaciones de la conformación del ala un tanto diferentes a las descritas con anterioridad. Estos autores observaron que el cambio conformacional fue similar en ambos casos e implicó un desplazamiento de los puntos homólogos a través de la mayor parte del ala aunque mayor en la región anterior (Dworkin & Gibson, 2006). Las diferencias fenotípicas podrían estar relacionadas con distintas ubicaciones

del elemento *P*, tal y como fue observado para otros caracteres (Capítulo 2; Rollamnn *et al.*, 2006).

Todos los cambios conformacionales descritos anteriormente, que reflejan aproximadamente los extremos de la variación vinculada a la conformación del ala de la muestra; indican que las mutaciones generaron predominantemente un alargamiento de la región distal del ala y un acortamiento de la proximal. Sin embargo, en algunos casos se registró un desplazamiento de las venas tal que redundó en cierto achatamiento antero-posterior. En general, estos resultados son consistentes con los obtenidos a 25°C, en los que se observaron cambios conformacionales predominantemente en la dirección proximo-distal y un desplazamiento preferencial de PCV. Además, las mutaciones causaron distintos cambios generalmente pequeños en ambas temperaturas, lo que refleja la sensibilidad de la conformación del ala ante las modificaciones genéticas. Por un lado, estos resultados coinciden con lo observado en trabajos previos (Dworkin & Gibson, 2006; Weber *et al.*, 2005); en los que se observó que la mayoría de las mutaciones analizadas mostraron efectos pequeños pero significativos en la conformación del ala. Por otro lado, los resultados están de acuerdo con lo observado en distintos estudios que mostraron que la variación morfométrica presenta, simultáneamente, un alto grado de integración a través del ala y cierta especificidad local (Cavicchi *et al.*, 1981; Cowley & Atchley, 1990; Guerra *et al.*, 1997; Imasheva *et al.*, 1995; Klingenberg & Zaklan, 2000; Pezzoli *et al.*, 1997; Thompson & Woodruff, 1982; Weber, 1990; 1992).

### **Análisis conjunto de las líneas criadas a ambas temperaturas**

Como se dijo anteriormente, la aproximación de la norma de reacción denominada *del estado de carácter*, considera que un carácter medido en dos ambientes diferentes puede ser considerado como dos caracteres genéticamente correlacionados (Falconer, 1952; Via, 1987; Via & Lande, 1985). En particular, en este caso, se han analizado cuatro caracteres vinculados al tamaño corporal tanto a 17°C como a 25°C; por lo que cada uno de ellos puede ser considerado como dos caracteres, uno por temperatura estudiada. La correlación genética entre los valores de cada variable estudiada a ambas temperaturas fue positiva en todos los casos aunque fue significativa sólo para TA en las hembras y para todos los caracteres menos TA en los machos. El porcentaje de la varianza total explicado por la correlación fue del 10% en todos los casos excepto en el de LT, en el que alcanzó el 19%. Por lo tanto se puede decir que cada uno de los caracteres posee una base genética compartida entre ambientes pero no idéntica. Es más, para cada carácter vinculado al tamaño corporal, los genes que se expresan en ambas temperaturas parecen ser pocos y difieren entre los sexos.

Ninguna de las 42 líneas analizadas mostró diferencias significativas con respecto al control en la mayor parte de los caracteres en ambos sexos y temperaturas. Sólo se encontraron líneas que mostraron dichas diferencias en las hembras, las cuales han sido mencionadas en los resultados derivados de los análisis de pleiotropía realizados a 25°C (Capítulo 2). Por un lado, la inserción del elemento *P* en *msn* disminuyó el tamaño de todos los caracteres de manera similar pero lo hizo de manera más pronunciada a 17°C que a 25°C. Por otro lado, la mutación que afectó a *Lsd-2* causó una disminución desigual de los caracteres que, a la vez, fue mayor a 25°C que a 17°C. *Lsd-2* es un gen vinculado al transporte y almacenamiento de partículas lipídicas (Gronke *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003; Welte *et al.*, 2005) que ya ha sido analizado con cierta profundidad en el Capítulo 2. Con respecto a *msn* se puede decir que codifica una proteína receptora de señalización con actividad de kinasa que ha sido asociada a distintos procesos entre los que se encuentran diferentes instancias del desarrollo embrionario, la oogénesis y la regulación de la forma celular Flybase (quinta publicación). Dado que los resultados sugieren que estos genes son altamente pleiotrópicos y que, en general, no parece haber referencias que los relacionen con el tamaño de los órganos o del cuerpo; sería interesante realizar más estudios que permitan comprender su rol en la regulación del crecimiento.

El análisis general de todas las líneas criadas en ambas temperaturas, realizado separadamente para cada carácter (DO, AC, LT, TA y DP), reveló diferencias significativas entre los sexos y las temperaturas prácticamente en todos los casos. En particular, los análisis realizados con los caracteres vinculados al tamaño corporal (DO, AC, LT, TA), revelaron resultados que coinciden con los obtenidos previamente (Capítulo 2 de esta tesis; tesis de Imberti, 2008; análisis previos en este capítulo). Estos resultados mostraron que el efecto de la inserción del elemento *P* fue generalmente opuesto entre sexos, aumentando el tamaño en los machos y disminuyéndolo en las hembras. Además, los análisis de dichos caracteres revelaron que la línea control tendió a aumentar su tamaño más que las líneas mutantes a 17°C mientras que a 25°C ocurrió lo opuesto. Esto significa que los distintos caracteres analizados aumentaron su tamaño con la disminución de la temperatura, de acuerdo con lo observado en múltiples trabajos previos (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 2002; David *et al.*, 2006c; de Moed *et al.*, 1997; French *et al.*, 1998; Gebhardt & Stearns, 1993; Noach *et al.*, 1996; Nunney & Cheung, 1997; Partridge *et al.*, 1994; Scheiner *et al.*, 1991). Simultáneamente, los resultados implican que las mutaciones tendieron a disminuir y a aumentar el tamaño de los distintos caracteres (en relación al control contemporáneo) a 17°C y a 25°C respectivamente. Dado que el análisis de la conformación del ala (DP) mostró resultados análogos; se puede decir que, en todos los casos, tanto los caracteres estudiados como el efecto de las distintas mutaciones en los mismos mostraron cierta plasticidad con el cambio de temperatura.

Los análisis realizados para cada carácter, en machos y hembras por separado, revelaron la existencia de una importante variación genética que mostró una fuerte dependencia de la temperatura en todos los casos. Por un lado, los resultados relacionados con los caracteres vinculados al tamaño corporal mostraron que el aporte de los factores genéticos (línea y línea x temperatura) varió entre el 18% y el 27% en las hembras y entre el 14% y el 26% en los machos. Por otro lado, los resultados relacionados con la conformación del ala mostraron que el aporte de los factores genéticos fue del 12% en las hembras y del 19% en los machos. Asimismo, los resultados de estos análisis más particulares mostraron que todos los caracteres, excepto TA en las hembras, mostraron un comportamiento plástico con el cambio de temperatura.

Al estudiar la interacción entre el genotipo y el ambiente se puede observar que, en el caso de los caracteres vinculados al tamaño corporal, la correlación genética entre las mediciones del mismo carácter en distintos ambientes fue relativamente baja. En estos casos, el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por la correlación varió entre el 1% y el 14% en las hembras y entre el 12% y el 28% en los machos. Sin embargo, en el caso de la conformación del ala dichos porcentajes fueron del 14% y el 41% en las hembras y los machos respectivamente. Estos valores indican que un cierto número de genes, que parece ser algo mayor en el caso de la conformación del ala que en el de los caracteres vinculados al tamaño corporal, controla la expresión de los distintos caracteres en ambas temperaturas.

Tanto para los caracteres vinculados al tamaño corporal como para la conformación del ala, el cambio de escala (las diferencias en la varianza genética entre temperaturas) explicó un porcentaje mucho menor de la correlación que el cambio de rango (las desviaciones de la correlación perfecta entre temperaturas). Por un lado, en el caso de los caracteres de tamaño, los valores de la segunda fuente fueron superiores al 98% en las hembras y al 80% en los machos. Por otro lado, en el caso de la conformación del ala, dichos valores fueron superiores al 90% en ambos sexos. En el Capítulo 1 se ha mencionado que el tamaño corporal muestra una multiplicidad de interacciones con otros componentes del *fitness* (Calder, 1984; Roff, 1992; Schlichting & Pigliucci, 1998; Stearns, 1992). En general, en los distintos trabajos se ha observado una relación positiva entre dichos componentes y los distintos estimadores del tamaño corporal utilizados (por ejemplo, McCabe & Partridge, 1997; Partridge & Fowler, 1993; Roff, 1977; Santos *et al.*, 1992). Tomando esto en consideración al analizar la interacción entre el genotipo y el ambiente para todos los caracteres vinculados al tamaño corporal en ambos sexos, se podría decir que ningún genotipo presenta un valor adaptativo máximo en ambas temperaturas. De esta manera, si las poblaciones naturales presentaran variantes genéticas similares a las analizadas, la selección podría favorecer a distintos genotipos en ambientes con



temperaturas diferentes (Thomas & Barker, 1993). Esto, a su vez, permitiría mantener la variabilidad genética intrapoblacional dado que distintos genotipos presentarían el mejor fenotipo en relación con cada temperatura (Ungerer *et al.*, 2003). Algo similar se podría decir para la conformación del ala aunque, en este caso, la relación del carácter con el *fitness* no está tan clara (ver el Capítulo 3 para más detalles).

Al analizar más detenidamente la interacción entre el genotipo y la temperatura asociada a cada carácter en las hembras, se pudo observar que una mutación en particular disminuyó TA y DP más que las demás en ambas temperaturas. El gen afectado en este caso, *CG11226*, ya fue mencionado con anterioridad por ser uno de los más pleiotrópicos a dicha temperatura. Cuando se realizó el mismo análisis en los machos se pudo observar que una mutación incrementó el valor de TA mucho más que las demás también a 17°C. En este caso, la inserción del elemento *P* afectó a *Imp*, un gen al que también se hizo referencia previamente debido a que parece afectar a la mayoría de los caracteres vinculados a la morfología del ala a 17°C. Asimismo, se pudo observar que una mutación incrementó el valor de DP mucho más que las demás, sobretodo a 25°C. En este caso, la inserción del elemento *P* afectó a *mam*, un gen que también fue mencionado debido a su efecto en la conformación del ala de ambos sexos a 17°C.

En términos generales, los resultados de este capítulo resaltan la necesidad de estudiar la expresión de los genes que conforman la base genética de un carácter en distintos ambientes cuando se pretende profundizar en el conocimiento de la arquitectura genética de dicho carácter. Particularmente, los resultados sugieren que determinados genes (entre los que se puede destacar a *CG11226*, *Btk29A*, *Imp*, *Lsd-2*, *mam*, *msn* y *spict*) parecen tener alguna relación con el tamaño y/o la forma de los órganos en distintas temperaturas, por lo que sería interesante realizar más estudios que permitan comprender su rol en la regulación del crecimiento.

---

## **Capítulo V**

Análisis de la variación de distintos caracteres vinculados al tamaño corporal en líneas de *D. melanogaster* derivadas de poblaciones naturales.

---

### **Resumen**

La comprensión de la arquitectura genética de cualquier carácter cuantitativo requiere del conocimiento de todos los factores que intervienen en su expresión. Esto incluye cuantificar la variación genética responsable de la variabilidad fenotípica en poblaciones naturales y determinar cuáles son las fuerzas evolutivas que gobiernan su cambio. En *Drosophila* se han descrito clinas latitudinales y altitudinales para distintos caracteres con una notable participación de los caracteres vinculados al tamaño corporal. Si bien los patrones clinales podrían explicarse como el resultado de procesos demográficos, las evidencias sugieren que son el producto de la acción de la selección natural. De hecho, la existencia de clinas latitudinales paralelas para el tamaño del cuerpo en diferentes continentes y distintas especies de *Drosophila* avala fuertemente su origen adaptativo. Entonces, con el objetivo de estudiar la variación natural en el tamaño corporal asociada al segundo cromosoma de *D. melanogaster*; se midieron distintos estimadores del tamaño corporal en individuos de ambos sexos de 66 líneas isogénicas en las que se ha sustituido el cromosoma 2 por uno natural, derivadas de 9 poblaciones dispuestas a lo largo de gradientes geográficos de Argentina. Los análisis para cada carácter mostraron que las hembras son más grandes que los machos y que existen diferencias entre las poblaciones en todos los casos. Además, el factor línea fue siempre significativo explicando entre un 9% y un 19% de la varianza fenotípica total, lo que indica la existencia de una base genética de la variación, ligada al cromosoma 2, para todos los caracteres. Los análisis de regresión múltiple revelaron asociaciones positivas y significativas entre la distancia intraocular en las hembras y el ancho de cabeza en ambos sexos con la latitud; mientras que el largo del tórax de los machos mostró una relación negativa con la altitud. Si bien las regresiones explicaron hasta el 13% de la varianza fenotípica total, hay que recordar que la variación se debe a factores genéticos presentes en el cromosoma 2. Estos resultados, que apoyan parcialmente la hipótesis de adaptación térmica para los caracteres analizados, son discutidos en el marco de los antecedentes acerca de las clinas relacionadas con el tamaño corporal en *Drosophila*.

## Introducción

En el reino animal existe abundante variación para el tamaño corporal, la cual a menudo puede observarse a simple vista. Existen diferencias para este carácter complejo tanto entre especies como entre poblaciones de la misma especie y, finalmente, entre individuos pertenecientes a una misma población. Como fue anticipado en el Capítulo 1, la variación natural en el tamaño corporal así como aquella generada experimentalmente mediante la participación de diferentes factores ambientales, tales como la temperatura, la densidad larvaria, el recurso alimentario, etc., ha sido ampliamente estudiada en *Drosophila* (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 2002; Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Capy *et al.*, 1993; Carreira *et al.*, 2006; de Moed *et al.*, 1997; Hallas *et al.*, 2002; Louis *et al.*, 1982; Misra & Reeve, 1964; Parkash *et al.*, 1999; Partridge *et al.*, 1994; Sokoloff, 1966; Stalker & Carson, 1947; Trotta *et al.*, 2006). Particularmente, los adultos provenientes de zonas de mayor latitud habitualmente son más grandes que los derivados de regiones de menor latitud cuando son criados a la misma temperatura. Este patrón ha sido observado en distintas especies del género alrededor de todo el mundo (por ejemplo, Arthur *et al.*, 2008; Capy *et al.*, 1993; Coyne & Beecham 1987; Folguera, 2007; Hallas *et al.*, 2002; Huey *et al.*, 2000; James *et al.*, 1995; Karan *et al.*, 1998; Misra & Reeve, 1964; Parkash *et al.*, 1999; van't Land *et al.*, 1999).

El cambio continuo de un carácter a lo largo de un gradiente geográfico se denomina *clina* y brinda la oportunidad de identificar caracteres y genes asociados a determinadas condiciones ambientales. Asimismo, cuando un mismo patrón se encuentra en repetidas oportunidades y puede ser interpretado en términos de sus efectos en el *fitness*, ofrece una evidencia fuerte acerca de la acción de la selección (Endler, 1977). En ese sentido, la existencia de clinas latitudinales paralelas para el tamaño del cuerpo en diferentes continentes y distintas especies de *Drosophila* parece avalar su origen adaptativo (Calboli *et al.*, 2003; Gilchrist *et al.*, 2001; Gilchrist & Partridge, 1999; Gockel *et al.*, 2001; Huey *et al.*, 2000; Zwaan *et al.*, 2000). Además se debe considerar que los distintos estudios han encontrado patrones similares de variación clinal a pesar de haber estimado el tamaño corporal de manera diferente (por ejemplo, mediante el peso corporal, el largo del ala, el largo del tórax, el área del ala, etc.). Por último, tanto los distintos componentes del tamaño corporal (es decir, los distintos caracteres analizados) como la arquitectura genética asociada a su modificación con la latitud pueden mostrar diferencias entre continentes (Gilchrist & Partridge, 1999; Huey *et al.*, 2000). Las diferencias en los componentes de ambos niveles (el genotípico y el fenotípico) asociados a distintas clinas, sugiere que la selección natural ha producido efectos fenotípicos similares a partir de arquitecturas genéticas diferentes (ver el Capítulo 1 para más detalles).

## Patrones clinales en *Drosophila*: el tamaño corporal y otros caracteres relacionados

En *D. melanogaster*, se han encontrado clinas latitudinales para el tamaño corporal en casi todos los lugares donde se las ha buscado. Probablemente, la detectada entre África y Europa fue la primera (David, 1975). Posteriormente, se describieron clinas en regiones cercanas a la anterior; una entre el Báltico y el centro de Asia (Imasheva *et al.*, 1994) y otra en el sur de África (Capy *et al.*, 1993). Clinas similares se observaron a lo largo de la costa este de América del Norte (Coyne & Beecham, 1987; Long & Singh, 1995) y de Australia (James *et al.*, 1995). Finalmente, se encontraron clinas para este carácter en América del Sur (Folguera, 2007; van't Land *et al.*, 1999). Sin embargo, la variación del tamaño corporal correspondiente a poblaciones de *D. melanogaster* de India o Japón no parece ajustarse a un patrón clinal (David *et al.*, 1976). Aparentemente, el aumento del tamaño de las alas con la latitud se debe en mayor medida al incremento de la cantidad de células que a su tamaño (James *et al.*, 1995; 1997; Zwaan *et al.*, 2000). Otro carácter asociado al *fitness* como el tiempo de desarrollo, también mostró variación clinal en Australia, ya que los individuos provenientes de poblaciones de mayor latitud se desarrollaron más rápidamente que los de poblaciones de latitudes menores cuando fueron criados a la misma temperatura (James & Partridge, 1995). Sin embargo, la variación del tamaño del cuerpo no mostró ninguna relación con la del tiempo de desarrollo en estas poblaciones, por lo que la clina en un carácter no podría ser explicada como una respuesta correlacionada a la selección actuando sobre el otro carácter (James *et al.*, 1995). En cambio, los patrones observados podrían ser explicados por la acción de la selección sobre un tercer carácter correlacionado con los dos anteriores. En ese sentido, se ha observado que los individuos de poblaciones de mayor latitud muestran un aumento en la eficiencia de crecimiento lo que podría explicar su mayor tamaño y menor tiempo de desarrollo (Robinson & Partridge, 2001). A su vez, se ha mostrado que los individuos de poblaciones de mayor latitud presentan un peso crítico mayor (De Moed *et al.*, 1999) y que los recursos almacenados son utilizados de manera preferencial en el aumento del tamaño corporal (Bochdanovits & de Jong, 2003a). En cambio, se comprobó que los recursos almacenados en los individuos provenientes de poblaciones de menor latitud, son destinados mayormente a la supervivencia larvaria (Bochdanovits & de Jong 2003a).

Asimismo, muchas enzimas poseen diferentes alelos (alozimas) que a menudo poseen distintas actividades y cuya frecuencia varía clinalmente. En el caso de las enzimas fosfoglucomutasa o PGM (por su nombre en inglés: *phosphoglucomutase*), alcohol dehidrogenasa o ADH (por su nombre en inglés: *alcohol dehydrogenase*) y glicerol-3-fosfato dehidrogenasa o GPDH (por su nombre en inglés: *glycerol-3-phosphate dehydrogenase*); la alozima que presenta la mayor actividad a menor temperatura es la que ha sido encontrada más frecuentemente a latitudes mayores (Eanes, 1999; Verrelli & Eanes, 2001a). Aparentemente, una mayor actividad

de ADH y GPDH podría facilitar el almacenamiento de lípidos (de Jong & Bochdanovits, 2003). Asimismo, se ha relacionado la mayor actividad de PGM con un mayor contenido de glucógeno en las moscas adultas (Verrelli & Eanes, 2001b). Para las enzimas glucosa-6-fosfato dehidrogenasa y 6-fosfogluconato dehidrogenasa, la alozima que presenta la menor actividad es la que ha sido encontrada más frecuentemente a latitudes mayores. La menor actividad de estas enzimas ha sido vinculada a la disminución de la síntesis de lípidos y al aumento de la de glucógeno (Eanes, 1999). Finalmente, se ha observado que las poblaciones de latitudes mayores presentan niveles de glucógeno más elevados y que el contenido de glucógeno de las larvas está directamente relacionado con el tamaño corporal del adulto (de Jong & Bochdanovits, 2003).

### **Patrones clinales en *Drosophila*: el tamaño corporal y los polimorfismos cromosómicos**

En muchas especies de *Drosophila*, distintas secciones de los cromosomas pueden estar invertidas y la frecuencia de la inversión puede variar entre poblaciones siguiendo un patrón clinal (Krimbas & Powell, 1992). Se ha observado que la frecuencia de cuatro inversiones de *D. melanogaster* cosmopolitas, *In(2L)t*, *In(2R)NS*, *In(3L)Payne* y *In(3R)Payne*, disminuyen con la latitud en Norteamérica, Asia y Australia (Knibb *et al.*, 1981; 1982). La inversión *In(2L)t* ha sido encontrada también en África y Europa, donde su frecuencia disminuye con la latitud; y en América del Sur (van't Land *et al.*, 2000).

Dado que algunos genes de interés se encuentran dentro de las inversiones o cerca de los puntos de ruptura, se pueden generar patrones de desequilibrio de ligamiento entre ambos dificultando la identificación de patrones clinales para los genes en cuestión. Por ejemplo, el locus *Gpdh* se encuentra dentro de la inversión *In(2L)t* y el locus *Adh* fuera de ella. Esta inversión está asociada con los alelos *Gpdh<sup>F</sup>* y *Adh<sup>S</sup>*, mientras que el arreglo cromosómico estándar (*St*) muestra todas las combinaciones de alelos *Gpdh* y *Adh* (Malpica *et al.*, 1987; van't Land *et al.*, 2000; Weeks *et al.*, 2002). Asimismo, la inversión *In(2L)t* mostró ser más abundante a temperaturas mayores (van Delden & Kamping, 1989; 1991). Además, se demostró que los cambios en la frecuencia de esta inversión, asociados a distintas temperaturas, guardan una relación con distintos caracteres que es compatible con la idea de que las inversiones son el blanco de la selección natural (Betrán *et al.*, 1998; van Delden & Kamping, 1989; 1991; Weeks *et al.*, 2002).

Gockel y colaboradores (2001) encontraron que 5 de 19 de marcadores de tipo microsatélite exhibieron clinas en relación a la frecuencia del alelo más común y que cuatro de ellos estaban ubicados en regiones abarcadas por inversiones. Los resultados de sus análisis sugieren que la selección natural mantiene las diferencias entre las poblaciones para el tamaño corporal mostrando un patrón clinal (Gockel *et al.*, 2001). Posteriormente, distintos análisis de

QTLs revelaron que la mayor parte de la variación genética para el tamaño corporal en poblaciones naturales de Australia y Sudamérica de *D. melanogaster* podía ser explicada por factores ubicados en los autosomas, principalmente en el cromosoma 3 (Calboli *et al.*, 2003; Gockel *et al.*, 2002). Estos resultados coinciden con otros estudios que demostraron que la región asociada a la inversión *In(3R)Payne* controla una gran cantidad de variación vinculada al tamaño corporal (Rako *et al.*, 2006; Weeks *et al.*, 2002). Luego, Kennington y colaboradores (2006) investigaron los patrones de variación genética y de desequilibrio de ligamiento para 24 marcadores moleculares ubicados dentro o cerca de la inversión *In(3R)Payne*. Estos autores determinaron que las regiones de mayor asociación entre los marcadores y la inversión fueron los que mostraron patrones clinales más fuertes aunque el nivel de variación clinal fue mayor al explicado únicamente por la inversión (Kennington *et al.*, 2006). Posteriormente, estos autores examinaron las asociaciones de dichos marcadores y el tamaño del ala en una población ubicada en el centro de la clina del este de Australia y encontraron que tres alelos de dos regiones distintas dentro de la inversión mostraron efectos aditivos significativos tras haber removido el explicado por la inversión (Kennington *et al.*, 2007). Sin embargo, ninguno de los alelos afectó significativamente al tiempo de desarrollo, lo cual es consistente con otros estudios que no encontraron una relación entre este carácter y la inversión *In(3R)Payne* (Rako *et al.*, 2006; Weeks *et al.*, 2002). Todo lo anterior sugiere que distintos genes controlan a ambos caracteres y que los patrones clinales que presentan ambos caracteres han surgido de manera independiente (Kennington *et al.*, 2007). Asimismo, la existencia de múltiples regiones que controlan el tamaño corporal dentro de la inversión es consistente con la idea de que las inversiones persisten en las poblaciones porque mantienen juntas partes del genoma que actúan conjuntamente facilitando la adaptación local (Kennington *et al.*, 2007).

Finalmente, vale la pena mencionar que los genes de los caminos metabólicos vinculados al crecimiento y la proliferación celular mencionados en el Capítulo 1, el de la insulina y TOR; están asociados a tres de las inversiones cosmopolitas (de Jong & Bochdanovits, 2003). *chico*, *Pten* y *Tor* están localizados en la región de *In(2L)t* mientras que *Pi3K21B*, por un lado, y *Idgf1*, *Idgf2* y *Idgf3*, por el otro, están justo antes y después de esa inversión, respectivamente. *S6k*, *Ilp1*, *Ilp2*, *Ilp3*, *Ilp4*, *Ilp5* y *Pi3K68D* están ubicados en la región de *In(3L)P*; mientras que *Pk61C* y *Tsc2* (*gigas*) están antes y después de esa inversión, respectivamente. Por último, *Pi3K92E*, *InR* y *Tsc1* están localizados en la región de *In(3R)Payne* mientras que *Akt1* está justo antes esa inversión. De esta manera, la región correspondiente a cada una de las tres inversiones cosmopolitas mencionadas y sus alrededores presenta al menos un gen de los caminos metabólicos más importantes implicados en el crecimiento y la proliferación celular (de Jong & Bochdanovits, 2003).

## Variación en los patrones clinales: los factores causales

Las frecuencias de las inversiones, de las alozimas y del tamaño del cuerpo varían estacionalmente a lo largo del año (por ejemplo, Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Kamping & van Delden, 1999; Kari & Huey, 2000; Parkash *et al.*, 1999; 2005; Stalker & Carson, 1949; Tantawy, 1964). Asimismo, se han analizado distintos caracteres en poblaciones de diferentes especies correspondientes a gradientes altitudinales. Si bien estos estudios no son tan numerosos como los asociados a gradientes latitudinales, sus resultados han sido a menudo consistentes con la idea de que la temperatura es uno de los principales factores selectivos que da cuenta de los patrones de variación de distintos caracteres de *Drosophila* en la naturaleza (por ejemplo, Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Dahlgaard *et al.*, 2001; Dobzhansky, 1948; Etges, 1989; Folguera, 2007; Folguera *et al.*, 2008; Hammond *et al.*, 2001; Louis *et al.*, 1982; Munjal *et al.*, 1997; Norry *et al.*, 2001; Sambucetti *et al.*, 2006; Sørensen *et al.*, 2005; Stalker & Carson, 1948). De esta manera, el aumento del tamaño medio en las poblaciones ubicadas en regiones de clima más frío (es decir, a latitudes y altitudes mayores) suele ser considerado como una evidencia de adaptación térmica, aunque no se conozca exactamente el mecanismo subyacente (por ejemplo, Atkinson & Sibly, 1997; Blackburn *et al.*, 1999). De acuerdo con esta interpretación, distintos estudios experimentales han analizado el efecto de diferentes regímenes térmicos en caracteres vinculados al *fitness*. Una aproximación muy utilizada ha sido mantener réplicas de distintas poblaciones de una especie a diferentes temperaturas por un tiempo prolongado para luego estudiar determinados caracteres de interés. En general, estos experimentos han dado resultados similares: los individuos de poblaciones que fueron mantenidas a temperaturas bajas son genéticamente más grandes que los de las que fueron conservadas a temperaturas más elevadas (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 2002; Bochdanovits & de Jong, 2003a; Cavicchi *et al.*, 1985; de Moed *et al.*, 1997; Huey *et al.*, 1991; Partridge *et al.*, 1994; Trotta *et al.*, 2006). Asimismo, la evolución de un tamaño mayor debido a las bajas temperaturas fue generalmente acompañada de un tamaño celular mayor (Azevedo *et al.*, 2002; Partridge *et al.*, 1994), de tanto un mayor número (Partridge *et al.*, 1995) como de un mayor tamaño (Azevedo *et al.*, 1996) de huevos; un menor tiempo de desarrollo (James & Partridge, 1995), una mayor eficiencia de crecimiento larvario (Neat *et al.*, 1995) y una mayor tasa metabólica (Berrigan & Partridge, 1997). Algunas poblaciones experimentales presentaron un mayor *fitness* cuando fueron analizadas en el ambiente en el que fueron seleccionadas (por ejemplo, Bochdanovits & de Jong, 2003b; McCabe & Partridge, 1997; Nunney & Cheung 1997; Reeve *et al.*, 2000; Trotta *et al.*, 2006). Tanto en las poblaciones naturales como en las experimentales el mecanismo principal para alcanzar un tamaño corporal mayor parece ser la mayor eficiencia de crecimiento que poseen las poblaciones de latitudes mayores la cual podría estar relacionada con su mejor desempeño ante

la escasez de recursos (Bochdanovits & de Jong, 2003c).

A pesar de que los resultados de la evolución experimental bajo temperaturas altas y bajas muestran patrones similares a los observados en poblaciones de latitudes menores y mayores respectivamente, los detalles del mecanismo subyacente permanecen oscuros (por ejemplo, David *et al.*, 2006c; Santos *et al.*, 2005). Esto puede estar relacionado, entre otras cosas, con que la temperatura puede cambiar en forma compleja a lo largo de los gradientes geográficos. Por ejemplo, la amplitud térmica (la diferencia entre la temperatura máxima y la mínima, que suele coincidir con la diferencia entre la temperatura diurna y la nocturna) puede diferir en gran medida entre las poblaciones de altura y de llanura. Es más, se ha sugerido que la amplitud térmica, que está directamente asociada a la altitud, afecta significativamente a la variación de distintos caracteres vinculados al *fitness* como el tiempo de desarrollo, la viabilidad larvaria y distintos caracteres morfológicos (Folguera, 2007; Folguera *et al.*, 2008; Loeschcke *et al.*; 2000; Pétavy *et al.*, 2001a, b; 2004). Entonces, si bien la existencia de clinas suele ser considerada como una respuesta adaptativa a diferentes regímenes térmicos, los patrones de variación naturales sugieren que la temperatura media sólo puede brindar una explicación parcial de los mismos.

En esta parte de la tesis se realizó un análisis genético-cuantitativo del tamaño corporal en *D. melanogaster* con el objetivo de caracterizar parte de la arquitectura genética de este carácter complejo. En particular, se cuantificó el aporte de distintas fuentes de variación que contribuyen a la variación total de caracteres vinculados al tamaño corporal en individuos derivados de poblaciones naturales dispuestas a lo largo de gradientes geográficos en Argentina. Se utilizaron líneas donde se puso en homocigosis el cromosoma 2 proveniente de la naturaleza mientras que el resto del acervo génico fue sustituido por uno isogénico e idéntico para todas las líneas estudiadas. Esta particularidad, permitió analizar la porción de la varianza total de cada carácter explicada por factores genéticos asociados a ese cromosoma considerando, además, el efecto del sexo y de la población de origen. Finalmente, se pudo determinar que los resultados están parcialmente de acuerdo con la hipótesis de adaptación térmica asociada a gradientes geográficos para algunos de los caracteres analizados.

## **Materiales y métodos**

### ***Stocks de Drosophila***

Se utilizaron líneas de *D. melanogaster* derivadas de isolíneas provenientes de nueve poblaciones naturales dispuestas a lo largo de un gradiente ambiental de Argentina (Figura 5.1). Estas líneas fueron obtenidas mediante un esquema de cruzamientos con cepas balanceadoras, de forma tal de poner en homocigosis un cromosoma 2 de cada una de las isolíneas utilizadas



(para conocer más detalles acerca de la obtención de estas líneas y de sus características, ver el Anexo Metodológico I). Por lo tanto, estas líneas isogénicas tienen la particularidad de que varían únicamente con respecto al cromosoma natural que se puso en homocigosis (sustitución cromosómica) ya que su fondo genético (el resto de los cromosomas) es idéntico al de las líneas BDGP. Este sistema permite, tras criar a las moscas bajo las mismas condiciones, atribuir las diferencias fenotípicas observadas entre las líneas a factores genéticos presentes, en este caso, en el cromosoma 2.



**Figura 5.1:** Localidades en las que se tomaron las muestras de moscas de las que derivan las líneas analizadas.

Cabe aclarar que en el proceso de sustitución cromosómica e isogenización se perdieron muchas líneas, siendo la eficiencia promedio de un 25%. Esto se debería, principalmente, a la existencia de una alta proporción de líneas portadoras de alelos letales recesivos que se expresan durante el proceso de isogenización, en el cual se ponen en homocigosis dicho alelos.

De esta manera, se obtuvo un número variable de líneas en las que se ha sustituido el cromosoma 2 por uno natural a partir de cada población. La cantidad de líneas que se logró obtener para las distintas poblaciones, así como algunas características de dichas poblaciones, se muestran en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1:** Datos vinculados a los sitios de origen de las isolíneas de *D. melanogaster* de las que se derivaron las líneas de sustitución cromosómica analizadas.

Población	Latitud (Sur)	Longitud (Oeste)	Altitud sobre el nivel del mar (metros)	Nº de líneas de sustitución cromosómica
Güemes	24° 41'	65° 03'	695	11 (10)
San Blas	28° 25'	67° 06'	1061	9
Chilecito	29° 10'	67° 28'	1043	13
Jáchal	30° 12'	68° 45'	1238	3
San Juan	31° 27'	68° 31'	671	3
Barreal	31° 32'	69° 27'	1626	4
Uspallata	32° 35'	69° 22'	1915	6
Lavalle	32° 50'	68° 28'	647	8
Neuquen	38° 58'	68° 08'	260	14 (10)

§ El número que se indica es la cantidad de líneas que se logró obtener para cada población que generalmente se corresponde con el número de líneas analizadas. Algunas líneas presentaron una viabilidad tan baja que tuvieron que ser descartadas del análisis ya que el número de individuos de cada una no fue suficiente para realizar el análisis fenotípico. En estos casos, el número de líneas analizadas se indica entre paréntesis.

## Diseño Experimental

El análisis de las líneas de sustitución cromosómica se realizó en dos bloques. En cada uno se estudió un promedio de 35 de estas líneas además de la línea control de las líneas BDGP. En cada bloque se aplicó el diseño experimental detallado en el Anexo Metodológico I de forma tal de obtener las moscas adultas utilizadas para estimar las variables morfológicas. Algunas de las líneas utilizadas presentaron una viabilidad muy baja (líneas subvitalas) por lo que, en esos casos, la cantidad de adultos emergidos en los tubos fue bastante menor al resto de las líneas analizadas y por lo tanto, estas líneas fueron descartadas del análisis (Tabla 5.1). En el resto de los casos, generalmente, se disecaron, fotografiaron y midieron cinco moscas adultas de cada sexo por tubo.

## Caracteres vinculados al tamaño corporal

Los caracteres vinculados al tamaño corporal medidos en esas moscas adultas son los mismos que en las líneas BDGP: la distancia interocular (DO), el ancho de la cabeza (AC), el

largo del tórax (LT) y el tamaño del ala (TA). La manera en la que se fotografiaron los individuos y se realizaron las mediciones se detalla en el Anexo Metodológico II.

### **Análisis Estadísticos**

*Corrección de datos.* Para poder realizar un análisis con todas las líneas medidas en ambos bloques hay que saber, ante todo, si hubo diferencias entre los bloques; las cuales se deberían principalmente a factores ambientales. Esto puede hacerse analizando lo ocurrido con la línea control, línea compartida entre los bloques. Entonces, los valores de la línea control correspondientes a cada variable, fueron analizados de acuerdo al siguiente modelo de ANOVA:

$$Y = \mu + B + R + S + B \times S + R \times S + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media general del carácter analizado en cada caso; B es el factor bloque (fijo), con dos niveles; R es el factor réplica (aleatorio), anidado en el factor bloque, con tantos niveles como réplicas se utilizaron en cada bloque; S es el factor sexo (fijo), con dos niveles; y  $\epsilon$  representa al error.

Los resultados mostraron que, si bien existieron diferencias entre los bloques y los sexos, ninguna interacción resultó significativa. Esto permitió realizar una corrección sencilla: considerando a cada variable y sexo por separado, se sumó al valor de cada individuo del bloque para el que la línea control presentó una media menor, el valor de la diferencia entre las medias de la línea control de ambos bloques. Los valores corregidos de esta manera fueron utilizados en todos los análisis que se detallan a continuación.

*Análisis de correlación genética.* Se realizó un análisis de correlación entre cada par de variables en cada sexo por separado y otro entre sexos para cada variable. En estos análisis se utilizaron los valores medios de las 66 líneas. Debido a que se utilizaron los mismos valores en diferentes análisis de correlación, se aplicó la corrección de Bonferroni ( $P_B = 0,0125$ ).

*Análisis genético-cuantitativo.* Los valores correspondientes a cada variable, transformados como se explicó anteriormente, fueron analizados de acuerdo al siguiente modelo de ANOVA:

$$Y = \mu + P + L(P) + S + P \times S + L(P) \times S + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media general del carácter analizado en cada caso; P es el factor población (fijo), con tantos niveles como poblaciones analizadas; L es el factor línea (aleatorio, anidado en el factor población), con tantos niveles como líneas se utilizaron, que permitió analizar la existencia de variabilidad genética intrapoblacional; S es el factor sexo (fijo), con dos niveles, que permitió estudiar las diferencias entre las medias de machos y hembras; y  $\epsilon$  representa al error. Asimismo se estimaron los componentes de la varianza para las fuentes de variación aleatorias para cada variable morfológica lo que permitió conocer la proporción de la varianza

fenotípica total explicada por dichas fuentes de variación. En los casos en los que el factor población resultó significativo se determinó qué poblaciones son las responsables de dicho efecto mediante comparaciones *a posteriori* (contrastes HSD para tamaños muestrales diferentes).

En este modelo, el factor línea se encuentra anidado en el factor población por lo que no se puede conocer si existen diferencias en cuanto a los patrones genéticos entre las poblaciones. Es decir, los resultados vinculados a las fuentes de variación que incluyen al factor línea corresponderán al comportamiento medio que este presenta en las distintas poblaciones. Por lo tanto, se realizaron ANOVAs separados para cada población de forma tal de estudiar las fuentes de variación genéticas en cada una de ellas. Estos ANOVAs de dos factores presentan una interacción aleatoria (línea x sexo) cuyos cuadrados medios son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a cada una de las fuentes de variación principales. Por lo tanto, en los casos en los que esta interacción resultó significativa, se realizaron ANOVAs con los datos correspondientes a cada sexo por separado para evaluar el efecto del factor línea en cada uno de ellos.

Dado que se emplearon los mismos datos en distintos análisis, se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

*Análisis de regresión.* Se realizó un análisis de regresión múltiple *Forward stepwise* entre los valores de cada uno de los caracteres de tamaño corporal en cada sexo y las variables independientes latitud (considerando sus valores en el sistema decimal) y altitud. Asimismo, se realizaron los análisis de regresión considerando las siguientes transformaciones no lineales de las variables: X a la potencia de 2, 3, 4, 5 y  $\frac{1}{2}$ ,  $\ln(X)$ ,  $\log(X)$  y  $1/X$ ; donde X representa al carácter de tamaño corporal analizado en cada caso. En el caso de TA no se pudo computar X a la potencia de 3, 4 y 5 debido a que sus valores son muy grandes. En todos los análisis se utilizaron los valores medios de las 66 líneas.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el paquete STATISTICA (StatSoft Inc., 2004).

## **Resultados**

### **Análisis de correlación**

Se realizaron análisis de correlación para estudiar la relación, debida a factores presentes en el cromosoma 2, entre cada par de variables en cada sexo por separado y entre machos y hembras para cada carácter. La correlación genética entre cada par de variables fue positiva y altamente significativa en ambos sexos excepto para AC-TA en las hembras (Tabla 5.2). El porcentaje de la varianza total explicado por la correlación (el cuadrado de  $r$  x 100) varió entre el 11% (DO-TA) y el 49% (AC-LT) en hembras y entre el 16% (DO-LT) y el 45% (DO-AC) en

machos (Tabla 5.2). El ordenamiento de los pares de variables de acuerdo a dichos porcentajes difiere entre sexos al considerar cada posición exacta aunque se mantiene en términos generales. Es decir, en ambos sexos los coeficientes de determinación (el cuadrado de  $r$ ) de las correlaciones entre DO y los caracteres del tórax (LT y TA), están entre tres los más bajos junto con el correspondiente a la correlación entre AC y TA (significativo sólo en machos); el porcentaje de la varianza explicado por la correlación entre LT y TA es, en ambos casos, el tercero entre los mayores valores; y los coeficientes de determinación de las correlaciones entre AC y LT, por un lado y AC y DO por el otro, son los dos más altos (Tabla 5.2).

En términos generales, estos resultados difieren de los obtenidos para las líneas BDGP considerando cada sexo por separado (Tablas 2.1 y 5.2). En ese caso, los porcentajes más bajos incluían los de las correlaciones entre DO y AC, por un lado, y entre DO y TA, por el otro (Tabla 2.1). Asimismo, los valores correspondientes a las correlaciones entre LT y AC, por un lado; y entre LT y TA, por el otro, estaban entre los más altos (Tabla 2.1). En este caso, el patrón general mencionado se mantiene excepto para la correlación entre los caracteres vinculados a la cabeza (Tabla 5.2). El coeficiente de determinación correspondiente a la correlación entre DO y AC en el caso de las líneas BDGP era el anteúltimo (es decir, esta correlación era una de las que menos varianza fenotípica explicaba), mientras que en este caso ocupa el primer lugar en los machos y el segundo en las hembras (es decir, esta correlación es una de las que más varianza fenotípica explica; Tablas 2.1 y 5.2).

**Tabla 5.2:** Principales resultados de los análisis de correlación genética de los caracteres vinculados al tamaño corporal (valor de  $r$  y su significancia). Se realizó un análisis de correlación entre cada par de variables en los machos (sobre la diagonal), en las hembras (bajo la diagonal) y entre sexos para cada variable (sobre la diagonal). Los análisis se realizaron utilizando el valor medio de cada línea para cada carácter y sexo.

		Machos			
		DO	AC	LT	TA
Hembras	DO	0,61***	0,67***	0,41***	0,45***
	AC	0,66***	0,74***	0,64***	0,53***
	LT	0,49***	0,70***	0,76***	0,60***
	TA	0,34**	0,24	0,55***	0,65***

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.  
\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

La correlación genética entre los sexos para cada variable fue positiva y altamente significativa en todos los casos y el porcentaje de la varianza total explicado por la correlación

estuvo entre el 38% y el 58% (Tabla 5.2). Cada uno de estos caracteres mostró una correlación mayor entre sexos que con ningún otro carácter dentro del mismo sexo excepto DO, que presentó una correlación mejor sólo con AC en ambos sexos (Tabla 5.2). Esto también constituye una diferencia con respecto a los resultados obtenidos en el análisis de las BDGP, en los que se observó que sólo dos correlaciones fueron significativas entre sexos (DO y TA). Sin embargo, en esos casos también la correlación de cada carácter entre los sexos explicó un porcentaje de la varianza mayor que la correlación de cada uno de ellos con los demás caracteres dentro del mismo sexo (Tablas 2.1 y 5.2).

### **Análisis genético-cuantitativo**

Se realizaron análisis de varianza para analizar las diferencias entre las poblaciones y los sexos para los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal así como para cuantificar el efecto del factor genético, debido a diferencias en el cromosoma 2, y de la interacción entre el genotipo y el sexo en la variación de dichos caracteres. Los resultados de los ANOVAs mostraron que las hembras son significativamente más grandes que los machos para todos los caracteres vinculados al tamaño corporal (Tabla 5.3). Asimismo, los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas entre las poblaciones para todos los caracteres excepto TA (Tabla 5.3). Vale la pena destacar que, en principio, ambos tipos de diferencias se deben a factores genéticos presentes en el cromosoma 2. Además, el factor línea resultó ser altamente significativo en todos los casos explicando entre un 9% y un 19% de la varianza fenotípica total de lo que se desprende que existe abundante variabilidad genética intrapoblacional, asociada al cromosoma 2, para todos los caracteres (Tabla 5.3). La interacción entre la línea y el sexo fue significativa sólo para TA aunque el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por esta fuente de variación fue sólo del 2% (Tabla 5.3).

Dado que la interacción entre la línea y el sexo fue significativa para TA, y que en este modelo se utilizan los cuadrados medios de esta fuente de variación para calcular el valor de  $F$  de la interacción población x sexo; la significación asociada a dicho valor de  $F$  no es confiable. Por lo tanto se realizaron comparaciones *a posteriori* para determinar qué poblaciones difieren entre sí para dicho carácter en cada sexo. Estos análisis no revelaron resultados significativos. Asimismo, dado que el factor línea fue altamente significativo para TA, y que en este modelo se utilizan los cuadrados medios de esta fuente de variación para calcular el valor de  $F$  del factor población; la significación asociada a dicho valor de  $F$  no es confiable. Por lo tanto se realizaron comparaciones *a posteriori* para determinar qué poblaciones difieren entre sí en todos los casos, incluido TA. Los resultados de estos contrastes mostraron que existen diferencias entre las medias correspondientes a TA sólo entre Jáchal y Chilecito, que presentaron el menor y el

mayor tamaño respectivamente, considerando el promedio de todas las poblaciones (Tablas 5.4 y 5.5). De todos modos, vale la pena mencionar que Jáchal es una de las poblaciones de las que se derivó un número de líneas de sustitución cromosómica bastante pequeño, por lo que los valores mencionados podrían no representar adecuadamente a los reales.

**Tabla 5.3:** Principales resultados de los ANOVAs para los caracteres vinculados al tamaño corporal. Se realizó un ANOVA con los valores de cada variable de acuerdo con un modelo con los factores población (fijo), línea (aleatorio, anidado en población) y sexo (fijo). Se muestra el valor de *F* y su significancia para cada fuente de variación así como el porcentaje de la varianza explicado por cada fuente de variación aleatoria entre paréntesis.

Fuente de variación	DO	AC	LT	TA
Población	2,50*	2,70*	2,21*	0,31
Línea	4,15*** (9)	6,00*** (15)	6,51*** (15)	6,88*** (19)
Sexo §	427,29***	1346,48***	3235,60***	3409,05***
Población x Sexo	1,11	0,70	1,01	0,87
Línea x Sexo	1,16	1,29	1,08	1,37* (2)

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . § Las hembras mostraron valores medios mayores que los machos.

**Tabla 5.4:** Valores medios (en unidades arbitrarias) de los caracteres vinculado al tamaño corporal en cada población.

Población	DO	AC	LT	TA (x e <sup>16</sup> )
Güemes	137,91	261,51	290,45	6,84
San Blas	140,56	262,06	293,65	6,83
Chilecito	141,18	261,08	287,06	6,89
Jáchal	138,16	256,65	282,85	6,75
San Juan	141,89	261,32	290,98	6,87
Barreal	140,00	264,62	290,79	6,83
Uspallata	141,07	264,23	289,45	6,81
Lavalle	136,95	258,26	289,39	6,83
Neuquen	142,27	267,81	294,06	6,83

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.

**Tabla 5.5:** Principales resultados de las comparaciones *a posteriori* entre los valores medios de todas las poblaciones para cada variable vinculada al tamaño corporal. Se muestran la parte inferior de la tabla (resultados debajo de la diagonal) la cual, a su vez, ha sido dividida en dos (parte izquierda arriba y parte derecha debajo).

Continúa debajo →

	Barreal				Chilecito				Güemes				Jáchal			
	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA
Chilecito																
Güemes					***		*									
Jáchal		***	***			*		**		*	***					
Lavalle	*	***			***					*						**
San Blas							***		**					**	***	
San Juan									*				*	*	***	
Neuquen						***	***		***	***	*		**	***	***	
Uspallata									**					***	**	

→ Continuación de la tabla

	Lavalle				San Blas				San Juan				Neuquen			
	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA
Chilecito																
Güemes																
Jáchal																
Lavalle																
San Blas		***	**	**												
San Juan		***														
Neuquen		***	***	**		***			***							
Uspallata		***	***				*						*	**		

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

En relación con los demás caracteres (DO, AC y LT), la observación de los valores medios permitió notar que Neuquen y Jáchal fueron las poblaciones que generalmente presentaron los valores medios mayores y menores respectivamente (Tabla 5.4). Los resultados de los contrastes mostraron que Barreal es la población que presentó un menor número de diferencias significativas con las demás poblaciones considerando todos los caracteres vinculados al tamaño corporal, y estas diferencias involucran sólo a Jáchal y a Lavalle (Tabla 5.5). Asimismo, las comparaciones revelaron que Jáchal es la población que presentó un mayor



número de diferencias significativas con las demás poblaciones y, junto a Lavalle, son las únicas poblaciones que difirieron significativamente de todas las demás respecto de algún carácter (Tabla 5.5). En este caso se debe destacar que Barreal, igual que Jáchal, es una de las poblaciones de las que se derivó un número de líneas de sustitución cromosómica bastante pequeño. Por lo tanto, los resultados relacionados con esas poblaciones en particular podrían variar de manera importante si dicho número se incrementara.

Los principales resultados de los ANOVAs realizados con los datos de cada carácter vinculado al tamaño corporal en cada población, a fin de estudiar las fuentes de variación genéticas en cada una de ellas, se muestran en la Tabla 5.6. Los análisis revelaron que existen diferencias significativas entre los valores correspondientes a machos y a hembras en todos los casos (Tabla 5.6). Sin embargo, las fuentes de variación genéticas no mostraron resultados significativos en todos los casos (Tabla 5.6). Por un lado, Chilecito fue la única población que presentó variabilidad genética para todos los caracteres vinculados al tamaño corporal y dicha fuente de variación explicó entre un 18% (LT) y un 25% (TA) de la varianza fenotípica total (Tabla 5.6). Por otro lado, Jáchal y San Juan son las únicas poblaciones que no mostraron resultados significativos para el factor genético en ningún caso, tras haber aplicado la corrección de Bonferroni (Tabla 5.6).

**Tabla 5.6:** Principales resultados de los ANOVAs para los caracteres vinculados al tamaño corporal analizados en cada población por separado. Se realizó un ANOVA con los valores de cada variable de acuerdo con un modelo con los factores línea (aleatorio) y sexo (fijo). Se muestra el valor de *F* y su significancia para cada fuente de variación así como el porcentaje de la varianza explicado por cada fuente de variación aleatoria entre paréntesis.

	Barreal	Chilecito	Güemes	Jáchal	Lavalle	Neuquen	San Blas	San Juan	Uspallata
<b>DO</b>									
Línea	3,37	5,60** (19)	2,46	6,80	2,74	3,85* (12)	5,15* (9)	0,08	7,93* (10)
Sexo	28,75*	57,56***	64,80***	155,38**	56,22***	64,61***	76,24***	20,43*	110,28***
Línea x Sexo	0,93	1,61	1,04	0,40	0,96	1,56	0,84	1,28	0,62
<b>AC</b>									
Línea	15,92* (13)	8,32*** (24)	6,96** (15)	33,60* (18)§	21,90*** (16)	1,84	5,87* (16)	0,19	12,48** (22)
Sexo	474,40***	177,70***	284,66***	449,33**	530,95***	103,17***	158,01***	44,37*	346,61***
Línea x Sexo	0,42	1,36	1,07	0,282	0,31	2,13* (6)§	1,44	2,82	0,93
<b>LT</b>									
Línea	18,55* (15)	7,56*** (18)	16,99*** (27)	8,51	13,27** (16)	4,32* (11)	3,75* (8)§	0,31	6,63* (12)§
Sexo	1015,91***	596,46***	756,79***	412,60**	668,27***	373,16***	396,19***	38,51*	614,29***
Línea x Sexo	0,40	1,03	0,86	0,53	0,54	1,18	1,13	4,23* (14)	0,88
<b>TA</b>									
Línea	20,74* (21)	8,47*** (25)	4,68* (9)	2,25	6,96* (15)	11,55*** (31)	8,00** (18)	1,65	6,47* (15)§
Sexo	852,80***	388,72***	621,03***	118,83**	753,75***	990,65***	545,99***	78,72*	904,18***
Línea x Sexo	0,55	1,39	0,97	3,44* (10)§	1,05	1,37	1,08	4,38* (13)	1,20

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . § No significativo tras aplicar la corrección de Bonferroni.

En cambio, el factor línea fue significativo para todos los caracteres excepto DO en Barreal, Güemes y Lavalle; dónde explicó entre un 9% (TA en Güemes) y un 27% (LT en Güemes) de la varianza fenotípica total (Tabla 5.6). Neuquen presentó variabilidad genética para todos los caracteres excepto AC y San Blas lo hizo para todos menos LT (Tabla 5.6). En estos casos, la fuente de variación genética explicó entre un 9% (DO en San Blas) y un 31% (TA en Neuquen) de la varianza fenotípica total (Tabla 5.6). Finalmente, el factor línea fue significativo sólo para DO y AC en Uspallata, explicando el 10% y el 22% respectivamente (Tabla 5.6).

La interacción entre la línea y el sexo fue significativa únicamente en San Juan, tras haber aplicado la corrección de Bonferroni (Table 5.6). Esta población, que no mostró resultados significativos para el factor línea en ningún caso, presentó una interacción significativa sólo para LT y TA, explicando el 13% y el 14% respectivamente (Table 5.6). En estos casos, se evaluó el efecto del factor línea en cada sexo por separado y se determinó que sólo las hembras presentaron variabilidad genética para ambos caracteres. Sin embargo, el factor línea continuó siendo significativo únicamente en el caso de TA, tras aplicar la corrección de Bonferroni; y explicó el 32% de la variación fenotípica total.

Vale la pena recordar que la única población que mostró la existencia de variabilidad genética para todos los caracteres vinculados al tamaño corporal, Chilecito, es aquella en la que se estudió un número mayor de líneas (Tablas 5.1 y 5.6). Asimismo, las poblaciones en las que el factor línea mostró resultados negativos para todos los caracteres, Jáchal y San Juan, son las que presentan el menor número de líneas (Tablas 5.1 y 5.6). Quizás esto guarda alguna relación con el hecho de que una de ellas (San Juan) es la única que mostró resultados significativos para la interacción en algunos casos. El resto de las poblaciones mostraron la existencia de variabilidad genética mayormente para tres caracteres y presentan una cantidad intermedia de líneas (Tablas 5.1 y 5.6).

### **Análisis de regresión**

Se realizó un análisis de regresión múltiple *Forward stepwise* entre los valores de cada uno de los caracteres de tamaño corporal en cada sexo y las variables independientes latitud y altitud para saber si estas variables pueden explicar, aunque sea parcialmente, la variación fenotípica observada. Los resultados de estos análisis revelaron que DO y AC aumentan con la latitud en las hembras, mientras que, en los machos, AC es el carácter que se incrementa con este factor (Tabla 5.7). Asimismo, los resultados mostraron que LT disminuye con la altitud en los machos. Si bien la relación lineal entre los caracteres mencionados y las variables independientes explicó un porcentaje bajo (entre el 6% y el 8% en las hembras y entre el 12% y

el 13% en los machos) de la varianza fenotípica total observada (Tabla 5.7); se debe recordar que la varianza fenotípica se debe principalmente a factores genéticos presentes en el cromosoma 2.

**Tabla 5.7:** Principales resultados de los análisis de regresión múltiple *Forward stepwise* entre los valores de cada uno de los caracteres de tamaño corporal en cada sexo y las variables independientes latitud y altitud. Se muestran los valores de Beta, t y su significancia para la variable independiente que hizo un aporte significativo a la regresión (entre paréntesis) así como el valor de  $R^2$  de la misma. Todos los análisis se realizaron utilizando el valor medio de cada línea para cada carácter y sexo.

Carácter	Hembras			Machos		
	Beta	t	$R^2$	Beta	t	$R^2$
DO	0,29 (L)	2,41*	0,08	0,23	1,86	0,05
AC	0,25 (L)	2,09*	0,06	0,36 (L)	3,05**	0,13
LT	0,14	1,13	0,02	-0,27 (A)	-2,21*	0,13
TA	-	-	-	-	-	-

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . L: aporte significativo de la latitud, A: aporte significativo de la altitud. “-”: Ninguna variable independiente ingresó en el modelo de regresión.

Los análisis de regresión considerando las diferentes transformaciones no lineales de cada uno de los caracteres de tamaño corporal generaron resultados similares a los mencionados anteriormente (resultados no mostrados). Por un lado, en el caso de DO y AC en las hembras, los resultados de los análisis de todas las variables fueron significativos para la latitud. En el primer caso, los valores de Beta estuvieron entre 0,25 y 0,27 (excepto para 1/DO, en el que fue de -0,24) y la regresión explicó entre un 8% y un 9% de la variación fenotípica total. En el caso de AC, los valores de Beta estuvieron entre 0,29 y 0,30 (excepto para 1/AC, en el que fue de -0,28) y la regresión explicó entre un 6% y un 7% de la variación fenotípica total. En el caso de AC en los machos, los resultados de los análisis de todas las variables fueron significativos para la latitud; los valores de Beta estuvieron entre 0,36 y 0,37 (excepto para 1/AC, en el que fue de -0,35) y la regresión explicó entre un 12% y un 14% de la variación fenotípica total. Finalmente, en el caso de LT en los machos, los resultados de los análisis de todas las variables fueron significativos para la altitud; los valores de Beta estuvieron entre -0,27 y -0,28 (excepto para 1/LT, en el que fue de 0,27) y la regresión explicó entre un 13% y un 14% de la variación fenotípica total.

### **Identificación de las líneas con fenotipos más extremos**

Para identificar las líneas con los valores más extremos en cada caso, se ordenaron los valores medios de las líneas para cada carácter y sexo por separado. Las diez líneas que ocupan cada extremo de ese ordenamiento para cada carácter se muestran en la Tabla 5.8 para las hembras y en la Tabla 5.9 para los machos.

A continuación, se buscaron líneas en común entre machos y hembras en esas listas de líneas más extremas para cada carácter y, de entre estas líneas, se seleccionaron aquellas que mostraron valores extremos para más de un carácter simultáneamente. De este modo se identificaron las líneas que presentaron efectos más pleiotrópicos considerando todos los caracteres en ambos sexos (Tabla 5.10). Esta selección permitió escoger, posteriormente, las líneas a ser utilizadas en la tercer y última etapa experimental de esta tesis en la que se realizaron pruebas de complementación genética entre estas líneas y líneas BDGP con el objetivo de determinar la existencia de genes de caracteres cuantitativos o QTGs (por su sigla en inglés *Quantitative Trait Genes*) que serían los responsables de la variabilidad observada en las poblaciones naturales para los caracteres vinculados al tamaño corporal (ver el Capítulo 7).

**Tabla 5.8:** Líneas que mostraron el aumento o la disminución más extrema para cada carácter vinculado al tamaño corporal en hembras. Para cada carácter se indica, a la izquierda, el nombre de la población seguido del número de la línea dentro de la población respectiva y, a la derecha, la media de la línea correspondiente (en unidades arbitrarias).

Línea	DO	Línea	AC	Línea	LT	Línea	TA (x e <sup>16</sup> )
<u>Valores mayores</u>							
Neuquen-58	161,30	Neuquen-58	289,94	Neuquen-58	323,44	Chilecito-47	8,13
Chilecito-38	155,76	San Blas-29	283,65	San Blas-29	322,96	Chilecito-38	7,86
Neuquen-25	151,81	Neuquen-25	283,54	Lavalle-32	320,09	San Blas-29	7,64
Uspallata-6	151,38	Güemes-269	283,45	Chilecito-38	319,19	San Juan-16	7,59
Neuquen-39	150,46	Chilecito-38	283,22	Güemes-286	317,81	Chilecito-3	7,56
San Blas-29	150,01	Neuquen-39	282,57	Neuquen-5	317,21	San Blas-7	7,55
Neuquen-36	149,92	Neuquen-5	280,17	San Blas-17	317,10	Lavalle-15	7,55
Chilecito-3	149,33	Uspallata-6	279,91	Uspallata-6	316,68	San Blas-17	7,50
Chilecito-48	149,28	Neuquen-11	279,87	San Blas-7	316,37	Güemes-269	7,48
Chilecito-25	148,37	San Blas-17	279,85	Güemes-269	315,82	Neuquen-5	7,47
<u>Valores menores</u>							
Chilecito-1	140,21	Güemes-251	264,85	Jáchal-25	300,69	Jáchal-5	7,09
Chilecito-24	138,95	Güemes-24	264,49	Güemes-289	298,91	Güemes-15	7,09
Chilecito-29	140,73	San Blas-42	263,67	Chilecito-47	297,99	Chilecito-29	7,08
Güemes-251	136,57	Chilecito-21	263,66	Chilecito-24	297,21	Neuquen-52	7,07
Güemes-281	139,80	San Blas-44	263,01	Jáchal-5	296,26	Lavalle-12	7,06
Lavalle-12	136,61	Lavalle-25	262,88	Chilecito-29	295,32	Neuquen-18	7,06
Lavalle-32	139,64	Jáchal-5	261,08	Lavalle-12	294,47	Güemes-24	7,04
Lavalle-6	138,35	Lavalle-12	260,88	Neuquen-18	294,36	Neuquen-36	7,00
Neuquen-18	137,47	Chilecito-24	257,78	Güemes-15	288,65	Chilecito-30	6,99
San Blas-44	137,54	Chilecito-47	242,83	Chilecito-21	287,23	Chilecito-21	6,76

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.

**Tabla 5.9:** Líneas que mostraron el aumento o la disminución más extrema para cada carácter vinculado al tamaño corporal en machos. Para cada carácter se indica, a la izquierda, el nombre de la población seguido del número de la línea dentro de la población respectiva y, a la derecha, la media de la línea correspondiente (en unidades arbitrarias).

Línea	DO	Línea	AC	Línea	LT	Línea	TA (x e <sup>16</sup> )
<u>Valores mayores</u>							
Chilecito-21	146,48	Neuquen-25	264,98	Neuquen-58	287,44	Chilecito-38	6,77
Neuquen-58	145,85	Neuquen-58	263,68	Neuquen-5	286,91	Lavalle-32	6,62
Chilecito-38	145,62	Güemes-269	260,65	Lavalle-32	283,31	San Blas-29	6,62
Güemes-269	142,34	Uspallata-22	259,60	Güemes-286	282,10	San Blas-7	6,61
Barreal-18	141,51	Neuquen-11	259,28	San Blas-42	281,58	Neuquen-35	6,57
San Blas-7	140,83	Neuquen-22	259,27	Neuquen-35	281,52	Güemes-269	6,56
Uspallata-6	140,72	Neuquen-35	259,25	Güemes-209	279,48	Barreal-37	6,53
San Blas-45	140,57	San Blas-7	259,17	San Blas-45	279,39	Neuquen-5	6,52
Chilecito-14	140,35	Barreal-37	258,71	San Blas-29	278,78	Güemes-251	6,52
Chilecito-34	139,97	Uspallata-6	257,99	Güemes-269	278,64	Chilecito-1	6,52
<u>Valores menores</u>							
Lavalle-25	131,77	Güemes-238	245,01	Güemes-24	265,19	San Blas-44	6,25
Jáchal-25	131,67	San Blas-42	244,82	Lavalle-12	265,11	Uspallata-17	6,25
San Blas-47	131,54	San Blas-44	243,89	Chilecito-21	263,67	Güemes-24	6,24
Jáchal-5	131,05	San Juan-16	243,46	Chilecito-29	262,94	Lavalle-12	6,23
Güemes-24	130,77	Chilecito-29	242,88	Uspallata-10	262,45	Neuquen-36	6,23
Güemes-238	129,39	Lavalle-25	242,12	Güemes-15	261,82	Chilecito-29	6,21
Chilecito-29	128,84	Lavalle-12	241,64	Chilecito-24	261,55	Jáchal-5	6,18
Chilecito-30	127,92	Jáchal-5	240,27	Jáchal-5	260,41	Chilecito-24	6,15
Lavalle-6	127,54	Chilecito-47	240,20	Chilecito-30	258,08	Neuquen-52	6,13
Chilecito-47	126,63	Chilecito-24	238,97	Chilecito-47	252,08	Chilecito-30	5,98

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.

**Tabla 5.10:** Líneas que mostraron el aumento o la disminución más extrema para más de un carácter vinculado al tamaño corporal en ambos sexos considerando las primeras y las últimas 10 de la lista de líneas ordenadas por el valor medio de cada carácter. Para cada carácter se indica, a la izquierda, el nombre de la población seguido del número de la línea dentro de la población respectiva y, a la derecha, los caracteres que presentaron dichos valores extremos en ambos sexos.

Valores medios mayores		Valores medios menores	
Línea	Caracteres	Línea	Caracteres
Chilecito-38	DO, TA	Chilecito-24	AC, LT
Güemes-269	AC, LT, TA	Chilecito-29	DO, LT, TA
Neuquen-5	LT, TA	Chilecito-47	AC, LT
Neuquen-58	DO, AC, LT	Jáchal-5	AC, LT, TA
San Blas-29	LT, TA	Lavalle-12	AC, LT, TA
Uspallata-6	DO, AC		

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala.

## Discusión

Se realizó un análisis genético-cuantitativo utilizando líneas de *D. melanogaster* derivadas de poblaciones naturales de Argentina para cada uno de los siguientes caracteres: distancia interocular (DO), ancho de la cabeza (AC), largo del tórax (LT) y tamaño del ala (TA). En esta parte de la tesis se utilizaron líneas homocigotas para el cromosoma 2 proveniente de la naturaleza en un fondo genético isogénico. Este estudio permitió analizar la porción de la varianza total de cada carácter explicada por factores genéticos asociados al cromosoma 2 considerando, además, el efecto del sexo y de la población de origen. Finalmente, se pudo determinar que los resultados están parcialmente de acuerdo con la hipótesis de adaptación térmica asociada a gradientes geográficos para algunos de los caracteres analizados. Estos resultados son discutidos en el marco de los antecedentes acerca de las clinas relacionadas con el tamaño corporal en *Drosophila*.

### Análisis de correlación genética

La correlación genética entre cada par de variables fue positiva y altamente significativa en ambos sexos excepto para AC-TA en las hembras. El porcentaje de la varianza total explicado por la correlación varió entre el 11% y el 49% en hembras y entre el 16% y el 45% en machos y se debe principalmente a factores genéticos presentes en el cromosoma 2. El ordenamiento de los pares de variables de acuerdo a dichos porcentajes es similar en ambos sexos siendo los



coeficientes de determinación de las correlaciones entre AC y LT, por un lado y AC y DO por el otro, los dos más altos. En términos generales, estos resultados difieren de los obtenidos para las líneas BDGP (Capítulo 2), particularmente en relación con la correlación entre los caracteres vinculados a la cabeza. El coeficiente de determinación correspondiente a la correlación entre DO y AC en el caso de las líneas BDGP fue uno de los últimos, mientras que en el caso de las líneas derivadas de la naturaleza ocupa los primeros lugares. La correlación genética entre los sexos para cada variable fue positiva y altamente significativa en todos los casos y el porcentaje de la varianza total explicado por la correlación estuvo entre el 38% y el 58% y, nuevamente, se debe a factores genéticos asociados al cromosoma 2. Cada uno de estos caracteres mostró una correlación mayor entre sexos que con ningún otro carácter dentro del mismo sexo excepto DO, que presentó una correlación mejor sólo con AC en ambos sexos. En este caso también se pueden observar diferencias comparativamente con los resultados vinculados a las líneas BDGP (Capítulo 2) ya que, en ese caso, sólo DO y TA mostraron una correlación mayor entre sexos que con ningún otro carácter dentro del mismo sexo porque las correlaciones entre sexos para AC y LT no fueron significativas.

Al considerar las correlaciones significativas tanto para las líneas derivadas de la naturaleza como para las BDGPs, se puede ver que sólo una correlación (DO-LT en hembras) explicó el mismo porcentaje de la variación fenotípica total en ambos casos. Por un lado, siete correlaciones explicaron un porcentaje mayor de la variación fenotípica total en las líneas derivadas de la naturaleza (DO entre sexos, DO-AC y DO-TA en ambos sexos, AC-LT en las hembras y LT-TA en los machos); siendo la diferencia superior al 10% en cinco de esos casos (DO entre sexos, DO-AC en ambos sexos, DO-TA en machos y AC-LT en las hembras). Por otro lado, cinco correlaciones explicaron un porcentaje mayor de la variación fenotípica total en las líneas BDGP (TA entre sexos, LT-TA en las hembras y DO-LT, AC-LT y AC-TA en los machos), siendo la diferencia superior al 10% sólo en un caso (AC-LT en los machos). En general, la comparación de los resultados de los análisis de correlación de ambos capítulos permite concluir que el porcentaje de la variación total explicado por la correlación fue mayor en el caso de las líneas derivadas de la naturaleza para el cromosoma 2 que en el de las BDGPs en la mayoría de los casos. Por lo tanto, los resultados de las correlaciones realizadas con las líneas derivadas de poblaciones naturales son más consistentes con los provenientes de estudios previos (Cowley & Atchley, 1988, 1990; De Moed *et al.*, 1997; Scheiner *et al.*, 1991) que los concernientes a las BDGPs (ver el Capítulo 2 para más detalles). Es más, los resultados comentados anteriormente dan un mayor apoyo a la hipótesis de que caracteres derivados del mismo disco imaginal están mejor correlacionados entre sí que aquellos que provienen de precursores diferentes como fue discutido con anterioridad (Capítulos 1 y 2; Cowley & Atchley,

1990). Esto se debe a que tanto las correlaciones entre los caracteres derivados del disco óculo-antenal (los caracteres de la cabeza) como las de aquellos provenientes del disco alar (los caracteres de tórax y ala) estuvieron entre las tres mejores en ambos sexos. Sin embargo, estos resultados difieren con respecto a los del estudio de Cowley y Atchley (1990) en que estos autores encontraron diferencias entre los sexos que adjudicaron a un efecto significativo del cromosoma X. Finalmente, todos los caracteres mostraron una muy buena correlación entre sexos, lo que sugiere que el dimorfismo sexual en la arquitectura genética de los caracteres de tamaño corporal no es tan marcado en las líneas derivadas de poblaciones naturales en comparación con las líneas mutantes.

### **Análisis genético-cuantitativo**

Los análisis genético-cuantitativos revelaron la existencia de una importante variación genética intrapoblacional para todos los caracteres estudiados. Particularmente, los resultados de los análisis generales mostraron que los factores genéticos juntos explicaron entre un 9% y un 20% de la varianza fenotípica total. Sin embargo, cuando se analizaron las poblaciones en forma separada, los resultados presentaron valores que alcanzaron el 31%. Dado que los valores extremos pertenecen a poblaciones que se encuentran entre las que presentan la mayor cantidad de líneas; esto muestra que, en general, pueden existir diferencias importantes en relación a la variabilidad genética asociada a los caracteres vinculados al tamaño corporal entre las poblaciones naturales.

Si los factores genéticos que contribuyen a la expresión del tamaño corporal se distribuyeran aleatoriamente en el genoma, se esperaría que la varianza fenotípica total explicada por cada cromosoma fuera proporcional a la información genética contenida en cada uno de ellos. Dado que el cromosoma 2 constituye aproximadamente el 40% del genoma de *D. melanogaster* (Flybase), los factores genéticos en el caso de las líneas derivadas de la naturaleza no deberían explicar un porcentaje superior a ese. Si bien los valores en cuestión nunca superaron el 40%, a menudo se encontraron muy por debajo del mismo. Esto puede tener que ver con el hecho de que los caracteres vinculados al tamaño corporal analizados tienen un cierto error de medición asociado el cual, en combinación con la varianza interindividual, podría reducir en gran medida la proporción de la varianza fenotípica explicada por los componentes genéticos. En el Capítulo 2 se mencionó, además, al fondo genético de las líneas BDGP como otro factor que podría haber colaborado en la reducción del porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por los componentes genéticos para cada uno de los caracteres estudiados.

Los resultados también mostraron que las hembras son más grandes que los machos para todos los caracteres vinculados al tamaño corporal. Si bien este resultado no sorprende,

debido a que el dimorfismo sexual para el tamaño corporal ha sido ampliamente documentado en *Drosophila* (por ejemplo, Cowley & Atchely, 1988 y referencias), se debe resaltar que las diferencias se deben a factores genéticos presentes en el cromosoma 2. Asimismo, los análisis revelaron que las poblaciones presentan diferencias entre ellas para los caracteres que se pueden explicar por variantes genéticas presentes en el cromosoma 2. En general, las comparaciones entre las poblaciones mostraron que todas difirieron significativamente de alguna otra con respecto a algún carácter. Estos resultados están de acuerdo con los estudios previos, que encontraron una gran cantidad de variación genética para otros estimadores del tamaño corporal tanto dentro como entre poblaciones de *D. melanogaster* provenientes de gradientes latitudinales de distintas partes del mundo (por ejemplo, Capy *et al.*, 1993; 1994; Coyne & Beecham, 1987; James *et al.*, 1995; Long & Singh, 1995; van't Land *et al.*, 1999; ver más abajo).

### **Análisis de regresión**

Los análisis de regresión revelaron que ambos caracteres vinculados a la cabeza aumentan con la latitud en las hembras; mientras que, en los machos, únicamente AC se incrementa con este factor. Estos resultados están parcialmente de acuerdo con varios estudios previos que encontraron clinas latitudinales para el tamaño corporal de *D. melanogaster* en distintas regiones del mundo (por ejemplo, Capy *et al.*, 1993; Imasheva *et al.*, 1994; James *et al.*, 1995; Long & Singh, 1995; van't Land *et al.*, 1999). Este patrón ha sido encontrado en todos los continentes a pesar de que los distintos trabajos han estimado el tamaño corporal de manera diferente. De hecho, la mayoría de ellos ha analizado el área del ala (por ejemplo, Gilchrist & Partridge *et al.*, 1999; Gockel *et al.*, 2001; 2002) y el largo de este órgano (por ejemplo, Coyne & Beecham, 1987; Imasheva *et al.*, 1994) y, en menor medida, el largo del tórax (por ejemplo, James *et al.*, 1995). Sin embargo, algunos estudios han utilizado otros estimadores como el largo del fémur (por ejemplo, Folguera, 2007), la distancia entre los ojos (Long & Singh, 1995) y el peso corporal (Capy *et al.*, 1993). Este detalle no es menor dado que, como se ha discutido reiteradamente a lo largo de esta tesis, las relaciones entre los distintos caracteres y el tamaño corporal son alométricas. Sin ir más lejos, los análisis de correlación discutidos anteriormente en este Capítulo mostraron que los caracteres están directamente relacionados entre sí aunque no de manera perfecta. Es más, los análisis de regresión mostraron que sólo los caracteres derivados del disco óculo-antenal presentaron una relación positiva con la latitud. Estos resultados son sumamente interesantes dado que LT y TA, dos caracteres para los que se han encontrado clinas latitudinales (suponiendo que el estimador del tamaño del ala utilizado en este trabajo se encuentra estrechamente asociado a los que han sido analizados anteriormente)

no mostraron ese patrón mientras que, de los caracteres que lo hicieron (DO y AC), sólo uno había sido estudiado con anterioridad (ver más arriba; Long & Singh, 1995). Cabe la posibilidad que las diferencias con trabajos previos se deban, aunque sea parcialmente, a que las líneas sólo difieren en relación al cromosoma 2 que poseen.

Dadas las diferencias entre los análisis hechos en este capítulo y los correspondientes a los trabajos previos (no sólo en relación con la base genética de las líneas empleadas sino también con respecto a los caracteres estudiados, las condiciones de cría de las moscas, el tipo de análisis hecho y el sexo considerado en los análisis) sólo se pueden comparar los resultados de ambos grupos de manera general. Por un lado, el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por las regresión en los distintos casos informados fue, en general, mayor a los obtenidos en este estudio (8% para DO en las hembras; 6% y 13% para AC en hembras y machos respectivamente). Por otro lado, el valor de la pendiente de la regresión varió bastante entre los distintos casos pero fue generalmente superior a los obtenidos en este estudio (0,29 para DO en las hembras; 0,25 y 0,36 para AC en hembras y machos respectivamente). Una vez más, estas diferencias podrían deberse a que las líneas estudiadas sólo difieren en relación a la información genética asociada al cromosoma 2.

James y colaboradores (1995) y van't Land y colaboradores (1999) encontraron clinas latitudinales para el tamaño corporal de *D. melanogaster* en Australia y Sudamérica respectivamente. En ambas investigaciones se encontró que no existía una relación entre el tiempo de desarrollo y el tamaño corporal (James *et al.*, 1995; van't Land *et al.*, 1999). De acuerdo con estos antecedentes, no se ha encontrado una relación significativa entre el tiempo de desarrollo de las líneas derivadas de la naturaleza empleadas en este trabajo y la latitud (Mensch *et al.*, 2008). Por lo tanto, el blanco de la selección natural podría ser otro carácter correlacionado con el tamaño corporal como la eficiencia de crecimiento (Bochdanovits & de Jong 2003a; De Moed *et al.*, 1999; Neat *et al.*, 1995; Robinson & Partridge, 2001). En ese sentido, los patrones observados podrían ser explicados por una asociación con la inversión *In(2L)t*, que ha mostrado un aumento en frecuencia hacia el ecuador (Knibb *et al.*, 1981; 1982). Sin embargo, van't Land y colaboradores (1999) no encontraron una relación significativa entre el tamaño corporal y la frecuencia de dicha inversión en las poblaciones de la costa oeste de América del Sur. Asimismo, un estudio previo no había encontrado una clina latitudinal para la frecuencia de la inversión de interés en un conjunto más grande de poblaciones (van't Land, 1997). Esto llevó a realizar un análisis cromosómico de cada una de las líneas derivadas de la naturaleza con el fin de establecer la existencia de inversiones para el cromosoma 2 y, en el caso de hallarlas, estudiar su relación con la latitud. Los resultados de estudio mostraron que casi todas las líneas presentan el arreglo estándar del cromosoma 2, de lo que se deduce que no puede

existir una relación significativa con ningún gradiente ambiental (resultados no mostrados). Por lo tanto, las clinas observadas para algunos estimadores del tamaño corporal en este trabajo no puedan ser explicadas por una clina en alguna inversión del cromosoma 2, lo cual es consistente con los resultados mencionados anteriormente (van't Land, 1997; van't Land *et al.*, 1999).

Además, los análisis de las líneas derivadas de la naturaleza revelaron la existencia de una clina altitudinal que puede ser explicada por factores genéticos asociados al cromosoma 2. Particularmente, los resultados mostraron que LT disminuye con la altitud en los machos, siendo los valores de la pendiente y del porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por la regresión similares a los de las clinas latitudinales (Beta= -0,27;  $R^2=13\%$ ). Si bien los estudios correspondientes a gradientes altitudinales no son tan numerosos como los asociados a gradientes latitudinales, se han analizado distintos caracteres en poblaciones de diferentes especies de *Drosophila* provenientes de distintas alturas (por ejemplo, Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Dahlgaard *et al.*, 2001; Dobzhansky, 1948; Etges, 1989; Folguera, 2007; Folguera *et al.*, 2008; Hammond *et al.*, 2001; Louis *et al.*, 1982; Munjal *et al.*, 1997; Norry *et al.*, 2001; Sambucetti *et al.*, 2006; Sørensen *et al.*, 2005; Stalker & Carson, 1948). En general, los resultados de estos trabajos han sido consistentes con la idea de que la temperatura es uno de los principales factores selectivos que da cuenta de los patrones de variación de distintos caracteres en la naturaleza. Particularmente, cuatro de ellos guardan cierta relación con este estudio. Por un lado, Bitner-Mathé y colaboradores (1995) encontraron una clina latitudinal para el tamaño corporal en *D. mediopunctata*, con un aporte significativo a la variación encontrada proveniente de inversiones del cromosoma 2. Aunque aparentemente no existen estudios similares previos en *D. melanogaster*; en base a lo mencionado anteriormente se puede decir que la clina altitudinal hallada en este trabajo no puede ser explicada por una clina en una inversión asociada al cromosoma 2. Por otro lado, Sambucetti y colaboradores (2006) encontraron una relación negativa entre el largo del tórax de los machos y la altitud en poblaciones de *D. buzzatii* correspondientes a un extenso gradiente altitudinal. Finalmente, Louis y colaboradores (1982) encontraron un aumento del largo del ala con la altitud mientras que Folguera (2007) encontró un aumento de un carácter vinculado al tamaño corporal (largo del fémur) y una disminución de otros (largo proximal, largo distal y ancho del ala) con la altitud; habiéndose realizado ambos estudios en *D. melanogaster*.

Los resultados que mostraron relaciones positivas con la altitud son consistentes con la noción de adaptación térmica ya que, al igual que en las clinas latitudinales, el tamaño corporal aumenta a medida que disminuye la temperatura. Sin embargo, los resultados del trabajo de Folguera (2007) vinculados al ala, al igual que los de Sambucetti y colaboradores (2006) y los de las líneas de sustitución cromosómica, no estarían de acuerdo con dicha idea. Cabe aclarar que

dos de los caracteres relacionados con el ala (largo distal y ancho del ala) también mostraron una relación negativa con la latitud (al igual que el largo del fémur; Folguera, 2007). Estos resultados son interesantes dado que la mayoría de las poblaciones de *D. melanogaster* utilizadas en ese trabajo (todas excepto Güemes y Neuquen; es decir, las poblaciones de los extremos del gradiente latitudinal) han sido empleadas para generar las líneas de sustitución cromosómica analizadas en este estudio. Asimismo, estos resultados reflejan la complejidad de la arquitectura genética del tamaño corporal y de su relación con los gradientes geográficos. En particular, la asociación positiva entre la amplitud térmica y la altitud ha llevado a algunos autores a estudiar su efecto en relación con la variación de distintos caracteres y a mencionarlo como un factor que podría dar cuenta de los patrones observados (Folguera, 2007; Folguera *et al.*, 2008; Loeschcke *et al.*, 1999; Pétavy *et al.*, 2001a, b; 2004). De hecho, algunos de estos trabajos han encontrado resultados consistentes con los de las líneas de sustitución cromosómica al analizar 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 en relación con otros que fueron criados bajo una temperatura media similar aunque sin variación diaria (Folguera, 2007; Pétavy *et al.*, 2001b; 2004).

En conclusión, generalmente se ha encontrado que las poblaciones ubicadas en regiones de clima más frío (es decir, de latitudes y altitudes mayores) poseen un tamaño medio mayor que las de zonas más cálidas, pero existen excepciones a la regla. Estas irregularidades sugieren que la adaptación a la temperatura media sólo puede representar una explicación parcial de los patrones de variación observados en la naturaleza. La variación latitudinal y altitudinal en la temperatura está asociada con la variación en otros factores, tanto bióticos como abióticos, y cualquiera de ellos podría actuar como agente selectivo.

### **Identificación de las líneas con fenotipos más extremos**

Por último, se identificaron las líneas que presentaron los efectos más pleiotrópicos y extremos en ambos sexos. Esta selección permitió escoger, posteriormente, las líneas a ser utilizadas en la tercer y última etapa experimental de esta tesis en la que se realizaron pruebas de complementación genética entre estas líneas y líneas BDGP con el objetivo de determinar la existencia de QTGs que serían los responsables de la variabilidad observada en las poblaciones naturales para los caracteres vinculados al tamaño corporal (Capítulo 7). Vale la pena resaltar que, entre las líneas seleccionadas, hay líneas derivadas de las poblaciones de menor latitud (Güemes, San Blas y Chilecito) y de las de mayor latitud (Uspallata, Lavalle y Neuquen). Asimismo, las líneas elegidas representan bien el gradiente altitudinal estudiado, habiendo líneas de las poblaciones pertenecientes a los extremos del mismo así como a altitudes

intermedias. Si bien aparentemente nadie ha llevado a cabo un estudio de las características mencionadas en relación con caracteres vinculados al tamaño corporal, existen algunos antecedentes que permitieron pensar que podía generar resultados significativos.

Por un lado, Turner y colaboradores (2008) estudiaron la expresión génica diferencial en poblaciones de los extremos de las clinas de Australia y Norteamérica. En concordancia con lo discutido previamente, no encontraron una expresión diferencial en la región de la inversión *In(2L)t* y lo adjudicaron al menor tamaño de esta clina con respecto a la de *In(3R)Payne* (Turner *et al.*, 2008). Sin embargo, sus datos indicaron que algunas partes asociadas al centrómero del cromosoma 2 están muy diferenciadas entre las poblaciones de los extremos (Turner *et al.*, 2008). Asimismo, encontraron un patrón clinal para los 11 polimorfismos comunes del locus *Or22b* del cromosoma 2 (Turner *et al.*, 2008). Por último, los análisis revelaron que las regiones que muestran diferencias contienen más genes de los esperados en relación con ciertas categorías de ontología génica, entre los que se encuentran *Cyp6a17*, *Cyp6a22*, *Cyp6a23* y *Cyp6g1* del cromosoma 2 (Turner *et al.*, 2008). Por otro lado, Calboli y colaboradores (2003) encontraron una gran similitud entre los mapas de QTLs realizados al estudiar la variación genética latitudinal para el tamaño corporal en Sudamérica y Australia. Sus resultados mostraron que el brazo derecho del cromosoma 2 presenta QTLs para el tamaño corporal (Calboli *et al.*, 2003). Asimismo los resultados de determinados análisis les permitieron sugerir que esta región es pleiotrópica o contiene QTLs estrechamente ligados con efectos predominantes en un solo carácter (Calboli *et al.*, 2003).

Estos resultados junto con otros mencionados anteriormente (clinas en relación a la frecuencia de determinadas enzimas, asociación de los genes respectivos y de otros relacionados con los caminos metabólicos vinculados al crecimiento y la proliferación celular con las inversiones cromosómicas cosmopolitas; de Jong & Bochdanovits, 2003) llevaron a pensar que algunos de los genes del cromosoma 2 vinculados a la expresión de distintos caracteres de tamaño corporal (Capítulo 2) podrían presentar variación natural en las poblaciones de las que se derivaron las líneas de sustitución cromosómica (resultados de este capítulo) y constituyeron el puntapié inicial en el desarrollo del trabajo que se detalla en el Capítulo 7.

---

## **Capítulo VI**

Análisis de la variación de la conformación del ala en líneas de *D. melanogaster* derivadas de poblaciones naturales.

---

### **Resumen**

En los insectos alados, el desempeño en el vuelo suele estar relacionado con el *fitness*. Dado que estos son animales ectodérmicos, la frecuencia del aleteo (y, por lo tanto, el ascenso medio) está directamente relacionada con la temperatura. Asimismo, el vuelo de los insectos está influenciado por características morfológicas. Los antecedentes sugieren que las moscas con valores menores de *wing loading* o mayores de *wing aspect* tendrían una mayor capacidad de ascenso a temperaturas bajas. De esta manera, se analizó la variación en la conformación del ala y la relación de su tamaño con el del tórax en individuos de ambos sexos de 66 líneas isogénicas en las que se ha sustituido el cromosoma 2 por uno natural, derivadas de 9 poblaciones naturales dispuestas a lo largo de gradientes geográficos en Argentina. Los resultados sugieren que existe abundante variabilidad genética intrapoblacional (asociada al cromosoma 2) para la conformación del ala, cuya proporción sería mayor que la asociada al tamaño de este órgano. Asimismo, los análisis revelaron diferencias entre los sexos y entre las poblaciones para dicho carácter complejo debidas a variantes genéticas presentes en el cromosoma 2. Los resultados mostraron que la conformación del ala varía con la latitud y, si bien el porcentaje de la variación fenotípica total explicado por la relación es menor al 5%, este se debe al cromosoma 2. En ambos sexos, las modificaciones conformacionales sugieren que el ala se elonga en la dirección próximo-distal a medida que aumenta la latitud. Además, los análisis revelaron que el cociente TA/LT (estimador de la inversa del *wing loading*) aumenta con la altitud en los machos. Esta relación, que explicó alrededor del 17% de la varianza fenotípica total, se debería a la disminución del tamaño del tórax de los machos a medida que se incrementa la altitud. Tanto los resultados vinculados a la conformación del ala como los relacionados con el *wing loading* son consistentes con los de estudios previos realizados tanto con poblaciones naturales de *Drosophila* como con moscas criadas a distintas temperaturas. Las diferencias entre los sexos en relación al *wing loading* son discutidas en el contexto de los compromisos sexo-específicos con otros caracteres vinculados al *fitness* y la existencia de otros factores que presentan diferencias entre gradientes geográficos y que afectan al desempeño en el vuelo como la densidad del aire.



## Introducción

Como se ha mencionado en el Capítulo 5, el aumento del tamaño medio en las poblaciones de *Drosophila* ubicadas en regiones de clima más frío suele considerarse como evidencia de adaptación térmica. Por un lado, esto se debe a que los resultados de los experimentos de selección artificial en los que se ha sometido a las moscas a temperaturas altas y bajas generalmente han mostrado patrones similares a los observados en las poblaciones de latitudes (o altitudes) menores y mayores respectivamente. Por otro lado, esto es así porque distintos autores han asociado el patrón visto en ectodermos con el observado en endodermos, el cual llevó a Bergmann a proponer la regla que lleva su nombre en 1847 (por ejemplo, Atkinson & Sibly, 1997). La versión original de la regla establecía que, en regiones de temperaturas bajas, la selección favorecería a especies de mayor tamaño con un cociente superficie-volumen más bajo de forma tal de disminuir la pérdida de calor. Sin embargo, posteriormente la regla fue modificada por James (1970) de forma tal de referirse a la variación intraespecífica. Asimismo, las versiones más recientes han intentado generalizar la regla a todos los animales y reemplazar la referencia a regiones más frías o más cálidas por mayores o menores latitudes respectivamente (Blackburn *et al.*, 1999). La explicación del patrón sigue siendo materia de discusión cuando se aplica a animales endotermos y es inapropiada para los ectodermos, ya que estos no pueden controlar el calor corporal (Atkinson & Sibly, 1997). Además de la hipótesis de la conservación del calor se han propuesto otras entre las que están la de que los organismos de mayor tamaño serían mejores migrantes (por lo que podrían evitar las condiciones extremas asociadas a los climas más fríos) y la de que los individuos más grandes serían más resistentes a la muerte por inanición (Blackburn *et al.*, 1999). Sin embargo, las evidencias a favor de los diferentes mecanismos no son concluyentes y actualmente se discute si uno sólo de ellos sería suficiente para explicar el patrón observado en diferentes grupos (Blackburn *et al.*, 1999).

Entre estos mecanismos existe uno que está relacionado con el desempeño en el vuelo de los insectos alados. Habitualmente, se considera que el desempeño en el vuelo (estudiado a través de caracteres tales como la velocidad y duración del vuelo, la eficiencia energética, etc.) está relacionado con el *fitness* en los insectos alados. En Diptera se ha comprobado que la duración del vuelo se relaciona negativamente con componentes del *fitness* tales como la fecundidad de las hembras (Roff, 1977), la fertilidad de los machos (Benjamin & Bradshaw, 1994) y la resistencia a la inanición y a la desecación (Graves *et al.*, 1992); supuestamente debido a los altos costos metabólicos (Yuval *et al.*, 1994). En insectos pequeños como los dípteros, que no generan suficiente calor metabólico como para regular la temperatura corporal; la frecuencia del aleteo se relaciona positivamente con la temperatura (por ejemplo, Curtsinger & Laurie-

Ahlberg, 1981; Reed *et al.*, 1942; Stevenson & Josephson 1990; Unwin & Corbet, 1984; Yurkiewicz & Smyth, 1966a). Dado que el ascenso medio en los insectos está directamente relacionado con la frecuencia mencionada (Ellington, 1984c), a medida que disminuye la temperatura también lo hace dicho ascenso. Además, la temperatura ambiente afecta a la eficiencia energética del vuelo en los insectos la cual está determinada conjuntamente por la frecuencia del aleteo y la frecuencia de resonancia mecánica del aparato muscular asociado (Greenewalt, 1960; Machin *et al.*, 1962; Yurkiewicz, 1968; Yurkiewicz & Smyth 1966b). Asimismo (y tal vez de manera más importante en el contexto de esta tesis), hace tiempo se ha demostrado que el vuelo de los insectos está influenciado por características morfológicas como el peso corporal, el volumen del tórax, el área del ala, el *wing loading* (la relación entre el peso corporal y el área del ala), el cociente entre el tamaño del ala y el del tórax (largo del ala/largo del tórax, estimador inversamente relacionado al *wing loading*) y el cociente entre el largo y el ancho del ala o *wing aspect* (Ellington, 1984a, b, c; Reed *et al.*, 1942; Weis-Fogh, 1973). En general, la magnitud del ascenso generado por un único aleteo estaría relacionada con la velocidad del mismo así como con el área y la conformación del ala (Dudley, 2000). Suponiendo que la forma del ala se mantiene constante y que el aleteo es oscilante, el ascenso medio sería proporcional al cuadrado de la frecuencia de aleteo (Ellington, 1984c). Por lo tanto, se espera que la selección que actúa sobre el desempeño en el vuelo favorezca a distintos valores de los caracteres morfológicos que afectan al vuelo a distintas temperaturas de forma tal de compensar el impacto de estas en la frecuencia del aleteo.

El aumento en la relación entre el tamaño del ala y el del tórax (o la disminución del *wing loading*) ha sido propuesto reiteradamente como una adaptación al vuelo en ambientes fríos para distintas especies de insectos alados en general y de *Drosophila* en particular (por ejemplo, Barker & Krebs, 1995; David *et al.*, 1994; Gilchrist & Huey, 2004; Karan *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1999; Noach *et al.*, 1996; Starmer & Wolf, 1989; Wolf *et al.*, 2000). Algo similar se ha propuesto para el *wing aspect* aunque menos frecuentemente (Azevedo *et al.*, 1998; Gilchrist *et al.*, 2000; van't Land *et al.*, 1999). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, las moscas con valores menores de *wing loading* o mayores de *wing aspect* tendrían una mayor capacidad de ascenso a temperaturas bajas (Ellington, 1984c). En ese sentido, Stalker (1980) estudio un índice relacionado con los anteriores (directamente proporcional a la inversa del *wing loading* y al *wing aspect*) en *D. melanogaster* y mostró que las moscas que podían volar a temperaturas más bajas presentaban un valor mayor del índice en comparación con las que podían volar a temperaturas más altas pero que estos individuos no diferían en el tamaño del tórax.

Por un lado, distintos estudios experimentales llevados a cabo en *Drosophila* demostraron que el *wing loading* aumenta con la temperatura (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 1998;

Barker & Krebs, 1995; Bitner-Mathé & Kaczko, 1999; David *et al.*, 1994; de Moed *et al.*, 1997; Gilchrist & Huey, 2004; Loeschcke *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 1999; Noach *et al.*, 1996; Pétavy *et al.*, 1997; Scheiner *et al.*, 1991; Thomas & Barker, 1993). Asimismo, los resultados de los pocos trabajos que han analizado el *wing aspect* o los caracteres que lo componen han demostrado que dicho índice disminuye con el aumento de la temperatura (Azevedo *et al.*, 1998; Sokoloff, 1966; Stalker & Carson, 1949). Por otro lado, la comparación entre diferentes especies de *Drosophila* (Reed, 1942) y líneas de *D. melanogaster* de distintas regiones geográficas (Barnes & Laurie-Ahlberg, 1986) sugirió que la frecuencia del aleteo evolucionó hacia valores menores en las moscas adaptadas al frío. Finalmente, se han descrito clinas para el cociente entre el tamaño del ala y el del tórax en las que el índice aumenta con la latitud y la altitud (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 1998; Gilchrist & Huey, 2004; Karan *et al.*, 1998; Misra & Reeve, 1964; Parkash *et al.*, 1999; Sambucetti *et al.*, 2006; Stalker & Carson, 1947, 1948). Nuevamente, los escasos resultados relacionados con el *wing aspect* sugieren que este índice podría aumentar con ambos gradientes geográficos (Azevedo *et al.*, 1998; Gilchrist *et al.*, 2000; Pegueroles *et al.*, 1995; Sokoloff, 1965; Stalker & Carson, 1947; van't Land *et al.*, 1999).

La disminución del *wing loading* con la temperatura podría lograrse mediante la reducción del tamaño corporal y/o por el aumento del tamaño del ala. Sin embargo, los costos de estas soluciones pueden diferir de manera significativa. Por ejemplo, el incremento en el área del ala podría ser relativamente barato en términos de materiales y energía. En cambio, la reducción de la masa corporal implicaría un precio mayor debido a que podría realizarse a costa de la inversión reproductiva (Berrigan, 1991; Marden, 1989, 1995). Como ya se ha mencionado anteriormente, se ha comprobado que el tamaño corporal está fuertemente asociado a la fecundidad en muchos insectos, incluido *Drosophila* (Nunney & Cheung, 1997; Robertson, 1957; Santos *et al.*, 1992).

En el Capítulo 5 se hizo una breve referencia a las diferencias entre los gradientes geográficos que han sido analizados más frecuentemente, el latitudinal y el altitudinal. En esa oportunidad se esbozó una posible explicación para las diferencias entre los patrones de variación latitudinales y altitudinales que tenía que ver, sobretudo, con la amplitud térmica diferencial entre ambos gradientes. A esta altura, tras haber mencionado algunas cuestiones acerca de los factores que pueden influir en el desempeño en el vuelo de los insectos; vale la pena retomar esa discusión enmarcándola en este nuevo contexto. Los gradientes altitudinales están caracterizados por cambios abruptos en el ambiente físico. La temperatura media del aire decae aproximadamente 6°C por cada kilómetro que se asciende por lo que el cambio de temperatura al subir desde el nivel del mar hasta unos 4000 metros de altura equivale, aproximadamente, al cambio experimentado al desplazarse 4500 kilómetros en relación con la

latitud (Dillon *et al.*, 2006). Además de este rápido descenso de temperatura, a 4000 metros de altura la presión parcial de oxígeno decae aproximadamente a la mitad del valor que tiene a nivel del mar y la densidad del aire disminuye en un 40%. Estos cambios físicos podrían comprometer la fisiología de los insectos (Mani, 1968; Sømme, 1989). A pesar de estos desafíos, muchos insectos viven a grandes alturas (por ejemplo, Brehm *et al.*, 2003; Mani, 1968; Romero-Alcaraz & Avila, 2000). En particular, se puede encontrar a distintas especies de *Drosophila* a 3000 metros de altura en Sierra Nevada, California (Dobzhansky, 1948) y hasta a 5000 metros de altura en el Himalaya (Khare *et al.*, 2002). La disminución de la temperatura a altitudes elevadas afecta el desempeño de los insectos porque las tasas de las reacciones fisiológicas están determinadas fuertemente por la temperatura (Huey & Kingsolver, 1989). Como ya se mencionó, las bajas temperaturas reducen la potencia del aleteo en *D. melanogaster* (Curtsinger & Laurie-Ahlberg, 1981; Lehmann, 1999) pero, además, la disminución de la presión parcial de oxígeno podría causar un efecto similar al reducir la tasa metabólica. Asimismo, la menor densidad del aire podría dificultar el vuelo a grandes alturas porque las fuerzas aerodinámicas producidas por el aleteo aumentan linealmente con la densidad del aire (Dudley, 2000).

De esta manera, Dillon y Frazier (2006) estudiaron los efectos de la temperatura y la densidad del aire en el desempeño de *D. melanogaster* en la caminata y el vuelo. Estos autores observaron que la reducción de la temperatura y de la presión del aire a niveles ecológicamente realistas, causó efectos negativos importantes en ambos caracteres pero, sobretodo, en el desempeño en el vuelo (Dillon & Frazier, 2006). Es más, la interacción entre ambos factores redujo el desempeño en el vuelo más de lo que se esperaba según la suma de los efectos de las variables analizadas (Dillon & Frazier, 2006). Esto se debió a que, a temperaturas cálidas, la presión del aire tuvo un efecto menor en el desempeño en el vuelo mientras que, a temperaturas frías, la disminución de la presión del aire causó una gran disminución del mismo (Dillon & Frazier, 2006). Según los autores, aún con una presión del aire del 50% a nivel del mar y 18°C, el 90% de las moscas pudo volar pero estimaron que esta reducción de la densidad del aire forzó a las moscas a duplicar la fuerza requerida para poder ascender (Dillon & Frazier, 2006).

La habilidad de *D. melanogaster* para volar con temperaturas y niveles de presión de aire bajos refuerza la idea de que los insectos tienen una gran capacidad para aumentar el desempeño en el vuelo (Dillon & Dudley, 2004; Lehmann, 1999). Los insectos pueden incrementar la fuerza necesaria para ascender, considerando un determinado peso, aumentando la amplitud del batido de las alas (Dillon & Dudley, 2004; Lehmann, 1999) pero difícilmente puedan lograr esto aumentando la frecuencia del aleteo en condiciones de frío (Curtsinger & Laurie-Ahlberg, 1981; Lehmann, 1999). De todos modos, para poder volar a bajas temperaturas, las moscas deberían hacer una gran fuerza muscular de forma tal de alterar la

cinemática del aleteo (Dudley, 2000). Esto podría ser muy difícil dada la disminución de las tasas metabólicas con la temperatura y, además, podría conllevar un costo muy elevado (por ejemplo, Berrigan & Partridge, 1997; Huey & Kingsolver, 1989). Sin embargo, los insectos podrían compensar estas condiciones que desafían la capacidad de vuelo a grandes altitudes reduciendo el *wing loading* ya que, de esta manera, disminuirían los requerimientos energéticos y aumentaría la capacidad de ascenso (Dudley, 2000).

Esta parte de la tesis tiene como objetivo realizar un análisis genético-cuantitativo en *D. melanogaster* con el fin de caracterizar parte de la arquitectura genética de la conformación del ala. En particular, se cuantificó el aporte de distintas fuentes de variación que contribuyen al cambio conformacional del ala en individuos derivados de poblaciones naturales dispuestas a lo largo de gradientes geográficos en Argentina. Dado que se utilizaron las líneas de sustitución cromosómica empleadas en el Capítulo 5; se pudo analizar la porción de la varianza fenotípica total explicada por factores genéticos asociados a ese cromosoma considerando, además, el efecto del sexo y de la población de origen. Finalmente, el análisis de la morfología de las alas en combinación con el estudio del tamaño corporal realizado en el Capítulo 5 permitió poner a prueba las hipótesis adaptativas mencionadas que relacionan los cambios en la morfología de las moscas con los gradientes geográficos. De esta manera, se analizó la correspondencia entre la modificación de la conformación del ala y los gradientes geográficos estudiados, por un lado; y el cambio de la relación entre el tamaño del ala y el del tórax con dichos gradientes, por el otro. En general, los resultados de estos análisis parecen apoyar las hipótesis mencionadas anteriormente en términos del *wing loading* y el *wing aspect*.

## **Materiales y métodos**

### ***Stocks de Drosophila***

Las mismas 66 líneas de sustitución cromosómica mencionadas en el Capítulo 5, utilizadas para estudiar la variación asociada a caracteres vinculados al tamaño corporal; fueron empleadas en otros análisis destinados a analizar la variación de la conformación del ala. Como fue explicado previamente, estas líneas de *D. melanogaster* fueron derivadas de poblaciones naturales dispuestas a lo largo de un gradiente ambiental de Argentina, mediante la implementación de un protocolo que permitió poner en homocigosis un cromosoma 2 de cada una de las isolíneas utilizadas en un fondo genético isogénico e idéntico al de las líneas BDGP (para conocer más detalles acerca de la obtención de estas líneas y de sus características, ver el Anexo Metodológico I). De esta manera, el sistema permite atribuir las diferencias fenotípicas observadas entre las líneas a factores genéticos presentes en el cromosoma 2.

## Diseño Experimental

El análisis de las líneas se realizó, tal y como se explicó en el Capítulo 5, en dos bloques que contenían al control de las líneas BDGP. En cada bloque se aplicó el diseño experimental detallado en el Anexo Metodológico I de forma tal de obtener las moscas adultas utilizadas para estimar la conformación del ala. Asimismo, los individuos fueron disecados y fotografiados de la manera explicada en el Capítulo 5.

## Conformación del ala

Similarmente a lo realizado en otros capítulos, la conformación del ala fue analizada a partir de la estimación de dos variables distintas debido a que cada una de ellas permite llevar a cabo análisis diferentes (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II). Por un lado, se utilizó la variable univariada *Distancia de Procrustes* (DP), para realizar análisis genético-cuantitativos como los del Capítulo 5 (ver más abajo). Por otro lado, se utilizó la variable multivariada *Deformaciones Relativas* (DR), para realizar un análisis detallado del cambio conformacional debido a factores genéticos presentes en el cromosoma 2 y para llevar a cabo una regresión multivariada (ver más abajo). Como fue explicado en el Capítulo 3, ambas variables fueron a partir de la implementación de una técnica de *Morfometría geométrica* (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II). Nuevamente, los valores de las DRs correspondientes a los machos y a las hembras se analizaron por separado debido a que se sabe que los sexos difieren en relación con la conformación del ala y, de acuerdo con la técnica utilizada, deben ser estudiados por separado (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II). De la misma manera, los bloques fueron analizados por separado debido a que se presume que son diferentes; sobretodo porque las líneas que corresponden a cada uno se distribuyen de distinta manera entre las poblaciones y los bloques.

## Análisis Estadísticos

*Análisis genético-cuantitativo.* Los valores de las distintas DR correspondientes a cada línea fueron analizados de acuerdo al siguiente modelo de MANOVA:

$$Y = \mu + P + L(P) + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media general de la conformación del ala; P es el factor población (fijo), con tantos niveles como poblaciones analizadas; L es el factor línea (fijo, anidado en el factor población), con tantos niveles como líneas se utilizaron, que permitió estudiar la existencia de diferencias entre las líneas dentro de cada población; y  $\epsilon$  representa al error. En los casos en los que el factor población resultó significativo se determinó qué poblaciones son las responsables de dicho efecto mediante comparaciones *a posteriori* (MANOVAs de a pares de poblaciones considerando todas las combinaciones posibles dentro de cada bloque) y, en estos casos, se aplicó la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples.

Dado que en el MANOVA no se puede incluir al factor línea como aleatorio, no se puede estudiar el aporte genético a la varianza fenotípica total. Debido a esto se utilizó al estimador univariado de la conformación del ala, DP, para estudiar el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por las fuentes de variación aleatorias. Como ya fue explicado en el Capítulo 3, esta otra variable estima a la conformación del ala de manera menos exacta por ser univariada pero, justamente por eso, permite realizar análisis con factores aleatorios. Para poder realizar un análisis con todas las líneas de ambos sexos medidas en cada bloque, al valor de cada individuo se le restó el valor medio de la línea control del sexo y bloque respectivo. Los valores transformados fueron analizados de acuerdo al siguiente modelo de ANOVA:

$$Y = \mu + P + L(P) + S + P \times S + L(P) \times S + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media general de DP; P es el factor población (fijo), con tantos niveles como poblaciones analizadas; L es el factor línea (aleatorio, anidado en el factor población), con tantos niveles como líneas se utilizaron, que permitió analizar la existencia de varianza genética intrapoblacional; S es el factor sexo (fijo), con dos niveles, que permitió estudiar las diferencias entre las medias de machos y hembras; y  $\epsilon$  representa al error. Asimismo se estimaron los componentes de la varianza para las fuentes de variación aleatorias lo que permitió conocer la proporción de la varianza asociada a la conformación del ala explicada por dichas fuentes de variación. Se determinó qué poblaciones difieren entre sí mediante comparaciones *a posteriori* (contrastes HSD para tamaños muestrales diferentes).

En este modelo, el factor línea se encuentra anidado en el factor población por lo que no se puede conocer si existen diferencias en cuanto a los patrones genéticos entre las poblaciones. Es decir, los resultados vinculados a las fuentes de variación que incluyen al factor línea corresponderán al comportamiento medio que este presenta en las distintas poblaciones. Por lo tanto, se realizaron ANOVAs separados para cada población de forma tal de estudiar las fuentes de variación genéticas en cada una de ellas. Estos ANOVAs de dos factores presentan una interacción aleatoria (línea x sexo) cuyos cuadrados medios son utilizados para estimar el valor del estadístico asociado a cada una de las fuentes de variación principales. Por lo tanto, en los casos en los que esta interacción resultó significativa, se realizaron ANOVAs con los datos correspondientes a cada sexo por separado para evaluar el efecto del factor línea en cada uno de ellos.

Dado que se emplearon los mismos datos en distintos análisis, se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

*Análisis de regresión.* Se realizó un análisis de regresión múltiple entre los valores de las distintas DR de los individuos de cada bloque y sexo y las variables independientes latitud (considerando sus valores en el sistema decimal) y altitud. Asimismo se compararon las

pendientes significativamente diferentes de cero entre si considerando la posibilidad de unificar, por un lado, los datos correspondientes a un mismo sexo y, por el otro, los de un mismo bloque. Estos análisis se realizaron utilizando el programa *tpsRegr* (Rohlf, 2000).

Asimismo, se realizó un análisis de regresión múltiple *Forward stepwise* entre los valores del cociente TA/LT, utilizado como un estimador de la inversa del *wing loading*, y las variables independientes latitud (considerando sus valores en el sistema decimal) y altitud. Los valores de TA y LT utilizados en estos análisis son los mismos que fueron empleados en el Capítulo 5 (es decir, los valores transformados como se detalla en ese capítulo). Dado que los valores de ambas variables corresponden a órdenes de magnitud muy diferentes, fueron transformados antes de realizar el cociente, calculando el logaritmo natural de cada uno. Igual que en el caso anterior, los sexos fueron analizados por separado utilizando los valores medios de las 66 líneas.

Todos los análisis estadísticos anteriores, excepto los de regresión múltiple utilizando las DR, fueron realizados usando el paquete STATISTICA (StatSoft Inc., 2004).

### **Visualización de las modificaciones en la conformación del ala**

*Visualización de los cambios conformacionales asociados a las líneas más extremas.* Se graficó el cambio conformacional asociado a cada extremo de las dos primeras DRs (que son aquellas que explican el mayor porcentaje de la varianza fenotípica total). Particularmente, para cada sexo, se mostró el cambio conformacional del consenso del bloque al que pertenece la línea que presentó el valor más extremo en una DR "en general" (juntando los datos de ambos bloques para cada sexo; ver más abajo) en el extremo correspondiente. Se utilizaron gráficos similares a los del Capítulo 3 (diagramas de vectores) pero estimados mediante el programa *tpsRegr* (Rohlf, 2000). Estas figuras muestran el desplazamiento de cada punto homólogo en el consenso del bloque de interés (al que está asociado una determinada línea) con respecto al extremo en cuestión, mediante flechas que indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II).

*Visualización de los cambios conformacionales asociados a los extremos de los gradientes geográficos.* Se graficó el cambio conformacional del consenso asociado a cada extremo de los gradientes geográficos que explicaron parte de la varianza fenotípica total en cada bloque y sexo por separado (ver, en *Análisis de regresión*, los análisis de regresión múltiple utilizando los valores de las DR). Nuevamente, se utilizaron diagramas de vectores estimados mediante el programa *tpsRegr* (Rohlf, 2000). Sin embargo, en este caso, al ser el cambio conformacional muy pequeño, hubo que magnificarlo multiplicándolo por diez (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II).



## Resultados

### Análisis genético-cuantitativo

Se realizó un análisis de varianza multivariado para analizar las diferencias entre las poblaciones para la conformación del ala en cada sexo y bloque por separado así como para estudiar la existencia de diferencias entre las líneas correspondientes. Los resultados de los MANOVAs mostraron una variación significativa entre las poblaciones estudiadas así como entre las líneas dentro de las poblaciones en todos los casos estudiados (Tabla 6.1). Estos resultados sugieren que hay variabilidad genética natural para la conformación del ala localizada en el cromosoma 2.

**Tabla 6.1:** Principales resultados de los MANOVAs para la conformación del ala. Se realizó un MANOVA con los factores población (fijo) y línea (fijo, anidado en población) en cada sexo y bloque. Se muestra el valor de  $F$  y su significancia para cada fuente de variación correspondiente a cada MANOVA.  $p < 0,000001$  en todos los casos.

Fuente de variación	Bloque 1		Bloque 2	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Población	12,09	12,74	11,64	12,54
Línea	6,67	6,97	7,96	7,59

Dado que el factor población resultó altamente significativo, se realizaron comparaciones *a posteriori* (MANOVAs de a pares de poblaciones considerando todas las combinaciones posibles dentro de cada bloque) para determinar qué poblaciones difieren entre si en cada grupo. Los resultados de estos análisis revelaron que la conformación del ala difiere significativamente entre todas las poblaciones de cada grupo, aún después de haber realizado la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples ( $P_{B \text{ bloque } 1} = 0,0023$ ;  $P_{B \text{ bloque } 2} = 0,0031$ ; Tabla 6.2).

**Tabla 6.2:** Principales resultados de las comparaciones *a posteriori* para la conformación del ala. Estas comparaciones se realizaron mediante un MANOVA por cada par de poblaciones dentro de cada sexo y bloque, considerando los factores población (fijo) y línea (fijo). Se muestra el valor de *F* y su significancia para cada comparación.  $p < 0,000001$  en todos los casos.

Bloque 1				Bloque 2			
Población 1	Población 2	Hembras	Machos	Población 1	Población 2	Hembras	Machos
Barreal	Chilecito	8,76	7,22	Chilecito	Güemes	9,93	6,96
Barreal	Güemes	5,42	5,57	Chilecito	Lavalle	9,38	11,35
Barreal	Jachal	19,97	32,22	Chilecito	Neuquén	10,77	13,90
Barreal	Lavalle	11,32	10,68	Chilecito	San Blas	17,72	17,17
Barreal	San Blas	9,92	4,11	Chilecito	Uspallata	9,73	10,82
Barreal	San Juan	9,63	14,02	Güemes	Lavalle	14,39	10,78
Chilecito	Güemes	8,60	5,23	Güemes	Neuquén	16,53	25,08
Chilecito	Jachal	23,02	27,67	Güemes	San Blas	10,38	8,85
Chilecito	Lavalle	13,77	10,68	Güemes	Uspallata	10,72	11,59
Chilecito	San Blas	7,33	6,19	Lavalle	Neuquén	4,65	10,41
Chilecito	San Juan	13,38	7,21	Lavalle	San Blas	20,21	16,75
Güemes	Jachal	20,04	21,92	Lavalle	Uspallata	15,33	13,34
Güemes	Lavalle	10,99	9,14	Neuquén	San Blas	22,20	20,69
Güemes	San Blas	6,02	4,71	Neuquén	Uspallata	12,99	16,42
Güemes	San Juan	13,37	7,60	San Blas	Uspallata	10,94	10,35
Jachal	Lavalle	5,95	17,64				
Jachal	San Blas	11,49	17,31				
Jachal	San Juan	25,77	36,57				
Lavalle	San Blas	9,88	9,72				
Lavalle	San Juan	17,62	17,76				
San Blas	San Juan	14,99	14,79				

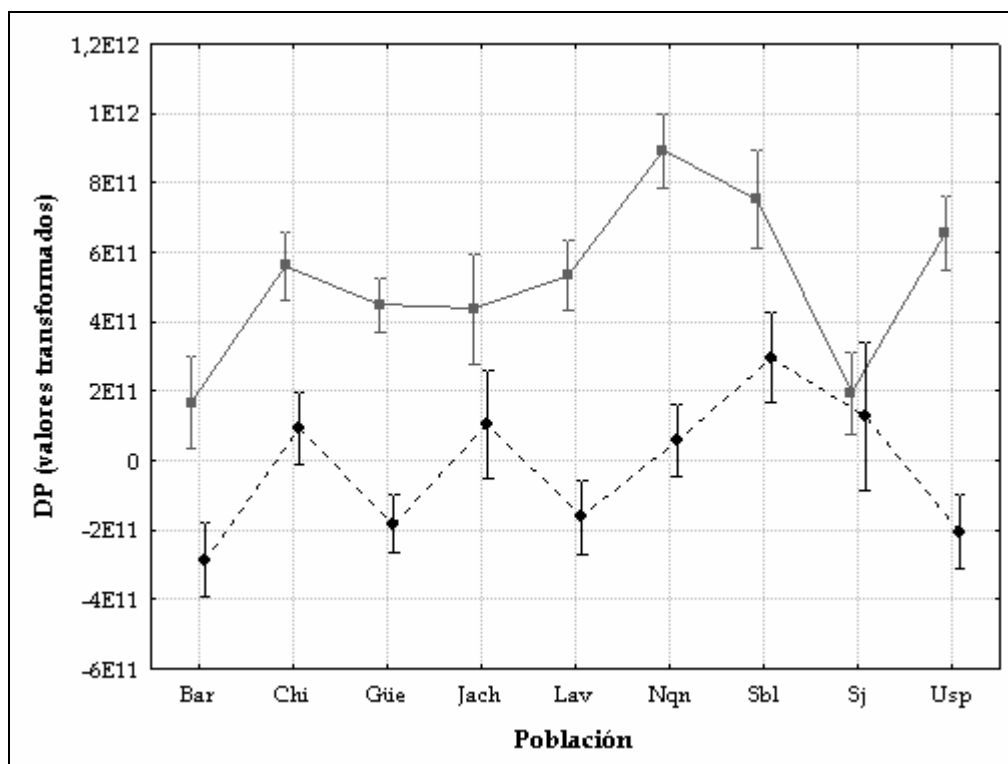
Como se describió en materiales y métodos el MANOVA no permite incluir factores aleatorios lo cual impide analizar la composición de la varianza fenotípica total observada. Por esta razón, se realizó un análisis de varianza univariado utilizando las DP para cuantificar el aporte de las fuentes de variación aleatorias a la varianza total de la conformación del ala. Los resultados del ANOVA muestran que existen diferencias significativas para la conformación del ala entre los sexos pero no entre las poblaciones estudiadas (Tabla 6.3). Sin embargo, la interacción entre estos factores fijos fue significativa (Tabla 6.3) lo cual indica que el dimorfismo sexual para la conformación del ala depende de la población analizada (Figura 6.1). Asimismo, los análisis revelaron que el factor línea fue altamente significativo y explicó un 23% de la varianza fenotípica total (Tabla 6.3). La interacción entre la línea y el sexo también fue

significativa, sugiriendo que el dimorfismo sexual depende del genotipo. Sin embargo, el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado por esta fuente de variación fue sólo del 2% (Tabla 6.3). De estos resultados se desprende que existe abundante variabilidad genética intrapoblacional, asociada al cromosoma 2, para la conformación ala.

**Tabla 6.3:** Principales resultados del ANOVA para la conformación del ala. Se realizó un ANOVA utilizando los valores de DP de acuerdo con un modelo con los factores población (fijo), línea (aleatorio, anidado en población) y sexo (fijo). Para cada fuente de variación se muestra el valor de los cuadrados medios (CM), el de  $F$ , su significancia y el porcentaje de la varianza explicado (CV).

Fuente de variación	CM	$F$	CV
Población	6,79E+24	1,63	-
Línea	4,26E+24	8,36***	23,3
Sexo	1,39E+26	273,70***	-
Población x Sexo	2,95E+24	5,84***	-
Línea x Sexo	5,09E+23	1,46*	2,0

\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 6.1:** Conformación del ala estimada a través de DP en machos (●) y en hembras (■) para cada población analizada: Barreal (Bar), Chilceto (Chi), Güemes (Güe), Jáchal (Jach), Lavalle (Lav), Neuquén (Nqn), San Blas (Sbl), San Juan (Sj) y Uspallata (Usp). Se muestra el valor medio y el intervalo de confianza del 95%.

Dado que la interacción población x sexo fue significativa, se realizaron los contrastes correspondientes. De los resultados de estos contrastes se desprende que Jáchal es la población que presentó un menor número de diferencias significativas con las demás poblaciones en ambos sexos (Figura 6.1; Tabla 6.4). Particularmente, esta población sólo se diferenció de Barreal en los machos y de Neuquén en las hembras (Figura 6.1; Tabla 6.4). Asimismo, los resultados mostraron que Neuquén y Barreal son las poblaciones que presentaron un mayor número de diferencias significativas con las demás en las hembras (Figura 6.1; Tabla 6.4). En el caso de los machos, San Blas y Barreal fueron las poblaciones que mostraron una mayor cantidad de diferencias con las demás (Figura 6.1; Tabla 6.4). Estos resultados muestran la existencia de diferencias entre las poblaciones que varían según el sexo analizado y se deben a factores presentes en el cromosoma 2. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el número de líneas derivadas de Barreal y Jáchal es bastante pequeño, por lo que los resultados vinculados con esas poblaciones en particular podrían variar significativamente si dicho número aumentara.

**Tabla 6.4:** Principales resultados de los contrastes de la interacción población x sexo realizados para la conformación del ala. Se muestra la significación asociada al contraste entre cada par de poblaciones dentro cada sexo.

	Barreal	Chilecito	Güemes	Jáchal	Lavalle	Neuquén	San Blas	San Juan
<u>Machos</u>								
Chilecito	**							
Güemes	ns	**						
Jáchal	*	ns	ns					
Lavalle	ns	*	ns	ns				
Neuquén	*	ns	*	ns	ns			
San Blas	***	ns	***	ns	***	*		
San Juan	*	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	
Uspallata	ns	*	ns	ns	ns	Ns	***	ns
<u>Hembras</u>								
Chilecito	**							
Güemes	ns	ns						
Jáchal	ns	ns	ns					
Lavalle	**	ns	ns	ns				
Neuquén	***	***	***	**	***			
San Blas	***	ns	***	ns	ns	Ns		
San Juan	ns	ns	ns	ns	ns	***	***	
Uspallata	***	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	**

ns: no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Los resultados de los análisis realizados con las DP mostraron una menor cantidad de diferencias significativas que aquellos hechos con las DRs. Tal y como se discutió en el Capítulo 3, en el que también se realizaron análisis uni y multivariados para la conformación del ala a título comparativo; este resultado era esperado debido a que las DP estiman la conformación del ala en forma menos exacta que las DRs.

Los principales resultados de los ANOVAs realizados con los datos de DP en cada población, a fin de estudiar las fuentes de variación genéticas en cada una de ellas, se muestran en la Tabla 6.5. Los análisis revelaron que existen diferencias significativas entre los valores correspondientes a machos y a hembras en todos los casos excepto Jáchal y San Blas (Tabla 6.5). Asimismo, estas poblaciones no mostraron resultados significativos para ninguna fuente de variación genética, así como tampoco lo hicieron Barreal y Uspallata (Tabla 6.5). El factor línea fue significativo en todas las demás poblaciones excepto Güemes, que fue la única que presentó una interacción línea x sexo significativa (Tabla 6.5). En los casos en los que el factor genético fue significativo, este explicó entre un 20% y un 37% de la varianza fenotípica total (Tabla 6.5). En cambio, la interacción explicó sólo el 8% de la varianza de la conformación del ala en Güemes (Tabla 6.5). En este caso se evaluó el efecto del factor línea en cada sexo por separado y se determinó que tanto los machos como las hembras presentaron variabilidad genética, la cual explicó el 13% y el 20% de la variación fenotípica total respectivamente.

**Tabla 6.5:** Principales resultados de los ANOVAs para la conformación del ala analizada en cada población por separado. Se realizó un ANOVA con los valores de DP de acuerdo con un modelo con los factores línea (aleatorio) y sexo (fijo). Se muestra el valor de F y su significancia para cada fuente de variación así como el porcentaje de la varianza explicado por cada fuente de variación aleatoria entre paréntesis.

Población	Línea	Sexo	Línea x Sexo
Barreal	5,17	46,81**	0,60
Chilecito	14,79*** (37)	45,43***	1,34
Güemes	2,52	50,13***	2,68** (8)
Jáchal	38,81* (39)§	18,90*§	0,67
Lavalle	12,18** (24)	97,63***	0,97
Neuquen	11,19*** (28)	123,19***	1,23
San Blas	5,69* (20)	9,42*	1,91
San Juan	11,14	0,56	0,73
Uspallata	4,70	162,33***	0,79

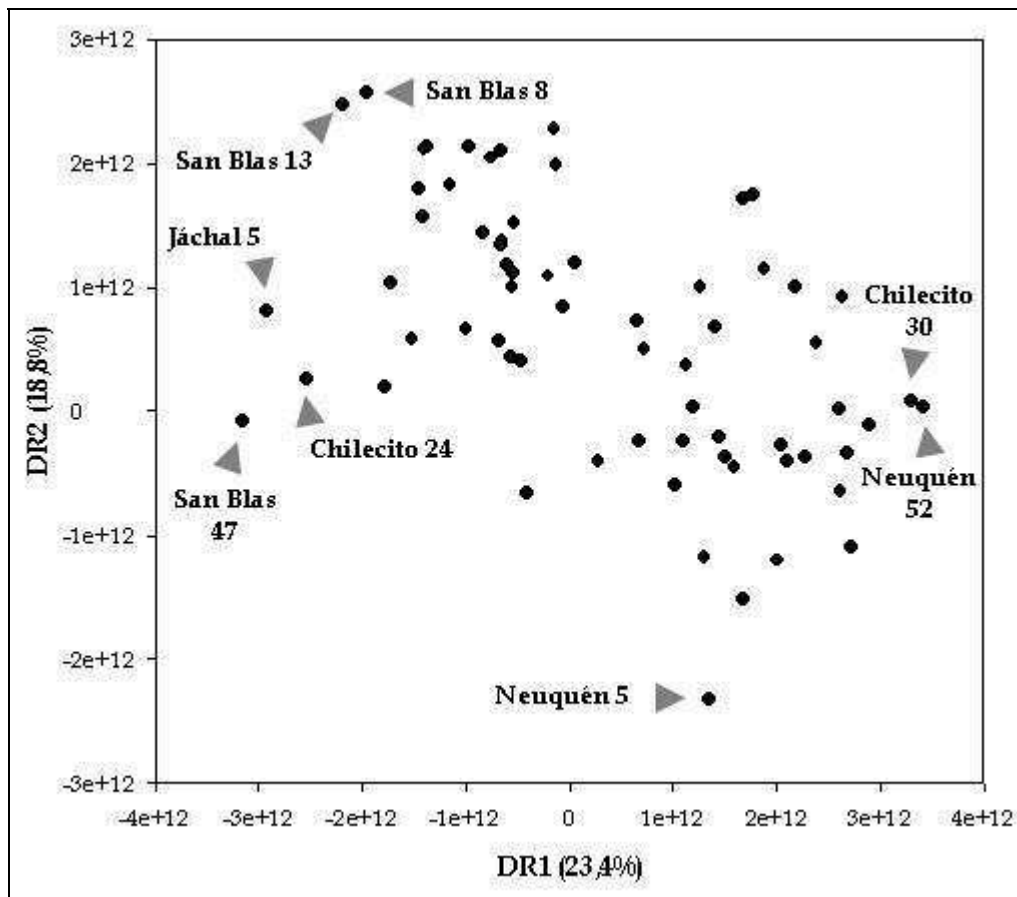
\*p<0,05; \*\*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,001. § No significativo tras aplicar la corrección de Bonferroni.

Vale la pena destacar que las poblaciones que no presentaron variabilidad genética para la conformación del ala son aquellas en la que se estudió un número menor de líneas (entre 3 y 6; Tablas 5.1 y 6.5). En cambio, las poblaciones que mostraron resultados significativos en ese sentido, presentan una cantidad bastante mayor de líneas (entre 8 y 13; Tablas 5.1 y 6.5).

### **Identificación de las líneas que presentaron los cambios conformacionales más extremos**

Debido a que las líneas pertenecen a bloques diferentes, los valores de cada DR fueron transformados restándole al valor de cada individuo el valor medio de la línea control del sexo y bloque respectivo. Luego se calculó el valor medio de cada DR para todas las líneas y se las ordenó de acuerdo a dichos valores. Dado que se pretende visualizar los mayores cambios asociados a la conformación del ala y que las dos primeras DR explican el mayor porcentaje de la varianza fenotípica total; se decidió tomar en consideración los resultados obtenidos para DR1 y DR2. De esta manera, las Figuras 6.2 y 6.3 muestran los valores mencionados para machos y hembras respectivamente. Asimismo, en cada eje, se indica el porcentaje de la varianza fenotípica explicado por cada DR que fue calculado como la media de los valores correspondientes a ambos bloques ponderada por la cantidad de líneas analizadas en cada uno.

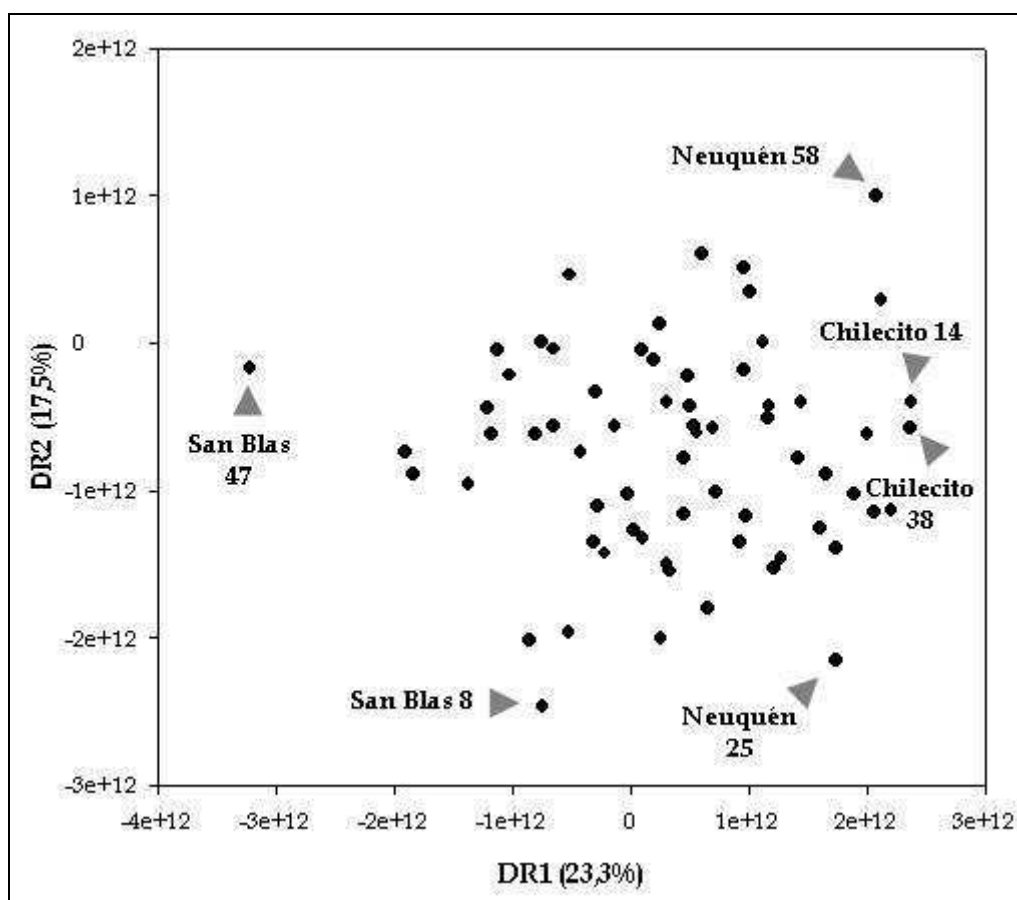
Una breve inspección de la figura correspondiente a los machos permite notar que la línea que presentó los mayores valores respecto de DR1, en comparación con la línea control del bloque respectivo, fue Neuquén 52 (Figura 6.2). Sin embargo, hay que destacar que los machos de Chilecito 30 presentaron valores cercanos a los de la línea mencionada en este eje (Figura 6.2). La línea que presentó los menores valores respecto de DR1 en este sexo fue San Blas 47 (Figura 6.2). Nuevamente, hay que considerar que los machos de otras líneas presentaron valores cercanos a los de la línea mencionada en este eje, Jáchal 5 y Chilecito 24 (Figura 6.2). En relación con DR2, la línea que presentó los mayores valores en los machos, en comparación con la línea control del bloque respectivo, fue San Blas 8 (Figura 6.2). Sin embargo, los machos de San Blas 13 mostraron valores similares a los de la línea mencionada en ese extremo (Figura 6.2). Finalmente, la línea que presentó los menores valores respecto de DR2 en este sexo fue Neuquén 5, alejándose bastante del resto en ese extremo (Figura 6.2).



**Figura 6.2:** Valor medio de las dos primeras DR de cada línea relativizado con respecto al control del bloque respectivo en los machos. El porcentaje de la varianza fenotípica explicado por cada DR es la media de los valores correspondientes a ambos bloques ponderada por la cantidad de líneas analizadas en cada uno.

Al observar la figura correspondiente a las hembras se puede ver que la línea que presentó los mayores valores respecto de DR1, en comparación con la línea control del bloque respectivo, fue Chilecito 14 (Figura 6.3). De la misma manera que en el caso de los machos, hay que destacar que las hembras de otras líneas presentaron valores cercanos a los de la línea mencionada en este eje, particularmente Chilecito 38 (Figura 6.3). La línea que presentó los menores valores respecto de DR1 en este sexo fue la misma que en los machos, San Blas 47 (Figura 6.3). Sin embargo, en este caso, no hay otras líneas cuyas hembras hayan mostrado valores similares a los de la línea mencionada en este extremo (Figura 6.3). En relación con DR2, la línea que presentó los mayores valores en las hembras, en comparación con la línea control del bloque respectivo, fue Neuquén 58 (Figura 6.3). En este caso tampoco parece haber una línea cuyas hembras hayan mostrado valores similares a los de la línea mencionada en este eje. Finalmente, la línea que presentó los menores valores respecto de DR2 en este sexo fue San Blas 8 que, como se mencionó anteriormente, presentó los mayores valores para esta DR en los machos (Figura 6.3). En este caso, las hembras de Neuquén 25 mostraron valores similares a los

de la línea mencionada en este extremo (Figura 6.3).



**Figura 6.3:** Valor medio de las dos primeras DR de cada línea relativizado con respecto al control del bloque respectivo en las hembras. El porcentaje de la varianza fenotípica explicado por cada DR es la media de los valores correspondientes a ambos bloques ponderada por la cantidad de líneas analizadas en cada uno.

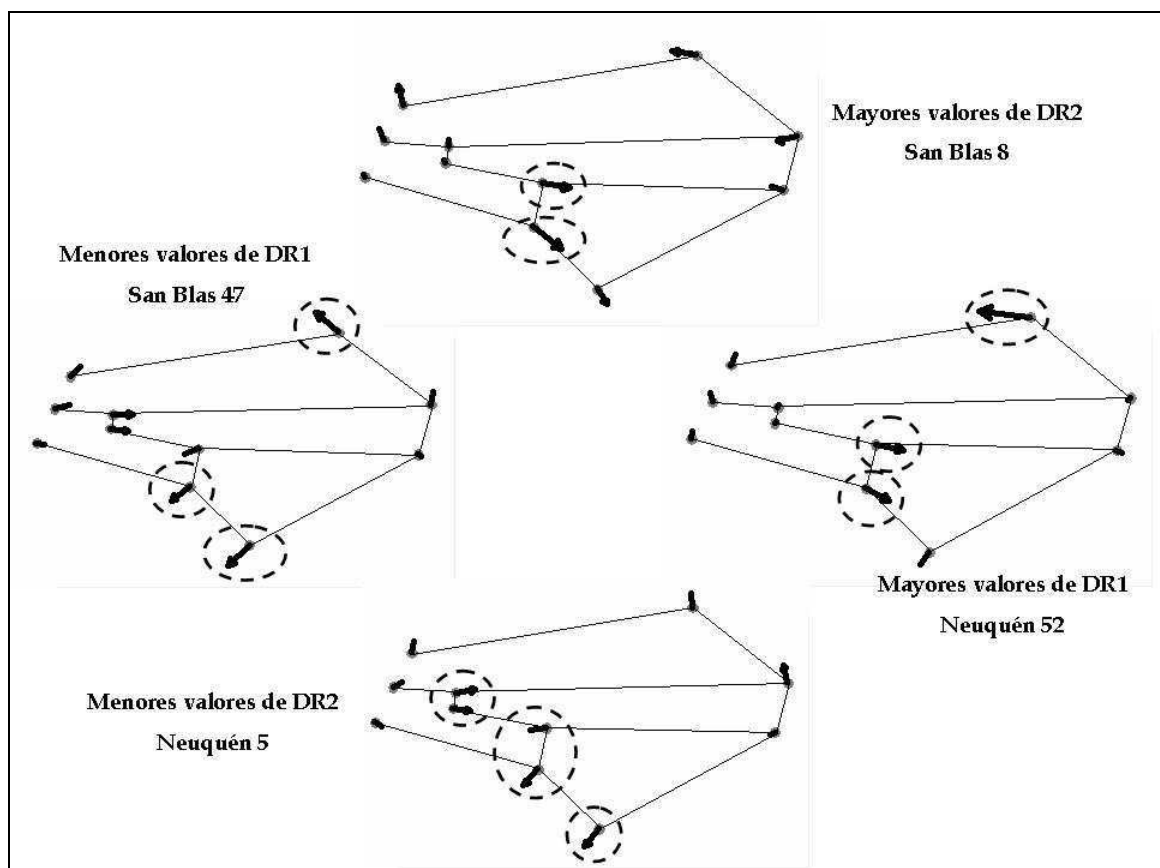
### Visualización de los cambios conformacionales asociados a las líneas más extremas

Debido a que las líneas que presentaron los cambios más extremos en la conformación del ala pertenecen generalmente a bloques diferentes, no sería adecuado mostrar las modificaciones asociadas a cada eje como parte de un continuo (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II). Sin embargo, la línea asociada a cada extremo de cada DR presenta los valores más extremos de esa DR en el bloque al que pertenece. Por ejemplo, para los machos, Neuquén 5 mostró los menores valores de DR2 considerando a todas las líneas y, a su vez, presentó los menores valores de DR2 del bloque 2. Por lo tanto, en este caso, la conformación del ala asociada a los menores valores de DR2 se asemeja mucho a la del consenso del bloque 2 en relación con ese extremo. Por lo tanto, la conformación del ala asociada a cada extremo es la que corresponde al consenso del bloque al que pertenece la línea en relación con dicho extremo. De esta manera, las Figuras 6.4 y 6.5 muestran diagramas del ala (uno por cada extremo de DR1 y



DR2 que está asociado a una línea diferente), para los machos y las hembras respectivamente, que pueden ser analizadas por separado para inferir que regiones del ala se vieron más afectadas en cada caso.

En los machos, el cambio de la conformación del ala en la línea que presentó los mayores valores respecto de DR1, Neuquén 52, involucró los puntos homólogos 5, 6, 7, y 10 (ver el Anexo Metodológico II), es decir, la región intermedia el ala; siendo el desplazamiento de los puntos 5, 6 y 7 aparentemente mayor que el de los demás (Figura 6.4). En el otro extremo de los valores de DR1 se encuentra San Blas 47, cuyo cambio conformacional implicó, sobretodo, a los puntos 3, 4, 6, 7 y 10; es decir, una modificación de casi toda el ala (Figura 6.4). En este caso el desplazamiento parece haber sido levemente desigual, siendo un poco mayor en el caso de los puntos 6, 7 y 10 (Figura 6.4).

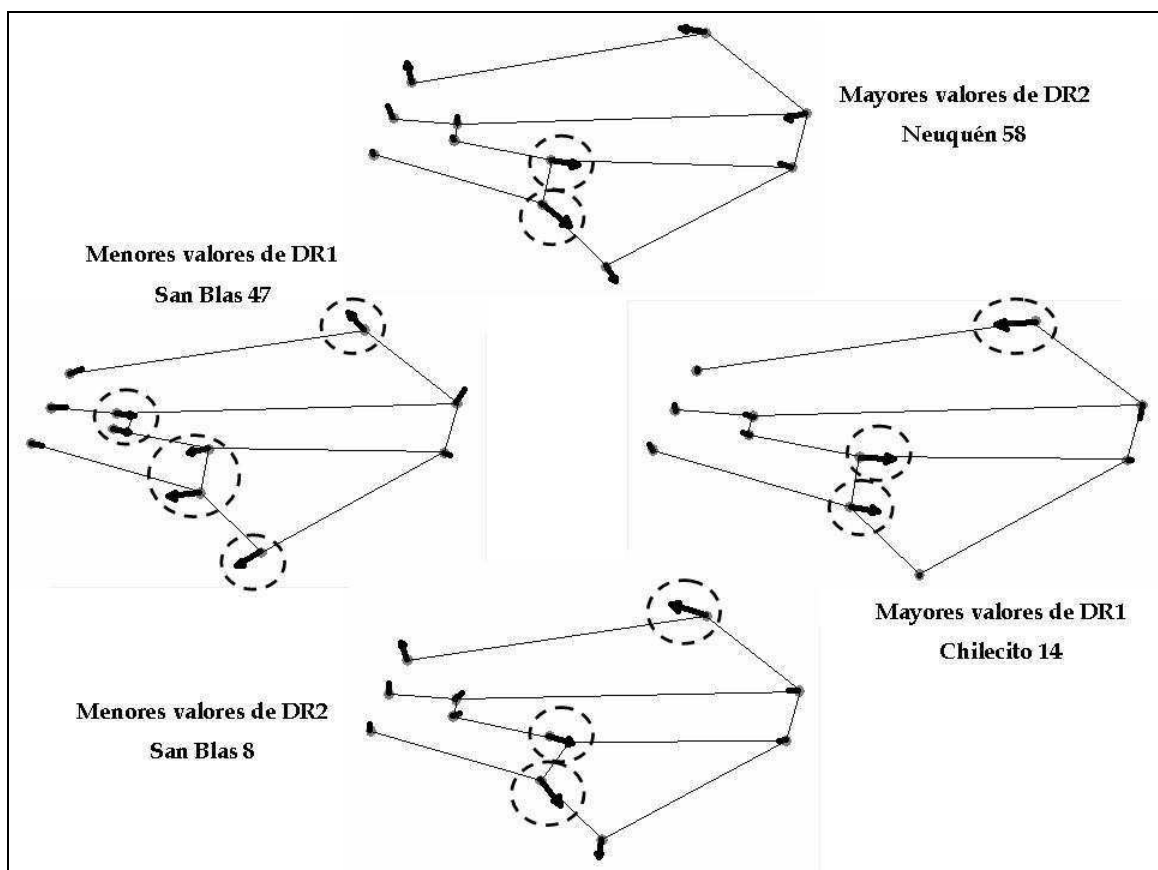


**Figura 6.4:** Líneas que presentaron los valores más extremos para cada una de las dos primeras DR con respecto a la línea control del bloque respectivo en los machos. Se muestra el cambio conformacional del consenso del bloque al que pertenece cada línea en relación al extremo en cuestión. Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.

En relación con DR2, el cambio de la conformación del ala en la línea que presentó los mayores valores, San Blas 8, involucró predominantemente a los puntos homólogos 5, 6, 7 y 8;

es decir, la parte más distal del ala (Figura 6.4). Sin embargo, el desplazamiento de los puntos 5 y 6 fue aparentemente mayor que el de los demás (Figura 6.4). Por último, el cambio conformacional de la línea que presentó los menores valores respecto de DR2, Neuquén 5, implicó un desplazamiento similar de los puntos 3, 4, 5, 6 y 10 (Figura 6.4).

En las hembras, el cambio de la conformación del ala en la línea que presentó los mayores valores respecto de DR1, Chilecito 14, involucró a los puntos homólogos 5, 6 y 7; es decir, la zona intermedia del ala (Figura 6.5). Este cambio parece ser similar al observado en los machos (Figuras 6.4 y 6.5). En el otro extremo de los valores de DR1 se encuentra San Blas 47, cuyo cambio conformacional implicó un desplazamiento de casi todos los puntos; particularmente de 3, 4, 5, 6, 7 y 10 (Figura 6.5). Este cambio también parece ser similar al observado en los machos (Figuras 6.4 y 6.5).



**Figura 6.5:** Líneas que presentaron los valores más extremos para cada una de las dos primeras DR con respecto a la línea control del bloque respectivo en las hembras. Se muestra el cambio conformacional del consenso del bloque al que pertenece cada línea en relación al extremo en cuestión. Las flechas indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio. Se señalan los puntos homólogos que mostraron el cambio más importante.

En relación con DR2, el cambio en la conformación del ala en la línea que presentó los mayores valores, Neuquén 58, involucró los puntos homólogos 5, 6, 7 y 8 (Figura 6.5). En este

caso los puntos 5 y 6 parecen haberse desplazado más que el resto (Figura 6.5). Finalmente, el cambio conformacional de la línea que presentó los menores valores respecto de DR2, San Blas 8, implicó un desplazamiento de los puntos 5, 6, 7 y 10, siendo el de 5, 6 y 7 aparentemente mayor que el del 10 (Figura 6.5).

Si bien no se registraron exactamente las mismas líneas para ambos sexos en cada uno de los extremos analizados, vale la pena resaltar que hubo coincidencia en relación con un extremo, el de los menores valores de DR1; que es la que explica un porcentaje mayor de la varianza fenotípica total (Figuras 6.2 y 6.3). Es más, no sólo la línea que presentó los valores más pequeños para esta DR fue la misma en ambos sexos sino que el cambio en la conformación media observado en relación a la disminución de los valores de dicha DR fue similar en machos y hembras (Figuras 6.4 y 6.5). Algo similar se puede decir para San Blas 8 que, si bien presentó los mayores valores de DR2 en los machos y los menores valores de ese eje en las hembras, también involucró un cambio conformacional parecido. Esto puede deberse a que el consenso en el que se observan los cambios conformacionales con respecto a cada DR se estima para cada grupo de manera independiente. Por lo tanto, puede haber ocurrido que un cambio similar en ambos sexos se haya codificado con valores absolutos similares pero con un signo opuesto entre ellos (para más detalles, ver el Anexo metodológico II). Esto no hace más que resaltar el hecho de que los cambios conformacionales asociados a los extremos de un eje en este caso no forman parte de un continuo. Cada una de estas figuras corresponde a la modificación de la conformación del consenso de un bloque en relación con un determinado extremo de una DR; y fue elegido, únicamente, porque una línea que pertenece a él presentó los valores más asociados a ese extremo. A su vez, esto se hizo tras relativizar los valores de las DR con respecto a las del control del bloque respectivo con lo cual se juntaron individuos de distintas muestras cuyos valores de DR fueron estimados en relación a consensos diferentes. Esta asociación de datos sólo fue implementada para visualizar algunos de los cambios conformacionales más extremos asociados a las líneas, debido a la imposibilidad de graficar los cambios asociados a cada DR para todas las líneas.

### **Análisis de regresión de la conformación del ala**

Se realizó un análisis de regresión múltiple entre la conformación del ala y las variables independientes latitud y altitud correspondientes a la ubicación de cada población; para saber si estas variables pueden explicar, aunque sea parcialmente, la variación fenotípica observada. El análisis de regresión múltiple, realizado en cada sexo y bloque utilizando los valores de las DR, revelaron que la conformación del ala varía con dichas variables en todos los casos (Tabla 6.6). Si bien dicha relación explica un porcentaje muy bajo (alrededor del 2% en el caso de las

hembras y del 4% en el caso de los machos) de la varianza fenotípica total observada (Tabla 6.6), vale la pena recordar que esta se debe, fundamentalmente, a factores genéticos asociados al cromosoma 2. Asimismo, hay que aclarar que el coeficiente de regresión de la relación entre las variables morfológicas y cada variable independiente fue siempre mucho mayor (entre uno y cuatro órdenes de magnitud) en el caso de la latitud con respecto a la altitud. De esto que se deduce que la altitud explicó muy poco de la regresión en cada caso; por lo que el pequeño porcentaje de la variación fenotípica total explicado por la regresión se debió, predominantemente, al aporte de la latitud.

A continuación se compararon las pendientes de regresión correspondientes a los análisis entre bloques dentro de cada sexo. Este análisis reveló que la conformación del ala varía de manera diferente con la latitud y la altitud en moscas pertenecientes a bloques distintos para un mismo sexo (Tabla 6.7). Asimismo, se compararon las pendientes de regresión correspondientes a los análisis del bloque 1, por un lado, y a los del bloque 2, por el otro. Este análisis mostró que las pendientes de regresión de los machos y hembras de un mismo bloque, no fueron significativamente diferentes entre si (Tabla 6.7). Por lo tanto, estas comparaciones revelaron que la conformación del ala varía de manera similar con la latitud y la altitud en moscas de distinto sexo pertenecientes al mismo bloque (Tabla 6.7).

**Tabla 6.6:** Principales resultados de los análisis multivariados de regresión múltiple entre la conformación del ala y las variables independientes latitud y altitud, en cada sexo y bloque. Se muestra el valor del estadístico asociado a cada prueba así como el porcentaje de la varianza explicado por la regresión en cada sexo y bloque. En todos los casos  $p < 0,00001$ .

Estadístico	Bloque 1		Bloque 2	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Lambda de Wilks	6,66	6,50	13,19	15,78
Trace de Pillai	6,42	6,38	12,58	15,24
Trace de Hotelling-Lawley	6,90	6,62	13,80	16,32
Raíz máxima de Roy	11,37	9,80	21,39	23,72
Goodall	6,83	6,11	12,84	13,73
% de la varianza explicado	2,25	2,04	4,32	4,59

**Tabla 6.7:** Principales resultados de las comparaciones entre las rectas de regresión múltiple entre la conformación del ala y las variables independientes latitud y altitud entre bloques (para un sexo) o entre sexos (para un bloque). Se muestra el valor del estadístico asociado a cada prueba.

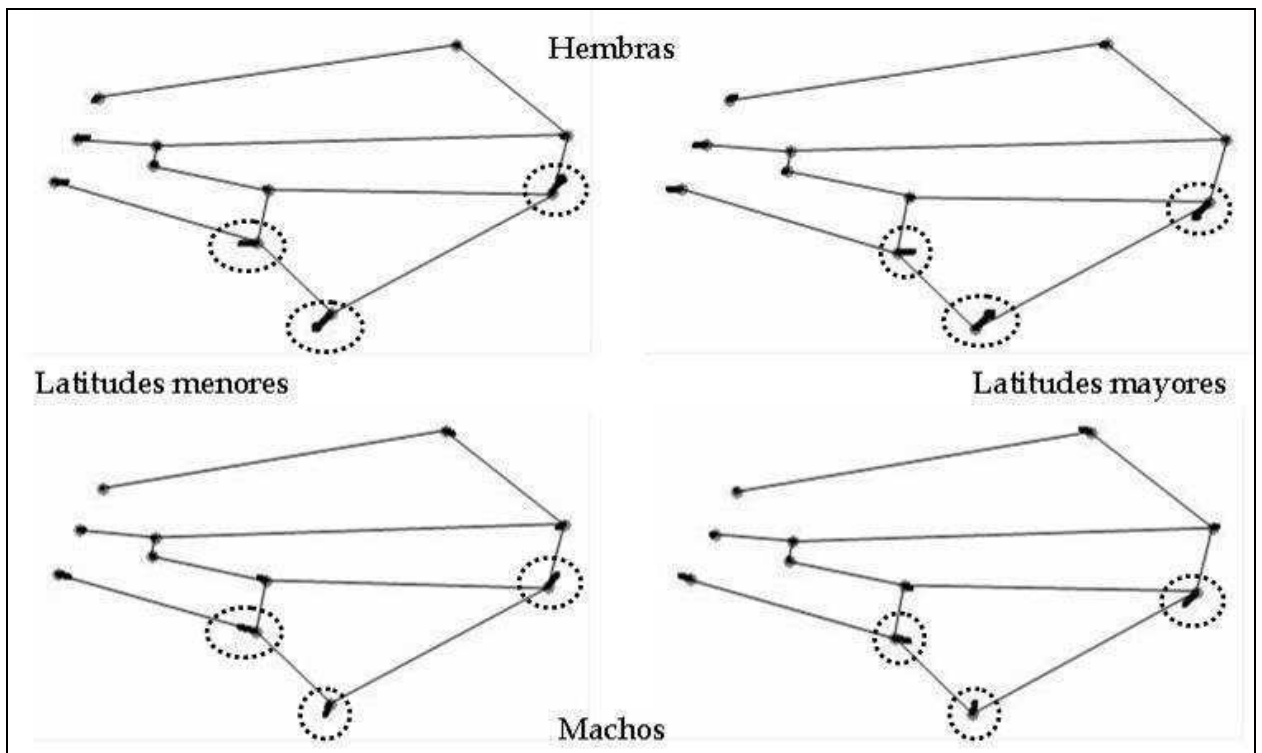
Estadístico	Entre bloques		Entre sexos	
	Hembras	Machos	Bloque 1	Bloque 2
Lambda de Wilks	6,41**	4,95*	1,13	1,04
Trace de Pillai	6,29**	4,91*	1,13	1,04
Trace de Hotelling-Lawley	6,54**	5,00*	1,13	1,04
Raíz máxima de Roy	10,78**	7,68*	1,23	1,38

\*  $p < 1E-18$ , \*\*  $p < 1E-27$ .

### Visualización de los cambios conformacionales asociados a los extremos de los gradientes geográficos

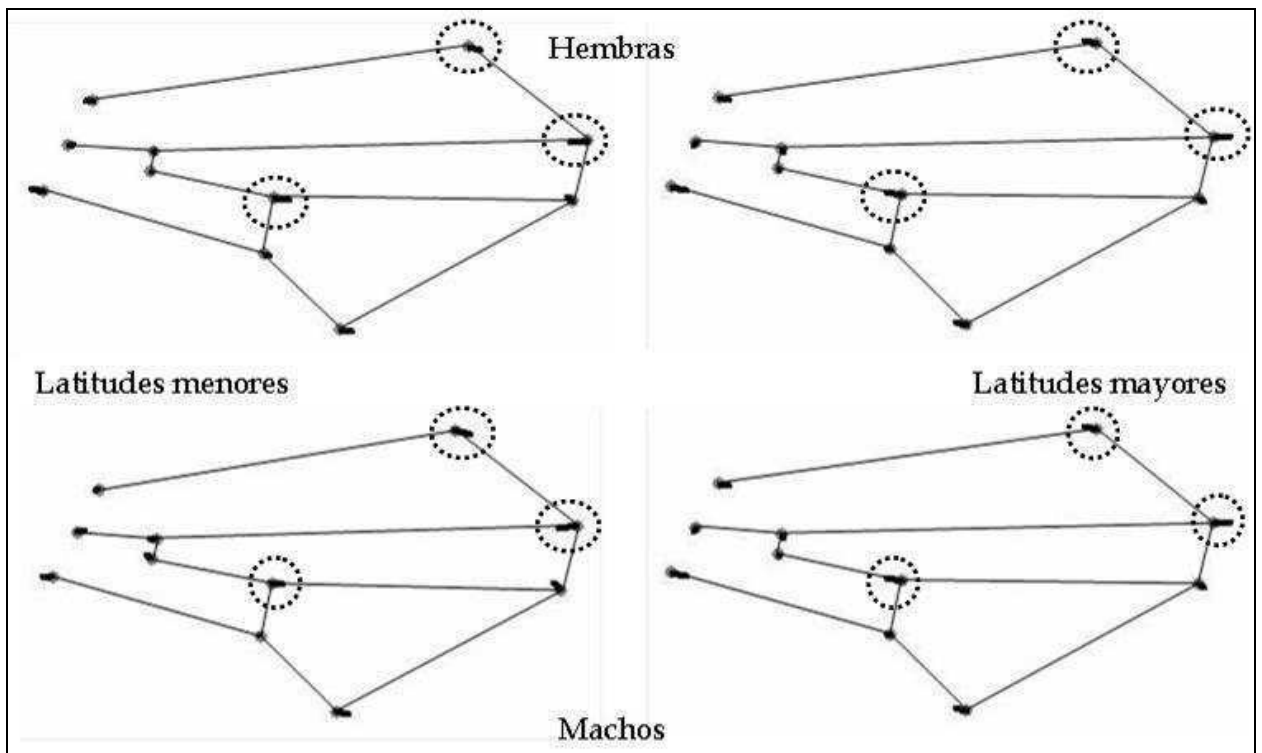
Se graficó el cambio conformacional del consenso asociado a cada extremo del gradiente latitudinal debido a que la altitud explicó, comparativamente, muy poco de la variación fenotípica total. Estos gráficos se hicieron para cada bloque y sexo por separado porque, en este caso, se quieren visualizar las modificaciones en la conformación del ala asociadas a un continuo definido por el gradiente geográfico. De esta manera, las Figuras 6.6 y 6.7 muestran los cambios conformacionales asociados a los extremos del gradiente latitudinal para cada sexo en el bloque 1 y 2 respectivamente.

El cambio en la conformación del ala de las hembras del bloque 1 en relación con la latitud parece ser mayor que el de los machos del mismo bloque (Figura 6.6). Esta modificación conformacional implica, predominantemente, un desplazamiento de los puntos homólogos 6, 9 y 10; es decir, la parte posterior del ala (Figura 6.6). Aparentemente, la región definida entre las venas longitudinales 4 y 5 (LV4 y LV5), la vena transversal posterior (PCV) y el margen posterior del ala (ver el Anexo metodológico II), se reduce a medida que aumenta la latitud (Figura 6.6). El desplazamiento de los demás puntos homólogos, particularmente el del 2 y el 11, si bien parece ser mucho menor que el de los mencionados anteriormente, parece indicar que el ala se alarga en dirección próximo-distal al aumentar la latitud y se acorta a latitudes menores (Figura 6.6). En síntesis, el desplazamiento de los puntos homólogos sugiere que el ala se elonga en la dirección próximo-distal y se comprime en la dirección antero-posterior, a latitudes mayores; mientras que adopta una forma más globular cuando la latitud disminuye.



**Figura 6.6:** Cambio conformacional del consenso del bloque 1 asociado a cada extremo del gradiente latitudinal para cada sexo (ver el texto para más detalles).

En el bloque 2, el cambio en la conformación del ala de las hembras en relación con la latitud parece ser más parecido al de los machos en comparación con el bloque 1 (Figura 6.7). En este caso, la modificación de la conformación del ala implica, predominantemente, un desplazamiento de los puntos homólogos 5, 7 y 8; es decir, la parte más anterior del ala en ambos sexos (Figura 6.7). Si bien en este caso no parece haber una región del ala claramente asociada al cambio conformacional y que el desplazamiento de los puntos homólogos parece ser menor que en el bloque 1; las venas longitudinales 3 y 4 (LV3 y LV4) y la vena transversal posterior (PCV) parecen estar implicadas en el cambio (Figura 6.7). El desplazamiento de los puntos homólogos mencionados (principalmente el 5 y el 8), por un lado; y el de los puntos 1, 5 y 11 (principalmente el 5 y el 11), parecen indicar que la zona distal se alarga con la latitud a la vez que la región proximal se acorta; mientras que ocurriría lo opuesto a latitudes menores (Figura 6.7). En general, el desplazamiento de todos los puntos homólogos parece indicar que, al igual que el bloque 1, el ala se alarga en dirección próximo-distal al aumentar la latitud y se acorta cuando la latitud disminuye (Figura 6.7).



**Figura 6.7:** Cambio conformacional del consenso del bloque 2 asociado a cada extremo del gradiente latitudinal para cada sexo (ver el texto para más detalles).

Si bien el cambio conformacional no fue igual en ambos bloques, se pudieron encontrar modificaciones similares entre ellos. Las diferencias probablemente se debieron a que, no sólo la cantidad de las líneas asociadas a cada población fue diferente en cada uno de ellos sino que, además, existieron diferencias en relación a las poblaciones que los constituyeron. Por un lado, en el bloque 1 no hubo líneas de las poblaciones de Neuquén y Uspallata, que son las de mayor latitud y altitud respectivamente (Tabla 5.1 del Capítulo 5). Por otro lado, en el bloque 2 no estuvieron representadas las poblaciones de Barreal, Jáchal y San Juan. Si bien el bloque 2 estuvo constituido por un menor número de poblaciones, aquellas que lo conformaron parecen ser más representativas de los gradientes geográficos estudiados. De todos modos, hay que considerar que se asignó la misma cantidad de líneas a cada bloque de manera aleatoria y que los cambios conformacionales asociados a la latitud observados en cada uno de ellos parecen ser consistentes entre sí.

### **Análisis de regresión del estimador relacionado con el *wing loading***

Se realizó un análisis de regresión múltiple *Forward stepwise* entre los valores del cociente TA/LT, utilizado como un estimador de la inversa del *wing loading*; y las variables independientes latitud y altitud en cada sexo por separado. Los resultados de estos análisis revelaron que el componente de TA/LT explicado por la variación genética asociada al

cromosoma 2, varía únicamente con la altitud y sólo en los machos. En este caso, la relación explicó alrededor del 17% de la varianza fenotípica total observada y el valor de la pendiente fue de 0,28 ( $t_{63}=2,35$ ,  $p=0,02$ ). De esta manera se puede decir que el tamaño de las alas aumenta más que el del tórax al aumentar la altura o, similarmente, que el tamaño de las alas disminuye en menor grado que el del tórax a medida que se incrementa la altitud.

## **Discusión**

Se realizó un análisis genético-cuantitativo utilizando líneas de *D. melanogaster* derivadas de poblaciones naturales de Argentina con el fin de caracterizar parte de la arquitectura genética de la conformación del ala. Dado que se utilizaron líneas isogénicas que difieren únicamente en el cromosoma 2 proveniente de la naturaleza; se pudo analizar la porción de la varianza fenotípica total explicada por factores genéticos asociados a ese cromosoma considerando, además, el efecto del sexo y de la población de origen. Finalmente, el análisis de la morfología de las alas en combinación con el estudio del tamaño corporal realizado en el Capítulo 5 permitió poner a prueba las hipótesis adaptativas que relacionan los cambios en la morfología de las moscas con los gradientes geográficos. De esta manera, se analizó la correspondencia entre la modificación de la conformación del ala y los gradientes geográficos, por un lado; y el cambio de la relación entre el tamaño del ala y el del tórax con dichos gradientes, por el otro. Los resultados sugieren que existe abundante variabilidad genética intrapoblacional así como diferencias entre los sexos y entre las poblaciones para la conformación del ala, las cuales se deberían a variantes genéticas presentes en el cromosoma 2. Asimismo, los análisis relacionados con los gradientes geográficos revelaron resultados que son consistentes con los derivados de trabajos previos en los que se observó que la inversa del *wing loading* y el *wing aspect* aumentan con la latitud y la altitud. Por lo tanto, los resultados son discutidos en el marco de los dichos antecedentes, tomando en consideración la existencia de otros factores que presentan diferencias entre gradientes geográficos y que afectan al desempeño en el vuelo.

### **Análisis genético-cuantitativo**

El análisis genético-cuantitativo general reveló la existencia de una importante variación genética intrapoblacional, asociada al cromosoma 2, para la conformación del ala. Particularmente, los resultados mostraron que los factores genéticos juntos explicaron un 25% de la varianza fenotípica total. Sin embargo, cuando se analizaron las poblaciones en forma separada, los resultados presentaron valores que estuvieron entre el 8% y el 37%. Dado que las poblaciones que mostraron resultados significativos para las fuentes de variación genética son



aquellas que presentan la mayor cantidad de líneas; esto muestra que, en general, pueden existir diferencias importantes en relación a la variabilidad genética asociada a la conformación del ala entre las poblaciones naturales.

Como se mencionó en el Capítulo 5, si los factores genéticos que contribuyen a la conformación del ala se distribuyeran aleatoriamente en el genoma, se esperaría que el cromosoma 2 explique aproximadamente el 40% de la varianza fenotípica total. Los valores en cuestión nunca alcanzaron dicho valor y, a menudo, fueron bastante menores. Esto puede deberse, como se mencionó en el Capítulo 5, a la suma del error de medición, la varianza interindividual y, quizás, el fondo genético utilizado.

En principio, estos resultados están de acuerdo con las estimaciones hechas previamente para la varianza genética asociada a este carácter (Birdsall *et al.*, 2000; Dworkin & Gibson, 2006; Mezey *et al.*, 2005; Mezey & Houle, 2005; Weber, 1990; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2005; 2008; Zimmerman *et al.*, 2000). Sin embargo hay que destacar que todos estos trabajos se realizaron con el objetivo de identificar QTLs que afecten a la conformación del ala, de manera similar al estudio vinculado al Capítulo 3 de esta tesis. Por lo tanto, si bien estos trabajos demostraron que la base genética de la conformación del ala está constituida por una gran cantidad de genes, generalmente no analizaron la variabilidad genética natural asociada a este carácter complejo. Algunos de estos trabajos permitieron saber que muchos de esos genes se encuentran en el cromosoma 2 (Mezey *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2001, 2008; Zimmerman *et al.*, 2000), lo cual es consistente con la importante variabilidad genética encontrada entre las líneas de sustitución cromosómica analizadas.

Asimismo, de la comparación de estos resultados con los del Capítulo 5 se desprende que la varianza genética para la conformación del ala explica un porcentaje de la varianza fenotípica total mayor que en el caso del tamaño del ala (20%). Estas diferencias sugieren que existe una mayor variabilidad genética asociada al cromosoma 2 para la conformación del ala que para el tamaño de este órgano en las poblaciones naturales estudiadas. En principio, estos resultados pueden implicar que los factores genéticos asociados a cada carácter están distribuidos de distinta manera en el genoma, habiendo más genes vinculados a la conformación del ala en el cromosoma 2. Sin embargo, otra explicación posible, que no excluye a la anterior, es que ambos caracteres presentan un nivel de variabilidad diferente porque están sujetos a distintas fuerzas selectivas en la naturaleza. De todos modos, estos resultados reflejan, una vez más, la complejidad de la arquitectura genética de los componentes de la forma del ala (es decir, de su conformación y de su tamaño). Particularmente, los resultados sugieren que la arquitectura genética de ambos caracteres difiere en las poblaciones naturales de *D. melanogaster*, tal y como lo han sostenido otros autores previamente (Gilchrist & Partridge,

2001).

Los resultados también mostraron que los sexos difieren significativamente entre si para la conformación del ala. Si bien este resultado no sorprende debido a que distintos análisis han demostrado que existen diferencias para la conformación del ala entre machos y hembras en *Drosophila* (por ejemplo, Cowley *et al.*, 1986; Gilchrist *et al.*, 2000); se debe resaltar que las diferencias se deben a factores genéticos presentes únicamente en el cromosoma 2. Asimismo, los análisis revelaron que las poblaciones presentan diferencias entre ellas para la conformación del ala que se pueden explicar por variantes genéticas localizados en dicho cromosoma. En general, estos resultados están de acuerdo con los estudios previos, que encontraron diferencias para la conformación del ala entre poblaciones de *D. melanogaster* de distintas partes del mundo (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 1998; Bublly *et al.*, 1996; Gilchrist *et al.*, 2000; Imasheva *et al.*, 1995; van't Land *et al.*, 1999; Weber, 1990; ver más abajo).

### **Visualización de los cambios conformacionales asociados a las líneas más extremas**

Al considerar únicamente las líneas que presentaron los cambios más extremos de la conformación del ala en cada una de las dos primeras dimensiones analizadas, se pudo notar que la mayoría de ellas fueron diferentes entre machos y hembras. Sin embargo, hubo dos que coincidieron entre los sexos, que mostraron modificaciones conformacionales similares. Por un lado, la línea San Blas 47, mostró un acercamiento entre las dos venas transversales (ACV y PCV) y un ensanchamiento del extremo distal del ala debido a un desplazamiento de dos puntos homólogos en sentidos opuestos: la unión entre LV1 y LV2, por un lado, y la unión entre LV5 y el margen del ala, por el otro. Por otro lado, la línea San Blas 8, mostró un desplazamiento de PCV hacia la parte distal de ala y un ensanchamiento del extremo distal del ala debido, sobretodo, a un desplazamiento de la unión entre LV5 y el margen del ala. El resto de las líneas en las que se visualizó el cambio conformacional mostraron modificaciones similares, con un desplazamiento de la mayoría de los puntos homólogos considerados en el análisis aunque con cierta preponderancia de aquellos mencionados anteriormente.

### **Análisis de regresión**

#### ***La conformación del ala y los gradientes geográficos***

Los análisis de regresión revelaron que la conformación del ala varía predominantemente con la latitud y, si bien dicha relación explicó un porcentaje muy bajo de la varianza fenotípica total observada, este se debe a factores genéticos asociados al cromosoma 2. En general, el cambio conformacional parece involucrar una elongación en la dirección próximo-distal con el aumento de la latitud.

A pesar de las numerosas diferencias entre los análisis hechos en este capítulo y los correspondientes a los trabajos previos (no sólo en relación con la base genética de las líneas empleadas sino también con respecto a la manera de estudiar la morfología del ala, las condiciones de cría de las moscas y el sexo considerado en los análisis), se pueden observar ciertas coincidencias entre ellos, al menos en términos generales. Distintos grupos de investigación ha encontrado variación genética clinal para diferentes estimadores de la morfología del ala al estudiar poblaciones naturales de *D. melanogaster* asociadas a varias regiones del mundo como Asia, Europa, Australia y Sudamérica (Azevedo *et al.*, 1998; Bublly *et al.*, 1996; Imasheva *et al.*, 1995; van't Land *et al.*, 1999). Algunos de estos autores analizaron diferentes variables lo que les permitió observar que el cambio ocurrió predominantemente en el compartimiento posterior (Bublly *et al.*, 1996; Imasheva *et al.*, 1995). Otros autores analizaron el *wing aspect* y observaron una tendencia al aumento del largo del ala en relación a su área con el incremento de la latitud (Azevedo *et al.*, 1998; Gilchrist *et al.*, 2000; van't Land *et al.*, 1999). A pesar de las diferencias metodológicas, generalmente todos coinciden en que el ala sufre modificaciones en la dirección próximo-distal con la latitud, la cual tiende a elongarse desproporcionadamente con la latitud (Azevedo *et al.*, 1998; Bublly *et al.*, 1996; Gilchrist *et al.*, 2000; Imasheva *et al.*, 1995; van't Land *et al.*, 1999). El trabajo de Gilchrist y colaboradores (2000) es digno de una mención especial debido a que es el único en el que se estudió el cambio conformacional del ala de *D. melanogaster* entre las poblaciones correspondientes a los extremos de las clinas previamente caracterizadas para el tamaño del ala pertenecientes a Australia, África y Sudamérica (Gilchrist & Partridge, 1999). Estos autores, además de analizar el *wing aspect*, realizaron un análisis multivariado similar al hecho en este trabajo y encontraron modificaciones conformacionales asociadas a las poblaciones de mayor y menor altitud muy parecidas a las observadas en este estudio en relación al gradiente latitudinal.

Algunos de los autores mencionados también analizaron el cambio en la conformación del ala asociado a la latitud en poblaciones de *D. subobscura* correspondientes a Europa y Norteamérica y encontraron un patrón que, en términos generales, coincide con el mencionado anteriormente para *D. melanogaster* (Gilchrist *et al.*, 2001; Huey *et al.*, 2000). Estos autores observaron que la longitud del ala aumentaba con la latitud en ambos continentes (Huey *et al.*, 2000; Gilchrist *et al.*, 2001). Sin embargo, en el Viejo Mundo la porción proximal del largo del ala es la que les permitió explicar el patrón clinal mientras que la parte distal es la que lo hizo en Norteamérica (Huey *et al.*, 2000; Gilchrist *et al.*, 2001). Estos autores dijeron que era extremadamente improbable que la diferencia entre ambas clinas, relacionada con la disposición de la vena transversal posterior, tuviera algún significado adaptativo. El argumento que emplearon fue que, dado que la región más posterior y distal del ala estaría sujeta a una

menor restricción funcional que la más anterior y proximal (Dickinson *et al.*, 1999), podría evolucionar más fácilmente por deriva génica. De acuerdo con estos autores, Gilchrist y colaboradores (2000) encontraron una variación considerable para la posición de la vena transversal posterior de *D. melanogaster* entre continentes, lo cual sería consistente con su hipótesis. Asimismo, los resultados observados en este trabajo también parecen estar de acuerdo con esa idea.

### ***El wing loading y los gradientes geográficos***

Los análisis de regresión revelaron que el cociente TA/LT, utilizado como un estimador de la inversa del *wing loading*, aumenta con la altitud en los machos. En este caso, la relación explicó alrededor del 17% de la varianza fenotípica total observada (asociada al cromosoma 2) y el valor de la pendiente fue de 0,28. Tras analizar conjuntamente estos resultados y los correspondientes a los análisis individuales de cada estimador del tamaño corporal (Capítulo 5); se puede decir que el tamaño de las alas de los machos disminuye en menor grado que el del tórax a medida que se incrementa la altitud. Estos resultados están parcialmente de acuerdo con algunos estudios previos que encontraron clinas geográficas, sobretodo latitudinales, para distintos estimadores del *wing loading* en poblaciones naturales de *Drosophila* de distintas regiones del mundo (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 1998; Gilchrist & Huey, 2004; Karan *et al.*, 1998; Parkash *et al.*, 1999; Sambucetti *et al.*, 2006). Particularmente, Sambucetti y colaboradores (2006) encontraron una relación positiva entre el cociente largo del ala/largo del tórax y la altitud en machos de poblaciones argentinas de *D. buzzatii*.

En forma similar a lo mencionado anteriormente para el *wing aspect*, los cambios observados en el *wing loading* en relación con los gradientes geográficos son generalmente similares a los vistos entre individuos de *Drosophila* criados a distintas temperaturas. A pesar de que estos trabajos estimaron el *wing loading* de diferentes maneras, sus resultados mostraron que sus valores generalmente disminuyen (o los valores de la relación entre el tamaño del ala y el del cuerpo aumentan) a medida que la temperatura decrece (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 1998; Barker & Krebs, 1995; Bitner-Mathé & Kaczko, 1999; David *et al.*, 1994; de Moed *et al.*, 1997; Gilchrist & Huey, 2004; Loeschcke *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 1999; Noach *et al.*, 1996; Pétavy *et al.*, 1997; Scheiner *et al.*, 1991; Thomas & Barker, 1993).

### ***Conclusiones generales de los análisis de regresión***

Dado que la frecuencia del aleteo disminuye con la temperatura (Barnes & Laurie-Ahlberg, 1986; Curtsinger & Laurie-Ahlberg, 1981; Lehmann, 1999; Reed, 1942), sería adaptativo poseer valores menores de *wing loading* o mayores de *wing aspect* en ambientes fríos ya que estos les otorgarían a las moscas una mayor capacidad de ascenso (Ellington, 1984c). Por lo tanto se

puede decir que, en general, los resultados expuestos en este capítulo están de acuerdo con la hipótesis de adaptación térmica vinculando al *wing loading* y el *wing aspect* con los gradientes geográficos. Particularmente, se ha observado que las moscas de ambos sexos presentan alas más alargadas a medida que aumenta la latitud y que el *wing loading* de los machos disminuye con la altitud debido a una reducción del tamaño de su tórax. En principio, la especificidad de sexo de este último resultado en comparación con la generalidad del primero es sorprendente. Sin embargo, los costos asociados al incremento del área del ala y a la disminución del tamaño del tórax podrían ser muy diferentes. Esto se debe a que la reducción de la masa corporal podría implicar una disminución de la capacidad reproductiva dado que el tamaño corporal está fuertemente asociado a la fecundidad en muchos insectos, incluido *Drosophila* (Berrigan, 1991; Marden, 1989, 1995; Nunney & Cheung, 1997; Robertson, 1957; Santos *et al.*, 1992). Por lo tanto, las diferencias entre los sexos en relación al *wing loading* podrían deberse a que sería menos adaptativo para las hembras disminuir su masa corporal (lo que llevaría a una mayor capacidad dispersiva) por el efecto negativo que esto tendría en la fecundidad. En cambio, el aumento del área del ala demandaría costos menores, que no comprometerían seriamente a otros caracteres vinculados al *fitness*, por lo que podría lograrse más fácilmente en ambos sexos. Las razones por las cuales no se observaron patrones similares considerando la latitud y la altitud no se pueden inferir a partir de estos resultados pero podrían tener que ver con otros factores ambientales que muestran diferencias entre poblaciones de altura y de llanura y que no cambian con la latitud. Entre estos factores está la densidad del aire, que disminuye a medida que se incrementa la altitud lo que podría dificultar el vuelo a grandes alturas dado que las fuerzas aerodinámicas producidas por el aleteo aumentan con la densidad del aire (Dudley, 2000). De hecho, como se mencionó anteriormente, se ha observado que la reducción de la temperatura y de la presión del aire afecta negativamente al desempeño en el vuelo en *D. melanogaster* (Dillon & Frazier, 2006). Es más, se demostró que, a bajas temperaturas, la disminución de la presión del aire afecta negativamente el desempeño en el vuelo (Dillon & Frazier, 2006). Dado que, para poder volar en esas condiciones, las moscas deberían hacer una gran fuerza muscular de forma tal de alterar la cinemática del aleteo (Dudley, 2000) y que esto podría ser muy difícil dada la disminución de las tasas metabólicas con la temperatura (Berrigan & Partridge, 1997; Huey & Kingsolver, 1989); el aumento del área del ala podría aportar poco para incrementar la eficiencia del vuelo. De esta manera, las moscas podrían compensar las condiciones que desafían la capacidad de vuelo a grandes alturas reduciendo el *wing loading* ya que, de esta manera, disminuirían los requerimientos energéticos y aumentaría la capacidad de ascenso (Dudley, 2000). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esto podría ser menos adaptativo para las hembras debido al gran costo reproductivo que les

demandaría. Sería necesario realizar otros estudios para saber si las hembras poseen efectivamente tasas de dispersión menores que las de los machos y, en ese caso, si existen factores compensatorios para que las hembras puedan sobrevivir y reproducirse en forma similar a los machos como, por ejemplo, una mayor resistencia a la inanición.

---

## **Capítulo VII**

Identificación de regiones genómicas responsables de la variación de los caracteres estudiados en las líneas de *D. melanogaster* derivadas de poblaciones naturales.

---

### **Resumen**

Los estudios destinados a conocer la arquitectura genética de un carácter cuantitativo requieren saber qué proporción de los genes involucrados en su expresión es responsable de la variabilidad fenotípica observada en poblaciones naturales. Debido a esto, se realizaron pruebas de complementación genética entre seis líneas de sustitución cromosómica, que presentaron valores extremos para los caracteres vinculados al tamaño corporal (Capítulo 5), y seis líneas BDGP en las cuales el gen afectado por la mutación se encuentra en el cromosoma correspondiente y es candidato a integrar la base genética de dichos caracteres (Capítulo 2). Los análisis de los caracteres vinculados al tamaño corporal revelaron la existencia de variabilidad natural para todos los genes analizados en la mayoría de los casos, con un efecto fenotípico similar en ambos sexos. Sin embargo, los resultados indican que distintos caracteres vinculados al tamaño corporal presentan distintos niveles de variación natural y sugieren que la expresión de DO está más canalizada que la del resto. Con respecto a la conformación del ala, los resultados mostraron un menor nivel de variación genética natural que para el tamaño corporal la cual, a su vez, dependería fuertemente del sexo. Particularmente, el análisis univariado reveló la existencia de variabilidad únicamente en los machos descendientes de *jing* mientras que los análisis multivariados revelaron la existencia de variabilidad para *toc* y *CG14478* en las hembras y para *Fas3* y *Rtnl1* en los machos. En ese sentido, los resultados sugieren que la expresión de la conformación del ala está más canalizada que la de los estimadores del tamaño corporal. En general, las variantes naturales encontradas sugieren que los genes estudiados interactúan con otros que intervienen directamente en la expresión de los distintos caracteres estudiados. De todos modos, se puede decir que todos los genes analizados presentan variabilidad genética, independientemente de que la contribución a la variabilidad natural de los caracteres analizados sea en forma directa o indirecta. Otros estudios más específicos permitirán confirmar la participación de estos genes en el desarrollo de las distintas estructuras del adulto de *Drosophila* y conocer las bases moleculares de la variación entre los alelos involucrados en la expresión de los caracteres analizados en las poblaciones estudiadas.

## Introducción

La comprensión de la arquitectura genética de cualquier carácter cuantitativo requiere, entre otras cosas (ver el Capítulo 1), saber qué proporción de los genes involucrados en su expresión es responsable de la variabilidad fenotípica observada en poblaciones naturales (Mackay, 2004). Tal y como fue mencionado anteriormente (ver el Capítulo 5), distintos trabajos han estudiado la variación natural en el tamaño corporal en *Drosophila* en general y en *D. melanogaster* en particular (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 2002; Capy *et al.*, 1993; 1994; Coyne & Beecham 1987; Folguera, 2007; James *et al.*, 1995; Louis *et al.*, 1982; van't Land *et al.*, 1999). Asimismo, diferentes autores han obtenido evidencias que apoyan la idea de que las clinas latitudinales para el tamaño del cuerpo, observadas en repetidas oportunidades, especialmente en *D. melanogaster*; tienen un origen adaptativo (Calboli *et al.*, 2003; Gilchrist & Partridge, 1999; Gockel *et al.*, 2001; 2002; Turner *et al.*, 2008; Zwaan *et al.*, 2000). En particular, esto implicaría, necesariamente, la existencia de variabilidad genética asociada a loci vinculados a la expresión del tamaño corporal. En ese sentido, distintos análisis de QTLs revelaron que la mayor parte de la variación genética para el tamaño corporal en poblaciones naturales de Australia y Sudamérica de *D. melanogaster* podía ser explicada por factores ubicados en los autosomas, principalmente en el cromosoma 3 (Calboli *et al.*, 2003; Gockel *et al.*, 2002; Kennington *et al.*, 2006; 2007; Rako *et al.*, 2006; Weeks *et al.*, 2002). Sin embargo, uno de estos trabajos mostró que el brazo derecho del cromosoma 2 presenta una región pleiotrópica con respecto a distintos caracteres vinculados al tamaño corporal o que contiene QTLs estrechamente ligados con efectos predominantes en un solo carácter (Calboli *et al.*, 2003). De la misma manera, previamente se mencionó (Capítulo 6) que se realizaron distintos estudios con el objetivo de identificar QTLs que afecten a la conformación del ala (Dworkin & Gibson, 2006; Mezey *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2005; 2008; Zimmerman *et al.*, 2000). De acuerdo con los resultados obtenidos en el marco de esta tesis (Capítulo 3), estos estudios demostraron que la base genética de la conformación del ala está constituida por una gran cantidad de genes. Algunos de estos trabajos permitieron saber que muchos de esos genes se encuentran en el cromosoma 2 (Mezey *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2001, 2008; Zimmerman *et al.*, 2000), lo cual es consistente con la importante variabilidad genética encontrada entre las líneas de derivadas de la naturaleza (Capítulo 6).

El mapeo de QTLs representa una aproximación complementaria con respecto a la mutagénesis por inserción de elementos móviles para identificar genes candidatos a formar parte de la base genética de los caracteres de interés (Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2001; 2004). Este tipo de estudios aprovecha inicialmente la variación natural vinculada a los caracteres de interés pero requiere de un trabajo posterior de refinamiento de los intervalos



identificados de forma tal de identificar y validar los genes asociados (Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2001; 2004). Inversamente, la mutagénesis por inserción de elementos móviles permite inicialmente identificar tales genes candidatos pero requiere de un trabajo posterior que permita establecer que dichos genes presentan variación genética asociada a la diversidad de los caracteres estudiados (Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2001; 2004). De esta manera, ambas aproximaciones al análisis de la base genética de un determinado carácter requieren de una etapa posterior de validación que puede ser llevada a cabo a través de pruebas de complementación de deficiencias cromosómicas y/o de mutaciones puntuales (Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2001; 2004).

Tradicionalmente, se utilizó el protocolo experimental que emplea deficiencias cromosómicas para mapear mutaciones recesivas que poseen un efecto fenotípico importante (Pasyukova *et al.*, 2000). De esta manera, una línea que presenta una de tales mutaciones es cruzada con distintas líneas que presentan diferentes deficiencias superpuestas en la región correspondiente y se registra el fenotipo de la descendencia heterocigota (Mackay, 2001; 2004; Pasyukova *et al.*, 2000). Para caracteres cuantitativos este diseño debe modificarse porque se intenta detectar pequeñas diferencias entre las líneas y porque múltiples loci con efectos que no son estrictamente recesivos contribuyen al fenotipo de interés (Pasyukova *et al.*, 2000). Por lo tanto, como mínimo, se deben cruzar dos líneas con distintas variantes del locus de interés con cada línea portadora de una determinada deficiencia (Pasyukova *et al.*, 2000). Sin embargo, una diferencia significativa entre las medias de ambos heterocigotas podría explicarse de dos maneras diferentes: a) podrían deberse a distintos alelos del QTL en cuestión presentes en las líneas parentales que no son cubiertos por la deficiencia, b) podrían deberse a efectos aditivos de QTLs que segregan entre las líneas parentales pero que no son descubiertos por la deficiencia (Pasyukova *et al.*, 2000). Para controlar este último efecto, se debe comparar la diferencia entre los heterocigotas para la deficiencia con la diferencia entre los heterocigotas para una línea que presente el mismo fondo genético que la línea portadora de la deficiencia pero que no presenta dicha deficiencia (Pasyukova *et al.*, 2000). Una vez realizados los cruzamientos y registrados los fenotipos de los descendientes heterocigotas se dice que hay complementación entre un determinado QTL y una deficiencia en la misma región, si el fenotipo de la descendencia del cruzamiento entre ambas líneas (que muestran diferencias para el carácter analizado) presenta un fenotipo similar al salvaje (Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2001; 2004). La ausencia de complementación se puede explicar de dos maneras posibles: a) la deficiencia deja al descubierto alelos de las dos líneas parentales con diferentes efectos en el carácter de interés (alelismo), b) existen interacciones génicas entre los QTLs en ambas líneas parentales con otros QTLs que afectan al mismo carácter (epístasis; Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2001; 2004; Pasyukova *et*

*al.*, 2000). La comparación de los puntos de ruptura de las deficiencias que no complementaron con los de las que si lo hicieron permiten reducir los intervalos de QTLs y particionarlos en múltiples loci ligados (por ejemplo, De Luca *et al.*, 2003; Fanara *et al.*, 2002; Harbison *et al.*, 2004; Pasyukova *et al.*, 2000). A continuación, se pueden llevar a cabo pruebas de complementación con todos los mutantes disponibles de los genes en cuestión de forma tal de validarlos (Mackay, 2001; 2004). Este procedimiento se ha utilizado en repetidas oportunidades para identificar genes candidatos a integrar la base genética de distintos caracteres (por ejemplo, De Luca *et al.*, 2003; Fanara *et al.*, 2002; Gurganus *et al.*, 1999; Harbison *et al.*, 2004; Long *et al.*, 1995). De todos modos, los loci implicados siguen siendo genes candidatos hasta que se pueda probar que son responsables del fenotipo observado (Mackay, 2001; 2004). Esto se logra, en última instancia, cuando se obtiene el fenotipo salvaje tras cruzar la línea con el alelo salvaje en un determinado fondo genético con otra línea portadora de un alelo nulo del locus en el mismo fondo genético (Mackay, 2001; 2004). Asimismo, estos genes que presentan variabilidad genética en las poblaciones naturales (QTGs) pueden ser confirmados por métodos independientes como el mapeo por desequilibrio de ligamiento para asociar los polimorfismos moleculares o SNP (por su sigla en inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*) que presentan los genes candidatos con la variación natural para el carácter analizado (por ejemplo, Long *et al.*, 1998; 2000; Lyman *et al.*, 1999; Lyman & Mackay, 1998).

Aparentemente, esta segunda etapa no se ha llevado tras haber realizado los distintos análisis de QTLs para el tamaño corporal de *D. melanogaster* mencionados anteriormente (Calboli *et al.*, 2003; Gockel *et al.*, 2002). Particularmente, algunos trabajos han analizado la relación entre marcadores presentes en el cromosoma 3 y la variación fenotípica natural y han prestado especial atención a la asociación con la inversión *In(3R)Payne* (Kennington *et al.*, 2006; 2007; Rako *et al.*, 2006; Weeks *et al.*, 2002). Sin embargo, prácticamente no existen estudios que hayan analizado el aporte del cromosoma 2 en mayor profundidad ni que hayan identificado genes vinculados a la variación del tamaño corporal en la naturaleza (ver el Capítulo 5). Similarmente, parece que esta segunda etapa del análisis no se ha desarrollado aún para la conformación del ala.

Dado que previamente se identificaron genes candidatos a integrar la base genética del tamaño corporal (Capítulo 2) así como líneas de sustitución cromosómica derivadas de poblaciones naturales que presentaron fenotipos extremos para los caracteres analizados (Capítulo 5); se comenzó a desarrollar dicha segunda etapa a partir de la información obtenida en el marco de esta tesis. De esta manera, se realizaron pruebas de complementación genética entre algunas de las líneas derivadas de la naturaleza mencionadas y determinadas líneas BDGP con el objetivo de determinar la existencia de QTGs que serían los responsables de la

variabilidad observada en las poblaciones naturales para los caracteres vinculados al tamaño corporal. Dado que este estudio se llevó a cabo con líneas isogénicas que difieren en el cromosoma 2 que se ha sustituido y que deriva de la naturaleza, y líneas BDGP en las que los genes mutados se encuentran en el cromosoma 2; esto permitió, además, profundizar en el conocimiento del aporte de dicho cromosoma a la variación natural para el tamaño corporal. Si bien las líneas fueron seleccionadas sólo por el fenotipo que mostraron en relación a los caracteres vinculados al tamaño corporal, la manera de estimar el tamaño del ala permite realizar un análisis de la conformación del ala con un esfuerzo adicional pequeño. Por lo tanto, también se llevó a cabo el análisis de la conformación del ala ante la posibilidad de identificar QTGs asociados al cromosoma 2 responsables de la variación natural observada para dicho carácter.

En resumen, esta última etapa de la tesis tiene como objetivo identificar QTGs para los caracteres vinculados al tamaño corporal y la conformación del ala en *D. melanogaster*, con el fin de profundizar en el conocimiento de la arquitectura genética de estos caracteres. En particular, se cruzaron seis líneas de sustitución cromosómica de las que presentaron los valores medios más extremos para los caracteres vinculados al tamaño corporal y seis líneas BDGP en las cuales el gen afectado por la mutación se encuentra en el cromosoma correspondiente y es candidato a integrar la base genética de dichos caracteres. Asimismo y de acuerdo con lo mencionado anteriormente, se realizaron los cruzamientos entre las mismas líneas derivadas de la naturaleza y la línea control en la que el gen no ha sido afectado por la mutación. De esta manera, en aquellos casos en los que no se registró complementación entre las líneas derivadas de la naturaleza para una determinada línea BDGP se identificó un QTG; ya sea porque el gen que presenta las variantes es el responsable directo de las diferencias fenotípicas observadas o porque interactúa epistáticamente con otro que causa tales diferencias.

## **Materiales y métodos**

### ***Stocks de Drosophila***

Por un lado, de las 113 líneas BDGP que difirieron significativamente de la línea control para algún carácter vinculado al tamaño corporal al menos en un sexo (Capítulo 2), se seleccionó un grupo para utilizar en los experimentos correspondientes a este capítulo. Se emplearon los siguientes criterios de selección: a) líneas que hayan mostrado diferencias con respecto al control para un número mayor de caracteres vinculado al tamaño corporal en ambos sexos; b) líneas que hayan presentaron los valores más extremos en más casos; c) líneas en las que se haya podido identificar un gen afectado por la inserción del elemento *P*; d) líneas en las que la mutación haya afectado al cromosoma 2; e) líneas en las que la inserción del elemento *P*

haya ocurrido dentro de un gen o muy cerca de alguno; f) líneas que hayan dado resultados similares a los obtenidos previamente al ser analizadas de nuevo tras aplicarles el mismo diseño experimental. De esta manera, y considerando que la línea BG02056 no estaba disponible, se seleccionaron las líneas BG00846, BG02023, BG02065, BG02081, BG2314 y BG2690; en las que los genes candidatos son *invected (inv)*, *Fasciclin 3 (Fas3)*, *toucan (toc)*, *Rtnl1*, *jing* y *CG14478* respectivamente.

Por otro lado, en el Capítulo 5 se preseleccionaron 11 líneas de sustitución cromosómica por ser las que mostraron el aumento o la disminución más extrema para más de un carácter vinculado al tamaño corporal en ambos sexos (considerando las primeras y las últimas 10 de la lista de líneas ordenadas por el valor medio de cada carácter). De estas líneas se seleccionó un grupo para utilizar en los experimentos correspondientes a este capítulo. En este caso, se emplearon los siguientes criterios de selección: a) líneas que hayan mostrado el aumento o la disminución más extrema para un número mayor de caracteres vinculado al tamaño corporal en ambos sexos; b) mismo número de líneas correspondientes a cada extremo; c) líneas que pertenezcan a diferentes poblaciones. De esta manera se seleccionaron las líneas Güemes 269, Neuquen 58 y San Blas 29, entre las que presentaron los valores medios mayores, y Chilecito 29, Jáchal 5 y Lavalle 12, entre las que presentaron los valores medios menores.

Cabe recordar que el *background* genético correspondiente a los cromosomas sexuales, 3 y 4 es idéntico entre las líneas provenientes de las poblaciones naturales (líneas de sustitución cromosómica), las líneas mutantes (líneas BDGP) y la línea control empleada en el estudio de ambos tipos de líneas (IsoB). Este *background* genético es el *Canton S B* (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II).

### **Diseño Experimental**

Se cruzaron machos de cada una de las seis líneas BDGP y de la línea IsoB con hembras vírgenes de cada una de las líneas de sustitución cromosómica. Cada uno de dichos cruzamientos se armó en una caja independiente aunque todos ellos se realizaron simultáneamente, en un mismo bloque, aplicando el diseño experimental detallado en el Anexo Metodológico I. De esta forma se obtuvieron las moscas adultas utilizadas para estimar los caracteres vinculados al tamaño corporal y la conformación del ala. Estos individuos fueron disecados y fotografiados de la manera detallada en el Capítulo 5.

### **Caracteres vinculados al tamaño corporal**

Los caracteres vinculados al tamaño corporal medidos en los descendientes de cada cruzamiento son los que se han estudiado en otros capítulos de la tesis: la distancia interocular (DO), el ancho de la cabeza (AC), el largo del tórax (LT) y el tamaño del ala (TA). La manera en

la que se fotografiaron los individuos y se realizaron las mediciones se detalla en el Anexo Metodológico II.

### **Conformación del ala**

La conformación del ala de las moscas adultas fue analizada en los descendientes de cada cruzamiento mediante la variable univariada *Distancia de Procrustes* (DP) de forma tal de llevar a cabo un análisis similar al realizado con los caracteres vinculados al tamaño corporal. Como fue mencionado en reiteradas oportunidades, esta variable se obtuvo mediante la implementación de una técnica de *Morfometría geométrica* (para más detalles, ver el Anexo Metodológico II).

### **Análisis Estadísticos**

Los datos correspondientes a los descendientes de los cruzamientos entre cada línea BDGP y las líneas de sustitución cromosómica fueron analizados por separado. En cada uno de estos análisis, se incorporaron los datos correspondientes a los descendientes de los cruzamientos entre la línea control y las líneas derivadas de la naturaleza.

De esta manera, se realizó un análisis distinto por cada línea BDGP para cada variable (DO, AC, LT, TA y DP) empleando el siguiente modelo de ANOVA:

$$Y = \mu + C + L + S + C \times L + C \times S + L \times S + C \times L \times S + \epsilon$$

donde  $\mu$  es la media del carácter analizado, C es el factor fijo cruzamiento con 2 niveles, la línea BDGP e IsoB cruzadas con cada línea isogénica; L es el factor fijo línea con 6 niveles, las 6 líneas de sustitución cromosómica cruzadas con las líneas BDGP e IsoB; S es el factor fijo sexo con dos niveles, machos y hembras; y  $\epsilon$  es el error.

Los términos de interés son C x L, que denota la ausencia de complementación de alguna línea isogénica; y C x L x S, que indica un efecto sexo-específico de tal ausencia. Dichos efectos se obtienen si las líneas derivadas de la naturaleza son portadoras de distintos alelos del gen; el cual puede ser el responsable directo de las diferencias fenotípicas observadas o puede interactuar epistáticamente con otro que causa tales diferencias. En aquellos casos en los que alguna de las interacciones mencionadas fue significativa, se identificó un QTG; es decir, un gen que presenta variabilidad genética para el carácter analizado en la naturaleza. En estos casos se determinó qué líneas son las responsables de dicho efecto mediante comparaciones *a posteriori* (contrastes HSD para tamaños muestrales diferentes). Se consideró que dos líneas son portadoras de alelos distintos del gen analizado si el resultado de la comparación entre ellas mostró diferencias entre cruzamientos. Por ejemplo, la comparación de los descendientes de Chilecito 29 x BG00846 con los de Lavalley 12 x BG00846 debe dar resultados diferentes a los de la comparación entre los descendientes de Chilecito 29 x IsoB y los de Lavalley 12 x IsoB para

considerar que las líneas derivadas de la naturaleza mencionadas son portadoras de distintos alelos de del gen en cuestión (en este caso, *inv*).

Si se considera que la presencia de la mutación (en el cromosoma 2 de la línea BDGP analizada) puede representar un ambiente diferente que su ausencia (en el cromosoma 2 de IsoB) para el alelo natural analizado en cada caso (en el cromosoma 2 de la línea isogénica estudiada); se puede considerar que el valor medio del carácter analizado en los descendientes del cruzamiento entre una línea BDGP y una línea isogénica y aquel correspondiente a los descendientes del cruzamiento entre IsoB y la misma línea isogénica componen una *norma de reacción* (Capítulo 4). En ese caso, si las normas de reacción de dos líneas de derivadas de la naturaleza son diferentes, se puede decir que tales líneas presentan distintos alelos del gen en cuestión. Entonces, siguiendo con el ejemplo anterior, si la recta determinada por las medias de los descendientes de Chilecito 29 x BG00846 y de Chilecito 29 x IsoB difiere de la correspondiente a los valores medios de los descendientes de Lavalley 12 x BG00846 y de Lavalley 12 x IsoB; se puede decir que las normas de reacción de las líneas derivadas de la naturaleza mencionadas son diferentes por lo que dichas líneas presentan distintos alelos de *inv*.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el paquete STATISTICA (StatSoft Inc., 2004).

## Resultados

### Caracteres vinculados al tamaño corporal

Los principales resultados de los ANOVAs correspondientes a las distintas líneas mutantes, realizados con los valores de cada carácter vinculado al tamaño corporal por separado, se muestran en la Tabla 7.1. Con respecto a las fuentes de variación de interés, los análisis revelaron que la interacción triple (C x L x S) nunca fue significativa y que la interacción doble (C x L) fue significativa en la mayoría de los casos (Tabla 7.1). En general, estos resultados implican que, en los casos en los que hubo ausencia de complementación, el efecto fue similar en ambos sexos.

La observación detenida de los resultados correspondientes a cada gen permitió notar algunas particularidades en los mismos. Por un lado, los análisis correspondientes a *jing* (BG02314) fueron los que presentaron una menor cantidad de resultados significativos. En este caso, la interacción doble resultó significativa sólo para AC y TA (Tabla 7.1). Por otro lado, los resultados correspondientes a *inv* (BG00846), *toc* (BG02065) y *CG14478* (BG02690) mostraron que la interacción mencionada resultó significativa para todos los caracteres excepto DO (Tabla 7.1). Finalmente, los análisis correspondientes a *Fas3* (BG02023) y *Rtnl1* (BG02081) revelaron que la interacción de interés resultó significativa para todos los caracteres (Tabla 7.1).

**Tabla 7.1:** Principales resultados de las pruebas de complementación para distintos caracteres vinculados al tamaño corporal utilizando seis líneas de sustitución cromosómica y seis líneas BDGP en las que el gen mutado se localiza en dicho cromosoma (*inv*, *Fas3*, *toc*, *Rtnl1*, *jing* y *CG14478*) además de la línea control (IsoB). Se realizó un ANOVA con los valores de cada carácter medido en los descendientes de los cruzamientos entre cada línea mutante y las líneas de sustitución cromosómica, por un lado, y entre dichas líneas e IsoB, por el otro. El modelo empleado incluye a los factores línea isogénica, cruzamiento (Línea BDGP e IsoB) y sexo como fijos. Se muestra el valor de *F* y su significancia para cada fuente de variación.

Fuente de variación	<i>Inv</i>				<i>Fas3</i>				<i>toc</i>			
	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA
Línea (L)	14,36***	13,17***	4,42***	11,53***	4,57***	7,39***	3,06*	14,51***	11,51***	9,24***	7,61***	10,05***
Cruzamiento (C)	19,90***	17,39***	18,16***	9,37**	2,45	0,82	10,84**	0,00	0,17	2,66	0,03	0,08
Sexo (S)	254,36***	477,02***	861,30***	1351,07***	144,19***	326,32***	568,38***	1258,38***	156,34***	405,48***	646,39***	1145,65***
L x C	1,42	9,32***	9,01***	5,95***	5,40***	5,84***	5,49***	3,46**	1,73	4,07**	3,66**	2,71*
L x S	0,91	0,54	1,90	1,44	1,20	1,77	1,44	1,66	1,22	2,91*	1,37	1,01
C x S	10,42**	0,82	2,74	0,05	0,69	4,46*	1,14	1,88	0,11	0,03	0,00	1,61
L x C x S	0,79	0,76	0,78	0,61	0,88	1,12	2,07	0,74	1,40	1,31	0,92	1,26

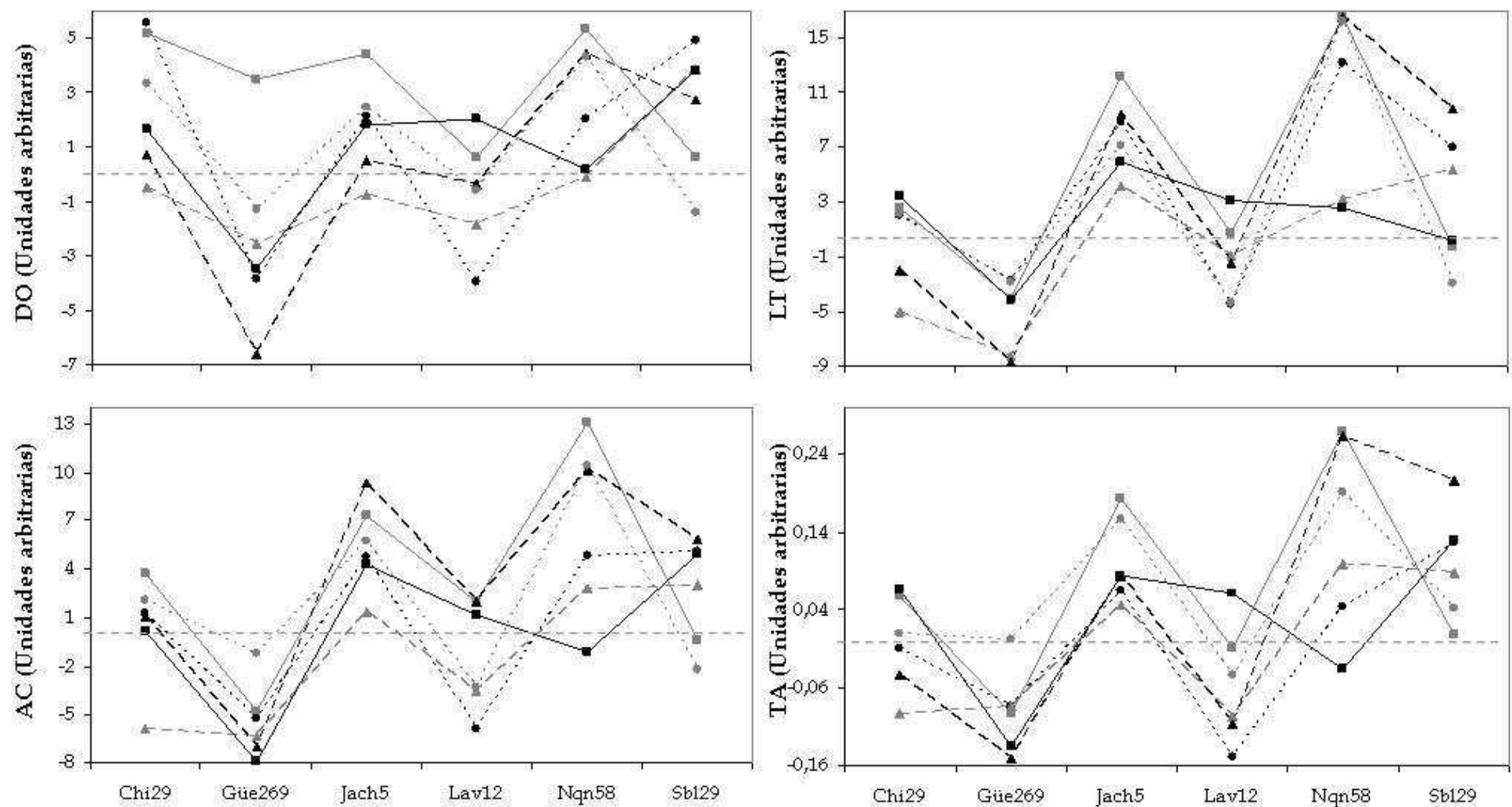
Fuente de variación	<i>Rtnl1</i>				<i>Jing</i>				<i>CG14478</i>			
	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA
Línea (L)	9,05***	7,09***	2,06	4,08**	13,92***	15,28***	11,03***	18,07***	9,73***	11,66***	4,80***	12,95***
Cruzamiento (C)	0,10	19,13***	11,97***	3,56*	1,80	0,08	2,76	1,70	2,11	4,33*	4,66*	6,34*
Sexo (S)	166,58***	522,86***	775,09***	1392,24***	196,34***	532,89***	726,40***	1407,58***	159,45***	351,04***	643,52***	1160,01***
L x C	4,24***	10,48***	11,42***	9,83***	1,96	5,87***	1,69	3,39**	1,76	5,77***	7,87***	2,84*
L x S	1,20	1,25	0,79	0,44	0,28	1,72	0,49	1,39	0,92	1,83	0,65	2,27*
C x S	0,41	1,52	2,50	0,18	2,34	1,53	0,01	0,00	0,55	0,08	0,00	0,71
L x C x S	1,32	0,94	1,56	1,99	0,26	1,56	1,96	1,59	0,77	1,14	2,61	0,78

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

Por lo tanto, existe ausencia de complementación de alguna línea isogénica para todos los caracteres excepto DO en *jing*, *inv*, *toc* y *CG14478* y LT en *jing*.

La interacción significativa entre la línea y el cruzamiento se debe a que las normas de reacción correspondientes a dos o más líneas derivadas de la naturaleza presentan distinta pendiente. Dicho de otro modo, la interacción mencionada es significativa si la diferencia de los valores que conforman cada norma de reacción difiere entre dos o más líneas. De esta manera, se graficó la diferencia entre el valor medio del carácter medido en los descendientes del cruzamiento entre una línea isogénica e IsoB y los descendientes del cruzamiento entre la misma línea isogénica y una línea mutante (Figura 7.1). Este gráfico, que se hizo para cada carácter vinculado al tamaño corporal considerando el promedio de los valores de ambos sexos (debido a que la interacción C x L x S fue no significativa en todos los casos), muestra que la diferencia entre los valores mencionados no mantiene un valor constante (es decir, un mismo valor independientemente de la línea isogénica) en ningún caso (Figura 7.1), lo cual indicaría la ausencia de una interacción significativa entre la línea y el cruzamiento. Asimismo, estos gráficos muestran que existen tanto valores positivos (la media correspondiente a IsoB es mayor que la asociada a la línea mutante) como negativos (la media correspondiente a IsoB es menor que la asociada a la línea mutante) en todos los casos (Figura 7.1), lo cual indicaría diferencias en la disposición relativa de las normas de reacción.

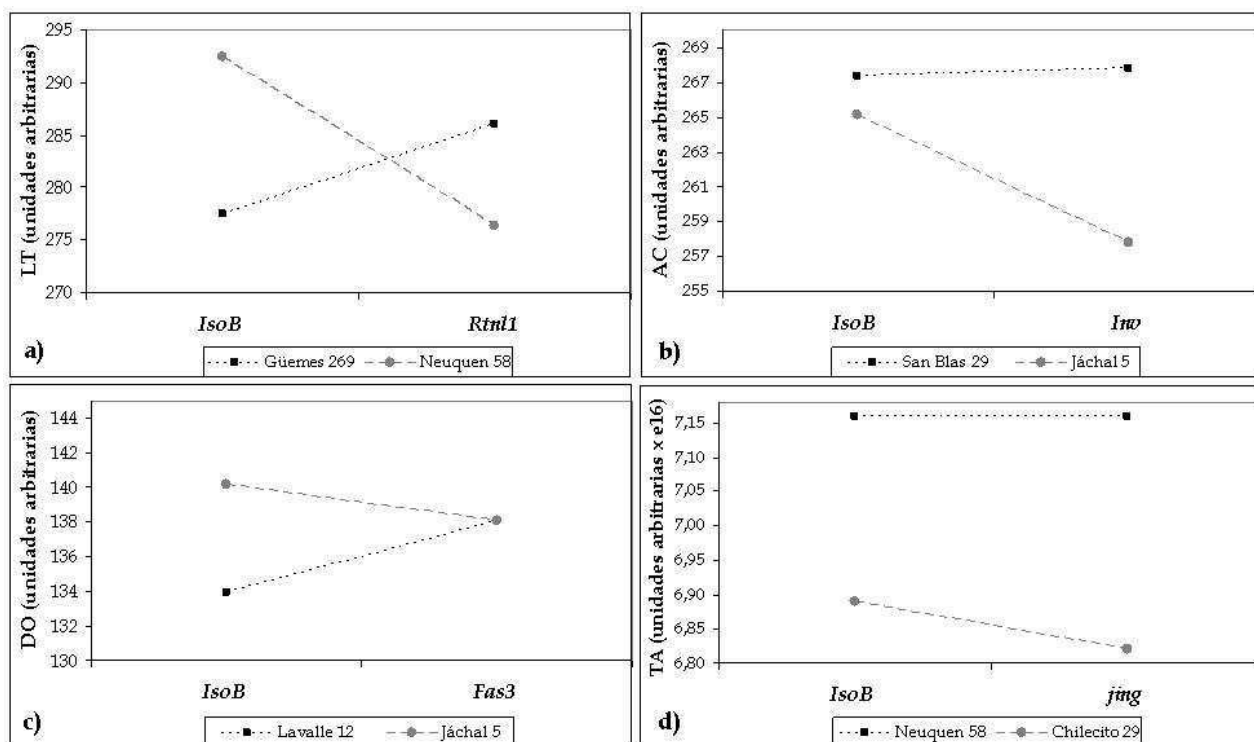




**Figura 7.1:** Diferencia entre el valor medio de un carácter medido en los descendientes del cruzamiento entre una línea isogénica y la línea control y en los descendientes del cruzamiento entre la misma línea isogénica y una línea mutante considerando el promedio de ambos sexos. DO: distancia interocular, AC: ancho de la cabeza, LT: largo del tórax, TA: tamaño del ala. Genes mutados en las líneas BDGP: *inv* (■), *Fas3* (●), *toc* (▲), *Rtnl1* (▲), *jing* (◆) y *CG14478* (⬡). Líneas isogénicas: Chilecito 29 (Chi29), Güemes 269 (Gue269), Jáchal 5 (Jach5), La valle 12 (Lav12), Neuquen 58 (Nqn58) y San Blas 29 (Sbl29). La línea punteada gris señala el cero.

Para saber cuales son las normas de reacción que difieren significativamente entre si y cual es su disposición relativa, se realizaron comparaciones de a pares (contrastes de interacción en los que el error de tipo I se mantiene controlado). En general, estos contrastes mostraron que todas las normas de reacción difirieron de alguna otra prácticamente en todos los casos en los que hubo ausencia de complementación. Asimismo, estos análisis permitieron notar la existencia de cuatro patrones distintos con respecto a la disposición de las normas de reacción de las dos líneas comparadas. Estos patrones son:

- a) Cambio de rango: la media del carácter medido en los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 1 e IsoB **difiere** de la media correspondiente a los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 2 e IsoB; la media del carácter medido en los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 1 y la línea BDGP **difiere** de la media correspondiente a los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 2 y la línea BDGP; y las normas de reacción **se cruzan** entre si (Figura 7.2a).
- b) Cambio de escala tipo 1: la media del carácter medido en los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 1 e IsoB **no difiere** de la media correspondiente a los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 2 e IsoB; la media del carácter medido en los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 1 y la línea BDGP **difiere** de la media correspondiente a los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 2 y la línea BDGP (Figura 7.2b).
- c) Cambio de escala tipo 2: la media del carácter medido en los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 1 e IsoB **difiere** de la media correspondiente a los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 2 e IsoB; la media del carácter medido en los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 1 y la línea BDGP **no difiere** de la media correspondiente a los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 2 y la línea BDGP (Figura 7.2c).
- d) Cambio de escala tipo 3: la media del carácter medido en los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 1 e IsoB **difiere** de la media correspondiente a los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 2 e IsoB; la media del carácter medido en los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 1 y la línea BDGP **difiere** de la media correspondiente a los descendientes del cruzamiento entre la línea isogénica 2 y la línea BDGP; y las normas de reacción **no se cruzan** entre si (Figura 7.2d).



**Tabla 7.2:** Ejemplos de los patrones observados en relación a la disposición de las normas de reacción de las dos líneas comparadas. a) Cambio de rango, b) Cambio de escala tipo 1, c) Cambio de escala tipo 2, y d) Cambio de escala tipo 3 (ver el texto para más detalles).

En general, se encontró una cantidad mucho mayor de casos en los que la interacción entre la línea y el cruzamiento se pudo explicar por un cambio de escala que por un cambio de rango (124 y 2 respectivamente; Tabla 7.2). Asimismo, considerando los casos en los que la interacción se debió a un cambio de escala, el de tipo 2 (Figura 7.2c) explicó un número mucho mayor de casos (103) que el de tipo 1 (Figura 7.2b) el cual, a su vez, explicó el doble de casos que el de tipo 3 (Figura 7.2c; 14 y 7 respectivamente; Tabla 7.2). En particular, la interacción entre la línea y el cruzamiento (significativa para todos los caracteres menos DO) en *toc* y *CG14478* sólo pudo ser explicada por un cambio de escala tipo 2 (Tabla 7.2). En cambio, los casos en los que dicha interacción resultó significativa relacionados con los otros cuatro genes mostraron entre uno y tres de los cuatro patrones mencionados dependiendo del carácter analizado (Tabla 7.2).

Finalmente, los contrastes revelaron que los descendientes de algunas líneas derivadas de la naturaleza presentaron una mayor cantidad de diferencias significativas que los derivados de las demás. Este es el caso de Neuquen 58, seguida por Güemes 269, Lavalle 12 y San Blas 29 (resultados no mostrados).

**Tabla 7.2:** Principales resultados de los contrastes *a posteriori* realizados en los casos en los que la interacción C x L del ANOVA principal fue significativa (ver Tabla 7.1). Se muestra la cantidad de comparaciones significativas con respecto a cada patrón, el cual está relacionado con la disposición de las normas de reacción de las dos líneas comparadas (ver el texto para más detalles).

Tipo de Interacción	<i>inv</i>				<i>Fas3</i>				<i>toc</i>			
	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA
Cambio de rango	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0
Cambio de escala tipo 1	-	3	3	2	3	0	0	1	-	0	0	0
Cambio de escala tipo 2	-	5	6	5	6	7	4	4	-	7	5	5
Cambio de escala tipo 3	-	2	0	0	0	0	0	1	-	0	0	0

Tipo de Interacción	<i>Rtnl1</i>				<i>jing</i>				<i>CG14478</i>			
	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA	DO	AC	LT	TA
Cambio de rango	0	1	1	0	-	0	-	0	-	0	0	0
Cambio de escala tipo 1	0	0	1	0	-	1	-	0	-	0	0	0
Cambio de escala tipo 2	7	6	4	5	-	7	-	3	-	7	5	5
Cambio de escala tipo 3	0	0	0	0	-	1	-	3	-	0	0	0

DO: distancia interocular, AC: ancho de cabeza, LT: largo de tórax, TA: tamaño de ala. “-“: interacción C x L no significativa.

### Conformación del ala

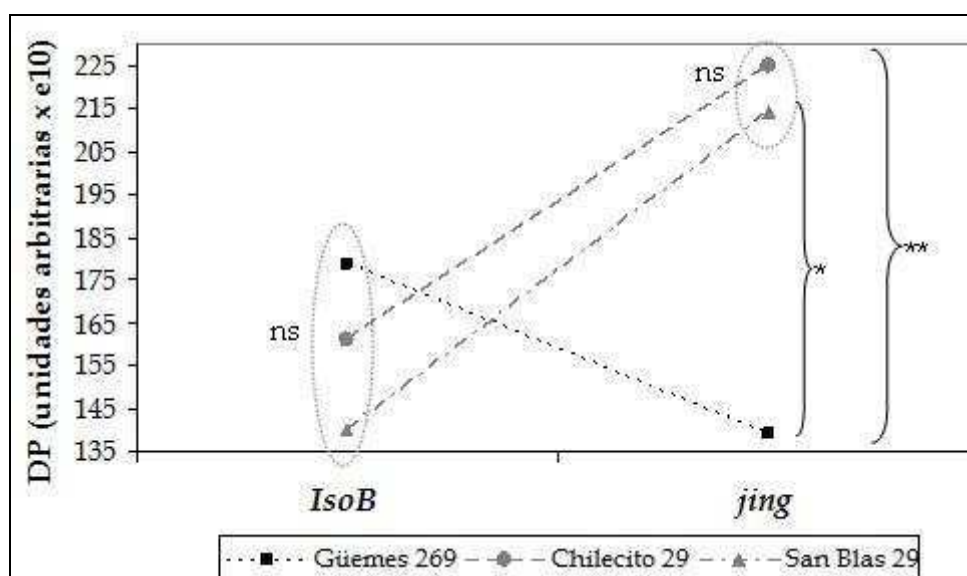
Los principales resultados de los ANOVAs correspondientes a las distintas líneas mutantes, realizados con los valores de DP, se muestran en la Tabla 7.3. Estos análisis revelaron que las dos fuentes de variación de interés (C x L y C x L x S) resultaron significativas para *jing* (BG02314) y *CG14478* (BG02690) mientras que sólo la interacción triple resultó significativa para *Rtnl1* (BG02081; Tabla 7.3). Por lo tanto, existe ausencia de complementación de alguna línea isogénica para la conformación del ala (estimada a través de DP) en los genes *jing*, *CG14478* y *Rtnl1*. Sin embargo, el efecto fenotípico depende del sexo en los tres casos, por lo que se estudió la interacción C x L en cada sexo por separado a través de los contrastes.

**Tabla 7.3:** Principales resultados de las pruebas de complementación para la conformación del ala (DP) utilizando seis líneas de sustitución cromosómica y seis líneas BDGP en las que el gen mutado se localiza en dicho cromosoma (*inv*, *Fas3*, *toc*, *Rtnl1*, *jing* y *CG14478*) además de la línea control (IsoB). Se realizó un ANOVA con los valores de DP estimados en los descendientes de los cruzamientos entre cada línea mutante y las líneas de sustitución cromosómica, por un lado, y entre dichas líneas e IsoB, por el otro. El modelo empleado incluye a los factores línea isogénica, cruzamiento (Línea BDGP e IsoB) y sexo como fijos. Se muestra el valor de *F* y su significancia para cada fuente de variación.

Fuente de variación	<i>inv</i>	<i>Fas3</i>	<i>toc</i>	<i>Rtnl1</i>	<i>jing</i>	<i>CG14478</i>
Línea	4,98***	2,46*	1,16	3,27**	1,59	1,40
Cruzamiento	0,75	0,33	9,00**	1,02	1,80	0,01
Sexo	0,41	0,18	6,92**	2,79	2,37	0,01
Línea x Cruzamiento	2,18	2,08	1,30	0,87	4,04**	2,66*
Línea x Sexo	2,18	0,81	0,57	0,79	0,50	1,54
Cruzamiento x Sexo	0,81	0,22	4,9*	2,95	2,78	0,01
Línea x Cruzamientos x Sexo	1,36	2,33	1,46	2,79*	3,34**	2,73*

\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

La interacción significativa entre la línea, el cruzamiento y el sexo se debe a que las normas de reacción correspondientes a dos o más líneas derivadas de la naturaleza presentan distinta pendiente y, a su vez, difieren entre los sexos. Para saber cuales son las normas de reacción que difieren significativamente entre si y cual es su disposición relativa, se realizaron comparaciones de a pares en cada sexo por separado (igual que antes, contrastes de interacción en los que el error de tipo I se mantiene controlado). Por un lado, los análisis correspondientes a *Rtnl1* (BG02081) y a *CG14478* (BG02690), no revelaron diferencias significativas entre las normas de reacción en ningún sexo. Esto probablemente se debe al gran número de comparaciones realizadas ya que, como se puede inferir a partir del valor del estadístico asociado a la interacción triple en cada caso (Tabla 7.3), el error es relativamente grande. Por otro lado, el análisis correspondiente a *jing* (BG02314) reveló que las normas de reacción de las líneas mostraron diferencias significativas únicamente en los machos. Particularmente, la norma de reacción asociada a Güemes 269 difirió significativamente de las vinculadas a Chilecito 29 y a San Blas 29 y, en ambos casos, la disposición de las normas de reacción fue consistente con un cambio de escala tipo 1 (Figura 7.3). Por lo tanto, se puede decir que sólo existe ausencia de complementación de las líneas derivadas de la naturaleza mencionadas para la conformación del ala de los machos en *jing*.



**Tabla 7.3:** Normas de reacción asociadas a los descendientes de los cruzamientos que difirieron entre sí para la conformación del ala (DP). La disposición corresponde a un cambio de escala tipo 1 (ver el texto para más detalles). ns: no significativo, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## Discusión

### QTGs asociados a los caracteres vinculados al tamaño corporal

Las pruebas de complementación genética realizadas para cada uno de los caracteres vinculados al tamaño corporal por separado revelaron la existencia de QTGs en la mayoría de los casos. Por un lado, los análisis correspondientes a *jing* fueron los que presentaron una menor cantidad de resultados significativos. En este caso, la interacción entre la línea y el cruzamiento, que es la que indica la ausencia de complementación genética; resultó significativa sólo para AC y TA. Por otro lado, los resultados correspondientes a *inv*, *toc* y *CG14478* mostraron que la interacción mencionada resultó significativa para todos los caracteres excepto DO. Finalmente, los análisis correspondientes a *Fas3* y *Rtn1* revelaron que la interacción de interés resultó significativa para todos los caracteres. Además, en todos los casos, el efecto fenotípico de la ausencia de complementación fue igual en ambos sexos.

En primera instancia, estos resultados indican que distintos caracteres vinculados al tamaño corporal muestran distintos niveles de variación natural. Particularmente, sólo dos de los genes analizados (*Fas3* y *Rtn1*) presentaron variabilidad natural para DO mientras que todos los genes estudiados mostraron variabilidad natural para AC y TA. Dado que previamente se determinó que todos los genes menos *Rtn1* son candidatos a integrar la arquitectura genética de DO (Capítulo 2) y que todos los genes analizados presentaron

variabilidad natural para algunos de los caracteres estudiados; los resultados sugieren que la expresión de DO está más canalizada (Capítulo 4) que la del resto.

Asimismo, estos análisis revelaron que los genes analizados presentan importantes niveles de variabilidad natural para los caracteres vinculados al tamaño corporal que aparentemente son mayores que los registrados previamente para otros caracteres como el número de quetas abdominales y esternopleurales (Long *et al.*, 1996; Lyman & Mackay, 1998), la longevidad (De Luca *et al.*, 2003) el comportamiento olfativo (Fanara *et al.*, 2002) y resistencia a la inanición (Harbison *et al.*, 2004). Por un lado, esto podría deberse a que la arquitectura genética del tamaño corporal es más compleja que la de los otros caracteres estudiados, la cual podría estar conformada por una mayor cantidad de genes que pueden presentar distintas variantes naturales. Por otro lado, la expresión del tamaño corporal podría estar menos canalizada que la de los otros caracteres. Finalmente, las diferencias podrían deberse a que en las pruebas de complementación realizadas en los estudios previos se empleó una cantidad menor de líneas derivadas de la naturaleza.

Como se mencionó anteriormente, la interacción significativa entre la línea y el cruzamiento que revela la ausencia de complementación, se debe a que las normas de reacción correspondientes a dos o más líneas de sustitución cromosómica son diferentes. Los contrastes realizados en aquellos casos en los que la interacción mencionada resultó significativa mostraron que todas las normas de reacción difirieron de alguna otra prácticamente en todos los casos. Sin embargo, se encontraron cuatro patrones básicos en relación a la disposición de las normas de reacción de las dos líneas comparadas en cada caso. Por un lado, en pocos casos las normas de reacción generaron un cambio de rango. Por otro lado, la mayoría de las normas de reacción presentó alguna variante del cambio de escala.

De acuerdo con el diseño experimental empleado, el cambio de escala puede generarse debido a que la diferencia de las medias de un carácter medido en los descendientes de los cruzamientos entre dos líneas de sustitución cromosómica y una línea BDGP es mayor que aquella correspondiente a las medias del carácter medido en los descendientes de los cruzamientos entre las mismas líneas derivadas de la naturaleza e IsoB o *vice versa*. En principio, sólo en el caso en el que existen diferencias significativas entre las medias de un carácter medido en los descendientes de los cruzamientos entre dos líneas de sustitución cromosómica y una línea BDGP y no existen tales diferencias entre las medias del carácter medido en los descendientes de los cruzamientos entre las mismas líneas derivadas de la naturaleza e IsoB (*cambio de escala tipo 1*), se puede decir que: a) el alelo del gen presente en IsoB es totalmente dominante con respecto a los alelos naturales y b) la inserción del elemento *P* en el gen anuló su función (transformó a la línea en mutante nula) o lo transformó en un alelo recesivo con

respecto a las variantes naturales. Los demás casos se pueden explicar considerando múltiples relaciones de dominancia entre el alelo de IsoB y los alelos naturales, por un lado, y entre el alelo generado por la mutación y los alelos naturales, por el otro. Dado que unos pocos casos presentaron un *cambio de escala tipo 1*, los resultados sugieren que no existe una relación de dominancia única entre el alelo de IsoB (salvaje o mutante) y los distintos alelos naturales asociados a cada gen.

Asimismo, siguiendo con el razonamiento anterior, sólo cuando la disposición de las normas de reacción comparadas es consistente con el patrón denominado *cambio de escala tipo 1* existe una mayor probabilidad de que el gen para el que se encontraron distintas variantes naturales intervenga directamente en la expresión del carácter estudiado (es decir, de que sea un gen *efector*). En cambio, cuando la disposición de las normas de reacción comparadas es consistente con cualquier otro patrón (*cambio de rango*, *cambio de escala tipo 2*, *cambio de escala tipo 3*) aumenta la probabilidad de que el gen analizado sea un gen *regulador* (es decir, interactúe con otro gen que es el que interviene en forma directa en la expresión del carácter analizado). Tomando en cuenta este criterio, sólo en los casos en los que se observó un *cambio de escala tipo 1* (AC, LT, TA en *inv*; DO y TA en *Fas3*; LT en *Rtnl1* y AC en *jing*) se habrían encontrado variantes naturales de genes implicados directamente en la expresión de los caracteres analizados. Sin embargo, para todos los casos en los que se registró ausencia de complementación (los cuales incluyen a los mencionados anteriormente) se encontraron variantes naturales que sugieren que los genes estudiados interactúan con otro/s que interviene/n directamente en la expresión de los distintos caracteres estudiados. Por lo tanto, se puede decir que todos los genes analizados presentan variabilidad genética (son QTGs), independientemente de que la contribución a la variabilidad natural de los caracteres analizados sea en forma directa o indirecta. Finalmente, el hecho de que los resultados que reflejan un *cambio de escala tipo 1* se puedan interpretar más fácilmente ha llevado a algunos autores a considerar sólo a los genes que muestran dicho patrón como QTGs (Mackay, 2001; Pasyukova *et al.*, 2000). Si bien este criterio podría implementarse para restringir la cantidad de genes que se continuará investigando; se debe considerar que el resto también son QTGs, a pesar de que su rol en la arquitectura genética de los caracteres analizados sea más difícil de establecer.

### **QTGs asociados a la conformación del ala**

Las pruebas de complementación genética realizadas para la conformación del ala estimada a través de DP, revelaron la existencia de QTGs sólo en algunos casos. Los resultados mostraron que las fuentes de variación de interés (las dos interacciones con los factores línea y cruzamiento) resultaron significativas para *jing* y *CG14478* mientras que sólo la interacción



triple resultó significativa para *Rtnl1*. Sin embargo, los contrastes revelaron resultados significativos únicamente en el caso de *jing*, probablemente debido a una baja potencia estadística. El análisis correspondiente a dicho gen mostró que las normas de reacción de las líneas mostraron diferencias significativas únicamente en los machos y presentaron un patrón consistente con un *cambio de escala tipo 1*. De esta manera, los resultados sugieren que el alelo de *jing* presente en IsoB es totalmente dominante con respecto a los alelos naturales y que la inserción del elemento *P* en dicho gen habría anulado su función o lo habría transformado en un alelo recesivo con respecto a las variantes naturales. Asimismo, según lo discutido previamente, las variantes naturales encontradas sugieren que *jing* está implicado directamente en la expresión de la conformación del ala.

La escasa variación encontrada para la conformación del ala en comparación con la asociada a los caracteres vinculados al tamaño corporal podría deberse a que la variable empleada en los análisis conlleva un mayor nivel de error. Esto llevó a realizar los análisis utilizando la aproximación multivariada utilizada a lo largo de la tesis (análisis de DR), la cual no fue incorporada inicialmente en esta parte debido a que no permite analizar a los sexos en forma conjunta y a que sus resultados son más difíciles de interpretar. Los análisis de los datos de las hembras revelaron que la interacción de interés fue significativa para *toc* y *CG14478* mientras que dicha interacción fue significativa para *Fas3* y *Rtnl1* en los machos (resultados no mostrados). Si bien el análisis multivariado reveló la existencia de una mayor cantidad de casos significativos que el univariado (lo cual es consistente con la mayor potencia estadística asociada al estimador multivariado), ambos mostraron que el efecto fenotípico de la ausencia de complementación presenta una fuerte dependencia del sexo. Las discrepancias entre los resultados de ambos análisis ponen en evidencia, una vez más, las diferencias existentes entre ambos tipos de variables en relación con la estimación de la conformación del ala.

Dado que previamente se determinó que todos los genes menos *Rtnl1* son candidatos a integrar la arquitectura genética de la conformación del ala (Capítulo 3) y que todos los genes analizados presentaron variabilidad natural para algunos de los estimadores del tamaño corporal estudiados; los resultados sugieren que la expresión de la conformación del ala (como la de DO) está más canalizada que la de los demás caracteres. Asimismo, estos resultados (obtenidos a partir del análisis de las mismas moscas empleadas en los análisis del tamaño) indican que la gran variación genética natural encontrada para el tamaño corporal en comparación con la observada previamente para otros caracteres (De Luca *et al.*, 2003; Harbison *et al.*, 2004; Long *et al.*, 1996; Lyman & Mackay, 1998) probablemente no se debe a haber utilizado más líneas derivadas de la naturaleza en las pruebas de complementación. Finalmente, el mayor nivel de variabilidad genética observado para el tamaño corporal con

respecto a los demás caracteres estudiados difícilmente podría deberse a que la arquitectura genética de dicho carácter está conformada por una mayor cantidad de genes que pueden presentar distintas variantes naturales, debido a que la misma parece ser menos extensa que la correspondiente a la conformación del ala (Capítulo 3).

### **Genes para los que se encontraron variantes naturales asociadas a distintos caracteres morfológicos**

Los resultados de los diferentes análisis mostraron la existencia de distintas variantes naturales de *inv* que afectan a distintos caracteres vinculados al tamaño corporal pero no a la conformación del ala. Los resultados obtenidos previamente sugieren que *inv* es un gen altamente pleiotrópico en relación a los distintos caracteres analizados (Capítulos 2 y 3). La mutación de este gen redujo en gran medida casi todos los caracteres vinculados al tamaño corporal en ambos sexos (Capítulo 2) pero afectó a la conformación del ala de manera menos extrema en ambos sexos (Capítulo 3). Estos resultados hacían pensar que en este capítulo se iban a obtener resultados opuestos a los observados. Es decir, se esperaba encontrar una menor cantidad de variabilidad genética asociada a los caracteres vinculados al tamaño corporal y mayor variación en relación a la conformación del ala. Tal y como se mencionó previamente (Capítulo 2), Flybase (Flybase, quinta publicación) presenta una cantidad considerable de información con respecto a este gen pero aparentemente no existen referencias relacionadas con los efectos del mismo en el tamaño de los órganos o del cuerpo. Por el contrario, existen muchas referencias que relacionan a *inv* con la conformación del ala. Básicamente, este gen parece estar implicado en la determinación de la identidad antero-posterior del ala (Guillén *et al.*, 1995; Simmonds *et al.*, 1995). Quizás las diferencias observadas estén relacionadas con las distintas funciones que pueda cumplir este gen a lo largo del desarrollo del organismo. En ese sentido, su expresión temprana en el desarrollo podría tener un efecto general en el desarrollo del cuerpo, consistente con la disminución generalizada del tamaño corporal causada por su mutación. Asimismo, su expresión más tardía podría ser más localizada y redundante en relación a la acción de otros genes, lo cual coincidiría con el efecto menor que tuvo la misma mutación en la conformación del ala. De esta manera, distintas variantes del gen podrían mostrar efectos diferentes en el tamaño del cuerpo y similares en la conformación del ala.

Con respecto a *Fas3*, los diferentes análisis revelaron la existencia de distintas variantes naturales que afectan a todos los caracteres vinculados al tamaño corporal en ambos sexos (y a la conformación del ala considerando el análisis multivariado aunque sólo en los machos). Los resultados obtenidos previamente no mostraron que este gen presente un alto grado de pleiotropía en relación a los distintos caracteres analizados ya que su mutación afectó

significativamente a la forma (tamaño y conformación) del ala de las hembras (Capítulos 2 y 3). Entonces, a partir de los resultados previos, se podría pensar que este gen interviene de alguna manera en el desarrollo del ala de las hembras exclusivamente y no cumple un rol importante en el control del tamaño corporal; aunque esto no parece ser consistente con los resultados observados en este capítulo. Sin embargo, se podría considerar que la mutación de *Fas3* podría no haber anulado la función del gen en relación a los caracteres analizados sino haberlo transformado en un alelo que posee un efecto fenotípico diferente al de los alelos naturales con los que mantiene una relación de dominancia que no es unívoca. Si bien Flybase (Flybase, quinta publicación) presenta una importante cantidad de información con respecto a este gen, aparentemente no existen referencias en relación con efectos en el tamaño de los órganos o del cuerpo o en la conformación del ala.

Los resultados relacionados con *toc* mostraron la existencia de distintas variantes naturales que afectan a distintos caracteres vinculados al tamaño corporal en ambos sexos (y a la conformación del ala considerando el análisis multivariado aunque sólo en las hembras). Los resultados obtenidos previamente sugieren que *toc* es un gen con un alto nivel de pleiotropía en relación a los distintos caracteres analizados (Capítulos 2 y 3). Por un lado, la mutación de este gen afectó a varios caracteres vinculados al tamaño corporal, causando generalmente un efecto opuesto entre sexos (Capítulo 2). Por otro lado, dicha mutación afectó levemente a la conformación del ala en ambos sexos (Capítulo 3). Entonces, los resultados previos sugieren que este gen interviene de alguna manera tanto en el control del tamaño del cuerpo como en el desarrollo del ala de ambos sexos. Por lo tanto, los resultados observados, podrían implicar algo similar a lo mencionado en el caso anterior. Es decir, se podría considerar que la mutación de *toc* podría haber transformado al gen en un alelo que posee un efecto fenotípico diferente al de los alelos naturales. Sin embargo, dado que los resultados relacionados con este gen siempre mostraron un patrón consistente con un *Cambio de escala tipo 2*, dicho alelo podría ser dominante con respecto a los naturales. Nuevamente se puede decir que Flybase (Flybase, quinta publicación) presenta abundante información en relación a este gen pero la misma no incluye referencias en relacionadas con efectos del mismo en el tamaño de los órganos o del cuerpo o en la conformación del ala.

En relación a *Rtnl1*, los resultados mostraron la existencia de distintas variantes naturales que afectan a todos caracteres vinculados al tamaño corporal en ambos sexos (y a la conformación del ala considerando el análisis multivariado aunque sólo en los machos). Los resultados obtenidos previamente no mostraron que este sea un gen muy pleiotrópico en relación a los distintos caracteres analizados, ya que su mutación sólo aumentó el tamaño de LT y TA en los machos (Capítulos 2 y 3). De esta manera, dichos resultados permitirían decir que

este gen interviene de alguna manera en el control del tamaño de las partes del cuerpo derivadas del disco imaginal del ala en los machos únicamente. Si bien esto no parece ser totalmente consistente con los resultados observados, otra vez se podría considerar que la mutación de *Rtnl1* podría haberlo transformado en un alelo que posee un efecto fenotípico diferente al de los alelos naturales con los que mantiene una relación de dominancia que no es unívoca. En este caso, la única referencia que parece haber en Flybase (Flybase, quinta publicación) en relación con los caracteres analizados, es la de un fenotipo particular relacionado con el compartimiento posterior del ala.

Los resultados vinculados a *jing* mostraron la existencia de distintas variantes naturales de que afectan a AC y TA en ambos sexos (y a la conformación del ala considerando el análisis univariado aunque sólo en los machos). Los resultados obtenidos previamente sugieren que *jing* es un gen con un alto grado de pleiotropía en relación a los distintos caracteres analizados (Capítulos 2 y 3). Por un lado, la mutación de este gen afectó a todos los caracteres vinculados al tamaño corporal menos TA, causando un efecto opuesto entre sexos (Capítulo 2). Por otro lado, dicha mutación modificó mucho la conformación del ala en las hembras (Capítulo 3). Por lo tanto, según estos resultados, *jing* interviene de alguna manera tanto en el control del tamaño del cuerpo como en el desarrollo del ala de las hembras; lo cual no parece estar de acuerdo con los resultados observados en este capítulo. Sin embargo, nuevamente, se podría considerar que la mutación de *jing* podría haber transformado al gen en un alelo que posee un efecto fenotípico diferente al de los alelos naturales con los que mantiene una relación de dominancia que no es unívoca. Si bien Flybase (Flybase, quinta publicación) presenta mucha información con respecto a este gen, aparentemente no existen referencias en relación con los efectos del mismo en el tamaño de los órganos o del cuerpo. En cambio, tal y como fue mencionado en el Capítulo 3, existen muchas referencias que relacionan a *jing* con modificaciones del ala. Básicamente, *jing* codifica un factor de transcripción requerido para el desarrollo del álula y de las venas del ala (Culi *et al.*, 2006). En general, los resultados obtenidos parecen apoyar la idea de que distintos alelos del gen afectarían el tamaño del ala de manera diferente, y modificarían su conformación de manera sexo-dependiente.

Finalmente, los distintos análisis revelaron la existencia de diferentes variantes naturales de *CG14478* que afectan a distintos caracteres vinculados al tamaño corporal en ambos sexos (y a la conformación del ala considerando el análisis multivariado aunque sólo en las hembras). Los resultados obtenidos previamente sugieren que *CG14478* es un gen pleiotrópico en relación a los distintos caracteres analizados (Capítulos 2 y 3). La mutación de este gen afectó significativamente a la forma (tamaño y conformación) del ala de las hembras, a la conformación del ala en los machos y a un carácter relacionado con la cabeza en cada sexo

(Capítulos 2 y 3). De acuerdo con estos resultados, este gen interviene de alguna manera en el desarrollo del ala y parece desempeñar un papel menor en el control del tamaño de las demás estructuras corporales. Esto no parece ser consistente con los resultados observados en este capítulo pero, igual que en los casos anteriores, las discrepancias se resolverían si se considera a la mutación del gen como un alelo más, con efectos fenotípicos diferentes al de los alelos naturales. Sin embargo, similarmente a lo observado para *toc*, los resultados relacionados con este gen siempre mostraron un patrón consistente con un *Cambio de escala tipo 2*, por lo que dicho alelo podría ser dominante con respecto a los naturales. Según Flybase (Flybase, quinta publicación), no existe información con respecto a las funciones que desempeña este gen ni al lugar o el momento en el que este se expresa. Por lo tanto, estos resultados constituirían un primer registro acerca de los fenotipos vinculados con este gen.

En conclusión, los resultados presentados en este capítulo sugieren que los genes que constituyen la base genética de los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal analizados presentan altos niveles de variabilidad en poblaciones naturales los cuales estarían presentes en ambos sexos. En cambio, los análisis revelaron un menor nivel de variación genética natural para la conformación del ala la cual, a su vez, dependería fuertemente del sexo. En ese sentido, los resultados sugieren que la expresión de la conformación del ala está más canalizada que la de los demás caracteres. En general, las variantes naturales encontradas sugieren que los genes estudiados interactúan con otros que intervienen directamente en la expresión de los distintos caracteres estudiados. De todos modos, se puede decir que todos los genes analizados presentan variabilidad genética (son QTGs), independientemente de que la contribución a la variabilidad natural de los caracteres analizados sea en forma directa o indirecta. Otros estudios más específicos permitirán confirmar la participación de estos genes en el desarrollo de las distintas estructuras del adulto de *Drosophila* y conocer las bases moleculares de la variación entre los alelos involucrados en la expresión de los caracteres analizados en las poblaciones estudiadas.

---

## **Capítulo VIII**

Conclusiones generales de la tesis: la arquitectura genética de caracteres morfológicos en *D. melanogaster*.

---

### **Resumen**

La comprensión de la arquitectura genética de cualquier carácter cuantitativo requiere del conocimiento de todos los factores que contribuyen a su expresión por lo que este tipo de estudios sólo pueden llevarse a cabo utilizando organismos modelo como *Drosophila melanogaster*. De esta manera, esta tesis se llevó a cabo con el objetivo de contribuir a la caracterización de la arquitectura genética de caracteres vinculados al tamaño y la forma corporal en *D. melanogaster*. En general, los resultados sugieren que las relaciones alométricas entre los caracteres son mantenidas dentro de cierto rango de variación en la naturaleza por la acción de la selección natural, de lo que se deduce que algunas de las mutaciones analizadas generan modificaciones que exceden los límites de variación natural por lo que podrían representar alelos que serían eliminados en la naturaleza. Por un lado, los resultados derivados de las líneas mutantes sustentan la idea de que la arquitectura genética de los distintos caracteres analizados es diferente y depende en gran medida del sexo y de la temperatura de cría. Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de las líneas de sustitución cromosómica permitieron saber que existe abundante variación genética natural asociada al cromosoma 2 para todos esos caracteres, algunos de los cuales mostraron patrones clinales. La comparación de los resultados correspondientes a los dos tipos de líneas sugiere que el dimorfismo sexual es mantenido por la acción de la selección natural, de lo que se infiere que algunas de las mutaciones generadas podrían representar alelos que serían eliminados en la naturaleza. Asimismo, los resultados globalmente indican que la temperatura media sólo puede brindar una explicación parcial de los patrones observados en la naturaleza por lo que deben considerarse otros factores que presentan diferencias entre gradientes geográficos que pueden dar cuenta de los mismos y de la evolución de los caracteres morfológicos en general. Finalmente, los resultados sugieren que existen altos niveles de variabilidad en las poblaciones naturales estudiadas con respecto a los genes implicados en la expresión de los distintos caracteres morfológicos, los cuales dependerían del gen analizado y del sexo únicamente en el caso de la conformación del ala.

## La arquitectura genética del tamaño y la forma del cuerpo en *D. melanogaster*

La comprensión de la arquitectura genética de cualquier carácter cuantitativo requiere del conocimiento de todos los factores que intervienen en su expresión (Anholt & Mackay, 2004). Particularmente, se debe determinar cuáles son los genes involucrados, qué proporción de los mismos es responsable de la variabilidad fenotípica en poblaciones naturales, si estos tienen efectos diferenciales sobre el fenotipo bajo diferentes condiciones ambientales, cuáles son las bases moleculares de la variación entre alelos y cuáles son las fuerzas evolutivas que gobiernan su cambio (Mackay, 2004). Asimismo es necesario conocer el modo en el que la acción de tales factores se combina para determinar la expresión de los caracteres estudiados (Barton & Keightley, 2002). Una vez caracterizada la arquitectura genética del carácter se puede estudiar su relación con otros caracteres de forma tal de realizar un análisis del fenotipo en sentido más amplio. Este tipo de análisis, que debe realizarse en un marco multidisciplinario, sólo pueden llevarse a cabo utilizando organismos modelo como *Drosophila melanogaster* que permitan emplear múltiples herramientas de distinto origen (Rubin & Lewis, 2000).

De esta manera, esta tesis se llevó a cabo con el objetivo de contribuir a la caracterización de la arquitectura genética de caracteres vinculados al tamaño y la forma corporal en *D. melanogaster*. Particularmente, el trabajo se estructuró de forma tal de profundizar en el conocimiento de algunos de los factores que intervienen en su expresión, los cuales se enumeran a continuación:

- Identificar y caracterizar genes asociados a la expresión de caracteres vinculados al tamaño corporal y a la conformación del ala,
- Analizar el efecto de la temperatura en la expresión de algunos de los genes identificados en el punto anterior,
- Cuantificar distintas fuentes de variación que contribuyen a la variación total de los caracteres estudiados en individuos derivados de poblaciones naturales dispuestas a lo largo de gradientes geográficos de Argentina,
- Identificar regiones genómicas responsables de la variación de los caracteres estudiados en las poblaciones naturales mencionadas.

Asimismo, los resultados obtenidos en relación con cada uno de los puntos mencionados se presentaron y discutieron en cada uno de los capítulos anteriores siguiendo dicha estructuración. Por lo tanto, este capítulo final tiene como objetivo realizar una discusión donde se incluyen los resultados más importantes obtenidos a lo largo del trabajo de forma tal de extraer conclusiones más generales de los mismos. Con ese fin, la discusión se organizó alrededor de tópicos que se analizaron en toda la tesis, los cuales están relacionados con las

fuentes de variación fenotípica y los caracteres morfológicos analizados a lo largo de todo este estudio.

## **El análisis de la morfología: la forma, el tamaño y la conformación**

El tamaño que puede alcanzar un organismo se puede definir en función de múltiples parámetros mensurables a partir de las distintas partes que conforman al individuo, ya que todas las especies animales presentan una relación específica entre el tamaño de cada órgano y el tamaño corporal total (Conlon & Raff, 1999; Shingleton *et al.* 2007). Estas relaciones, que al ser estimadas en individuos de una especie que se encuentran en un determinado estadio ontogenético se denominan *alometrías estáticas*, capturan la relación entre el tamaño y la forma en organismos complejos (Shingleton *et al.*, 2007). Por lo tanto, a lo largo de esta tesis, se analizaron distintos caracteres morfológicos provenientes de discos imaginales diferentes, a fin de establecer el grado de independencia genética de los mismos a lo largo del desarrollo. De esta manera, se estudió el ancho de la cabeza (AC) y la distancia interocular (DO), los cuales se originan a partir del disco óculo-antenal; y el largo del tórax (LT), el tamaño del ala (TA) y la conformación del ala, los cuales provienen del disco del ala. Los caracteres vinculados a la cabeza y el tórax fueron estimados mediante la medición directa de las estructuras en las fotografías (*morfometría clásica*) mientras que los caracteres relacionados con el ala fueron estimados a partir del establecimiento de 11 puntos homólogos en las intersecciones entre las venas y posterior tratamiento estadístico de las coordenadas generadas (*morfometría geométrica*). Este procedimiento permitió estimar el tamaño del ala a partir de una variable univariada denominada *tamaño de centroide*, mientras que la conformación del ala fue estimada independientemente, a partir de una variable univariada denominada *distancia de procrustes* y/o mediante las deformaciones relativas, que constituyen una aproximación multivariada. La estimación de distintos caracteres vinculados al tamaño corporal permitió realizar diferentes análisis, los cuales permitieron inferir cambios en la forma del cuerpo de *D. melanogaster*. Asimismo, la estimación de dos caracteres distintos relacionados con la morfología de del ala, permitió analizar a los componentes de la forma de dicho órgano, el tamaño y la conformación, de manera independiente.

### **Caracteres vinculados al tamaño corporal**

En general, los resultados relacionados con los caracteres estimadores del tamaño corporal obtenidos a lo largo de esta tesis están parcialmente de acuerdo con la mayoría de los estudios previos llevados a cabo con distintos dípteros, los cuales mostraron correlaciones positivas entre las mediciones de diferentes partes del cuerpo (por ejemplo, Barker & Krebs,



1995; Cowley & Atchley, 1988, 1990; David *et al.*, 2006a, b; De Moed *et al.*, 1997; Fernández Iriarte *et al.*, 2003; Loeschcke *et al.*, 1999; Misra, 1966; Moreteau *et al.*, 2003; Norry *et al.*, 1997a, b, c, 2000; Partridge *et al.*, 1999; Rohlf & Sokal, 1972; Scheiner *et al.*, 1991; Sisodia & Singh, 2001; Wilkinson *et al.*, 1990). Los resultados de estos estudios sugieren que las tasas de proliferación y crecimiento celular de distintos discos imaginales son proporcionales durante el crecimiento larval y son consistentes con la idea de que los distintos caracteres morfológicos no pueden ser completamente independientes debido a la existencia de la pleiotropía y el ligamiento (Cowley & Atchley, 1990; Nijhout & Emlen, 1998). Esto, a su vez, permitiría explicar la existencia de ciertas restricciones que limitarían la divergencia del plan corporal fundamental de las moscas.

Sin embargo, las correlaciones entre los caracteres dentro de cada sexo y entre los sexos para cada carácter, fueron generalmente menores que en los estudios previos. Estas diferencias pueden deberse tanto a la inclusión de distintos estimadores del tamaño corporal en los análisis como al empleo de determinadas condiciones experimentales y de líneas con características particulares. Asimismo, se encontraron algunas diferencias entre los resultados correspondientes a las distintas partes de este trabajo. En particular, las correlaciones mencionadas fueron menores en las líneas mutantes que en las líneas derivadas de la naturaleza. En primera instancia, estos resultados sorprenden debido a que las líneas mutantes son más parecidas entre sí que las líneas de sustitución cromosómica porque las primeras difieren únicamente en el sitio en el que ha ocurrido la mutación mientras que las segundas difieren en relación al cromosoma 2 natural que ha sido sustituido en un mismo fondo isogénico. Sin embargo, estos resultados podrían implicar que dichas relaciones alométricas son mantenidas dentro de cierto rango de variación en la naturaleza por la acción de la selección natural, mientras que algunas mutaciones analizadas generan modificaciones que exceden los límites de variación natural por lo que podrían representar alelos que serían eliminados en la naturaleza.

A su vez, los resultados derivados de los análisis de las líneas mutantes brindan menos apoyo que los de las líneas derivadas de la naturaleza a la hipótesis de que los caracteres derivados de un mismo disco imaginal están genéticamente más ligados entre sí y, en consecuencia, presentan una correlación mayor que con aquellos derivados de precursores diferentes (ver Cowley & Atchley, 1990 y referencias). Similarmente, dichos resultados parecen dar menos apoyo que los de las líneas de sustitución cromosómica a la idea de que los mismos caracteres analizados en machos y hembras están genéticamente correlacionados entre sí (ver Cowley & Atchley, 1988; Cowley *et al.*, 1986 y referencias). De acuerdo con el modelo propuesto por Stern y Emlen (1999), el crecimiento de diferentes estructuras podría estar parcialmente regulado por mecanismos que involucran un sistema centralizado para la traducción del

tamaño corporal en una señal de crecimiento y/ó por la comunicación entre tejidos imaginales y el resto del cuerpo. De esta manera, los distintos órganos podrían diferir en la densidad de receptores para tal *señal de tamaño corporal*, lo que llevaría a diferencias de *sensibilidad* entre los órganos que se traducirían en alometrías órgano-específicas. Un mecanismo de esta índole podría explicar la existencia de variación genética intrapoblacional así como el dimorfismo sexual (Stern & Emlen, 1999). Por lo tanto, las distintas mutaciones analizadas podrían afectar diferencialmente a los caracteres vinculados al tamaño corporal en forma sexo-específica. Esto podría ocurrir, por ejemplo, a través de un cambio sexo-específico en la expresión de un gen relacionado de alguna manera con la cascada de señales disparada por la recepción de tal *señal de tamaño corporal* en un determinado órgano.

En general, la comparación de los resultados de los análisis de varianza realizados con los valores de cada carácter vinculado al tamaño corporal por separado considerando ambos tipos de líneas, permite extraer conclusiones similares a las derivadas de los análisis de correlación. Por lo tanto, todos los resultados, que fueron obtenidos a partir del análisis de un número importante de líneas de distintas características; sustentan la idea de que la arquitectura genética de distintos caracteres vinculados al tamaño corporal es diferente y depende en gran medida del sexo. De esta manera, los resultados sugieren que los estudios vinculados con el tamaño corporal deben considerar estimaciones de distintos caracteres asociados al mismo realizadas en ambos sexos.

### **El tamaño y la conformación del ala**

El ala de *Drosophila* ha sido empleada como un modelo de estudio en innumerables trabajos, muchos de los cuales han buscado profundizar el conocimiento acerca del control del crecimiento del órgano (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 2002; Cavicchi *et al.*, 1985; Delcour & Lints, 1966; de Moed *et al.*, 1997; Guerra *et al.*, 1997; James *et al.*, 1995; McCabe *et al.*, 1997; Partridge *et al.*, 1994; Pezzoli *et al.*, 1997; Robertson, 1959; Stevenson *et al.*, 1995). En ese sentido, la disección genético-molecular del desarrollo del ala en *Drosophila* permitió conocer cómo se establecen los ejes dorso-ventral y antero-posterior de este apéndice y cómo los productos de los morfogenes determinan la ubicación de las futuras venas (para una revisión reciente del tema ver Blair, 2007). Si bien a menudo se ha utilizado el posicionamiento de las venas para realizar estimaciones de la forma del ala, la mayoría de los trabajos no ha logrado separar el análisis del tamaño del de la conformación del ala. Asimismo, los estudios previos generalmente han analizado la conformación del ala desde una perspectiva unidimensional (*Morfometría tradicional*). En cambio, la metodología empleada a lo largo de esta tesis permitió realizar un análisis multidimensional y, por lo tanto, más rico de la conformación de este órgano.

Asimismo, la implementación de dicha metodología permitió estimar a ambos componentes de la forma (tamaño y conformación) por separado, de forma tal de poder analizarlos de manera independiente. De esta manera, se pudo contribuir a la caracterización de la arquitectura genética de los dos componentes de la forma de un de este *órgano modelo* por separado.

Los resultados de los análisis correspondientes al tamaño y a la conformación del ala en ambos tipos de líneas reflejan la complejidad de la arquitectura genética de los componentes de la forma del ala. Por un lado, los resultados relacionados con las líneas mutantes sugieren que la base genética de la conformación del ala sería mayor que la de su tamaño. Asimismo, estos análisis revelaron que muchos de los genes asociados a dichos caracteres son diferentes y su expresión depende en gran medida del sexo. Por otro lado, los resultados vinculados a las líneas de sustitución cromosómica mostraron que la varianza genética para la conformación del ala explica un porcentaje de la varianza fenotípica total mayor que en el caso del tamaño del ala la cual, en ambos casos, muestra cierta dependencia del sexo. En primera instancia, estas diferencias pueden implicar que existe una mayor variabilidad genética asociada al cromosoma 2 para la conformación del ala que para el tamaño de este órgano en las poblaciones naturales estudiadas. Sin embargo, dado que los análisis derivados de ambos tipos de líneas mostraron resultados similares, parece poco probable que estos se deban a que los factores genéticos asociados a cada carácter están distribuidos de distinta manera en el genoma, habiendo más genes vinculados a la conformación del ala en el cromosoma 2. De hecho, la distribución de los genes que afectaron a la conformación del ala (aquellos identificados a partir del análisis de las líneas mutantes) a lo largo del genoma no se apartó de la esperada por azar ( $\chi^2=0,5$ ;  $p=0,7788$ ); así como tampoco lo hizo la de los genes vinculados al tamaño de este órgano ( $\chi^2=0,8$ ;  $p=0,6637$ ). De esta manera, los resultados sugieren que los genes asociados a cada uno de los componentes de la forma del ala se distribuyen al azar en el genoma, siendo la base genética de la conformación del ala mayor que la asociada a su tamaño. En general, los resultados sugieren que la arquitectura genética del tamaño de ala difiere de la de su conformación; lo cual coincide con observaciones previas realizadas tanto en poblaciones experimentales como naturales de *D. melanogaster* (Birdsall *et al.*, 2000; Dworkin & Gibson, 2006; Gilchrist & Partridge, 2001; Mezey *et al.*, 2005; Mezey & Houle, 2005; Weber, 1990; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2005; 2008; Zimmerman *et al.*, 2000).

La visualización de los cambios conformacionales asociados a los extremos de la variación vinculada a la conformación del ala en los distintos casos estudiados permitió notar que estos involucraron mayormente a todos los puntos homólogos considerados en el análisis. Asimismo, a pesar de que en algunos casos se registró un desplazamiento mayor de algunos puntos en relación a los demás (por ejemplo, el desplazamiento de la intersección entre la vena

transversal posterior o PCV y la vena longitudinal 5 o LV5); en los diferentes casos se observaron distintos cambios generalmente pequeños, lo que reflejaría la sensibilidad de la conformación del ala ante las modificaciones genéticas. Estos resultados coinciden con lo observado en trabajos previos realizados con la metodología utilizada en este estudio (Birdsall *et al.*, 2000; Dworkin & Gibson, 2006; Gilchrist *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2005; Mezey & Houle, 2005; Zimmerman *et al.*, 2000).

En general, todo lo anterior está de acuerdo con lo observado en estudios de variación natural y artificial de la conformación del ala que mostraron la existencia de efectos correlacionados a través de toda el ala así como de diferencias entre distintas regiones del ala (Cavicchi *et al.*, 1981; Cowley & Atchley, 1990; Guerra *et al.*, 1997; Imasheva *et al.*, 1995; Pezzoli *et al.*, 1997; Thompson & Woodruff, 1982; Weber, 1990; 1992). En ese sentido, Klingenberg y Zaklan (2000) mostraron que los movimientos relativos de los puntos homólogos que utilizaron para estudiar la conformación del ala covarían, aunque los desplazamientos también presentan diferencias de extensión y dirección, aún entre puntos vecinos. Todos estos resultados muestran que la variación morfométrica presenta, simultáneamente, un alto grado de integración a través del ala y cierta especificidad local; lo cual podría ser un resultado natural de la compleja sucesión de eventos que ocurren durante el desarrollo de este órgano. Particularmente, cada una de las mutaciones estudiadas podría afectar a la conformación del ala de forma más global o más localizada dependiendo de la ubicación del gen afectado en la jerarquía genética que determina el desarrollo del órgano y de la capacidad del sistema de transmitir o enmascarar los cambios a lo largo de los distintos pasos del proceso. Dado que la variación natural de la conformación del ala asociada al cromosoma 2 fue aparentemente similar a la observada en las líneas mutantes, se puede inferir que las variantes generadas por mutagénesis podrían producir efectos fenotípicos similares a las variantes naturales.

Finalmente, en algunos trabajos se ha afirmado que la conformación del ala en la naturaleza ocuparía una pequeña zona del espacio morfológico determinado por diferentes estudios de selección (Cavicchi *et al.*, 1985; 1991; Weber, 1990). Esto llevó a algunos autores a hipotetizar que la selección optimizadora podría ejercer alguna influencia en la conformación del ala en la naturaleza (Gilchrist *et al.*, 2000; Gilchrist & Partridge, 2001; Mezey & Houle, 2005; Pezzoli *et al.*, 1997; Weber, 1990). En ese sentido, los cambios conformacionales observados en las distintas líneas parecen estar contenidos dentro de ciertos límites pero la variación asociada a las líneas mutantes no parece ser mucho mayor que la relacionada con las líneas derivadas de la naturaleza, aún cuando esta última se debe únicamente a factores genéticos presentes en el cromosoma 2. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo parecen estar parcialmente de acuerdo con la hipótesis mencionada anteriormente. De todos modos se

debe considerar que la variación asociada a las líneas mutantes podría ser menor a la observada en los experimentos de selección debido a que, como se mencionó anteriormente, las variantes generadas por mutagénesis podrían ser representativas de las variantes naturales. Simultáneamente, hay que tomar en cuenta que los resultados de los estudios acerca de la relación entre el patrón de venación del ala y factores potencialmente vinculados al *fitness* como el vuelo en los insectos pequeños (por ejemplo, Combes & Daniel, 2003; Lehmann & Dickinson, 1998), aún no son suficientes para inferir el tipo de selección que podría actuar sobre la conformación del ala en la naturaleza.

## **El estudio de la arquitectura genética: el aporte de distintos factores**

El tamaño que puede alcanzar un organismo, así como el de sus partes, son caracteres complejos de variación cuantitativa, que están determinados tanto por factores genéticos como ambientales que operan a través de mecanismos moleculares y fisiológicos complejos (por ejemplo, Conlon & Raff, 1999; Edgar, 2006; Mirth & Riddiford, 2007; Shingleton, 2007). Asimismo, la variación de las alometrías estáticas puede deberse a diferencias genéticas entre individuos, a diferencias en el ambiente en el que estos se han criado o a la interacción entre ambos factores; los cuales pueden influir en el crecimiento a través de mecanismos diferentes generando distintas relaciones alométricas (Shingleton *et al.*, 2007). Por lo tanto, a lo largo de esta tesis, se estudió el aporte de distintos factores que intervienen en la expresión de los caracteres cuantitativos analizados. Particularmente, se cuantificó el aporte de distintas fuentes de variación genéticas (el factor línea y todas las interacciones que lo incluyen) y ambientales (la temperatura y los gradientes geográficos) a la variación fenotípica total; se identificaron genes que conforman la base genética de los caracteres analizados en distintas condiciones y se estudió la variabilidad natural asociada a algunos de ellos.

### **El aporte de distintas fuentes de variación genéticas**

#### ***Caracteres vinculados al tamaño corporal***

Por un lado, los análisis genético-cuantitativos realizados con las líneas mutantes revelaron la existencia de una importante variación genética (entre un 21% y un 42% de la variación fenotípica total) para todos los caracteres estudiados en ambas temperaturas (17°C y 25°C) sugiriendo que un número importante de genes contribuye a su expresión. Es más, el efecto de estos genes depende del sexo ya que la mutación generalmente aumentó el tamaño de uno o más caracteres en los machos mientras que lo disminuyó en las hembras. Por otro lado, los análisis correspondientes a las líneas de sustitución cromosómica revelaron la existencia de una importante variación genética intrapoblacional para todos los caracteres estudiados (entre

un 9% y un 20% de la variación fenotípica total al analizar todas las poblaciones juntas; hasta un 31% al analizar las poblaciones en forma separada). Esta variación genética, que está asociada al cromosoma 2, fue menor que en el caso anterior y generalmente no varió con el sexo.

Dado que el fondo genético empleado en la construcción de las líneas de sustitución cromosómica es el mismo que poseen las líneas mutantes, se pueden comparar los componentes de varianza correspondientes a ambos tipos de líneas si se incluyen en el análisis de las líneas mutantes sólo a las portadoras del elemento *P* en el cromosoma 2. Este análisis, que incluyó a 30 líneas, reveló que el aporte de factor genético fue significativo únicamente en el caso de DO y TA (este estudio incluyó únicamente a las líneas BDGP criadas a 25°C debido a que a esa temperatura se analizaron las líneas derivadas de la naturaleza) y explicó el 11,6% y el 35% de la varianza fenotípica total respectivamente. Sin embargo, los resultados mostraron que la interacción entre la línea y el sexo fue significativa en todos los casos. Esta fuente de variación explicó el 18,8% de la varianza asociada a DO, el 15,4% de la de AC, el 46,3% de la relacionada con LT y el 10,2% en el caso de TA. Por un lado, esto último indica que las inserciones localizadas únicamente en el cromosoma 2 también provocan efectos sexo-específicos, lo cual sugiere la potencialidad de observar dichos efectos como consecuencia de la variación natural asociada a este cromosoma. Por otro lado, la comparación de estos resultados con los asociados a las líneas derivadas de la naturaleza revela que el porcentaje de la variación fenotípica total explicado por las fuentes de variación genéticas para los distintos caracteres continúa siendo superior en el caso de las líneas mutantes.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los valores provenientes de los análisis de las líneas de sustitución cromosómica generalmente corresponden sólo al factor línea. Por lo tanto, existe una importante diferencia entre ambos tipos de líneas en relación al porcentaje de la varianza fenotípica total debido a los factores genéticos que aparentemente puede ser explicada por la existencia de una fuerte interacción entre el componente genético y el sexo en las líneas mutantes. Esto implica que el dimorfismo sexual para los caracteres vinculados al tamaño corporal permanece relativamente constante en las poblaciones naturales. Asimismo, los resultados obtenidos en los distintos análisis de las líneas mutantes BDGP mostraron que las mutaciones generalmente causaron una reducción del dimorfismo sexual, lo que explica la fuerte interacción observada entre la línea y el sexo en todos los casos. Por lo tanto, los resultados globalmente sugieren que el dimorfismo sexual podría ser mantenido por la acción de la selección natural, de lo que se deduce que las mutaciones generadas podrían representar alelos que estarían bajo una fuerte selección purificadora en la naturaleza.

### ***La conformación del ala***

En el caso de las líneas mutantes, el análisis genético-cuantitativo mostró que ambas fuentes de variación genéticas realizan un aporte significativo a la variación total de la conformación del ala (27% a 25°C y 22% a 17°C de la variación fenotípica total). Estos resultados sugieren que un número importante de genes contribuye a su expresión de dicho carácter complejo de manera sexo-específica. El análisis correspondiente a las líneas derivadas de la naturaleza también reveló un aporte significativo de ambas fuentes de variación genéticas a la variación total de la conformación del ala (25% de la variación fenotípica total al analizar todas las poblaciones juntas; hasta un 37% al analizar las poblaciones en forma separada). Estos resultados sugieren que un número importante de factores genéticos asociados al cromosoma 2 contribuye a su expresión de dicho carácter complejo de manera sexo-específica.

El análisis de varianza de la conformación del ala que incluye únicamente a las líneas mutantes en las que el elemento *P* se localiza en el cromosoma 2 reveló que tanto el factor línea como la interacción línea x sexo fueron significativos, explicando el 16% y el 7% de la varianza total asociada a la conformación del ala (nuevamente, este estudio sólo incluyó a las líneas BDGP criadas a 25°C debido a que a esa temperatura se analizaron las líneas de sustitución cromosómica). En promedio, la suma de estos valores es similar a los valores correspondientes a las líneas derivadas de la naturaleza. Sin embargo, al analizar las poblaciones por separado se observó que estos valores muestran importantes diferencias y generalmente corresponden al factor línea únicamente. De esta manera, el dimorfismo sexual para la conformación del ala también parece que se mantiene dentro de ciertos límites en las poblaciones naturales. Sin embargo, los resultados vinculados a las líneas BDGP mostraron que el efecto de las mutaciones depende del sexo. Por lo tanto, los resultados globalmente sugieren, similarmente a lo discutido para los caracteres vinculados al tamaño corporal, que el dimorfismo sexual podría ser mantenido por la acción de la selección natural por lo que las mutaciones generadas podrían representar alelos que serían eliminados en la naturaleza.

### **El rol de distintos factores ambientales**

#### ***Los gradientes geográficos y la temperatura media***

Los análisis de las líneas derivadas de la naturaleza revelaron que algunos de los caracteres vinculados al tamaño corporal analizados aumentan con la latitud, lo cual está de acuerdo con los resultados de trabajos previos en los que se estudió el tamaño corporal de *D. melanogaster* en distintas regiones del mundo (por ejemplo, Capy *et al.*, 1993; Imasheva *et al.*, 1994; James *et al.*, 1995; Long & Singh, 1995; van't Land *et al.*, 1999). Asimismo, los resultados son consistentes con los trabajos que mostraron que los individuos de poblaciones que fueron

mantenidas a temperaturas bajas son genéticamente más grandes que los de las que fueron conservadas a temperaturas más elevadas (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 2002; Bochdanovits & de Jong, 2003a; Cavicchi *et al.*, 1985; de Moed *et al.*, 1997; Huey *et al.*, 1991; Partridge *et al.*, 1994; Trotta *et al.*, 2006). De esta manera, el aumento del tamaño medio en las poblaciones ubicadas en regiones de clima más frío (es decir, a latitudes y altitudes mayores) suele ser considerado como una evidencia de adaptación térmica, aunque no se conozca exactamente el mecanismo subyacente (por ejemplo, Atkinson & Sibly, 1997; Blackburn *et al.*, 1999).

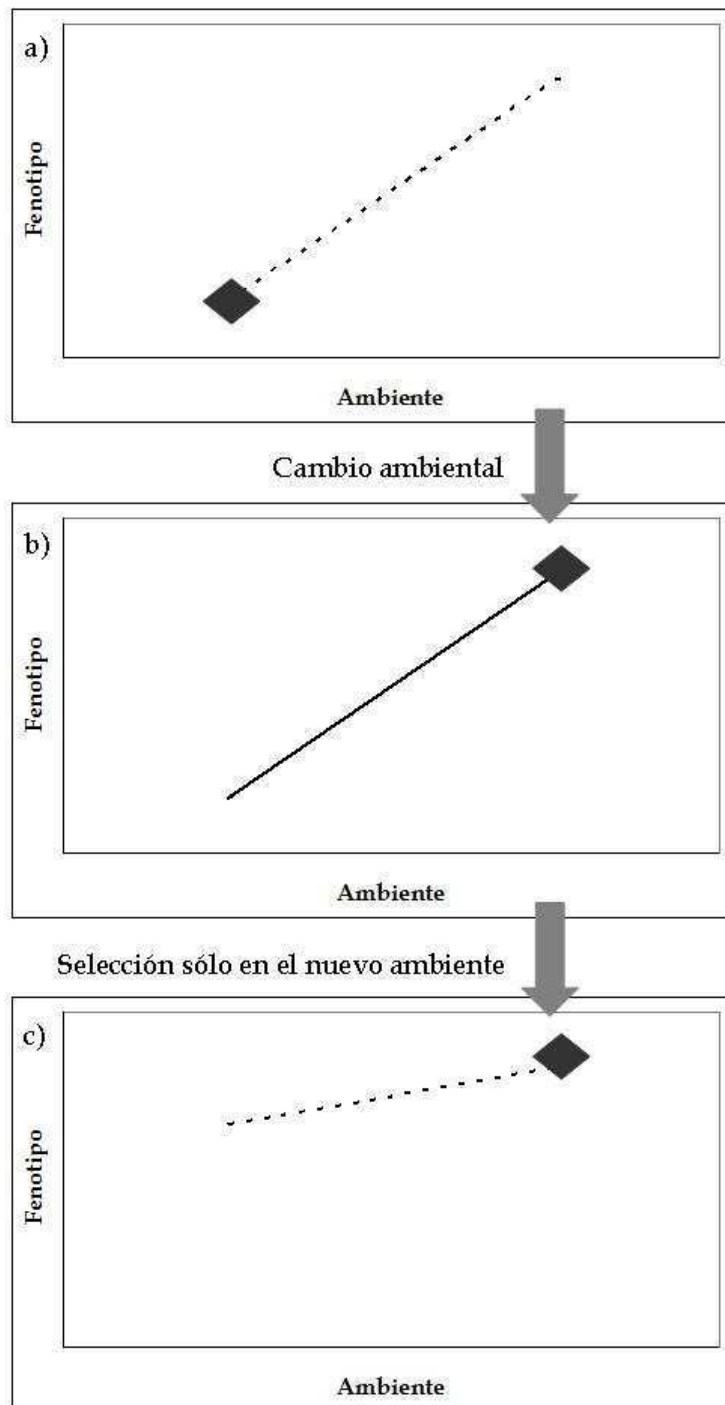
Con respecto a la conformación del ala, se observó una elongación en la dirección próximo-distal con el aumento de la latitud, lo cual es consistente con resultados obtenidos previamente a partir del análisis de diferentes estimadores de la morfología del ala de *D. melanogaster* en distintas partes del mundo (Azevedo *et al.*, 1998; Bublly *et al.*, 1996; Gilchrist *et al.*, 2000; Imasheva *et al.*, 1995; van't Land *et al.*, 1999). Asimismo, los cambios conformacionales detectados en relación con el aumento de la latitud son generalmente similares a los observados en individuos de *Drosophila* criados a temperaturas menores (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 1998; Birdsall *et al.*, 2000; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999; Cavicchi *et al.*, 1991; Debat *et al.*, 2003; Imasheva *et al.*, 2000; Kjærsgaard *et al.*, 2007; Matta & Bitner-Mathé, 2004; Moreteau *et al.*, 1998). La modificación de la conformación del ala con la latitud también podría ser considerada como una evidencia de adaptación térmica, aunque los estudios sobre los mecanismos subyacentes a las clinas se han relacionado predominantemente con el tamaño corporal (por ejemplo, Atkinson & Sibly, 1997; Blackburn *et al.*, 1999).

De acuerdo con todo lo anterior, los análisis de los distintos caracteres morfológicos estudiados en un grupo de líneas mutantes criadas en dos temperaturas diferentes revelaron que todos ellos mostraron un comportamiento plástico. Particularmente, los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal presentaron valores mayores cuando la temperatura fue menor, de acuerdo con lo observado en múltiples trabajos previos (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 2002; David *et al.*, 2006c; de Moed *et al.*, 1997; French *et al.*, 1998; Gebhardt & Stearns, 1993; Noach *et al.*, 1996; Nunney & Cheung, 1997; Partridge *et al.*, 1994; Scheiner *et al.*, 1991). Asimismo, las modificaciones de la conformación del ala observadas en las líneas mutantes con respecto al control respectivo en individuos criados a 17°C son similares a las que se registraron en trabajos previos entre individuos de *Drosophila* criados a distintas temperaturas. Si bien estos estudios difieren bastante entre si en relación con la metodología empleada, se observaron algunas similitudes. Mientras que en algunos de ellos se detectó un cambio mayor en el compartimiento posterior del ala; prácticamente en todos los casos se observó un alargamiento desproporcionado de las alas a medida que la temperatura disminuye (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 1998; Birdsall *et al.*, 2000; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999; Cavicchi *et al.*, 1991; Debat *et al.*,



2003; Imasheva *et al.*, 2000; Kjærsgaard *et al.*, 2007; Matta & Bitner-Mathé, 2004; Moreteau *et al.*, 1998). Por último, este estudio permitió observar la existencia de una fuerte interacción entre el genotipo y la temperatura que se debe a que, comparativamente con el elevado número de genes que mostraron un efecto dependiente de la temperatura, sólo unos pocos genes controlan la expresión de los distintos caracteres en ambas temperaturas. De esta manera, los resultados sugieren que se pueden observar modificaciones fenotípicas similares como respuesta a cambios tanto ambientales (temperatura) como genéticos (mutaciones).

La consideración simultánea de todos estos resultados lleva a pensar en un concepto relacionado con la variación ambiental que no fue abordado hasta ahora, la *asimilación genética*. Este término hace referencia a un proceso por el cual la variación fenotípica inducida inicialmente por el ambiente pasa a ser producida de manera constitutiva (es decir, su expresión ya no requiere de la señal ambiental inductora). Si bien este concepto existe desde hace mucho tiempo atrás; Waddington y Schmalhausen lo formularon independientemente en un contexto genético (Schmalhausen, 1949; Waddington, 1942; 1952; 1953; 1961). Waddington originalmente demostró que ciertos fenotipos (por ejemplo, la ausencia de una vena transversal en el ala de *D. melanogaster* o *cross-veinless*) puede obtenerse en baja frecuencia en una población a partir de un estímulo ambiental (por ejemplo, un golpe de calor o *heat shock* en ciertos estadios del desarrollo; Waddington, 1953). A continuación, Waddington seleccionó moscas de forma tal de incrementar la frecuencia del fenotipo nuevo generado en respuesta al estímulo ambiental. En otras palabras, realizó experimentos de selección para volver más frecuente a tal forma de plasticidad fenotípica en la población (Figura 8.1). Luego de unas pocas generaciones de selección, él observó que, no sólo la frecuencia mencionada había alcanzado niveles muy elevados, sino que el estímulo ambiental ya no parecía ser necesario para causar la aparición del fenotipo de interés. Waddington explicó esta aparente “herencia de un carácter adquirido” en términos Darwinianos, como el resultado de la selección actuando sobre el “límite de activación el carácter” durante el desarrollo y llamó a este tipo de resultado “asimilación”, discutiéndolo en términos de la canalización del fenotipo (Capítulo 4). Simultáneamente, Schmalhausen (1949) describió al proceso en tres pasos: la exposición de variación inicialmente “escondida” (es decir, no expresada) mediante la aparición de un estímulo ambiental nuevo; seguida de la selección de las respuestas adaptativas en relación al estímulo y, finalmente, la estabilización de la norma de reacción a través de la acción de la selección estabilizadora (Figura 8.1).



**Figura 8.1:** El concepto de asimilación genética desde la perspectiva de las normas de reacción y la plasticidad fenotípica. El genotipo analizado presenta una norma de reacción plástica en relación al ambiente estudiado pero sólo expresa un fenotipo debido a que inicialmente ocupa sólo un ambiente (♦ en a). Si el ambiente cambia, el genotipo persiste debido a que la plasticidad preexistente le permite producir un fenotipo nuevo (♦ en b). Finalmente, si la selección natural continúa operando sólo en el nuevo ambiente, el fenotipo nuevo puede fijarse genéticamente (asimilación) y la norma de reacción original puede perder su plasticidad (c); por ejemplo, por acción de la deriva o debido a los costos asociados al mantenimiento de la plasticidad cuando esta no es favorecida por la selección natural (porque desaparece el ambiente anterior). Figura modificada de Pigliucci y colaboradores (2006).

De acuerdo con esta visión, la plasticidad fenotípica sería una propiedad común de la norma de reacción de un genotipo (para un determinado carácter, en un rango de condiciones ambientales acotado) que haría posible la aparición de un fenotipo nuevo inducido ambientalmente el cual podría ser “fijado” (asimilado genéticamente) mediante un proceso de selección de tal expresión en el nuevo ambiente que terminaría alterando la forma de la norma de reacción (Figura 8.1).

En cambio, West-Eberhard (2003) considera a la asimilación genética como un caso particular del fenómeno más general de evolución fenotípica (ver también Schlichting & Pigliucci, 1998); el cual sería el resultado de los siguientes cuatro pasos:

- 1) El origen del carácter puede ocurrir por una mutación o un cambio ambiental que causa la aparición de una variante del desarrollo que expresa un carácter nuevo;
- 2) La acomodación fenotípica (es decir, un rearrreglo de diferentes aspectos del fenotipo) al nuevo carácter, la cual es factible debido a la plasticidad preexistente del sistema de desarrollo.
- 3) La propagación inicial de la nueva variante, la cual puede ser facilitada por su recurrencia en la población si el cambio inicial es ambiental (en otras palabras, no se necesita esperar a que una mutación rara ocurra otra vez para alcanzar una frecuencia relativamente alta en la población);
- 4) La acomodación genética (es decir, la fijación por sustitución alélica) del fenotipo nuevo como resultado de la acción de la selección.

De esta manera, la asimilación genética a partir de la evolución de la plasticidad fenotípica (Pigliucci & Murren, 2003) sería un caso particular del proceso de evolución fenotípica planteado por West-Eberhard (2003); particularmente, cuando el origen del carácter (paso 1) se debe a un cambio ambiental. Finalmente, muchos autores han mencionado que la asimilación genética podría tener consecuencias evolutivas más amplias a través de la integración de diferentes características fenotípicas (Pigliucci *et al.*, 2006). La asimilación podría revelar y hasta incrementar la plasticidad de los caracteres correlacionados con el que está siendo asimilado porque, al regular dicho carácter independientemente de la presencia del estímulo ambiental, otro carácter podría expresarse de manera condicional con una mayor probabilidad (el principio de “asimilación extendida”; Pigliucci *et al.*, 2006).

A partir de todo lo anterior se puede decir que los resultados derivados de los análisis realizados a lo largo de esta tesis, así como los obtenidos a partir de múltiples trabajos previos, son consistentes con la hipótesis de que la variación clinal de algunos caracteres vinculados a la morfología de *D. melanogaster* es consecuencia del proceso de asimilación genética. Por un lado, los resultados derivados de esta tesis muestran (igual que los correspondientes a muchos otros

trabajos previos) que algunos de los caracteres morfológicos estudiados varían con la latitud de la manera esperada considerando a la temperatura como el factor ambiental que hace las veces de agente selectivo a lo largo de dicho gradiente geográfico. Por otro lado, los análisis de las líneas mutantes revelaron que la base genética de los distintos caracteres analizados muestra importantes diferencias entre las temperaturas estudiadas. Por lo tanto, la variación clinal asociada a diferentes caracteres morfológicos podría haber surgido, originalmente, como respuesta al cambio de temperatura asociado al gradiente geográfico constituyendo, de esta manera, una respuesta plástica. Posteriormente, la constancia de la temperatura en cada punto de dicho gradiente pudo haber estabilizado localmente la respuesta adaptativa en relación al estímulo ambiental en cuestión (es decir, los valores de cada carácter asociados a cada punto de del gradiente). Finalmente, la constancia del agente selectivo en los distintos puntos del gradiente pudo haber estabilizado la norma de reacción de los genotipos seleccionados en cada uno de ellos (asimilación genética). De esta manera, la temperatura constante en cada punto del gradiente geográfico podría haber fijado el fenotipo asociado al mayor *fitness*, que originalmente fue el resultado de la plasticidad asociada a la norma de reacción de un genotipo y, posteriormente, fue el único fenotipo producido por ese genotipo (es decir, la norma de reacción del genotipo dejó de ser plástica, pudiendo producir únicamente el fenotipo que posee el mayor *fitness* en el ambiente en cuestión). Por último, este proceso podría haber revelado o hasta haber incrementado la plasticidad de otros caracteres correlacionados con el que está siendo asimilado. En ese sentido, la asimilación del tamaño corporal o algún carácter vinculado al mismo podría haber causado la expresión diferencial de otros caracteres morfológicos o, incluso, de otros de los muchos caracteres que presentan alguna relación con dicho carácter complejo. Particularmente, este principio de “asimilación extendida” (Pigliucci *et al.*, 2006) aplicado a caracteres de historia de vida que guardan una relación estrecha con el tamaño corporal podría explicar la observación ocasional de clinas en relación a tales caracteres.

### ***Los gradientes geográficos y otros factores ambientales***

A pesar de todo lo discutido anteriormente, no todos los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis están de acuerdo con la hipótesis de adaptación térmica mencionada previamente. Este es el caso de LT, el cual disminuyó con la altitud en los machos. Sin embargo, tal y como se discutió previamente (Capítulo 5), dicho resultado coincide con análisis previos que revelaron la existencia de una marcada disminución del tamaño en individuos sometidos a tratamientos de amplitud térmica en comparación con otros que fueron criados a una temperatura media similar aunque sin variación diaria (Folguera, 2007; Pétavy *et al.*, 2001b; 2004). Dado que estos y otros trabajos han demostrado que la amplitud térmica afecta significativamente a la variación

de distintos caracteres vinculados al *fitness*; se suele considerar que dicho factor se relaciona positivamente con el estrés (Folguera, 2007; Folguera *et al.*, 2008; Loeschcke *et al.*; 2000; Pétavy *et al.*, 2001a, b; 2004). Por lo tanto, el incremento de la amplitud térmica con la altitud podría representar un importante factor de estrés que puede tener una incidencia negativa en el crecimiento de los organismos. De esta manera, los resultados provenientes de este y otros trabajos sugieren que la temperatura media sólo puede brindar una explicación parcial de los patrones observados en la naturaleza.

Asimismo, la reducción de LT con la altitud causó un incremento del cociente TA/LT (estimador de la inversa del *wing loading*) con dicho factor únicamente en los machos. Este resultado también coincide con los derivados de estudios previos de poblaciones naturales de *Drosophila* y de individuos criados a distintas temperaturas (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 1998; Barker & Krebs, 1995; Bitner-Mathé & Kaczko, 1999; David *et al.*, 1994; de Moed *et al.*, 1997; Gilchrist & Huey, 2004; Loeschcke *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 1999; Noach *et al.*, 1996; Pétavy *et al.*, 1997; Scheiner *et al.*, 1991; Thomas & Barker, 1993). Dado que la frecuencia del aleteo disminuye con la temperatura (Barnes & Laurie-Ahlberg, 1986; Curtsinger & Laurie-Ahlberg, 1981; Lehmann, 1999; Reed, 1942), los valores menores de *wing loading* en ambientes fríos les otorgarían a las moscas una mayor capacidad de ascenso (Ellington, 1984c). Por lo tanto, los resultados derivados de este y otros trabajos podrían representar otra evidencia a favor de la hipótesis de adaptación térmica. Sin embargo, este resultado no se observó en relación a ambos gradientes geográficos, lo cual podría estar vinculado con otros factores ambientales que muestran diferencias entre poblaciones de altura y de llanura y que no cambian con la latitud. Uno de esos factores podría ser la densidad del aire, que disminuye a medida que se incrementa la altitud, pudiendo dificultar el vuelo a grandes alturas (Dudley, 2000). De hecho, se demostró que, a bajas temperaturas, la disminución de la presión del aire afecta negativamente el desempeño en el vuelo (Dillon & Frazier, 2006). Dado que en esas condiciones las moscas deberían hacer una gran fuerza muscular para alterar la cinemática del aleteo (Dudley, 2000) lo cual podría ser muy difícil dada la disminución de las tasas metabólicas con la temperatura (Berrigan & Partridge, 1997; Huey & Kingsolver, 1989); el aumento del área del ala podría ser de escasa utilidad mientras que la reducción del *wing loading* disminuiría los requerimientos energéticos y aumentaría la capacidad de ascenso (Dudley, 2000).

Sin embargo, la reducción de la masa corporal podría implicar una disminución de la capacidad reproductiva dado que el tamaño corporal está fuertemente asociado a la fecundidad en muchos insectos, incluido *Drosophila* (Berrigan, 1991; Marden, 1989, 1995; Nunney & Cheung, 1997; Robertson, 1957; Santos *et al.*, 1992). Por lo tanto, las diferencias entre los sexos en relación al *wing loading* podrían deberse a que sería menos adaptativo para las hembras disminuir su

masa corporal (lo que llevaría a una mayor capacidad dispersiva) por el efecto negativo que esto tendría en la fecundidad. En ese sentido, vale la pena recordar algunos resultados derivados de los análisis de las líneas mutantes empleadas a lo largo de la tesis. Como se mencionó en reiteradas oportunidades, la mayoría de las mutaciones que afectaron algún carácter vinculado al tamaño corporal causaron una disminución en las hembras y un incremento en los machos. Es más, las variaciones fenotípicas más importantes corresponden a disminuciones de los tamaños en las hembras, mientras que el incremento del tamaño fue el cambio más significativo detectado en los caracteres analizados en los machos. Sin embargo, al comparar la cantidad de líneas significativas en cada sexo se observó que el número correspondiente a las hembras (45) fue bastante menor que el de los machos (63; Capítulo 2). Estos resultados indican que la reducción del dimorfismo sexual como producto de la mutagénesis se alcanzó en una mayor cantidad de oportunidades a través del aumento del tamaño de los machos. De esta manera, los resultados globalmente sugieren que el aumento del tamaño en los machos se logra más fácilmente que la disminución del tamaño en las hembras; lo cual podría estar relacionado con la existencia de compromisos entre este carácter complejo y otros caracteres vinculados al *fitness*, los cuales podrían imponer mayores restricciones a la evolución del tamaño corporal en las hembras.

### **La variabilidad asociada a algunos genes candidatos**

Con respecto a los caracteres vinculados al tamaño corporal, las pruebas de complementación genética realizadas entre seis líneas de sustitución cromosómica y mutantes de *jing*, *inv*, *toc*, *CG14478*, *Fas3* y *Rtnl1* revelaron que todos los genes analizados presentan variabilidad natural con respecto a la mayor parte de los casos y, en esos casos, el efecto fenotípico de la ausencia de complementación fue igual en ambos sexos. Los resultados sugieren que no existe una relación de dominancia única entre los distintos alelos estudiados en relación a cada gen. Asimismo, para todos los casos se encontraron variantes naturales que sugieren que los genes estudiados interactúan con otro/s que interviene/n directamente en la expresión de los distintos caracteres analizados.

En relación a la conformación del ala, las mismas pruebas de complementación revelaron la existencia de QTGs sólo en algunos casos. Particularmente, el análisis del estimador univariado mostró la existencia de variabilidad genética únicamente para *jing* en los machos, siendo el alelo del control dominante con respecto a los alelos naturales y su mutación un alelo nulo y, por lo tanto, recesivo con respecto a las variantes naturales. Esto sugiere que *jing* está implicado directamente en la expresión de la conformación del ala y es consistente con la información existente sobre este gen, la cual indica que codifica un factor de transcripción

requerido para el desarrollo del álula y de las venas del ala (Culi *et al.*, 2006; ver el Capítulo 3). De hecho, la mutación de este gen fue la única que formó parte de la lista de aquellas que generaron un cambio más extremo en la conformación del ala a 25°C que pudo asociarse con algún antecedente vinculado al desarrollo del ala (Capítulo 3). El otro gen que formó parte de esa lista fue *Fas3*, aunque no parece haber información que relacione a este gen con la conformación del ala. De hecho, según el análisis multivariado, existe variabilidad genética para este gen aunque, nuevamente, sólo en los machos. Si se considera que ambas mutaciones sólo afectaron significativamente a la conformación del ala de las hembras a 25°C (Capítulo 3), se hace difícil sostener que los alelos generados por mutagénesis sean nulos y, por lo tanto, recesivos con respecto a los naturales. De esta manera, se podría considerar que la mutación de ambos genes podría haberlos transformado en alelos que afectarían la conformación del ala de manera diferente a los alelos naturales, con los que mantendrían una relación de dominancia que no es unívoca. Asimismo, similarmente a lo mencionado anteriormente, estos resultados apoyan la idea de que los genes estudiados interactúan con otro/s que interviene/n directamente en la expresión de los distintos caracteres analizados; lo cual es consistente con el rol de *Jing* como factor de transcripción y el de *Fas3* en la transducción de señales.

Por un lado, la consideración simultánea de todos los resultados derivados de las pruebas de complementación y de los análisis de las respectivas mutaciones en relación a los diferentes caracteres morfológicos estudiados sugiere que los genes analizados generalmente intervienen indirectamente en la expresión de los caracteres estudiados, es decir, a través de interacciones con otros genes que afectan al mismo carácter (epístasis, una de las dos posibilidades; Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2001; 2004; Pasyukova *et al.*, 2000). Estos resultados son consistentes con el hecho de que la mayoría de los genes candidatos en relación al tamaño corporal están involucrados en el desarrollo y/ó en procesos metabólicos y presentan actividad de unión a proteínas y a ácidos nucleicos. Asimismo, están de acuerdo con el hallazgo reciente de que la expresión de los caracteres complejos está gobernada por redes epistáticas de múltiples genes pleiotrópicos (Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2004). De esta manera, el criterio según el cual sólo los resultados que reflejan un determinado patrón (*cambio de escala tipo 1*; Capítulo 7) constituyen la principal evidencia para considerar a los genes como QTGs (Mackay, 2001; Pasyukova *et al.*, 2000), debería seguirse con suma precaución. Cabe la posibilidad de que este criterio pueda emplearse con caracteres cuya arquitectura genética prácticamente puede reducirse a su base genética, debido a que gran parte de los genes que intervienen en su expresión son *genes efectores* o *genes estructurales*. Sin embargo, también cabe la posibilidad de que la mayoría de los caracteres, como los estudiados a lo largo de esta tesis, posean una arquitectura genética mucho más compleja. De esta manera, semejante

simplificación podría llevar a la pérdida de mucha información importante para caracterizar la arquitectura genética de los caracteres estudiados.

Por otro lado, todos los genes menos *Rtnl1* son candidatos a integrar la arquitectura genética de ambos tipos de caracteres (Capítulos 2 y 3) pero la mayoría no mostró variación natural para la conformación del ala mientras que si lo hizo para los estimadores del tamaño corporal. Por lo tanto, los resultados sugieren que la expresión de la conformación del ala está más canalizada que la de los caracteres vinculados al tamaño corporal y es consistente con otros resultados discutidos previamente. En resumen, anteriormente se mencionó que los resultados derivados de esta tesis, igual que otras observaciones previas, coinciden en que un número importante de genes contribuye a la expresión de la conformación del ala y en que éste sería mayor que para el tamaño del mismo órgano (Birdsall *et al.*, 2000; Dworkin & Gibson, 2006; Mezey *et al.*, 2005; Mezey & Houle, 2005; Weber, 1990; Weber *et al.*, 1999; 2001; 2005; 2008; Zimmerman *et al.*, 2000). Asimismo, dichos resultados mostraron que la variación conformacional del ala en los distintos casos estudiados parece estar contenida dentro de ciertos límites. Particularmente, se observaron modificaciones fenotípicas acotadas y bastante similares, tanto en las líneas mutantes (considerando las dos temperaturas de cría) como en las líneas derivadas de la naturaleza (considerando los cambios conformacionales asociados tanto a los extremos “absolutos” de la variación como a los extremos del gradiente latitudinal). Estas observaciones coinciden con otras realizadas en estudios previos que involucraron tanto poblaciones naturales como experimentales de *D. melanogaster* (por ejemplo, Azevedo *et al.*, 1998; Birdsall *et al.*, 2000; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999; Bublly *et al.*, 1996; Cavicchi *et al.*, 1991; Debat *et al.*, 2003; Gilchrist *et al.*, 2000; Imasheva *et al.*, 1995; 2000; Kjærsgaard *et al.*, 2007; Matta & Bitner-Mathé, 2004; Moreteau *et al.*, 1998; van't Land *et al.*, 1999) y son parcialmente consistentes con la idea de que la selección optimizadora podría ejercer alguna influencia en la conformación del ala en la naturaleza (Gilchrist *et al.*, 2000; Gilchrist & Partridge, 2001; Mezey & Houle, 2005; Pezzoli *et al.*, 1997; Weber, 1990). En este contexto, los resultados de las pruebas de complementación refuerzan la idea de que la conformación del ala presenta cierta variación natural alrededor de un determinado óptimo fenotípico. Como se discutió previamente, el desarrollo de este órgano ocurre a través de una compleja sucesión de eventos potencialmente determinados por la expresión de un gran número de genes que podrían afectar a la conformación del ala de forma más o menos global dependiendo del momento y el lugar en el que estos se expresan. La mayor parte de estos genes podría carecer de variabilidad natural o dicha variación podría no ser traducida en modificaciones fenotípicas debido a la capacidad del sistema de enmascarar los cambios a lo largo de los distintos pasos del proceso. En ese sentido, las modificaciones ocurrieron predominantemente en la dirección próximo-distal y,



como involucraron frecuentemente a PCV, afectaron simultáneamente a la región posterior del ala. Dado que esa región del ala sería la que se desarrolla más tardíamente (Capítulo 3), los resultados sugieren que sólo la variación ligada a genes que se expresan más tardíamente en el desarrollo podría verse reflejada en cambios fenotípicos. De todos modos, a pesar de que habría que estudiar la variación asociada a más genes, los resultados de las pruebas de complementación apoyan la idea de que la conformación del ala es un carácter altamente canalizado como consecuencia de la acción de la selección estabilizadora en la naturaleza. Finalmente, los altos niveles de variabilidad genética observados para todos los caracteres vinculados al tamaño corporal podrían estar relacionados con la existencia de compromisos entre este carácter complejo y otros caracteres vinculados al *fitness*. Este tipo de relaciones, que parecen ser múltiples con respecto al tamaño corporal (Capítulo 1), podrían imponer mayores restricciones a la evolución direccional del tamaño corporal y, por lo tanto, a la pérdida de la variación genética asociada a su expresión o a su canalización.

### Otros genes candidatos y experimentos futuros

Por un lado, se identificaron 92 genes candidatos en relación a los caracteres vinculados al tamaño corporal estudiados a 25°C. Aparentemente, sólo ocho de estos genes afectan tres o cuatro caracteres en ambos sexos (*dnt*, *inv*, *LanA*, *lama*, *CG13086*, *sd*, *CG14782* y *Lsd-2*) mientras que otros ocho mostraron ser pleiotrópicos predominantemente en un sexo o en el otro (*lola*, *tmod*, *bif* y *CG8062* en los machos; *msn*, *CG17836*, *CG32529* y *amn* en las hembras). Las mutaciones en cuatro de estos genes candidatos (*inv*, *Lsd-2*, *amn* y *CG32529*) resultó en la disminución de casi todos los caracteres de tamaño corporal en ambos sexos mientras que dos inserciones independientes del elemento *P* en *sd* generaron un aumento del tamaño en todos los caracteres. En general, estos genes no habían sido relacionados con la regulación del tamaño de los órganos o del cuerpo previamente. Por otro lado, la mayoría de los 98 genes candidatos identificados con respecto a la conformación del ala analizada a 25°C no había sido relacionada previamente con dicho carácter. Asimismo, de los 16 genes responsables de los cambios conformacionales más extremos (*ade5*, *CG12418*, *CG12717*, *CG32038*, *CG32685*, *CG6175*, *CG6540*, *Crc*, *dally*, *Fas3*, *inx7*, *jing*, *Karl*, *LanA*, *l(3)82Fd* y *sd*), sólo tres (*jing*, *LanA* y *sd*) habían sido relacionados con modificaciones del ala en estudios previos y dos (*CG6175* y *sd*) aparentemente afectan a la conformación similarmente en ambos sexos. Finalmente, los resultados del estudio realizado a 17°C resaltan la necesidad de estudiar la expresión de los genes que conforman la base genética de un carácter en distintos ambientes cuando se pretende profundizar en el conocimiento de la arquitectura genética de dicho carácter. Como se mencionó previamente, los resultados sugieren que la base genética de los distintos caracteres varía de manera importante

con la temperatura por lo que sólo algunos genes parecen tener alguna relación con el tamaño y/o la forma de los órganos en ambas temperaturas estudiadas. Entre estos genes se puede destacar a *CG11226*, *Btk29A*, *Imp*, *Lsd-2*, *mam*, *msn* y *spict*.

La mayor parte de la información relevante vinculada a los genes candidatos mencionados, disponible en la base de datos de Flybase (Flybase, quinta publicación), fue mencionada a lo largo de los capítulos anteriores (fundamentalmente, Capítulos 2, 3, 4 y 7). Sin embargo, existe cierta información que podría resultar interesante discutir a esta altura del trabajo debido a que es bastante reciente y es relativamente más abarcativa con respecto a los resultados obtenidos en distintas partes de la tesis.

Por un lado, *LanA* parece ser un gen muy importante en relación a los distintos caracteres morfológicos estudiados ya que las cuatro mutaciones independientes de este gen (líneas BG01662, BG02113, BG02380 y BG02469; Capítulos 2 y 3) afectaron de diferente manera tanto a los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal como a la conformación del ala. En particular, una de esas mutaciones (BG02469) se destacó por haber causado un incremento de todos los caracteres vinculados al tamaño corporal excepto DO en ambos sexos y afectó a la conformación del ala de los machos. Otra mutación (BG02380) causó un aumento de LT y TA así como una modificación extrema de la conformación del ala únicamente en los machos. Finalmente, la tercera mutación (BG02113) afectó sólo a la conformación del ala aunque lo hizo en ambos sexos, mientras que la cuarta (BG01662) aumentó DO en las hembras y una disminuyó TA en los machos. Como se dijo anteriormente, estos resultados indican que el sitio exacto del transposón determina el efecto fenotípico de la mutación, como fue observado para distintos genes en relación a los caracteres morfológicos estudiados en esta tesis (Capítulos 2 y 3) así como para otros caracteres (Rollmann *et al.*, 2006). De acuerdo con la información disponible en Flybase (Flybase, quinta publicación), existen abundantes referencias que relacionan a *LanA* predominantemente con el desarrollo del ala de *Drosophila*. Sin embargo, recientemente algunos autores realizaron pruebas de complementación para identificar loci vinculados a los QTLs que previamente habían identificado como responsables de la variación natural vinculada al almacenamiento de triacilglicerol (De Luca *et al.*, 2005; 2008). Entre los genes candidatos identificados se encuentra *LanA*, el cual tiene una homología de secuencia significativa con la Laminina 5 de los mamíferos codificada por *LAMA5*. En los humanos, la región cromosómica en la que se localiza este gen ha sido relacionada con el índice de masa corporal y el porcentaje de grasa corporal (Durkin *et al.*, 1997; Rankinen *et al.*, 2006.). Esto llevó a dichos autores a investigar si los polimorfismos en *LAMA5* contribuyen a la variación natural del peso corporal y la adiposidad en humanos y encontraron una relación significativa entre algunas variantes moleculares y determinados indicadores del peso corporal (De Luca *et al.*,

2008). De acuerdo con estos autores, los resultados sugieren que *LanA* cumple un rol que se ha conservado en la evolución de los organismos en relación a la variación del peso y la composición corporal. Sería interesante profundizar en el conocimiento acerca de la manera en la que este gen se relaciona con el control del tamaño corporal y como ha ocurrido su evolución a través del estudio de distintas especies representantes de todo el reino animal.

Por otro lado, *sd* también parece ser un gen muy importante en relación a los distintos caracteres morfológicos estudiados, ya que las dos mutaciones independientes de este gen (líneas BG01633 y BG02605; Capítulos 2 y 3) afectaron de diferente manera tanto a los distintos caracteres vinculados al tamaño corporal como a la conformación del ala. En particular, una de esas mutaciones (BG01633) se destacó por haber causado un incremento de todos los caracteres vinculados al tamaño corporal excepto DO y haber causado una modificación extrema de la conformación del ala en ambos sexos. Sin embargo, la otra mutación sólo causó el aumento de DO en ambos sexos y de TA en los machos. Nuevamente, estos resultados indican que el sitio exacto del transposón determina el efecto fenotípico de la mutación (Capítulos 2 y 3; Rollmann *et al.*, 2006). Asimismo, también en este caso, la abundante información referida a *sd* que se encuentra disponible en Flybase (Flybase, quinta publicación) se relaciona predominantemente con el desarrollo del ala de *Drosophila*. Sin embargo, recientemente se ha vinculado a este gen con el camino de señalización denominado Hippo (Hpo), el cual tiene su análogo en los mamíferos y parecería que cumple un rol importante en la regulación del tamaño de los órganos a través de la proliferación celular (Dong *et al.*, 2007; Pan, 2007; Saucedo & Edgar, 2007). Aparentemente, Hpo se autofosforilaría y posteriormente fosforilaría a Warts, que haría lo mismo con otras proteínas efectoras entre las que se encuentra Yorkie (Yki). Yki es un co-activador transcripcional que no se une a ADN (Huang *et al.*, 2005). Recientemente se ha establecido que Sd es uno de los factores de transcripción a los que se une Yki, con el cual forma un factor de transcripción heterodimérico que regula “blancos” río abajo de la señalización de Warts (Goulev *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Originalmente, Sd no fue un candidato obvio para ser el compañero de Yki porque su presencia parece ser requerida específicamente para el desarrollo neuronal y del ala (Campbell *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2000) donde, como ya fue mencionado (Capítulo 3), se une a Vg (Halder *et al.*, 1998; Simmonds *et al.*, 1998). En cambio, Yki parece ser necesario para el crecimiento normal y la supervivencia de todas las células imaginales (Huang *et al.*, 2005). Distintos estudios han demostrado que *sd* es requerido para generar el fenotipo de sobre-crecimiento asociado a la sobre-expresión de *yki* y a la mutación de los supresores de tumores del camino de señalización de Warts (Goulev *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Aunque los resultados de los estudios más recientes no dejan lugar a dudas en cuanto a la relación de estas proteínas, no pueden explicar las

diferencias fenotípicas existentes entre los mutantes de ambos genes. Reddy e Irvine (2008) pensaron que esto podría explicarse mediante la existencia de otro factor de transcripción al que se una Yki fuera del ala. Alternativamente, estos autores plantearon la posibilidad de que Sd funcione como un activador transcripcional en presencia de Yki y como un represor de la transcripción en su ausencia (Reddy & Irvine, 2008). Tal represión de los “blancos” normales del camino de señalización de Warts explicaría la inhibición del crecimiento y la promoción de la apoptosis causada por la sobre-expresión de *sd* (Liu *et al.*, 2000). En este caso, la ausencia de Sd diferiría de la de Yki porque los genes “blanco” sería des-reprimidos sin Sd pero serían reprimidos sin Yki (Reddy & Irvine, 2008). Si bien *yki* y *vg* influyen en el crecimiento del ala y afectan a algunos genes “blanco” comunes allí; distintos experimentos señalan que cumplen diferentes funciones, de lo que se deduce que deberían diferir en relación con algún “blanco” de señalización. En ese sentido, Yki podría influenciar la especificidad de unión a ADN de Sd, tal y como se ha demostrado que ocurre con Vg (Halder & Carroll, 2001).

Los resultados mencionados anteriormente, relacionados con el efecto fenotípico de distintas mutaciones de *sd*, aparentemente constituyen un aporte significativo al conocimiento del rol de este gen en el control de la proliferación celular y el tamaño del cuerpo en general. Por un lado, estos resultados sugieren que *sd* desempeña algún papel en el crecimiento de distintas estructuras además del ala. Por otro lado, el efecto fenotípico de las distintas mutaciones parece apoyar a la segunda de las hipótesis planteadas por Reddy e Irvine (2008), mencionadas anteriormente. En ese sentido, distintas mutaciones podrían haber afectado a distintos sitios de *sd* de forma tal de que el producto resultante pudiera unirse de manera diferente a los co-activadores (Yki y Vg) y /o a la secuencia “blanco” de ADN. En particular, los cambios podrían haber incrementado la especificidad de unión a dichas secuencias, debido a que las mutaciones generalmente causaron un sobre-crecimiento. Sería necesario realizar otros estudios más específicos para dilucidar las causas moleculares de los cambios fenotípicos en cada caso.

Los antecedentes mencionados en relación a *LanA* y *sd*, que constituyen sólo una muestra de todos los que han surgido en el transcurso del último año; permiten vislumbrar los experimentos que podrían llevarse a cabo de ahora en más, a partir de las listas de genes candidatos que se han generado. En primera instancia, sería apropiado generar líneas que difieran entre sí en relación al cromosoma 3 o el X que se haya puesto en homocigosis y derive de la naturaleza; de forma tal de extender los experimentos desarrollados a lo largo de esta tesis a genes localizados en esos cromosomas. Asimismo, para algunos de los genes más importantes (por ejemplo, los mencionados anteriormente o *Lsd-2* y *msn*) se podrían generar líneas en las que se observe una reversión del fenotipo mutante tras haber retirado el elemento *P* causante de

la mutación (líneas revertantes), de forma tal de confirmar la participación del gen analizado en la expresión del carácter respectivo. Posteriormente, se podrían realizar experimentos de expresión de dichos genes (por ejemplo, *Real Time-PCR* ó *Microarrays*) que permitan conocer la/s etapa/s del desarrollo y/o el/los lugar/es del cuerpo en los que estos se expresan, de forma tal de dilucidar la relevancia de los mismos en la regulación del tamaño de distintas estructuras corporales. Finalmente, se podrían llevar a cabo estudios que permitan conocer las bases moleculares de la variación entre los alelos involucrados en la expresión de los caracteres analizados en la naturaleza y, de esta manera, identificar sitios nucleotídicos polimórficos ó SNPs (por su sigla en inglés: *Single Nucleotide Polymorphisms*).

## Conclusiones generales

Los resultados de esta tesis globalmente sugieren:

- que la arquitectura genética de los distintos caracteres morfológicos analizados es diferente y depende en gran medida del sexo y de la temperatura de cría;
- que existe abundante variación genética natural asociada al cromosoma 2 para todos esos caracteres, algunos de los cuales mostraron patrones clinales;
- que la temperatura media sólo puede brindar una explicación parcial de los patrones observados en la naturaleza, por lo que deben considerarse otros factores que presentan diferencias entre gradientes geográficos que pueden dar cuenta de los mismos y de la evolución de los caracteres morfológicos en general;
- que las relaciones alométricas entre los caracteres así como el dimorfismo sexual asociado a ellos son mantenidos dentro de cierto rango de variación en la naturaleza por la acción de la selección natural, de lo que se deduce que algunas de las mutaciones generadas podrían representar alelos que serían eliminados en la naturaleza;
- que existen altos niveles de variabilidad en las poblaciones naturales estudiadas con respecto a los genes implicados en la expresión de los distintos caracteres analizados aunque su expresión estaría en gran medida canalizada en relación a la conformación del ala.

En este recorrido hemos tratado de contribuir a la caracterización de la arquitectura genética de caracteres vinculados al tamaño y la forma corporal en *D. melanogaster*. De esta manera, hemos aportado resultados novedosos vinculados con algunos de los factores cuyo análisis es esencial en los estudios de estas características. Asimismo, hemos discutido dichos resultados intentando tener en cuenta todos los antecedentes vigentes acerca del desarrollo

morfológico, tanto en el plano ontogenético como en el evolutivo. Esperamos que este trabajo haya resultado ser de interés para el lector y que constituya un aporte significativo al conocimiento general acerca de la arquitectura genética de la morfología.

---

## **Anexo metodológico I**

Líneas de *D. melanogaster* y diseño experimental general utilizados a lo largo de la tesis.

---

### **Líneas de *D. melanogaster* utilizadas en la primera parte del trabajo**

Las líneas utilizadas en esta parte de la tesis se obtuvieron en el marco del proyecto denominado *Berkeley Drosophila Genome Project* (BDGP; Bellen *et al.*, 2004; Spradling *et al.*, 1995, 1999). A partir del stock B de la cepa *Canton-S* se generó una línea homocigota para todos los loci (línea isogénica), mediante un protocolo de cruzamientos en el cual se utilizaron cepas con cromosomas balanceadores que tienen marcadores fenotípicos dominantes (ver más adelante). La línea isogénica que se obtuvo se denominó *Canton-S B*. Mediante otro protocolo de cruzamientos, se insertó en un lugar al azar del genoma de *Canton-S B* un elemento transponible que, generalmente, interrumpe la secuencia de un gen (Lukacsovich *et al.*, 2001). Como resultado de la implementación de dicho protocolo, se generaron numerosas líneas isogénicas. Todas estas líneas poseen el mismo fondo genético y sólo difieren en la ubicación del elemento transponible, que también se encuentra en homocigosis.

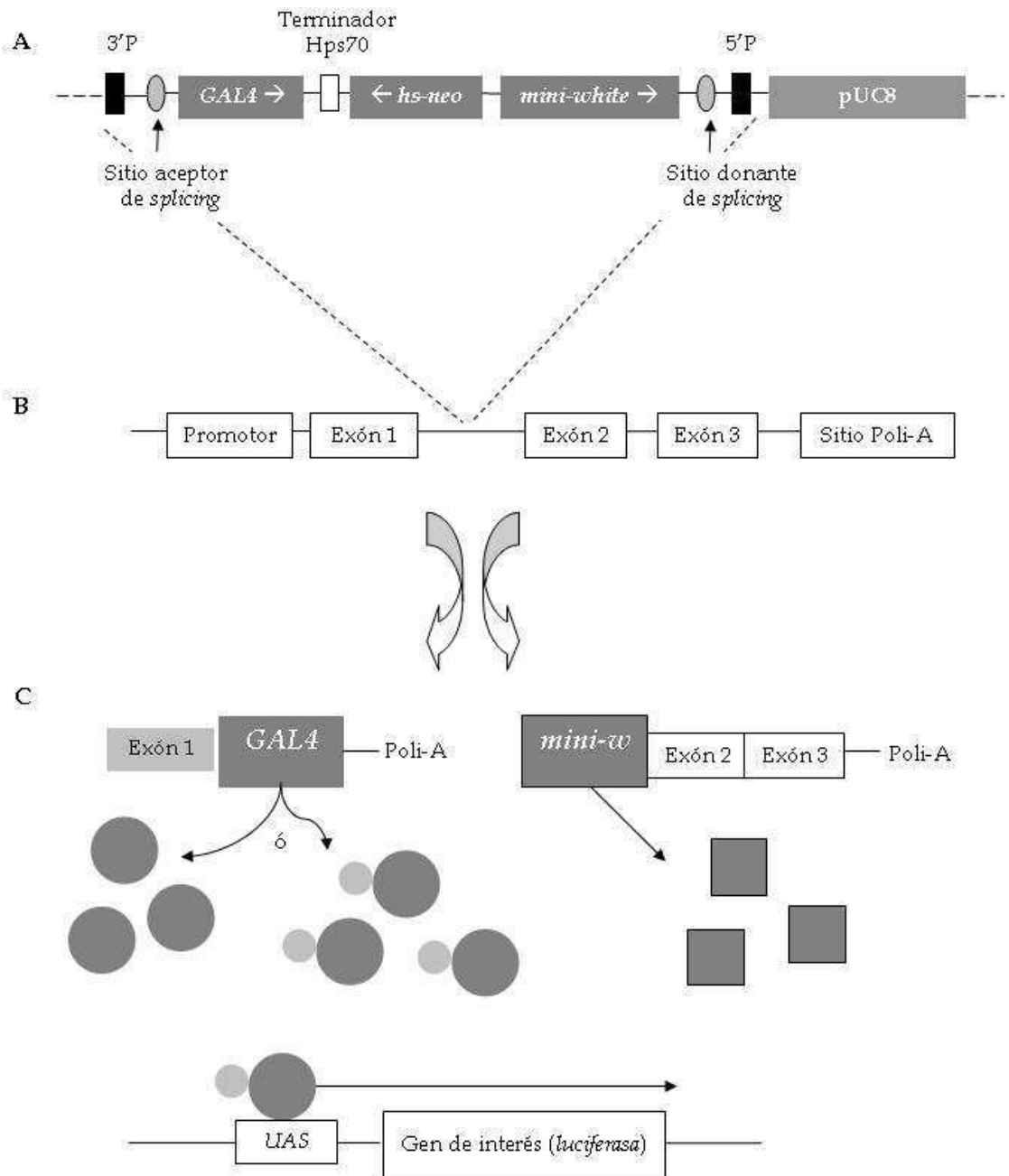
El vector utilizado como agente mutagénico es el elemento *P[GT1]* (Figura AI.1), que es un elemento transponible modificado que se inserta preferencialmente en la región regulatoria 5' de las unidades funcionales de transcripción (Spradling *et al.*, 1995). De esta manera, el promotor del gen reportero que lleva el inserto se activa por una secuencia *enhancer* cercana. Este método, llamado *enhancer-trap*, ha sido ampliamente utilizado para identificar nuevos genes en *Drosophila* de acuerdo con sus patrones de expresión (Bellen *et al.*, 1989; Bier *et al.*, 1989; O'Kane & Gehring, 1987; Wilson *et al.*, 1989). Este sistema también ha sido empleado para generar marcadores específicos de células o tejidos o para manipular un tipo particular de células a través de la expresión dirigida de transgenes de manera circuncortada (Bello *et al.*, 1998; Brand & Perrimon, 1993). A pesar de de la alta incidencia de la expresión del gen reportero, muchas de las líneas generadas a partir de éste método no exhiben fenotipos mutantes detectables. Esto significa que el sitio genómico en el que el inserto se ha integrado se encuentra bajo la influencia de una secuencia *enhancer* particular con un efecto pequeño en la transcripción del gen adyacente. Entonces, las líneas *enhancer-trap* típicamente no proveen de información funcional sobre los genes cercanos, aunque son bastante útiles para monitorear la actividad *enhancer* cercana al sitio de inserción del vector. En muchos casos, este patrón de

expresión recuerda el del transcripto de un gen intrínseco. Sin embargo, el gen puede hallarse a decenas de kilobases del punto de inserción. En tales circunstancias, el clonado y análisis del gen en cuestión podría consumir mucho tiempo. Una situación aún más complicada puede aflorar en algunas líneas *enhancer-trap* en las que la expresión del gen reportero es influenciada por múltiples secuencias *enhancer* correspondientes a unidades de transcripción diferentes (Bolwig *et al.*, 1995).

Dada la existencia de estos problemas inherentes al sistema *enhancer-trap*, Lukacsovich y colaboradores (2001) desarrollaron un nuevo método, denominado sistema *dual-tagging-gene-trap*, que utiliza otro vector (Figura AI.1). Este constructo contiene como gen reportero primario a *GAL4*, un factor de transcripción de hongos que funciona en *Drosophila*. En el constructo, este gen carece de promotor (pero tiene secuencia de poliadenilación), por lo que sólo se expresa cuando su RNA mensajero (RNA<sub>m</sub>) se une covalentemente a un RNA<sub>m</sub> endógeno ya sea mediante *splicing* o por transcripción directa. De esta manera, el patrón de expresión del gen reportero es exactamente el del gen “atrapado” ya que la transcripción ocurre a partir del promotor de ese gen. Todas las líneas que contienen el inserto son mutantes porque los transcriptos de los genes “atrapados” pierden su función como resultado de la fusión con la secuencia insertada. Además, este sistema invariablemente conduce a la fusión de los productos del gen reportero y una secuencia exónica del gen insertado. Esta fusión de los productos en las líneas mutantes permite realizar el clonado de manera más fácil y rápida.

Pocos estudios han procurado desarrollar sistemas *gene-trap* en *Drosophila* (Dunn *et al.*, 1993). Esto posiblemente se debe a que se espera que estos sistemas provean menos líneas que muestren la expresión del gen reportero que los sistemas *enhancer-trap*. En el sistema *enhancer-trap*, el gen reportero se expresa independientemente de la orientación relativa al gen en el que ocurre la inserción, mientras que en el sistema *gene-trap* el vector debe estar integrado en la misma orientación que el gen “atrapado”. Para sortear este inconveniente, el vector utilizado por Lukacsovich y colaboradores (2001) emplea otro marcador independiente de *GAL4*, el gen *mini-white* (*mini-w*), de forma tal de marcar al gen “atrapado” dos veces (Figura AI.1). *mini-w* tiene su propio promotor pero carece de la secuencia de poliadenilación. Entonces, sólo cuando el elemento *P* se inserta dentro de una unidad de transcripción, el RNA<sub>m</sub> fusionado se traduce dando como producto ambas proteínas funcionales, *GAL4* y *White* (Figura AI.1). La primera puede activar la transcripción de cualquier gen localizado río abajo de la señal de *UAS* mientras que la segunda confiere un color de ojos oscuro, implicando la inserción exitosa del constructo en un gen (Figura AI.1).





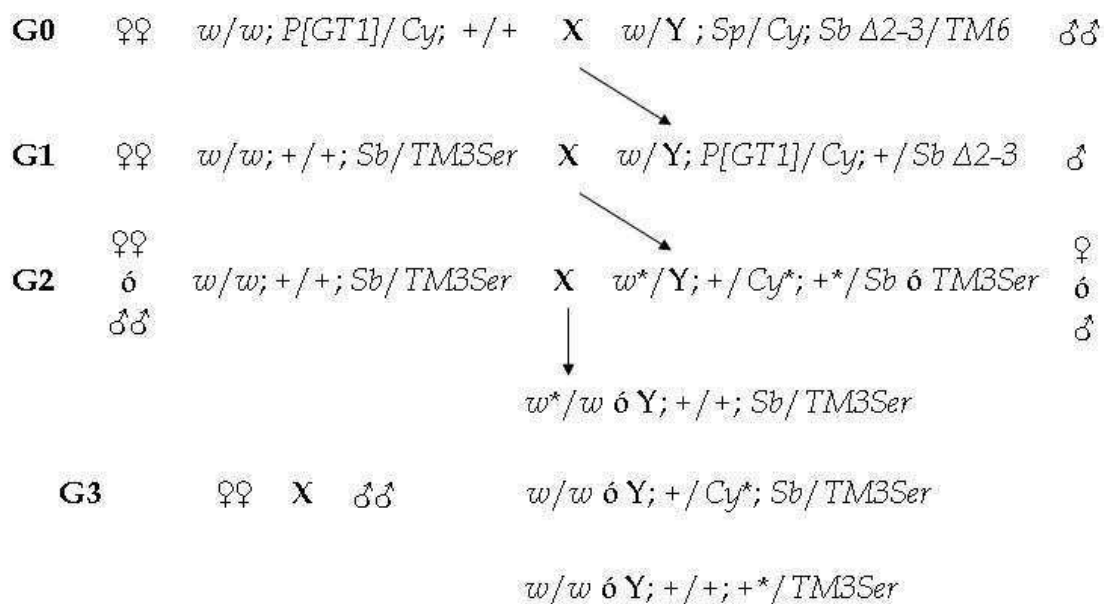
**Figura AI.1:** Representación esquemática del sistema *dual-tagging-gene-trap*. A) Esquema del elemento transponible *P[GT1]*. 3'P y 5'P son los extremos del elemento *P*. B) El elemento *P* cuando se integra en el genoma. A partir de la transcripción se producen dos transcritos fusionados, uno que codifica la secuencia de *GAL4* fusionada a la porción 5' del gen interrumpido y otro que codifica la secuencia de *mini-w* fusionada a la porción 3' del gen. C) El RNA<sub>m</sub> fusionado se traduce en dos proteínas funcionales, Gal4 (círculos gris oscuro) y White (cuadrados gris oscuro). Por un lado, Gal4, que puede estar unido o no al producto codificado por un exón ubicado del lado 5' (círculos gris claro); puede activar la transcripción de cualquier gen que se encuentre bajo el control de *UAS*. Por otro lado, White confiere pigmentación a los ojos implicando una inserción exitosa del elemento *P*. Figura modificada de Lukacsovich y colaboradores (2001).

El vector contiene un tercer marcador, el gen *hs-neo*, que permite recuperar las moscas que contienen el vector aún cuando la inserción haya ocurrido fuera de una unidad transcripcional (Figura AI.1). Asimismo, el elemento móvil contiene el plásmido pUC8, el cual posee un sitio de origen de replicación bacteriano y un gen de resistencia a antibióticos (Figura AI.1). Ambas herramientas moleculares se utilizan para clonar la secuencia flanqueante a la inserción.

Las líneas mutantes fueron obtenidas mediante el empleo de la técnica *jump-start* (Cooley *et al.*, 1988), utilizando como elemento mutagénico al vector *P[GT1]* para atrapar genes y a otro transposón como activador de la transposición (denominado *jump-starter*) dado que es el que posee la secuencia codificadora de la transposasa (Lukacsovich *et al.*, 2001). Como se mencionó anteriormente, el proceso de obtención de las líneas mutantes consiste en la utilización de un esquema de cruzamientos que permite insertar el elemento transponible en un background isogénico (Figura AI.2). A continuación se explica brevemente qué líneas se utilizaron y como se realizó la secuencia de cruzamientos, que se muestra de manera simplificada en la Figura AI.2.

El primer cruzamiento (Go) se realiza entre una hembra isogénica heterocigota para la inserción del elemento móvil en el cromosoma 2 (el cual no puede transponerse ya que no posee la enzima transposasa) y un macho que en el cromosoma 3 cuenta con el marcador fenotípico dominante, letal recesivo, *Stubble* (*Sb*); cuyo carácter diagnóstico es la presencia de quetas cortas. Este gen se encuentra ligado al gen  $\Delta 2-3$ , que codifica para la enzima transposasa responsable del salto del elemento *P*. El homólogo de este cromosoma es un cromosoma balanceador (por ejemplo, *Tm6*), el cual evita la recombinación por lo que los genes  $\Delta 2-3$  y *Sb* segregan ligados. Todas las moscas utilizadas tienen ojos blancos y alas curvas debido a la presencia de los marcadores *white* (*w*) y *Curly* (*Cy*) respectivamente.

De la descendencia del cruzamiento anterior se eligen los machos que presentan los marcadores fenotípicos que indican la ocurrencia de un evento de transposición (los que tienen ojos coloreados en mosaico). En estos machos, la enzima transposasa reconoce las regiones terminales del elemento móvil permitiendo la transposición no replicativa (que se va a manifestar en la próxima generación). De esta manera, el elemento transponible se inserta al azar en algún lugar del genoma interrumpiendo la secuencia de una determinada región de alguno de los 4 cromosomas. Por lo tanto, con cada uno de estos machos se puede fundar una línea mutante independiente, debido a que existe una única transposición por individuo siendo la ubicación de la misma aleatoria.



**Figura AI.2:** Esquema simplificado de los cruzamientos empleados para obtener las líneas utilizadas en la primer parte de la tesis (líneas BDGP). El asterisco (\*) simboliza la posible inserción del elemento móvil (ver el texto para más detalles). Figura modificada de Lukacsovich y colaboradores (2001).

Los machos elegidos se cruzan en el cruzamiento G1 individualmente con hembras que portan el fondo genético que se desea obtener para estas líneas. Este cruzamiento tiene como objetivo eliminar el cromosoma que tiene el gen de la transposasa para evitar nuevos eventos mutagénicos. De esta forma, se utilizan hembras que poseen el cromosoma 3 balanceador (*TM3Ser*) de forma tal de impedir la recombinación de los homólogos. Además, estas hembras poseen el marcador *Sb* en este cromosoma, lo que permite elegir entre los individuos de la progenie a los parentales de la siguiente generación (G2).

A partir de este punto, el objetivo es poner en homocigosis el elemento transponible y eliminar los cromosomas que poseen los marcadores fenotípicos dominantes recuperando el fondo isogénico. De esta manera, todas las moscas con ojos pigmentados y sin alas curvas son descartadas para eliminar la posibilidad de recuperar el cromosoma con la inserción original. Cada mosca con ojos pigmentados se cruza con moscas del otro sexo que tengan un cromosoma 3 balanceado (*Sb/TM3Ser*). La descendencia de este cruzamiento tiene el cromosoma mutado de un parental.

De esta manera, en el primer paso del *screening*, se seleccionan las moscas con color de ojos intenso como las candidatas más probables a haber sufrido un evento exitoso de “captura de gen”. Luego, se chequea la expresión de *GAL4 in vivo* en los descendientes del cruzamiento de estas líneas con una línea portadora del gen de la luciferasa, que se encuentra bajo el control

del promotor *UAS* y cuyo producto puede ser revelado por un detector de luminiscencia (Brandes *et al.*, 1996).

Esta metodología permite obtener mutantes en cualquiera de los cromosomas de *D. melanogaster*. Las líneas obtenidas son isogénicas (comparten el mismo fondo genético) y sólo difieren en que cada una presenta una única inserción de un elemento *P* que ocurrió al azar en cualquier región codificante del genoma. Además se cuenta con una línea libre de inserciones que posee el mismo fondo genético (*Canton-S B*), la cual puede ser utilizada como control. Este sistema permite, tras criar a las moscas bajo las mismas condiciones, atribuir las diferencias fenotípicas observadas entre las líneas BDGP y el control a factores genéticos y, en este caso en particular, a la mutación debida a la inserción del elemento *P* que, generalmente, afecta a un único gen.

Como se dijo anteriormente, el elemento *P[GT1]* presenta varias herramientas moleculares que facilitan el clonado de la secuencia flanqueante a la inserción (Lukacsovich *et al.*, 2001); la cual puede pertenecer tanto una región eucromática como a una heterocromática (Bellen *et al.*, 2004). Estas secuencias se obtuvieron mediante la secuenciación de los productos de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) inversa (Bellen *et al.*, 2004). El protocolo detallado se encuentra disponible en la página de Internet del BDGP (<http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/pscreen>). Brevemente, el primer paso consiste en la digestión del ADN genómico de una determinada línea con una enzima de restricción que posee un único sitio de corte en el elemento *P[GT1]*; por lo que el siguiente corte se produce en la secuencia flanqueante a la inserción. En el siguiente paso se emplea una ligasa, y de esta forma, se unen los extremos cohesivos. El fragmento de ADN circular contiene la región 3' del *P[GT1]* y parte de la secuencia flanqueante a la inserción. Esta secuencia es clonada a través de una PCR inversa y los productos obtenidos a partir de esta reacción son posteriormente secuenciados (Liao *et al.*, 2000). La información de la secuencia flanqueante a la inserción correspondiente a cada una de las líneas también se encuentra disponible en el sitio de Internet del BDGP (<http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/pscreen>).

### **Líneas de *D. melanogaster* utilizadas en la segunda parte del trabajo**

Las líneas utilizadas en esta parte de la tesis fueron generadas en el marco de un proyecto de mayor envergadura que se está llevando a cabo en el laboratorio en el que se desarrolló esta tesis. En este proyecto se planea obtener líneas isogénicas para sustituciones cromosómicas para el cromosoma 2 y cromosoma 3 que provienen de poblaciones naturales. Las líneas generadas, que son isogénicas, poseen el mismo fondo genético y sólo difieren con respecto al cromosoma que ha sido sustituido por un cromosoma (2 o 3) natural. De esta

manera, se puede investigar la variabilidad genética natural subyacente al cromosoma sustituido. En el marco de esta tesis se utilizaron las líneas isogénicas sustituidas para el cromosoma 2, las cuales son portadoras del mismo fondo genético que el utilizado para generar las líneas BDGP (*Canton-S B*).

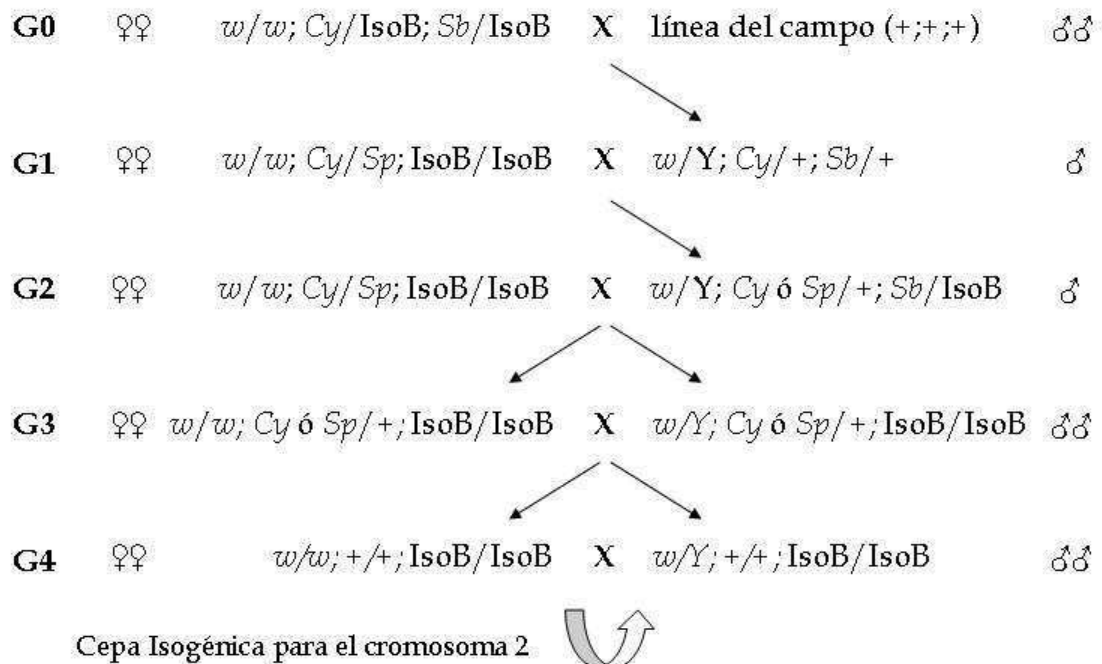
Para obtener estas líneas se empleo un esquema de cruzamientos en el que se utilizaron cepas portadoras de cromosomas balanceadores e isolíneas de *D. melanogaster* provenientes de varias poblaciones naturales dispuestas a lo largo de gradientes geográficos del Oeste argentino. Una isolínea es una línea de moscas cuyos integrantes descienden de una única hembra fecundada, que ha sido mantenida en forma aislada de otros individuos de su misma especie, tras haber sido colectada en el campo (David, 2005). A continuación se explica brevemente qué líneas se utilizaron y cómo se realizó la secuencia de cruzamientos, que se muestra de manera simplificada en la Figura AI.3.

El primer cruzamiento (G0) se realiza entre una hembra homocigota para el gen marcador que confiere ojos blancos (*w*) y heterocigota para los otros dos cromosomas que contienen los genes marcadores *Cy* (cromosoma 2) y *Sb* (cromosoma 3). Los homólogos de estos cromosomas son el 2 y el 3 de la línea *Canton-S B* (de ahora en adelante IsoB). Vale la pena recordar que IsoB es la línea control de las líneas BDGP (línea que posee igual fondo genético pero carece de la inserción del elemento *P*).

De la descendencia del cruzamiento anterior se eligen los machos que presentan los marcadores fenotípicos mencionados (*w*, *Cy* y *Sb*). En estos machos se puso en heterocigosis un cromosoma 2 y un cromosoma 3 de la isolínea utilizada. Por lo tanto, con cada uno de ellos se puede fundar una línea isogénica independiente. Debido a esto, en G1, los machos elegidos se cruzan de manera individual con hembras homocigotas para el gen *w* y el cromosoma 3 IsoB y heterocigotas para genes marcadores presentes en el cromosoma 2: un homólogo lleva *Cy* mientras el otro contiene el marcador fenotípico *Sternopleural (Sp)*, que confiere la presencia de un penacho de quetas (largas si la mosca tiene genotipo salvaje o cortas si su genotipo es *Sb*) en el costado del tórax, detrás del primer par de patas. Este alelo, al igual que *Cy* y *Sb*, es un marcador fenotípico dominante pero letal recesivo.

Para el siguiente cruzamiento (G2) se eligen machos con el mismo fenotipo que en el caso anterior (*w*, *Cy* y *Sb*) ó con el fenotipo dado por *Sp* en lugar de *Cy*; debido a que estos son los únicos que presentan el cromosoma natural 2 (en estos, el cromosoma natural 3 fue reemplazado por el IsoB). Estos machos son cruzados individualmente con hembras de la cepa utilizada en el caso anterior de forma tal de generar machos y hembras con el fenotipo dado solamente por los marcadores *w* y *Cy* ó *Sp*.

A partir de este punto, el objetivo es poner en homocigosis el cromosoma 2 derivado de la isolínea correspondiente. De esta manera, de los descendientes del cruzamiento entre hermanos (G3), se descartan todas las moscas con el fenotipo dado por *Cy* ó *Sp* y se cruzan entre si las moscas que tienen ojos blancos y son salvajes para el resto de los caracteres.



**Figura AI.3:** Esquema simplificado de los cruzamientos empleados para obtener las líneas utilizadas en la segunda parte de la tesis (ver el texto para más detalles).

Esta metodología permite obtener líneas idénticas entre si salvo por la particularidad de que cada una presenta un cromosoma natural diferente en homocigosis; ya que su fondo genético (el resto de los cromosomas) es idéntico al de las líneas BDGP (IsoB). Este sistema permite, tras criar a las moscas bajo las mismas condiciones, atribuir las diferencias fenotípicas observadas entre las líneas a factores genéticos, en este caso, presentes en el cromosoma 2.

### Mantenimiento de las líneas de trabajo

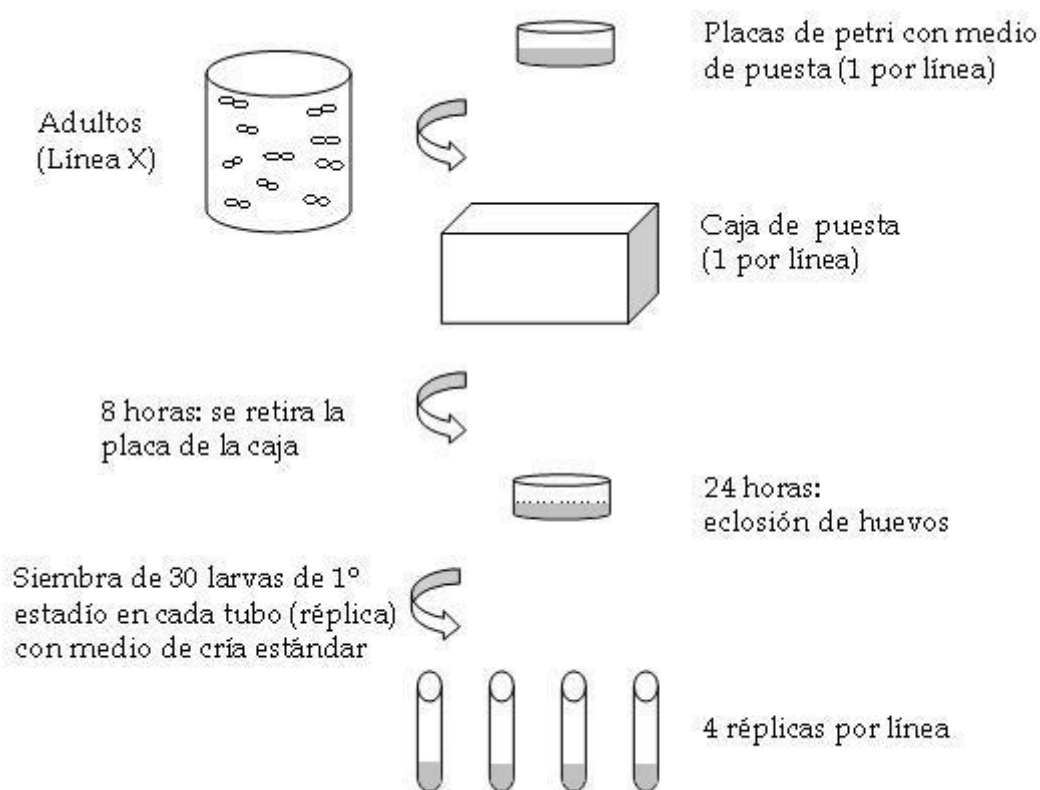
En el transcurso de los distintos experimentos desarrollados a lo largo de la tesis, el mantenimiento de las cepas se realizó colocando a los individuos adultos en recipientes (tubos o frascos de vidrio o de plástico) con medio de laboratorio estándar. Los adultos fueron transferidos, aproximadamente cada 15 días, a recipientes estériles con medio de cría fresco para evitar problemas de mortalidad larvaria denso-dependiente. En aquellos momentos en los

que fue necesario obtener una gran cantidad de individuos de determinada cepa para realizar un experimento, el procedimiento mencionado anteriormente se realizó con una mayor frecuencia.

Cada vez que se realizó un esquema de cruzamientos como los detallados en los apartados anteriores o, en general, un cruzamiento determinado de forma tal de obtener moscas con un genotipo de interés; las hembras de las cepas utilizadas debían ser vírgenes (Roberts, 1998). Esto se debe a que, luego de haberse llevado a cabo el cortejo y el apareamiento, las hembras son capaces de guardar el espermatozoos en su receptáculo ventral y en su espermateca. Este espermatozoos almacenado es suficiente para que las hembras puedan poner huevos fértiles durante muchos días: en condiciones ideales pueden hacerlo a lo largo de una semana a una tasa de 100 huevos por día y, en condiciones menos favorables, en un periodo mayor a una tasa diaria menor (Roberts, 1998). Como los machos y las hembras eclosionarán en el mismo recipiente, puede haber cruzamientos entre hermanos de forma tal que los cruzamientos no ocurrirían de la manera esperada. Por lo tanto, en estos casos, se llevó adelante el protocolo que se detalla a continuación de forma tal de obtener la cantidad necesaria de hembras vírgenes de las cepas correspondientes (Roberts, 1998). En condiciones normales, los individuos de *D. melanogaster* no se aparean hasta las 8 horas posteriores a su emergencia del adulto. Por este motivo, se puede descartar los individuos adultos emergidos en los recipientes de cría (dejando las pupas y las larvas) a la mañana y, una vez transcurridas alrededor de 5 horas, se pueden extraer los adultos emergidos en ese período de tiempo de forma tal de guardar las hembras. Entonces, se puede repetir este procedimiento al menos dos veces por día. Los recipientes de los que se extraen las hembras vírgenes pueden guardarse a una temperatura menor (por ejemplo a 17°C) durante la noche, de forma tal de reducir la tasa de desarrollo y eclosión de los individuos. De la misma manera, se pueden almacenar a una temperatura mayor (a 25°C) durante el día para adelantar su emergencia en ese período. Dos o tres días después, se puede inspeccionar los tubos en los que se guardaron las hembras para verificar que estas sean efectivamente vírgenes. Si los tubos no muestran señales de la presencia de larvas, se confirma que las hembras son vírgenes. De esta forma, las hembras pueden ser utilizadas en los cruzamientos de interés lo cual debe ocurrir, preferentemente, en el transcurso de los días siguientes para que no se vuelvan muy viejas. Para evitar esto y en concordancia con lo mencionado anteriormente, en aquellos casos en los que se necesita una gran cantidad de moscas de cada cepa (debido a lo cual habría que llevar adelante este procedimiento durante muchos días) es conveniente guardar a las hembras a una temperatura menor.

## Diseño experimental general utilizado a lo largo del trabajo

El diseño experimental general utilizado en los distintos experimentos desarrollados a lo largo de esta tesis se esquematiza en la Figura AI.4 y se describe a continuación.



**Figura AI.4:** Protocolo experimental general utilizado durante los distintos experimentos.

Por cada línea empleada, se utilizó una cámara de recolección de huevos que consistió en un recipiente de acrílico transparente de 5 x 20 x 12 cm. En cada una de ellas se colocó un número abundante de moscas sexualmente maduras de cada sexo (150 parejas aproximadamente) de una determinada línea. Asimismo, se colocó una placa de Petri conteniendo un medio de oviposición preparado con 1 gramo de agar en polvo disuelto en 60 mililitros de agua destilada y cocinado hasta el primer hervor. Posteriormente, una vez que la solución se solidificó, se efectuaron estrías en su superficie utilizando una aguja de disección y se colocaron granos de levadura comercial seca (*Saccharomyces cerevisiae*). Por un lado, este procedimiento sirve como estímulo para la oviposición y, por otro lado, la levadura sirve de alimento para las moscas adultas y las larvas.

Transcurridas unas 8 horas, se retiraron las placas de Petri y se observaron bajo una lupa buscando la presencia de huevos. En los casos en los que no se encontraron huevos en la placa



correspondiente a una determinada línea, se volvió a llevar a cabo el procedimiento detallado anteriormente para esa línea en forma inmediata, utilizando los mismos adultos y placas de Petri con medio fresco.

Una vez retiradas las placas de Petri de las cajas de puesta, se dejaron pasar unas 30 horas hasta la eclosión de la mayor parte de los huevos. Al cabo de ese tiempo se recolectaron larvas de primer estadio de cada línea. Estas larvas fueron transferidas a tubos conteniendo unos 5 mililitros de medio de cultivo de preparado con puré de papa comercial, agua destilada y una sustancia antimicótica. Se sembraron 30 individuos en cada tubo de forma tal de mantener la densidad larvaria constante. Esta densidad es la que asegura que se produzcan un menor efecto de mortandad larvaria denso-dependiente. La transferencia de larvas se realizó con una espátula y el muestreo de larvas se hizo siempre al azar.

Las larvas fueron criadas en condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 1$  °C salvo en el experimento de plasticidad en el que la temperatura media a la que fue criado un grupo de líneas fue de 17 °C) y luz (12 horas de luz : 12 horas de oscuridad) hasta la emergencia de los adultos. Una vez emergido el primer adulto se recolectaron las moscas emergidas diariamente. Los individuos emergidos fueron separados por sexo y almacenados en el *freezer* para su posterior medición.

En los casos en los que la cantidad de tubos empleados en el experimento sobrepasó la capacidad de manipulación, se repitió el mismo procedimiento varias veces (es decir, se hicieron varios "bloques") midiendo entre 20 y 40 líneas cada vez.

---

## Anexo metodológico II

Medición y análisis estadísticos de las variables utilizadas a lo largo de la tesis.

---

### **Estimación de los caracteres morfológicos**

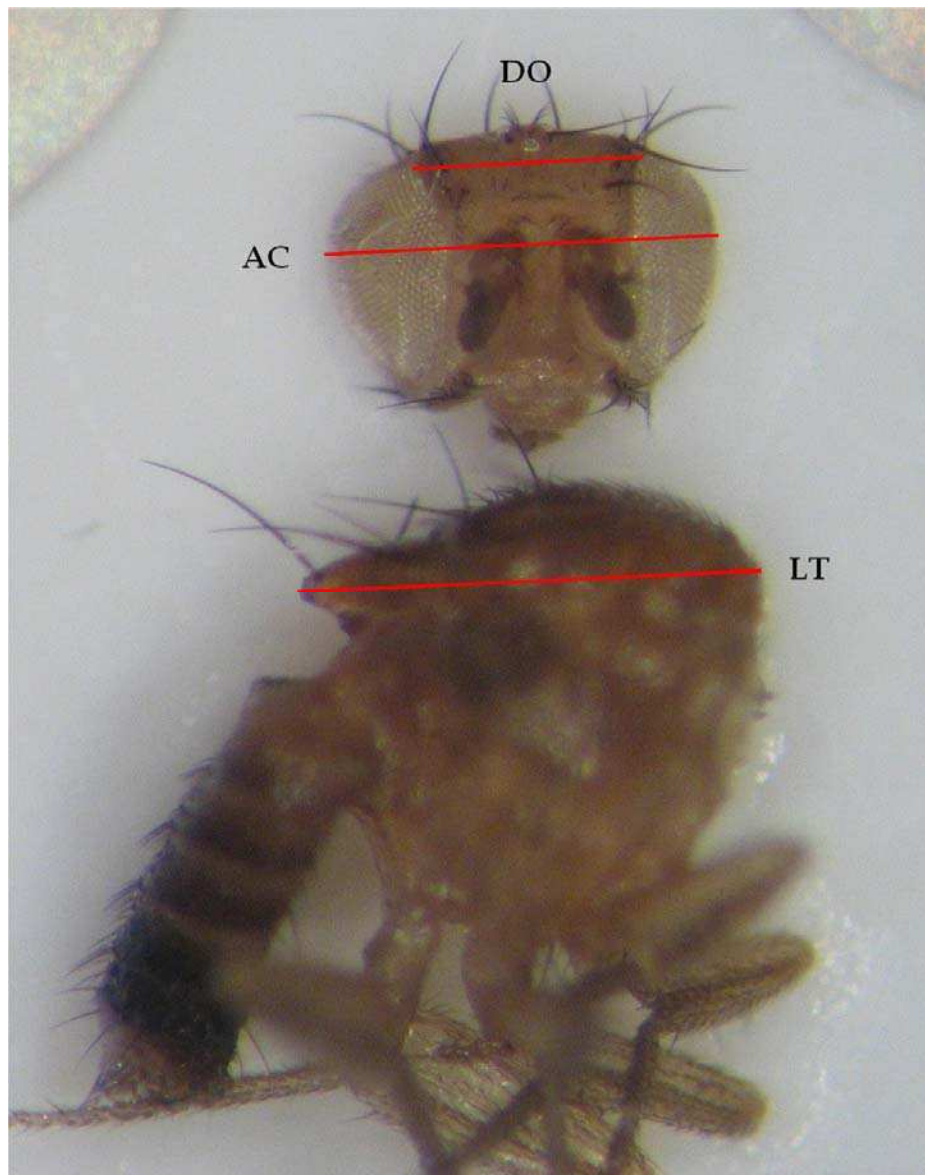
Del total de adultos emergidos en cada tubo se seleccionó un grupo de cada sexo al azar. Estos individuos fueron disecados montando las alas, la cabeza y el tórax de cada uno en un portaobjetos. La disposición relativa de las estructuras disecadas en el portaobjetos fue la misma al momento de tomar cada fotografía (Figura AII.1). Este material biológico fue fotografiado utilizando una lupa Leica MZ6 con una cámara digital Canon Powershot S50 acoplada a esta por medio de un adaptador Leica DC150 Camera y conectada a una computadora con el software Canon Utilities Remote Capture (Canon Inc., ©2000-2003). Todas las imágenes fueron tomadas con la misma resolución fotográfica y en las mismas condiciones de iluminación. Las imágenes obtenidas se utilizaron para realizar las mediciones morfométricas correspondientes mediante la utilización del programa tpsDig (Rohlf, 2001).

Se eligieron caracteres vinculados a distintas partes del individuo que provienen de discos imaginales diferentes (grupos de células que originan estas estructuras en la pupa; Gilbert, 1997), a fin de establecer el grado de independencia genética entre estos caracteres a lo largo del desarrollo. Bajo este criterio, se estimaron los siguientes caracteres morfológicos:

- |                         |   |   |
|-------------------------|---|---|
| ➤ Ancho de la cabeza    | } | Originados a partir del disco óculo-antenal |
| ➤ Distancia interocular |   |   |
| ➤ Largo del tórax       | } | Originados a partir del disco del ala       |
| ➤ Tamaño del ala        |   |   |
| ➤ Conformación del ala  |   |   |

Los caracteres vinculados a la cabeza y el tórax fueron estimados mediante la medición directa de las estructuras en las fotografías (*morfometría clásica*; Figura AII.1). En cambio, los caracteres relacionados con el ala fueron estimados a partir del establecimiento de 11 puntos homólogos (*landmarks*) en las intersecciones entre las venas y posterior tratamiento estadístico de las coordenadas generadas (*morfometría geométrica*, ver más abajo; Figura AII.6). De esta manera, el tamaño del ala fue estimado a partir de una variable univariada denominada *tamaño de centroide*, mientras que la conformación del ala fue estimada, por un lado, a partir de una

variable univariada denominada *distancia de procrustes* y, por otro lado, mediante las deformaciones relativas, que constituyen una aproximación multivariada (ver más abajo).



**Figura AII.1:** Disposición general de las estructuras disecadas de un individuo en el portaobjetos. Se muestran los caracteres, vinculados a la cabeza y el tórax, estimados mediante la medición directa de las estructuras en las fotografías (*morfometría clásica*): distancia interocular (DO), ancho de la cabeza (AC) y largo del tórax (LT).

## Generalidades sobre el estudio de la morfología

### El surgimiento y desarrollo de la morfometría

El estudio de la morfología ha tenido una importancia fundamental en el desarrollo de la biología desde sus comienzos. Esto se debe, principalmente, a que las diferencias más evidentes

entre los seres vivos son morfológicas. Por lo tanto, al estudiar este tipo de caracteres, se pueden comenzar a entender las causas de la diversidad biológica (Futuyma, 1998). Asimismo, los estudios morfológicos pueden ayudar a revelar los mecanismos que contribuyen a la evolución de los organismos así como los caminos evolutivos más probables y sus límites (Futuyma, 1998).

A principios del siglo pasado, la biología comenzó a volverse una ciencia más cuantitativa y el análisis de la morfología acompañó este proceso (Bookstein, 1998). Los estudios morfológicos incluían datos cuantitativos relacionados con una o más mediciones que se comparaban entre grupos. Simultáneamente, ocurrió un importante desarrollo de la estadística con el surgimiento de métodos tales como el análisis de correlación (Pearson, 1895), el análisis de varianza (Fisher, 1935) y el análisis de componentes principales (Hotelling, 1933). De esta manera, las metodologías utilizadas para cuantificar las diferencias morfológicas fueron refinándose a medida que se fueron desarrollando distintos métodos estadísticos que acompañaron al crecimiento y la sofisticación de las ciencias biológicas hasta consolidarse, hacia mediados del siglo XX, en lo que se conoce como Morfometría (Adams *et al.*, 2004). De esta manera, se denominó morfometría al estudio de la variación de la conformación y su covariación con otras variables (Bookstein, 1991; Dryden & Mardia, 1998).

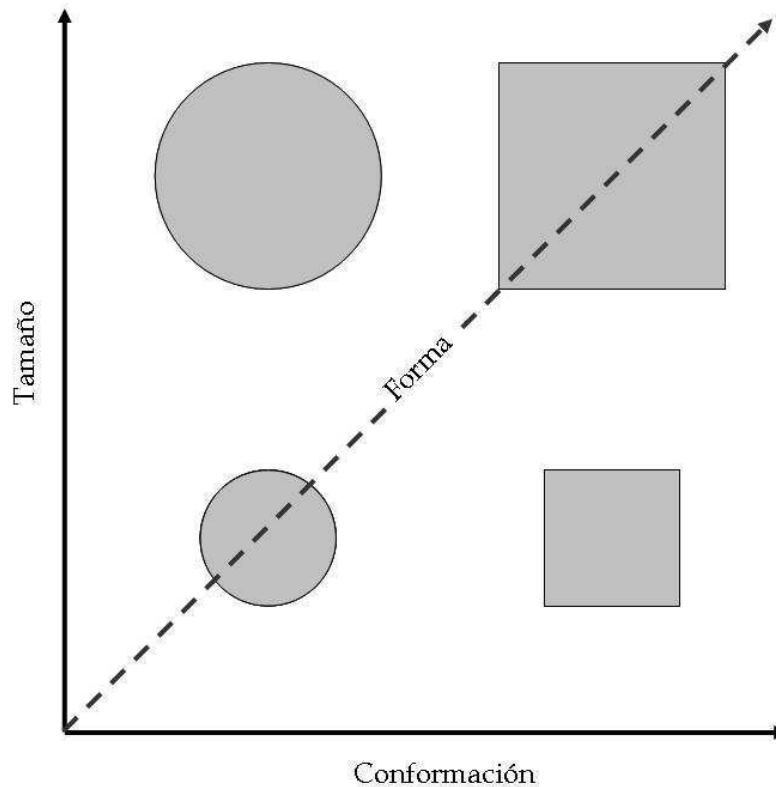
En las décadas de 1960 y 1970, se comenzó a utilizar todo el arsenal de herramientas de la estadística multivariada para describir los patrones de variación de la conformación. Esta aproximación al estudio de la morfología, generalmente denominado *Morfometría Tradicional* o *Clásica* (Marcus, 1990), consistía en la aplicación de análisis multivariados a grupos de variables cuantitativas. Usualmente se utilizaban medidas lineales como largos, anchos y alturas, pero a veces también se usaban variables más complejas como cocientes y ángulos (Adams *et al.*, 2004). Los análisis estadísticos incluían, por ejemplo, al Análisis de Componentes Principales ó PCA (por su sigla en inglés: *Principal Components Analysis*), el Análisis de variantes canónicas ó CVA (por su sigla en inglés: *Canonical Variates Análisis*) y el análisis de función discriminante. En muchos trabajos se realizaban estudios de alometrías (por ejemplo, Jolicoeur, 1963) y se intentaba desarrollar métodos que permitieran estudiar la conformación libre del componente debido al tamaño total de la estructura analizada (por ejemplo, Sundberg, 1989). Esto es importante porque diferentes métodos de corrección por tamaño generalmente conducían a resultados distintos. Asimismo, se volvía sumamente difícil probar la homología de las medidas lineales utilizadas. Finalmente, se podía obtener un mismo grupo de medidas lineales a partir de conformaciones diferentes. Por lo tanto, se infiere que la potencia estadística para revelar diferencias en la conformación era muy baja y difícilmente se podían generar representaciones gráficas del cambio en la conformación (Adams *et al.*, 2004).

Estas dificultades llevaron a los investigadores a explorar métodos alternativos que condujeron, hacia fines de la década de 1980 y principios de la de 1990, a un cambio en la forma de cuantificar la morfología y en la manera de analizar los datos obtenidos (Adams *et al.*, 2004). Estos cambios implicaron la utilización de métodos que capturaban la geometría de la estructura estudiada y preservaban esta información a lo largo de todos los análisis (Adams *et al.*, 2004). Simultáneamente, Kendall y otros matemáticos desarrollaron una teoría estadística para el análisis de la conformación, que hizo posible la utilización conjunta de los métodos de estadística multivariada y de métodos de visualización de los cambios de forma. Bookstein (1996) se refirió a este desarrollo del estudio de la morfometría como la “Síntesis morfométrica” y, posteriormente, Rohlf y Marcus (1993) denominaron a esta nueva aproximación como *Morfometría Geométrica* sugiriendo que estos cambios constituían una “revolución en la morfometría”. En estos últimos 15 años, la morfometría geométrica se ha desarrollado mucho y ha alcanzado una etapa más madura. Esto se debe, en gran medida, a la mayor comprensión de la base teórica que sustenta a la metodología, la cual será brevemente explicada a continuación.

### **Generalidades sobre la terminología utilizada en morfometría**

Antes de comenzar a explicar algunas generalidades acerca de la morfometría geométrica, se realizarán algunos comentarios sobre la terminología habitualmente utilizada y su correlato en inglés, idioma en el que se encuentra la mayoría de la bibliografía relacionada con el tema. Normalmente, cuando se dice que dos cuerpos tienen distinta forma en español, no se dice nada acerca de sus diferencias de tamaño. Sin embargo, en inglés muchas veces se utilizan palabras diferentes para mencionar las diferencias entre dos cuerpos según se deban únicamente a la forma (*shape*) o al tamaño (*size*) o a ambas variables simultáneamente (*form*). Esta distinción ha sido fundamental para el desarrollo de la morfometría geométrica y en algunas ocasiones ha llevado al análisis de la terminología utilizada en inglés y a la discusión acerca de su correcta traducción al español (Figura AII.2).

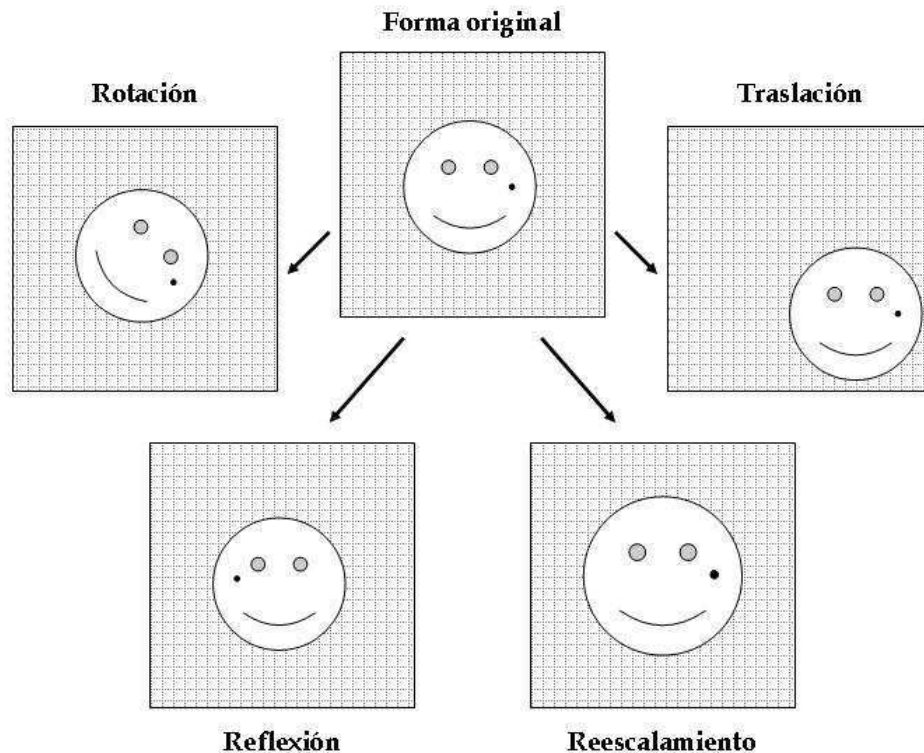
A lo largo de esta tesis, se utilizó el término *conformación* para hacer referencia a los cambios morfológicos que los anglo-parlantes usualmente relacionan con la expresión *shape*. Particularmente, se asociará el término *conformación* a la relación entre las partes de una estructura que no se ve modificada por los cambios provocados por las rotaciones, las traslaciones, las reflexiones y/o los reescalamientos (ver más abajo). De esta manera, se utilizará el término *forma* para hacer referencia a los cambios morfológicos que los anglo-parlantes muchas veces relacionan con la expresión *form*, que pueden explicarse por modificaciones tanto en la conformación como en el tamaño de la estructura (Figura AII.2).



**Figura AII.2:** Figura modificada de Richtsmeier y colaboradores (2002), que ilustra el significado de términos habitualmente utilizados en morfometría. El cambio morfológico puede deberse únicamente a la forma (*shape*), al tamaño (*size*) o a ambas variables simultáneamente (*form*).

### Generalidades sobre la morfometría geométrica: los métodos de referencias anatómicas

Existen distintos métodos asociados a la morfometría geométrica. El grupo de uso más generalizado, que es el que ha sido utilizado a lo largo del desarrollo de esta tesis, es el de los métodos de referencias anatómicas (*landmarks*). Todos estos métodos comienzan con la recolección de las coordenadas en 2 o 3 dimensiones de puntos homólogos (*landmarks*) en la estructura de interés (Adams *et al.*, 2004). Estos puntos pueden ser ubicados, por ejemplo, en la intersección de las venas en el ala de *Drosophila* (Figura AII.6). Estas variables no deberían ser utilizadas en los análisis estadísticos de esta manera ya que contienen información sobre la orientación, la posición y la escala de la estructura estudiada. Toda esta variación, que no es conformacional, debe ser removida matemáticamente para transformarlas en variables conformacionales (*shape variables*) que puedan ser utilizadas en análisis estadísticos con el objetivo de estudiar exclusivamente la conformación (Adams *et al.*, 2004). Las operaciones matemáticas utilizadas (rotación, traslación, reflexión y reescalamiento) permiten eliminar dicha variación sin modificar la conformación (Figura AII.3).



**Figura AII.3:** Figura modificada de Richtsmeier y colaboradores (2002), que ilustra la variación no conformacional que puede ser eliminada por operaciones matemáticas (rotación, traslación, reflexión y reescalamiento) para realizar análisis estadísticos con el objetivo de estudiar exclusivamente la conformación.

Los métodos denominados “de superposición” se encargan de hacer esto superponiendo las referencias homólogas siguiendo algún criterio específico de optimización. Uno de los métodos más utilizado es el Análisis Generalizado de Procrustes ó GPA (por su sigla en inglés: *Generalized Procrustes Analysis*) que superpone las configuraciones de puntos homólogos utilizando el criterio de cuadrados mínimos para estimar los parámetros de rotación y traslación. De acuerdo con este criterio, primero se traslada el centroide de cada configuración, que es el centro geométrico de cada espécimen, hasta el origen de coordenadas. Entonces, cada configuración se escala a una unidad común de tamaño. Esto se efectúa dividiendo a cada configuración por el tamaño de su centroide, el cual se define como la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias de cada referencia a su centroide al cuadrado (Bookstein, 1986). Luego, las configuraciones son rotadas buscando minimizar los cuadrados de las diferencias entre los puntos homólogos correspondientes (Rohlf & Slice, 1990). Esto permite calcular una conformación media que no se puede estimar antes de realizar todo este proceso. Entonces, las diferencias de conformación entre los distintos especímenes pueden describirse como diferencias entre las coordenadas de los puntos homólogos de distintos individuos o grupos de individuos.

Alternativamente, se puede utilizar la técnica de *Thin-Plate Spline* para describir un espécimen como la deformación de otro (Bookstein, 1991). Las diferencias de conformación expresadas de esta manera representan la aplicación matemática de la antigua idea de D'Arcy Thompson (1917) de utilizar grillas de deformación para transformar una figura de manera tal de mostrar la configuración de otra (Figura AII.4). Por lo tanto, las diferencias de conformación entre distintos especímenes pasan a ser diferencias entre las grillas de deformación que presentan parámetros específicos que conjuntamente permiten describir de manera diferencial a cada una. Estos parámetros se denominan deformaciones parciales (*partial warps*) y pueden ser utilizados como variables conformacionales en pruebas estadísticas para examinar la existencia de diferencias entre distintas muestras. Una aproximación relacionada con la anterior, que recibió mucha atención a comienzos de la década de 1990, fue el análisis de las deformaciones relativas (DR; *relative warps*); que son variables que se obtienen tras realizar un PCA con las deformaciones parciales (Bookstein, 1991; Rohlf, 1993). Una de las ventajas de utilizar estas variables es la posibilidad de pesarlas de acuerdo con la escala espacial en la cual ocurren las transformaciones. Esto se hace a través de un parámetro denominado alfa ( $\alpha$ ) descrito por Rohlf (1993). Por defecto, en los estudios se aplica un valor de  $\alpha = 0$ , lo que le otorga el mismo peso a todas las deformaciones. Los valores mayores a 0 le dan un mayor peso a las deformaciones que involucran prácticamente a toda la estructura mientras que los valores negativos hacen que las deformaciones más localizadas pesen más. En todos los análisis de DR realizados a lo largo de esta tesis se utilizó un valor de  $\alpha = 0$ .

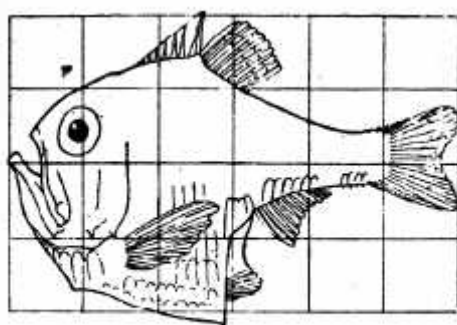


Fig. 517. *Argyropelecus Olfersi*.

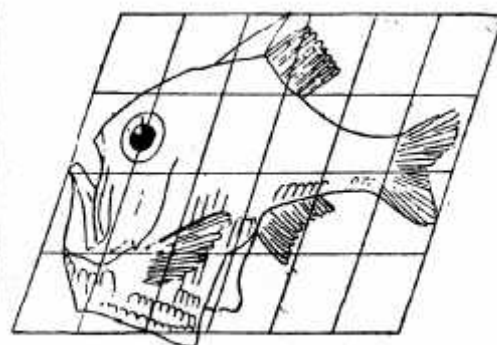
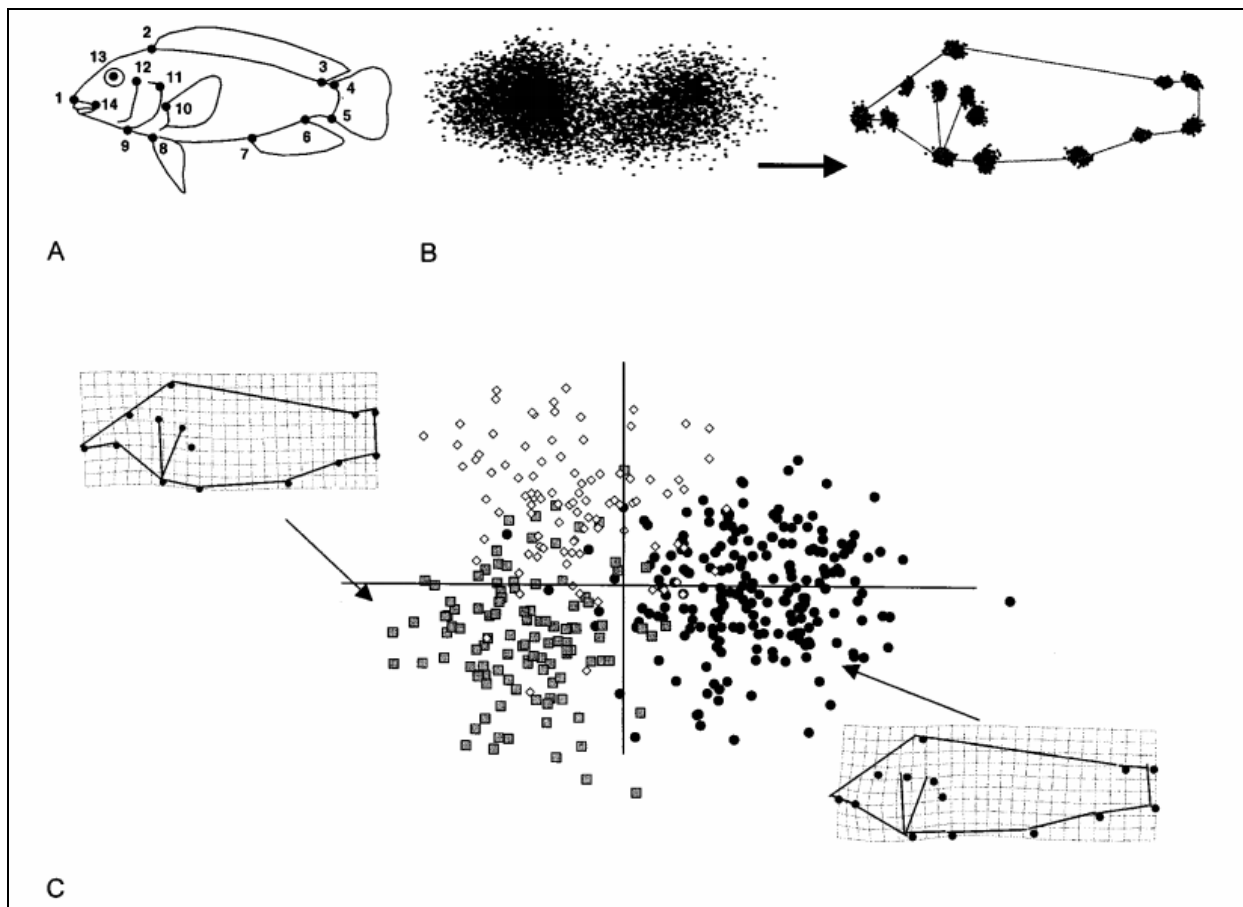


Fig. 518. *Sternoptyx diaphana*.

**Figura AII.4:** Figuras extraídas del libro *On Growth and Form*, de D'arcy Thompson (1917), que ilustran el uso de las grillas de deformación. En el ejemplo, se puede ver como, partiendo de la grilla que puede representar a la conformación de *Argyropelecus olfersi*, se puede obtener la de *Sternoptyx diaphana* deformando la grilla de manera adecuada.



La aproximación descrita para analizar datos de conformación a partir del establecimiento de referencias anatómicas o puntos homólogos puede resumirse de la manera ilustrada en la Figura AII.5. De acuerdo con esta síntesis, tras haber establecido los puntos homólogos en todos los especímenes de la muestra, los pasos fundamentales del análisis son: 1) GPA, 2) proyección de las coordenadas alineadas en un espacio tangente lineal (ver más abajo) para realizar análisis multivariados y 3) visualización gráfica de los resultados de los análisis multivariados en términos de la configuración de las referencias anatómicas (Figura AII.5).



**Figura AII.5:** Figura modificada de Adams y colaboradores (2004), que ilustra los pasos básicos que se siguen en un estudio de morfometría geométrica en el que se analizan datos de conformación derivados del establecimiento de referencias anatómicas. A: Digitalización de las referencias anatómicas en las imágenes; B: Remoción de la variación no conformacional derivada de las diferencias de posición, orientación y rotación de las configuraciones de referencias; C: Análisis estadístico y representación gráfica de los resultados (en este ejemplo se realizó un análisis de variables canónicas y se representaron los resultados mediante grillas de deformación para cada especie).

Vale la pena hacer la aclaración que hoy en día generalmente se trabaja con imágenes digitales de los especímenes, las cuales suelen ser tomada de forma tal de minimizar las diferencias entre los individuos. En el caso de que una foto haya sido tomada a partir de un individuo que estaba dispuesto en sentido opuesto a los demás (es decir, que la imagen sea

especular en relación al resto) se debe modificar la imagen de forma tal de que quede orientada como las demás antes de llevar a cabo el proceso mencionado anteriormente. Generalmente, esto se puede realizar con cualquier programa que permita manipular imágenes y, en particular, se puede hacer con el programa utilizado para digitalizar los puntos homólogos (tpsDig).

Entonces, el GPA es un procedimiento importante porque remueve la variación en conformación debida a la ubicación, la rotación y la escala que se produce al digitalizar los puntos homólogos sobre las imágenes. Al hacer esto, todas las configuraciones de referencias se superponen en un sistema de coordenadas común aunque arbitrario. Asimismo, los especímenes alineados utilizando el GPA pueden ser proyectados en un espacio que es tangente al espacio conformacional de Kendall (ver más abajo; Kendall, 1984; Rohlf, 1999).

### **Los espacios conformacionales y sus relaciones**

Estadísticamente, un espacio es una colección de objetos o de sus mediciones que son tratados como si fueran puntos en una superficie o un volumen o cualquier generalización de mayores dimensiones (Slice *et al.*, 1998). Existen distintos tipos de espacios entre los que están los euclidianos, los muestrales y los conformacionales. Un espacio conformacional es aquel en el que la conformación de una figura se representa con un punto (Slice *et al.*, 1998). Las cantidad de dimensiones de este espacio dependerá de si la configuración de referencias anatómicas es bi o tridimensional y del número de puntos homólogos empleados ( $p$ ; Slice *et al.*, 1998). En el primer caso será de  $2p-4$  dimensiones y en el segundo será de  $3p-7$  dimensiones.

El espacio conformacional de Kendall es la construcción fundamental que permitió el desarrollo de la morfometría geométrica (Slice *et al.*, 1998). Este espacio brinda un marco geométrico para los análisis de las distancias de Procrustes (DP) existentes entre cualquier conjunto arbitrario de referencias anatómicas (Bookstein, 1991). Cada punto ubicado en este espacio representa una configuración de referencias anatómicas (es decir, una conformación) que no involucra información de tamaño, orientación ni posición (Slice *et al.*, 1998). En el espacio conformacional, la dispersión de los puntos corresponde a la dispersión de configuraciones de referencias anatómicas (Slice *et al.*, 1998). Este espacio es curvo y los puntos se ubican en una esfera multidimensional (*hiperesfera*). Si la variación conformacional de la muestra es chica, es decir, si los puntos (configuraciones de referencias anatómicas) no están muy dispersos; entonces las distancias Euclidianas del espacio tangente pueden ser utilizadas como una buena aproximación a DP del espacio de Kendall. Dado que este espacio tangente es lineal, permite la aplicación de métodos estadísticos convencionales para estudiar la variación en la conformación (Bookstein, 1996; Rohlf, 1993). Esto es lo que hacen la mayoría de los

métodos de la morfometría geométrica, por lo que las variables conformacionales mencionadas anteriormente pueden ser interpretadas como ejes en el espacio Euclidiano. Los valores en estos ejes pueden ser tratados como datos correspondientes a variables multivariadas que representan a la conformación y que pueden ser analizadas mediante análisis multivariados convencionales (por ejemplo, Adams & Rohlf, 2000; Bookstein *et al.*, 1999; Klingenberg & Leamy, 2001; Rüber & Adams, 2001). Sin embargo, para validar esta aproximación, se debe analizar la correlación entre DP (espacio conformacional) y las distancias Euclidianas (espacio tangencial). Con este objetivo, se utilizó el programa tpsSmall (Rohlf, 2003a) cada vez que se realizaron análisis conformacionales a lo largo de la tesis. En todos los casos la correlación fue perfecta ( $r=1$ ;  $p<0,0001$ ) por lo que se puede considerar que la utilización de esta aproximación fue válida. Este resultado es esperable en el caso de este trabajo, ya que las muestras comparadas en los distintos análisis pertenecen a la misma especie (es decir, las conformaciones medias son similares).

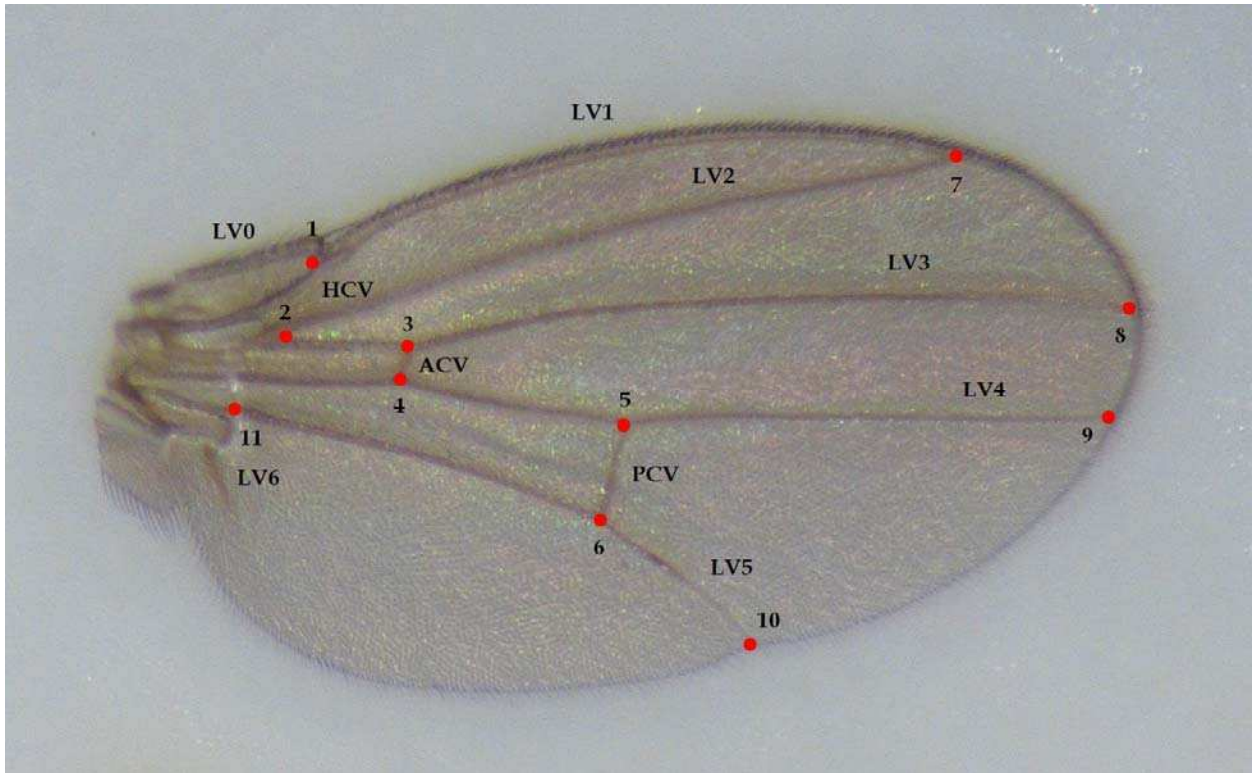
### **GPA aplicado al análisis de la conformación del ala**

*Drosophila* presenta cinco venas longitudinales principales o LVs (por su sigla en inglés: *Longitudinal Veins*; L1 a L5), que corren en forma próximo-distal; dos venas longitudinales más pequeñas (L0 y L6), dos venas transversales o CVs (por su sigla en inglés: *Cross Veins*) que unen L3 con L4 y L4 con L5 respectivamente (ACV y PCV por sus siglas en inglés: *Anterior Cross Vein* y *Posterior Cross Vein*, respectivamente) y la humeral o HCV (por su sigla en inglés: *Humeral Cross Vein*), que une el margen anterior con L0.

En este trabajo, la captura geométrica de la conformación del ala se realizó digitalizando, en la fotografía de la cara ventral del ala izquierda de cada individuo, 11 puntos homólogos (Figura AII.6) utilizando el programa tpsDig (Rohlf, 2001). Todas las referencias anatómicas se ubicaron en la intersección de dos venas o de una vena con el margen del ala; de forma tal de abarcar todas las zonas del órgano minimizando la cantidad de puntos utilizados (Figura AII.6). Los puntos homólogos digitalizados son los siguientes (Figura AII.6):

1. Unión de LV0, LV1 y HCV
2. Unión de LV2 y LV3
3. Unión de LV3 y ACV
4. Unión entre ACV y LV4
5. Unión entre LV4 y PCV
6. Unión entre PCV y LV 5
7. Unión entre LV2 y LV1
8. Unión entre LV3 y LV1

9. Unión entre LV4 y LV1 o el margen del ala
10. Unión entre LV5 y el margen del ala
11. Unión entre LV5 y LV6



**Figura AII.6:** Captura de la geometría del ala a partir del establecimiento de puntos homólogos (*landmarks*) en la intersección de las venas y posterior tratamiento estadístico de las coordenadas generadas (*morfometría geométrica*). Las siglas corresponden a los nombres generalmente utilizados para denominar a las distintas venas (ver el texto para más detalles).

A través de las técnicas detalladas anteriormente, la forma del ala de cada individuo se puede desdoblar en dos variables, su tamaño y su conformación. El tamaño de ala del individuo se estima mediante el tamaño de centroide y la conformación es estimada por DR. Para generar estas variables, se utilizó el programa tpsRelw (Rohlf, 2003b). En algunos casos se analizó la conformación del ala mediante la estimación de DP (ver más abajo). Estas distancias fueron calculadas con respecto a la referencia de la muestra (la conformación media de la muestra o consenso) utilizando el programa tpsSmall (Rohlf, 2003a).

En este punto, antes de hacer referencia a los análisis estadísticos empleados, vale la pena mencionar algunas conclusiones que se desprenden de todo lo explicado anteriormente. Dado que las variables estimadoras de la conformación del ala son calculadas con respecto a la conformación consenso de la muestra analizada, no sería apropiado unificar los valores de las distintas DR correspondientes a muestras diferentes en un mismo análisis estadístico.

Asimismo, en aquellos casos en los que se espera que haya diferencias entre muestras, no sería adecuado unificar las muestras antes de establecer las referencias anatómicas. Como fue mencionado anteriormente, en general se espera que las conformaciones medias correspondientes a distintas muestras sean similares porque pertenecen a la misma especie. Sin embargo, también se espera que haya diferencias para la conformación del ala entre los bloques correspondientes a los distintos experimentos debido a la identidad y la cantidad de líneas analizadas en cada uno de ellos. Asimismo, distintos análisis (tanto propios como pertenecientes a otros autores) han demostrado que existen diferencias para la conformación del ala entre machos y hembras. De esta manera, si se juntaran los especímenes de distintos bloques o sexos en una misma muestra, las diferencias explicadas por estos factores podrían oscurecer las relacionadas con otros factores que realizan aportes comparativamente menores a la conformación del ala pero que son aquellos que interesa analizar (por ejemplo, Gilchrist *et al.*, 2000). Por lo tanto, el análisis de DR se realizó en cada sexo y bloque por separado y sólo se compararon los patrones generales correspondientes a las distintas muestras (por ejemplo, machos y hembras) de manera cualitativa.

Una vez realizados los análisis multivariados utilizando DR, es necesario visualizar las modificaciones en la conformación del ala asociados a cada línea. Sin embargo, dada la gran cantidad de líneas correspondiente a cada análisis, se debe adoptar un criterio para mostrar los cambios conformacionales asociados a algunas de ellas. Asimismo, dada la naturaleza multivariada de la conformación del ala, también se debe adoptar un criterio para mostrar los cambios conformacionales asociados a algunas dimensiones. Debido a que DR es una variable que se obtiene tras realizar un PCA con las deformaciones parciales, cuentan con dos particularidades: son independiente entre sí y cada una de ellas explica un porcentaje de la variación fenotípica total que se hace menor a medida que se avanza de la primera a la última. De esta manera, se decidió tomar en consideración los resultados obtenidos para DR1 y DR2 (que son aquellas que explican el mayor porcentaje de la varianza fenotípica total) para visualizar las modificaciones en la conformación del ala asociados a determinadas líneas. En todos los casos, se seleccionaron las líneas que presentaron los cambios más extremos para esas DR en relación con la línea control del sexo y bloque correspondiente. Por un lado, en el caso de las líneas BDGP, se mostró el cambio conformacional de cada una de esas líneas con respecto al control respectivo mediante diagramas de vectores. Estas figuras, obtenidas utilizando el programa tpsSpln (Rohlf, 2004), muestran el desplazamiento de cada punto homólogo en una línea de interés (en este caso, cada línea BDGP asociada al extremo en cuestión) con respecto a otra línea (en este caso, la línea control del sexo y bloque correspondiente) mediante flechas que indican la dirección, el sentido y la magnitud del cambio. Por otro lado, en el caso de las líneas

de sustitución cromosómica, se mostró el cambio conformacional de cada una de esas líneas con respecto a la conformación consenso de la muestra correspondiente. Esto se debe a que, para estas líneas, no interesa visualizar las modificaciones con respecto al control sino el cambio conformacional asociado a los extremos de DR1 y DR2 en cada sexo. En este caso, se generaron diagramas de vectores utilizando el programa tpsRegr (Rohlf, 2000). Asimismo, este programa fue empleado para visualizar los cambios en la conformación del ala con respecto a la latitud en cada sexo y bloque por separado. En todos estos diagramas de vectores, el cambio conformacional ha sido magnificado (multiplicándolo generalmente por tres) de forma tal de hacerlo más evidente.

Finalmente, algunas aclaraciones con respecto a las variables univariadas vinculadas al ala. Por un lado, el tamaño de centroide es un valor propio de cada ala, por lo que es independiente de la muestra a la que pertenece. Por otro lado, DP es calculada para cada espécimen de la muestra con respecto al consenso de la misma. Sin embargo, al ser un estimador unidimensional de la conformación del ala, se calcula un valor único para cada espécimen de la muestra, incluidos los de la línea control. Por lo tanto, dado que en todos los bloques se analizó simultáneamente a la misma línea control, los valores de ambas variables pueden ser relativizados con respecto a los de la línea control del sexo y bloque correspondiente. Esto permite juntar los valores de los especímenes correspondientes a los distintos bloques y sexos relacionados con un experimento dado, de forma tal de realizar un análisis más general de los valores de estas variables (ver más abajo).

## **Generalidades sobre los análisis estadísticos**

### **Supuestos**

En los casos en que se realizaron análisis de varianza, se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedacia y en aquellos en los que se realizaron regresiones y correlaciones se comprobó el supuesto de normalidad de la distribución de los valores de las variables correspondientes a las muestras analizadas. En todos los casos se utilizó un  $\alpha$  (Error de tipo I) de 0,1. Para probar la homogeneidad de varianzas se utilizó la prueba de Levene y la distribución normal de los valores de la muestra se probó con la prueba de Lilliefors. En aquellos casos en los que no se cumplieron los supuestos, la variable correspondiente fue transformada de forma tal de ver si de esa manera se cumplían. Generalmente pudo verse que la transformación de la variable no tuvo una gran incidencia en el cumplimiento de los supuestos. Entonces, en esos casos, se realizó un análisis no paramétrico (utilizando la variable no transformada) equivalente al análisis paramétrico realizado con anterioridad. En general, los resultados de los análisis no paramétricos fueron similares a los de los análisis paramétricos.

Por lo tanto, se decidió mostrar únicamente los resultados de los resultados paramétricos realizados con las variables no transformadas en todos los casos.

### **Tipos de variables y análisis estadísticos**

A partir de todo lo expuesto anteriormente se puede decir que, en general, todo el trabajo se ha llevado a cabo mediante el análisis de cuatro variables estimadoras del tamaño corporal (el ancho de la cabeza, la distancia interocular, el largo del tórax y el tamaño del ala) y una variable estimadora de la conformación del ala (DR). Las variables estimadoras del tamaño corporal se analizaron mediante análisis univariados. En cambio, la naturaleza del estimador de la conformación del ala hizo necesaria la utilización de análisis multivariados en este caso. En algunos casos se estudió la variación en la conformación del ala mediante el análisis de las distancias de Procrustes. Esto se debe a que algunos análisis sólo se pueden hacer utilizando variables univariadas o a que sus resultados pueden ser interpretados más fácilmente si se usa este tipo de variable. Por lo tanto, en estos casos, se realizaron análisis univariados similares a los utilizados para analizar las otras variables univariadas.

### **Análisis estadísticos más utilizados**

Básicamente se realizaron tres tipos de análisis: análisis de varianza, correlaciones y regresiones. Tanto en el caso de los análisis de varianza como en el de las regresiones, se utilizaron pruebas univariadas y multivariadas.

#### Análisis de varianza

Estos análisis fueron utilizados para estudiar a cada uno de los caracteres morfológicos mencionados por separado en ambas partes de la tesis. Por un lado, se realizaron análisis de varianza univariados (ANOVAs) utilizando el factor Línea como aleatorio, lo que permitió estudiar la existencia de varianza genética. Este tipo de análisis permitió, además, conocer la proporción de la varianza fenotípica total explicada por dicho componente en relación con los demás componentes aleatorios, como puede ser la interacción entre la línea y el sexo, además del error. Por otro lado, se realizaron análisis de varianza con el factor Línea como fijo en los casos en los que se quería saber si las diferencias entre determinadas medias eran significativas. El resto de los factores que se incluyeron en los distintos análisis según el caso (Sexo, Temperatura, Población, etc.) fueron considerados como fijos debido a que en todos los casos se quería saber si las diferencias entre las medias correspondientes a los niveles de cada uno de esos factores (machos y hembras en el caso de Sexo, 17 °C y 25 °C en el caso de Temperatura, etc.) eran significativas. En el caso de los análisis de varianza multivariados (MANOVAs), sólo se pudo realizar el segundo tipo de análisis (todos los factores incluidos en el análisis tomados

como fijos) debido a que no se pueden estimar los componentes de varianza para variables multivariadas sino que hay que hacerlo para cada una de las variables que integran la variable compleja por separado. Como se quiere conservar la información de la geometría de la conformación del ala a lo largo de todo el análisis, no sería adecuado analizar a cada una de las variables que componen a este carácter complejo en forma separada. Por lo tanto, en aquellos casos en los que se quiso estudiar la conformación del ala mediante análisis que sólo pueden ser utilizados con variables univariadas, se empleó DP. En general, los distintos factores incorporados en un mismo análisis fueron incluidos cruzados entre sí. Sólo en el caso en el que se analizaron determinadas líneas de diferentes poblaciones, el factor Línea fue anidado en el factor Población.

### Correlaciones

En todos los casos, se realizaron análisis de correlación entre cada par de variables estimadoras del tamaño en cada sexo por separado y entre machos y hembras para cada carácter. Todas las correlaciones se realizaron utilizando el valor medio de cada línea para cada carácter en cada sexo. Este tipo de estudio permitió realizar un análisis de las relaciones alométricas entre caracteres en un mismo sexo y entre sexos para un mismo carácter. Es decir, por un lado, permitió analizar la proporcionalidad entre las tasas de proliferación y crecimiento celular de distintos discos imaginales durante el crecimiento larval. Asimismo, al haber utilizado líneas isogénicas que sólo difieren en un gen o un cromosoma, estos análisis permitieron analizar las diferencias en la arquitectura genética de los caracteres. Por otro lado, permitió analizar la proporcionalidad del crecimiento entre sexos así como el dimorfismo sexual en relación con la arquitectura genética de los caracteres vinculados al tamaño corporal.

### Regresiones

Este tipo de análisis se realizó únicamente en el caso de las líneas de sustitución cromosómica. Esto se debe a que, como se explicó previamente, estas líneas fueron obtenidas a partir de isolíneas provenientes de poblaciones naturales dispuestas a lo largo de gradientes geográficos del oeste de Argentina. Por un lado, se realizaron análisis de regresión múltiple entre el valor medio de cada línea y la latitud (considerando sus valores en el sistema decimal) y la altitud para cada variable univariada en cada sexo; de forma tal de determinar si existe una asociación entre las variables morfológicas y ambas variables ambientales. Por otro lado, se realizó un análisis de regresión múltiple entre los valores de DR correspondientes a cada bloque y sexo y las variables independientes mencionadas. En este caso, se compararon las pendientes significativamente diferentes de cero entre sí considerando la posibilidad de unificar, por un lado, los datos correspondientes a un mismo sexo y, por el otro, los de un mismo bloque.



Todos los análisis estadísticos anteriores, excepto los de regresión múltiple utilizando DR, fueron realizados usando distintas versiones del paquete STATISTICA (StatSoft Inc., 1999, 2001, 2004). Los análisis de regresión mencionados se realizaron utilizando el programa *tpsRegr* (Rohlf, 2000).

---

## Referencias bibliográficas

---

- Adams, M. D.; S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, *et al.* 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Adams D. C. & F. J. Rohlf. 2000. Ecological character displacement in *Plethodon*: biomechanical differences found from a geometric morphometric study. *PNAS* 97: 4106-4111.
- Adams, D. C.; F. J. Rohlf & D. E. Slice. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Ital. J. Zool.* 71: 5-16.
- Alexander, S. J.; N. S. Woodling & B. Yedvobnick. 2006. Insertional inactivation of the *L13a* ribosomal protein gene of *Drosophila melanogaster* identifies a new *Minute* locus. *Gene* 368: 46-52.
- Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, *et al.* 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
- Al-Shahrour, F.; P. Minguez, J. Tárraga, D. Montaner, E. Alloza, *et al.* 2006. BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucl. Acids Res.* 34: 472-476.
- Al-Shahrour, F.; P. Minguez, Vaquerizas, L. Conde & J. Dopazo. 2005. Babelomics: a suite of web-tools for functional annotation and analysis of group of genes in high-throughput experiments. *Nucl. Acids Res.* 33: 460-464.
- Allende M. L., A. Amsterdam, T. Becker, K. Kawakami, N. Gaiano, *et al.* 1996. Insertional mutagenesis in zebrafish identifies novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development. *Gene Dev.* 10: 3141-3155.
- Anholt, R. R. H.; R. L. Lyman & T. F. C. Mackay. 1996. Effects of single *P*-element insertions on olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 143: 293-301.
- Anholt, R. R. & T. F. C. Mackay. 2004. Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.* 5: 838-849.
- Arthur, A. L.; A. R. Weeks & C. M. Sgrò. 2008. Investigating latitudinal clines for life history and stress resistance traits in *Drosophila simulans* from eastern Australia. *J. Evol. Biol.* 21: 1470-1479.
- Atchley, W. R.; J. J. Rutledge & D. E. Cowley. 1981. Genetic components of size and shape, II. Multivariate covariance patterns in the rat and mouse skull. *Evolution* 35: 1037-1055.
- Atkinson, D. 1994. Temperature and organism size: a biological law for ectotherms? *Adv. Ecol. Res.* 25: 1-58.
- Atkinson, D. & R. M. Sibly. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends Ecol. Evol.* 12: 235-239.
- Azevedo, R. B. R.; V. French & L. Partridge. 1996. Thermal evolution of egg size in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 50: 2338-2345.
- Azevedo, R. B. R.; A. C. James, J. McCabe & L. Partridge. 1998. Latitudinal variation of wing:thorax size ratio and wing-aspect ratio in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 52: 1353-1362.
- Azevedo, R. B. R.; V. French & L. Partridge. 2002. Temperature modulates epidermal cell size in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 48: 231-237.
- Baehrecke, E. H. 1996. Ecdysone signaling cascade and regulation of *Drosophila* metamorphosis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 33: 231-244.
- Conlon, I. & M. Raff. 1999. Size control in animal development. *Cell* 96:235-244.
- Baker, D. & A. Sali. 2001. Protein Structure Prediction and Structural Genomics. *Science* 294: 93-96.
- Bangi, E. & K. Wharton. 2006a. Dpp and Gbb exhibit different effective ranges in the establishment of the BMP activity gradient critical for *Drosophila* wing patterning. *Dev. Biol.* 295: 178-193.
- Bangi, E. & K. Wharton. 2006b. Dual function of the *Drosophila* Alk1/Alk2 ortholog Saxophone shapes the Bmp activity gradient in the wing imaginal disc. *Development* 133: 3295-3303.
- Barker, J. S. F. & R. A. Krebs. 1995. Genetic variation and plasticity of thorax length and wing length in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii*. *J. Evol. Biol.* 8: 689-709.
- Barnes, P. T. & C. C. Laurie-Ahlberg. 1986. Genetic variability of flight metabolism in *Drosophila melanogaster* III. Effects of Gpdh allozymes and environmental temperature on power output. *Genetics* 112: 267-294.

- Barton, N. H. & P. D. Keightley. 2002.** Understanding quantitative genetic variation. *Nat. Rev. Genet.* 3: 11-21.
- Bellen, H. J., C. J. O'Kane, C. Wilson, U. Grossniklaus, R. K. Pearson, et al. 1989.** P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev.* 3: 1288-1300.
- Bellen, H. J.; C. J. O'Kane, C. Wilson, U. Grossniklaus, R. K. Pearson et al. 2004.** The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* 167: 761-781.
- Bello, B., D. Resendez-Perez & W. J. Gehring. 1998.** Spatial and temporal targeting of gene expression in *Drosophila* by means of a tetracycline-dependent transactivator system. *Development* 125: 2193-2202.
- Benjamin, S. N. & W. E. Bradshaw. 1994.** Body size and flight activity effects on male reproductive success in the pitcherplant mosquito (Diptera, Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 331-336.
- Berreur, P.; P. Porcheron, J. Berreur-Bonnenfant & P. Simpson. 1979.** Ecdysteroid levels and pupariation in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 210: 347-352.
- Berrigan, D. 1991.** The allometry of egg size and number in insects. *Oikos* 60: 313-321.
- Berrigan D. & L. Partridge. 1997.** Influence of temperature and activity on the metabolic rate of adult *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol.* A118: 1301-1307.
- Betrán, E.; M Santos & A. Ruiz. 1998.** Antagonistic pleiotropic effect of second-chromosome inversions on body size and early life-history traits in *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 52: 144-154.
- Bhatt, A. M.; T. Page, E. J. R. Lawson, C. Lister & C. Dean. 1996.** Use of *Ac* as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant J.* 9: 935-945.
- Bidlingmaier, S. & M. Snyder, 2002.** Large-scale identification of genes important for apical growth in *Saccharomyces cerevisiae* by directed allele replacement technology (DART) screening. *Funct. Integr. Genomics* 6: 345-356.
- Biehs, B.; M. A. Sturtevant & E. Bier. 1998.** Boundaries in the *Drosophila* wing imaginal disc organize vein-specific genetic programs. *Development* 125: 4245-4257.
- Bier, E. 2000.** Drawing lines in the *Drosophila* wing: initiation of wing vein development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 393-98.
- Bier, E., H. Vassin, S. Shepherd, K. Lee, K. McCall, et al. 1989.** Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a *P-lacZ* vector. *Genes Dev.* 3: 1273-1287.
- Birdsall, K.; E. Zimmerman; K. Teeter & G. Gibson. 2000.** Genetic variation for the positioning of wing veins in *Drosophila melanogaster*. *Evol. Dev.* 2(1): 16-24.
- Bitner-Mathé, B. C. & L. B. Klaczko. 1999.** Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* 105: 203-210.
- Bitner-Mathe, B. C.; A. A. Peixoto & L. B. Klaczko. 1995.** Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. *Heredity* 75: 54-61.
- Blackburn, T. M.; K. J. Gaston & N. Loder. 1999.** Geographic gradients in body size: a clarification of Bergmann's rule. *Div. & Distr.* 5: 165-174.
- Blair, S. S. 2003.** Lineage compartments in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 13: R548-551.
- Blair, S. S. 2007.** Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 293-319.
- Bochdanovits, Z. & G. de Jong. 2003a.** Temperature dependent larval resource allocation shaping adult body size in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 16: 1159-1167.
- Bochdanovits, Z. & G. de Jong. 2003b.** Temperature dependence of fitness components in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: Changing the association between size and fitness. *Biol. J. Linn. Soc.* 80: 717-725.
- Bochdanovits, Z. & G. de Jong. 2003c.** Experimental evolution in *Drosophila melanogaster*: interaction of temperature and food quality selection regimes. *Evolution* 57: 1829-1836.
- Bolwig, G. M., M. Del Vecchio, G. Hannon & T. Tully. 1995.** Molecular cloning of *linotte* in *Drosophila*: a novel gene that functions in adults during associative learning. *Neuron* 15: 829-842.
- Bookstein, F. L. 1986.** Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Stat. Sci.* 1:181-222.
- Bookstein, F. L. 1991.** *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bookstein, F. L. 1996.** Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bull. Math. Biol.* 58: 313-365.
- Bookstein, F. L. 1998.** A hundred years of morphometrics. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 44: 7-59.
- Bookstein, F. L.; K. Schäfer, H. Prossinger, H. Seidler, M. Fieder, et al. 1999.** Comparing frontal cranial profiles in archaic and modern *Homo* by morphometric analysis. *Anat. Rec.* 257: 217-224.

- Bornemann, D. J.; J. E. Duncan, W. Staatz, S. Selleck & R. Warrior. 2004.** Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development* 131: 1927-1938.
- Brand, A. H. & N. Perrimon. 1993.** Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
- Brandes, C., J. D. Plautz, R. Stanewsky, C. F. Jamison, M. Straume, et al. 1996.** Novel features of *Drosophila period* transcription revealed by real-time luciferase reporting. *Neuron* 16: 687-692.
- Brehm, G.; D. Suessenbach & K. Fiedler. 2003.** Unique elevational diversity patterns of geometrid moths in an Andean montane rainforest. *Ecography* 26: 456-466.
- Britton J. S., W. K. Lockwood, L. Li, S. M. Cohen & B. A. Edgar. 2002.** *Drosophila's* insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Dev. Cell* 2: 239-249.
- Broggiolo, W.; H. Stocker, T. Ikeya, F. Rintelen, R. Fernandez, et al. 2001.** An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* 11: 213-221.
- Brown, N. H.; S. L. Gregory & M. D. Martin-Bermudo. 2000.** Integrins as mediators of morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 223: 1-16.
- Bryant, P. J. & P. Levinson. 1985.** Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. *Dev. Biol.* 107: 355-363.
- Bryant, P. J. & P. Simpson. 1984.** Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q. Rev. Biol.* 59: 387-415.
- Bubliy, A., A. G. Imasheva & O. E. Lazebny. 1996.** Variation of a complex of wing characters in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetika* 32(11): 1513-1520.
- Burley, S. K. ; S. C. Almo, J. B. Bonanno, M. Capel, M. R. Chance, et al. 1999.** Structural genomics: beyond the Human Genome Project. *Nature genetics* 23: 151-157.
- Burns, N.; B. Grimwade, P. B. Ross-Macdonald, E. Y. Choi, K. Finberg, et al. 1994.** Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 8: 1087-1105.
- Butler, M. J.; T. L. Jacobsen, D. M. Cain, M. G. Jarman, M. Hubank, et al. 2003.** Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* 130: 659-670
- Calboli F. C. F., W. J. Kennington & 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, W. A. III. 1984.** *Size, Function, and Life History*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Caldwell P. E., M. Walkiewicz & M. Stern. 2005.** Ras activity in the *Drosophila* prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release. *Curr. Biol.* 15: 1785-1795.
- Campbell, S. D.; A. Duttaroy, A. L. Katzen & A. Chovnick. 1991.** Cloning and characterization of the scalloped region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 127: 367-80.
- Campbell, S.; M. Inamdar, V. Rodrigues, V. Raghavan, M. Palazzolo & A. Chovnick. 1992.** The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 6: 367-379.
- Canon Inc., ©. 2000-2003.** Canon Utilities Remote Capture. Versión 2.7.5.27.
- Capdevila, J. & I. Guerrero. 1994.** Targeted expression of the signaling molecule *Decapentaplegic* induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *Embo Journal* 13: 4459-4468.
- Capy, P.; E. Pla & J. R. David. 1993.** Phenotypic and genetic variability of morphological traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. I. Geographic variations. *Genet. Sel. Evol.* 25: 517-536.
- Capy, P.; E. Pla & J. R. David. 1994.** Phenotypic and genetic variability of morphological traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. II. Within-population variability. *Genet. Sel. Evol.* 26: 15-28.
- Cardenas M. E., N. S. Cutler, M. C. Lorenz, C. J. Di Como & J. Heitman. 1999.** The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 13: 3271-3279.
- Carreira V. P., I. M. Soto, E. Hasson & J. J. Fanara. 2006.** Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *J. Evol. Biol.* 19: 1275-1282.
- Cavicchi, S.; G. Giorgi; V. Natali & D. Guerra. 1991.** Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. III. Fourier and centroid analysis of wing shape and relationship between shape variation and fitness. *J. Evol. Biol.* 4: 141-159.

- Cavicchi, S.; D. Guerra, G. Giorgi & C. Pezzoli. 1985.** Temperature related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. I. Genetic and developmental basis of wing size and shape variation. *Genetics* 109: 665-689.
- Cavicchi, S.; C. Pezzoli & G. Giorgi. 1981.** Correlation between characters as related to developmental pattern in *Drosophila*. *Genetica* 56: 189-195.
- Celniker, S. E. & G. M. Rubin. 2003.** The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 4: 89-117.
- Champlin, D. T. & J. W. Truman. 1998a.** Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca sexta*. *Development* 125: 269-277.
- Champlin, D. T. & J. W. Truman. 1998b.** Ecdysteroids govern two phases of eye development during metamorphosis of the moth, *Manduca sexta*. *Development* 125: 2009-2018.
- Chapman, R. F. 1998.** *The Insects: Structure and Function*. Cambridge. Univ. Press, Cambridge.
- Chen, Y. & G. Struhl. 1996.** Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87: 553-563.
- Chihara, C. J.; J. W. Fristrom, W. H. Petri & D. S. King. 1972.** Assay of ecdysones and juvenile hormones on *Drosophila* imaginal disks in-vitro. *J. Insect. Physiol.* 18: 1115.
- Cho, K. S.; J. H. Lee, S. Kim, D. Kim, H. Koh, et al. 2001.** *Drosophila* phosphoinositide-dependent kinase-1 regulates apoptosis and growth via the phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *PNAS* 98: 6144-6149.
- Cohen, B.; E. A. Wimmer & S. M. Cohen. 1991.** Early development of leg and wing primordia in the *Drosophila* embryo. *Mech. Dev.* 33: 229-240.
- Coleman, K. G.; S. J. Poole, M. P. Weir, W. C. Soeller & T. Kornberg. 1987.** The *invected* gene of *Drosophila*: sequence analysis and expression studies reveal a close kinship to the *engrailed* gene. *Genes Dev.* 1: 19-28.
- Collins, F. S.; E. D. Green, A. E. Guttmacher & M. S. Guyer. 2003.** A vision for the future genomics research. *Nature* 422: 835-847.
- Colombani, J.; S. Raisin, S. Pantalacci, T. Radimerski, J. Montagne, et al. 2003.** A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 114: 739-749.
- Colombani J., L. Bianchini, S. Layalle, E. Pondeville, C. Dauphin-Villemant, et al. 2005.** Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* 310: 667-670.
- Combes, S. A. & T. L. Daniel. 2003.** Flexural stiffness in insect wings I. Scaling and the influence of wing venation. *J. Exp. Biol.* 206: 2979-2987.
- Conlon, I. & M. Raff. 1999.** Size control in animals. *Cell* 96: 235-244.
- Cook O, Biehs B, Bier E. 2004.** *brinker* and *optomotor-blind* act coordinately to initiate development of the L5 wing vein primordium in *Drosophila*. *Development* 131: 2113-2124.
- Cooley, L., R. Kelley & A. C. Spradling. 1988.** Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P-elements. *Science* 239: 1121-1128.
- Cooley, L., D. Thompson & A. C. Spradling. 1990.** Constructing deletions with defined endpoints in *Drosophila*. *PNAS* 87: 3170-3173.
- Cortese, M. D.; F. Norry, R. Piccinali & E. Hasson. 2002.** The evolution of two traits related in a trade-off under artificial selection in *Drosophila buzzatii*. Direct and indirect responses in developmental time and wing length. *Evolution* 56: 2541-2547.
- Cowley, D. E. & W. R. Atchley. 1988.** Quantitative genetics of *Drosophila melanogaster*. II. Heritabilities and genetic correlations between sexes for head and thorax traits. *Genetics* 119: 421-433.
- Cowley, D. E. & W. R. Atchley. 1990.** Development and quantitative genetics of correlation structure among body parts of *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* 135: 242-268.
- Cowley, D. E., W. R. Atchley & J. J. Rutledge. 1986.** Quantitative genetics of *Drosophila melanogaster*. I. Sexual dimorphism in genetic parameters for wing traits. *Genetics* 114: 549-566.
- Coyne, J. A. & E. Beecham. 1987.** Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117: 727-737.
- Crickmore, M. A. & R. S. Mann. 2006.** Hox control of organ size by regulation of morphogen production and mobility. *Science* 313: 63-68.
- Crozatier, M.; B. Glise, V. Khemici & A. Vincent. 2003.** Vein-positioning in the *Drosophila* wing in response to Hh; new roles of Notch signaling. *Mech. Dev.* 120: 529-535.
- Culi, J.; P. Aroca, J. Modolell & R. S. Mann. 2006.** *jing* is required for wing development and to establish the proximo-distal axis of the leg in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 173: 255-266.
- Cullen, C. F. & M. J. Milner. 1991.** Parameters of growth in primary cultures and cell-lines established from *Drosophila* imaginal disks. *Tissue Cell* 23: 29-39.

- Currie, D. A.; M. J. Milner & C. W. Evans. 1988. The growth and differentiation invitro of leg and wing imaginal disk cells from *Drosophila melanogaster*. *Development* 102: 805–814.
- Curtiss, J.; G. Halder & M. Mlodzik. 2002. Selector and signalling molecules cooperate in organ patterning. *Nat. Cell Biol.* 4: 48–51.
- Curtsinger, J. W. & C. C. Laurie-Ahlberg. 1981. Genetic variability of flight metabolism in *Drosophila melanogaster*. I. Characterization of power output during tethered flight. *Genetics* 98: 549–564.
- Dahlggaard, J.; E. Hasson & V. Loeschcke. 2001. Behavioral differentiation in oviposition activity in *Drosophila buzzatii* from highland and lowland populations in Argentina: plasticity or thermal adaptation? *Evolution* 55: 738–747.
- David, J. R. 1975. Evolution of a cosmopolitan species: genetic latitudinal clines in *Drosophila melanogaster* wild populations. *Experientia* 31: 164–166.
- David, J. R.; C. Bocquet & E. Pla. 1976. New results on the genetic characteristic of the Far East race of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 28: 253–260.
- David, J. R.; L. O. Araripe, B. C. Bitner-Mathé, P. Capy, B. Goñi, *et al.* 2006a. Quantitative trait analysis and geographic variability of natural populations of *Zaprionus indianus*, a recent invader in Brazil. *Heredity* 96: 53–62.
- David, J. R.; L. O. Araripe, B. C. Bitner-Mathé, P. Capy, B. Goñi, *et al.* 2006b. Sexual dimorphism of body size and sternopleural bristle number: a comparison of geographic populations of an invasive cosmopolitan drosophilid. *Genetica* 128: 109–22.
- David, J. R.; P. Gibert, H. Legout, G. Pétavy, P. Capy, *et al.* 2005. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity* 94: 3–12.
- David, J. R.; H. Legout & B. Moreteau. 2006c. Phenotypic plasticity of body size in a temperate population of *Drosophila melanogaster*: when the temperature-size rule does not apply. *J. Genet.* 85: 9–23.
- David, J. R.; B. Moreteau, J. P. Gauthier, G. Pétavy, A. Stockel, *et al.* 1994. Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in *Drosophila melanogaster*: an isofemale lines analysis. *Genet. Sel. Evol.* 26: 229–251.
- Davidowitz, G.; L. J. D'Amico, H. F. Nijhout. 2003. Critical weight in the development of insect body size. *Evol. Dev.* 5: 188–197.
- Davidowitz, G. & H. F. Nijhout. 2004. The physiological basis of reaction norms: the interaction among growth rate, the duration of growth and body size. *Integr. Comp. Biol.* 144: 443–449.
- Debat, V.; M. Bégin, H. Legout & J. R. David. 2003. Allometric and non allometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution* 57: 2773–2784.
- de Celis, J. F. 1997. Expression and function of *decapentaplegic* and *thick veins* during the differentiation of the veins in the *Drosophila* wing. *Development* 124: 1007–1018.
- de Celis, J. F. & R. Barrio. 2000. Function of the *spalt/spalt-related* gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mech. Dev.* 91: 31–41.
- de Celis, J. F.; S. Bray & A. Garcia-Bellido. 1997. *Notch* signaling regulates *veinlet* expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* 124: 1919–1928.
- de Celis, J. F. & F. J. Diaz-Benjumea. 2003. Developmental basis for vein pattern variations in insect wings. *Int. J. Dev. Biol.* 47: 653–63.
- de Celis, J. F.; M. Llimargas & J. Casanova. 1995. *ventral veinless*, the gene encoding the Cf1a transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*. *Development* 121: 3405–3416.
- de Jong, G. 1990. Quantitative genetics of reaction norms. *J. Evol. Biol.* 3: 447–468.
- de Jong, G. & Z. Bochdanovits. 2003. Latitudinal clines in *Drosophila melanogaster*: body size, allozyme frequencies, inversion frequencies, and the insulin-signalling pathway. *J. Genet.* 82: 207–223.
- Delcour, J. & F. A. Lints. 1966. Environmental and genetic variation of wing size, cell size and cell division rate, in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 37: 543–556.
- De Luca, M.; M. Moses Chambers, K. Casazza, K. H. Lok, G. R. Hunter, B. A. Gower & J. R. Fernández. 2008. Genetic variation in a member of the laminin gene family affects variation in body composition in *Drosophila* and humans. *BMC Genetics* 9: 52.
- De Luca, M.; N. V. Roshina, G. L. Geiger-Thornsberry, R. F. Lyman, E. G. Pasyukova, *et al.* 2003. Dopa decarboxylase (*Ddc*) affects variation in *Drosophila* longevity. *Nature genetics* 34: 429–433.
- De Luca, M.; N. Yi, D. B. Allison, J. Leips & D. M. Ruden. 2005. Mapping quantitative trait loci affecting variation in *Drosophila* triacylglycerol storage. *Obes. Res.* 13: 1596–1605.
- de Moed, G. H.; G. de Jong & W. Scharloo. 1997. Environmental effects on body size variation in *Drosophila melanogaster* and its cellular basis. *Genet. Res. Camb.* 70: 35–43.
- de Moed, G. H.; C. L. J. J. Kruitwagen, G. de Jong & W. Scharloo. 1999. Critical weight for the induction

of pupariation in *Drosophila melanogaster*: genetic and environmental variation. *J. Evol. Biol.* 12: 852–858.

**Diaz-Benjumea, F.J. & A. Garcia-Bellido. 1990.** Behaviour of cells mutant for an EGF receptor homologue of *Drosophila* in genetic mosaics. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 242:35–44.

**Diaz-Benjumea, F. J. & E. Hafen. 1994.** The *sevenless* signaling cassette mediates *Drosophila* EGF receptor function during epidermal development. *Development* 120: 569–578.

**Dickinson, M. H.; F. Lehmann & S. P. Sane. 1999.** Wing rotation and the aerodynamic basis of flight. *Science* 284: 1954–1960.

**Dillon, M. E. & R. Dudley. 2004.** Allometry of maximum vertical force production during hovering flight of neotropical orchid bees (Apidae: Euglossini). *J. Exp. Biol.* 207: 417–425.

**Dillon, M. E. & M. R. Frazier. 2006.** *Drosophila melanogaster* locomotion in cold thin air. *J. Exp. Biol.* 209: 364–371

**Dillon, M. E.; M. R. Frazier & R. Dudley. 2006.** Into thin air: physiology and evolution of alpine insects. *Int. Comp. Biol.* 46(1): 49–61.

**Dobzhansky, T. H. 1948.** Genetics of natural populations. XVI. Altitudinal and seasonal changes produced by natural selection. *Genetics* 33: 158–176.

**Dong J., G. Feldmann, J. Huang, S. Wu, N. Zhang, et al. 2007.** Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130: 1120–1133.

**Drosophila 12 Genomes Consortium. 2007.** Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450: 203–218.

**Dryden, I. L. & K. V. Mardia. 1998.** *Statistical analysis of shape*. Wiley, Chichester, U.K.

**Dudley, R. 2000.** *The biomechanics of insect flight: Form, function, evolution*. Princeton University Press, Princeton.

**Dunn, J. M., K. E. Zinsmaier, B. A. Mozer & S. Benzer. 1993.** A new ‘gene trap’ system for *Drosophila*. *Ann. Rep. Biol. Calif. Inst. Technol.* 1993: 206.

**Durkin, M. E.; F. Loechel, M. G. Mattei, B. J. Gilpin, R. Albrechtsen & U. M. Wewer. 1997.** Tissue-specific expression of the human laminin a5-chain, and mapping of the gene to human chromosome 20q13. 2–13.3 and to distal mouse chromosome2 near the locus for the ragged (Ra) mutation. *FEBS Letters* 411: 296–300.

**Dworkin, I. & G. Gibson. 2006.** Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-beta signaling contributes to variation for wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 173: 1417–1431.

**Dworkin, I.; A. Palsson & G. Gibson. 2005.** Replication of an *Egfr*-wing shape association in a wild-caught cohort of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 169: 2115–2125.

**Eanes, W. F. 1999.** Analysis of selection on enzyme polymorphisms. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30: 301–326.

**Eaton, S. 2006.** Release and trafficking of lipid-linked morphogens. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16: 17–22.

**Edgar B. A. 2006.** How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat. Rev. Genet.* 7: 907–916.

**Ellington, C. P. 1984a.** The aerodynamics of hovering insect flight. II. Morphological parameters. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 305: 17–40.

**Ellington, C. P. 1984b.** The aerodynamics of hovering insect flight. III. Kinematics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 305: 41–78.

**Ellington, C. P. 1984c.** The aerodynamics of hovering insect flight. VI. Lift and power requirements. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 305: 145–181.

**Emlen, D. J. & C. E. Allen. 2003.** Genotype to phenotype: Physiological control of trait size and scaling in insects. *Integr. Comp. Biol.* 43: 617–634.

**Endler, J. A. 1977.** *Geographic variation, speciation, and clines*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

**Etges, W. J. 1989.** Chromosomal influences on life-history variation along an altitudinal transect in *Drosophila robusta*. *Am. Nat.* 133: 83–110.

**Falconer, D. S. 1952.** The problem of environment and selection. *Am. Nat.* 86: 293–298.

**Falconer, D. S. 1960.** Introduction to Quantitative Genetics. The Ronald Press Company, New York.

**Falconer, D. S. & T. F. C. Mackay. 1996.** *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman, London.

**Fanara, J. J.; K. O. Robinson, S. Rollmann, R. R. H. Anholt & T. F. C. Mackay. 2002.** *Vanaso* is a quantitative trait locus for *Drosophila* olfactory behavior. *Genetics* 162: 1321–1328.

**Fedorowicz, F. M.; J. D. Fry, R. R. H. Anholt & T. F. C. Mackay. 1998.** Epistatic interactions between smell-impaired loci in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148: 1885–1891.

**Fernández Iriarte, P. E. & E. Hasson. 2000.** The role of antagonistic pleiotropy and different cactus host in the maintenance of the inversion polymorphism in *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 54: 743–748.

**Fernández Iriarte, P. J.; F. M. Norry & E. R. Hasson. 2003.** Chromosomal inversions effect body size and shape in different breeding resources in *Drosophila buzzatii*. *Heredity* 91: 51–59.

**Fisher, R. A. 1930.** *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press. Oxford, England.

- Fisher, R. A. 1935.** The logic of inductive inference. *J. R. Stat. Soc.* 98: 39-82.
- Fisher, R. A. 1958.** *The Genetical Theory of Natural Selection*. Dover Publications, New York.
- Folguera, G. 2007.** *Análisis de los efectos de la temperatura sobre caracteres fisiológicos y de historia de vida en especies de Drosophila*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Folguera G., S. Ceballos, L. Spezzi, J. J. Fanara & E. Hasson. 2008.** Clinal variation in developmental time and viability and the response to thermal treatments in two species of *Drosophila*. *Biol. J. Linn Soc.* 95: 233-245.
- Freeman, M. 1997.** Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development* 124: 261-270.
- Freeman, M. & J. B. Gurdon. 2002.** Regulatory principles of developmental signaling. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 515-539.
- French, V.; M. Feast & L. Partridge. 1998.** Body size and cell size in *Drosophila*: the developmental response to temperature. *J. Insect Physiol.* 44: 1081-1089.
- Fristrom, D. K.; M. E. Wilcox & J. Fristrom. 1993.** The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in *Drosophila* wing development. *Development* 117: 509-523.
- Fujise, M.; S. Takeo, K. Kamimura, T. Matsuo, T. Aigaki, et al. 2003.** Dally regulates Dpp morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* 130: 1515-1522.
- Funakoshi, Y.; M. Minami & T. Tabata. 2001.** *mtv* shapes the activity gradient of the Dpp morphogen through regulation of *thickveins*. *Development* 128: 67-74.
- Futuyma, D. J. 1998.** *Evolutionary Biology*. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Gaiano N., A. Amsterdam, K. Kawakami, M. Allende, T. Becker, et al. 1996.** Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish. *Nature* 383: 829-832.
- Garcia-Bellido, A. & J. F. de Celis. 1992.** Developmental genetics of the venation pattern of *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 26: 277-304.
- Garcia-Bellido, A. & J. R. Merriam. 1971.** Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 24: 61-87.
- Garcia-Bellido, A.; P. Ripoll & G. Morata. 1973.** Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nature* 245: 251-253.
- Gebhardt, M. D. & S. C. Stearns. 1993.** Phenotypic plasticity for life history traits in *Drosophila melanogaster*. I. Effect on phenotypic and environmental correlations. *J. Evol. Biol.* 6: 1-16.
- Gilbert, S. F. 1997.** *Developmental Biology*. Quinta edición. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Gilchrist, G. W. & R. B. Huey. 2004.** Plastic and genetic variation in wing loading as a function of temperature within and among parallel clines in *Drosophila subobscura*. *Integr. Comp. Biol.* 44: 461-470.
- Gilchrist, A. S. & L. Partridge. 1999.** A comparison of the genetic basis of wing size divergence in three parallel body size clines of *Drosophila melanogaster*: *Genetics* 153: 1775-1787.
- Gilchrist, A. S. & L. Partridge. 2001.** The contrasting genetic architecture of wing size and shape in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 86: 144-152.
- Gilchrist, A. S.; R. B. R. Azevedo, L. Partridge & P. P. O'Higgins. 2000.** Adaptation and constraint in the evolution of *Drosophila melanogaster* wing shape. *Evol. Dev.* 2: 114-124.
- Gilchrist, G. W.; R. B. Huey & L. Serra. 2001.** Rapid evolution of wing size clines in *Drosophila subobscura*. *Genetica* 112-113: 273-286.
- Gockel J., W. J. Kennington, A. Hoffmann, D.B. Goldstein, & L. Partridge. 2001.** Non-clinality of molecular variation implicates selection in maintaining a morphological cline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 158: 319-323.
- Gockel, J.; S. J. W. Robinson, W. J. Kennington, D. B. Goldstein & L. Partridge. 2002.** Quantitative genetic analysis of natural variation in body size in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 89: 145-153.
- Gomez-Skarmeta, J. L.; R. Diez del Corral, E. de la Calle-Mustienes, D. Ferre-Marco & J. Modolell. 1996.** *Araucan* and *caupolican*, two members of the novel *iroquois* complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* 85: 95-105.
- Gould, S. J. 1966.** Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biol. Rev.* 41(4): 587-638
- Gould, S. J. & R. C. Lewontin. 1979.** The Spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm. *Proc. R. Soc. Lond. B* 205: 581-598.
- Goulev, Y.; J. D. Fauny, B. Gonzalez-Marti, D. Flagiello, J. Silber & A. Zider. 2008.** Scalloped interacts with Yorkie, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 18: 435-441.
- Graves, J. L.; E. C. Toolson, C. Jeong, L. N. Vu, & M. R. Rose. 1992.** Desiccation, flight, glycogen, and postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Zool.* 65: 268-286.



- Greenewalt, C. H.** 1960. The wings of insects and birds as mechanical oscillators. *Proc. Am. Philos. Soc.* 104: 605-611.
- Greenspan, R. J.** 2001. The flexible genome. *Nat. Rev. Genet.* 2: 383-387.
- Gronke, S.; M. Beller, S. Fellert, H. Ramakrishnan, H. Jackle, et al.** 2003. Control of fat storage by a *Drosophila* PAT domain protein. *Curr. Biol.* 13: 603-606.
- Grossniklaus, U., H. J. Bellen, C. Wilson & W. J. Gehring.** 1989. P-element-mediated enhancer detection applied to the study of oogenesis in *Drosophila*. *Development* 107: 189-200.
- Guerra, D.; M. C. Pezzoli; G. Georgi; F. Garoia & S. Cavicchi.** 1997. Developmental constraints in the *Drosophila* wing. *Heredity* 79: 564-571.
- Guichard, A.; B. Biehs, M. A. Sturtevant, L. Wickline, J. Chacko, et al.** 1999. *rhomboid* and *Star* interact synergistically to promote EGFR/MAPK signaling during *Drosophila* wing vein development. *Development* 126: 2663-2676.
- Guillén, I.; J. L. Mullor, J. Capdevila, E. Sanchez-Herrero, G. Morata, et al.** 1995. The function of *engrailed* and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* 121: 3447-3456.
- Gurganus, M. C.; S. V. Nuzhdin, J. W. Leips & T. F. C. Mackay.** 1999. High-Resolution Mapping of Quantitative Trait Loci for Sternopleural Bristle Number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 152: 1585-1604.
- Halder, G. & S. B. Carroll.** 2001. Binding of the Vestigial co-factor switches the DNA-target selectivity of the Scalloped selector protein. *Development* 128: 3295-3305.
- Halder, G.; P. Polaczyk, M. E. Kraus, A. Hudson, J. Kim, et al.** 1998. The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12: 3900-3909.
- Halfon, M. S.; A. Carmena, S. Gisselbrecht, C. M. Sackerson, F. Jimenez, et al.** 2000. Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell* 103: 63-74
- Hallas, R.; M. Schiffer & A. A. Hoffmann.** 2002. Clinal variation in *Drosophila serrata* for stress resistance and body size. *Genet. Res.* 79 (2): 141-148.
- Hammond, K. A., J. Szewczak & E. Król.** 2001. Effects of altitude and temperature on organ phenotypic plasticity along an altitudinal gradient. *J. Exp. Biol.* 204: 1991-2000
- Han, C.; D. Yan, T. Y. Belenkaya & X. Lin.** 2005. *Drosophila* glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc. *Development* 132: 667-679.
- Hansen, T. F.** 2006. The evolution of genetic architecture. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 123-57.
- Harbison, S. T.; A. H. Yamamoto, J. J. Fanara, K. K. Norga & T. F. C. Mackay.** 2004. Quantitative trait loci affecting starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 166: 1807-1823.
- Hasson, E.; J. J. Fanara; C. Rodríguez; J. C. Vilardi; O. A. Reig, et al.** 1993. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXVII. Thorax length is positively correlated with longevity in a natural population of Argentina. *Genetica* 92: 61-65.
- Hennig K. M., J. Colombani & T. P. Neufeld.** 2006. TOR coordinates bulk and targeted endocytosis in the *Drosophila melanogaster* fat body to regulate cell growth. *J. Cell Biol.* 173: 963-974.
- Heslip, T. R. & R. B. Hodgetts.** 1994. Targeted transposition at the *vestigial* locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 138: 1127-1135.
- Hieter, P. & M. Boguski.** 1997. Functional Genomics: It's all how you read it. *Science* 278: 601-602.
- Hodgetts, R. B.; B. Sage & J. D. O'Connor.** 1977. Ecdysone titers during postembryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 60: 310-317.
- Hoffmann, A. A. & A. R. Weeks.** 2007. Climatic selection on genes and traits after a 100 year-old invasion: a critical look at the temperate-tropical clines in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *Genetica* 129: 133-147.
- Hotelling, H.** 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ. Psychol.* 24: 417-441, 498-520.
- Huang, J.; S. Wu, J. Barrera, K. Matthews & D. Pan.** 2005. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122: 421-434.
- Huet, F., J. T. Lu, K. V. Myrick, L. R. Baugh, M. A. Crosby, et al.** 2002. A deletion-generator compound element allows deletion saturation analysis for genome wide phenotypic annotation. *PNAS* 99: 9948-9953.
- Huey, R. B.; G. W. Gilchrist; M. L. Carlson; D. Berrigan & L. Serra.** 2000. Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. *Science* 287: 308-309.
- Huey, R. B. & J. G. Kingsolver.** 1989. Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. *Trends*

*Ecol. Evol.* 4: 131-135.

**Huey, R. B.; L. Partridge & K. Fowler. 1991.** Thermal sensitivity of *Drosophila melanogaster* responds rapidly to laboratory natural selection. *Evolution* 45: 751-756.

**Huxley, J. S. 1924.** Constant differential growth-ratios and their significance. *Nature* 114: 895-896.

**Hwangbo, D. S.; B. Gersham, M. P. Tu, M. Palmer & M. Tatar. 2004.** *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429: 562-566.

**Ikeya, T.; M. Galic, P. Belawat, K. Nairz & E. Hafen. 2002.** Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 12: 1293-1300.

**Imasheva, A. G.; O. A. Bubli & O. E. Lazebny. 1994.** Variation in wing length in Eurasian natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 72: 508-514.

**Imasheva, A. G., O. A. Bubli, O. E. Lazebny, and L. A. Zhivotovsky. 1995.** Geographic differentiation in wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 96: 303-306.

**Imasheva, A. G.; B. Moreteau & J. R. David. 2000.** Growth temperature and genetic variability of wing dimensions in *Drosophila*: opposite trends in two sibling species. *Genet. Res. Camb.* 76: 237-247.

**Imberti, M. 2008.** Genómica funcional de caracteres vinculados al tamaño corporal en *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Universidad de Buenos Aires.

**Irvine K. D. & C. Rauskolb. 2001.** Boundaries in development: formation and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 189-214.

**James, A. C.; R. B. Azevedo & L. Partridge. 1995.** Cellular basis and developmental timing in a size cline of *Drosophila melanogaster*: *Genetics* 140: 659-666.

**James, F. C. 1970.** Geographic size variation in birds and its relationship to climate. *Ecology* 51: 365-390.

**James, A. C.; R. B. Azevedo & L. Partridge. 1997.** Genetic and environmental responses to temperature of *Drosophila melanogaster* from a latitudinal cline. *Genetics* 146: 881-890.

**James, A. C. & L. Partridge. 1995.** Thermal evolution of the rate of larval development in *Drosophila melanogaster* in lab and field populations. *J. Evol. Biol.* 8: 315-330.

**Jolicoeur, P. 1963.** The generalization of the allometry equation. *Biometrics* 19: 497-499.

**Jun, T. & O. Gjoerup & T. M. Roberts. 1999.** Tangled webs: evidence of cross talk between c-Raf-1 and Akt. *Sci STKE* 13: pe1.

**Junger, M. A.; F. Rintelen, H. Stocker, J. D. Wasserman, M. Vegh, et al. 2003.** The *Drosophila* Forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *J. Biol.* 2: 20-36.

**Jursnich, V. A.; S. E. Fraser, L. I. Held Jr., J. Ryerse & P. J. Bryant. 1990.** Defective gap-junctional communication associated with imaginal disc overgrowth and degeneration caused by mutations of the *dco* gene in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 140: 413-429.

**Kamping, A. & W. van Delden 1999.** A long-term study on interactions between the Adh and alpha Gpdh allozyme polymorphisms and the chromosomal inversion *In(2L)t* in a seminatural population of *D. melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 12: 809-821.

**Karan, D.; A. K. Munjal; P. Gibert; B. Moreteau; R. Parkash, et al. 1998.** Latitudinal clines for morphometrical traits in *Drosophila kikkawai*: a study of natural populations from the Indian subcontinent. *Genet. Res.* 71:31-38.

**Kari, J.S. & R. B. Huey. 2000.** Size and seasonal temperature in free-ranging *Drosophila subobscura*. *J Therm. Biol.* 25: 267-272.

**Kawamura, K.; T. Shibata, O. Saget, D. Peel & P. J. Bryant. 1999.** A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development* 126: 211-219.

**Kearsey, M. J. & K. Kojima. 1967.** The genetic architecture of body weight and egg hatchability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 56: 23-37.

**Kendall, D. G. 1984.** Shape-manifolds, Procrustean metrics and complex projective spaces. *Bull. London Math. Soc.* 16: 81-121.

**Kennington, W. J.; L. Partridge & A. A. Hoffmann. 2006.** Patterns of diversity and linkage disequilibrium within the cosmopolitan inversion *In(3R)Payne* in *Drosophila melanogaster* are indicative of coadaptation. *Genetics* 172: 1655-1663.

**Kennington, W. J.; A. A. Hoffmann & L. Partridge. 2007.** Mapping regions within cosmopolitan inversion *In(3R)Payne* associated with natural variation in body size in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 177: 549-556.

**Kiger, J. A. Jr.; J. E. Natzle, D. A. Kimbrell, M. R. Paddy, K. Kleinhesselink, et al. 2007.** Tissue remodeling during maturation of the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* 301: 178-91.

**Khare, P. V.; R. J. Barnabas, M. Kanojiya, A. D. Kulkarni & D. S. Joshi. 2002.** Temperature dependent

- eclosion rhythmicity in the high altitude Himalayan strains of *Drosophila ananassae*. *Chronobiol. Int.* 19: 1041–1052.
- Kjærsgaard, A.; S. Faurby, D. H. Andersen, C. Pertoldi; J. R. David, *et al.* 2007. Effects of temperature and maternal and grandmaternal age on wing shape in parthenogenetic *Drosophila mercatorum*. *J. Therm. Biology* 32: 59–65.
- Klingenberg C. P. & L. J. Leamy. 2001. Quantitative genetics of geometric shape in the mouse mandible. *Evolution* 55: 2342–2352.
- Klingenberg, C. P. & H. F. Nijhout. 1998. Competition among growing organs and developmental control of morphological asymmetry. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 265: 1135–1139.
- Klingenberg, C. P. & S. D. Zaklan. 2000. Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution* 54(4): 1273–1285.
- Knibb, W. R.; J. G. Oakeshott & J. B. Gibson. 1981. Chromosome inversion polymorphism in *Drosophila melanogaster*. I. Latitudinal clines and associations between inversions in Australasian populations. *Genetics* 98: 833–837.
- Knibb, W. R.; J. G. Oakeshott & J. B. Gibson. 1982. Chromosome inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster*. II. Geographic clines and climatic associations in Australasia, North America and Asia. *Genetica* 58: 213–221.
- Konev, A. Y., C. M. Yan, D. Acevedo, C. Kennedy, E. Ward, *et al.* 2003. Genetics of *P*-element transposition into *Drosophila melanogaster* centric heterochromatin. *Genetics* 165: 2039–2053.
- Korswagen, H. C.; R. M. Durbin, M. T. Smits & R. H. A. Plasterk. 1996. Transposon Tc1-derived, sequence-tagged sites in *Caenorhabditis elegans* as markers for gene mapping. *PNAS* 93: 14680–14685.
- Kramer, J. M., J. T. Davidge, J. M. Lockyer & B. E. Staveley. 2003. Expression of *Drosophila* FOXO regulates growth and can phenocopy starvation. *BMC Dev Biol* 3: 5–18.
- Krimbas C. B. & J. R. Powell. 1992. *Drosophila* inversion polymorphism. CRC Press, Boca Raton.
- Lai, E. C.; G. A. Deblandre, C. Kintner & G. M. Rubin. 2001. *Drosophila* neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta. *Dev. Cell* 1: 783–794.
- Lande, R. 1980. Sexual dimorphism, sexual selection, and adaptation in polygenic characters. *Evolution* 34: 292–305.
- Le Borgne, R. 2006. Regulation of Notch signaling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 213–222.
- Le Borgne, R.; S. Remaud, S. Hamel, F. Schweisguth. 2005. Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of Delta and Serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 3: e96.
- Lecuit, T. & L. Le Goff. 2007. Orchestrating size and shape during morphogenesis. *Nature* 450 (8): 189–192.
- Legent, K.; A. Dutriaux, R. Delanoue & J. Silber. 2006. Cell cycle genes regulate vestigial and scalloped to ensure normal proliferation in the wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Genes Cells* 11(8): 907–918.
- Lehmann, F. O. 1999. Ambient temperature affects free-flight performance in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. B* 169: 165–171.
- Lehmann, F. O. & M. H. Dickinson 1998. The control of wing kinematics and flight forces in fruit flies (*Drosophila* spp.). *J. Exp. Biol.* 201: 385–401.
- Leibowitz, A.; M. Santos & A. Fontdevila. 1995. Heritability and selection on body size in a natural population of *Drosophila buzzatii*. *Genetics* 141: 181–190.
- Lerner, I. M. 1954. *Genetic Homeostasis*. John Wiley & Sons, New York.
- Liao, G. C., E. J. Rehm & G. M. Rubin. 2000. Insertion site preferences of the *P* transposable element in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 97: 3347–3351.
- Liu, X.; M. Grammont & K. D. Irvine. 2000. Roles for scalloped and vestigial in regulating cell affinity and interactions between the wing blade and the wing hinge. *Dev. Biol.* 228: 287–303.
- Loeschcke, V.; J. Bungaard & J. S. F. Barker. 1999. Reaction norms across and genetic parameters at different temperatures for thorax and wing size traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii*. *J. Evol. Biol.* 12: 605–623.
- Loeschcke, V.; J. Bungaard & J. S. F. Barker. 2000. Variation in body size and life history traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii* from a latitudinal cline in eastern Australia. *Heredity* 85: 423–433.
- Long, A. D.; S. L. Mullaney, L. A. Reid, J. D. Fry, C. H. Langley, *et al.* 1995. High resolution mapping of genetic factors affecting abdominal bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139: 1273–1291.
- Long, A. D.; R. F. Lyman, C. H. Langley & T. F. C. Mackay. 1998. Two sites in the *delta* gene region contribute to naturally occurring variation in bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 149: 999–1017.
- Long, A. D.; R. F. Lyman, A. H. Morgan, C. H. Langley & T. F. C. Mackay. 2000. Both naturally

occurring insertions of transposable elements and intermediate frequency polymorphisms at the *achaete-scute* complex are associated with variation in bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 154: 1255–1269.

**Long, A. D. & R. S. Singh. 1995.** Molecules versus morphology: the detection of selection acting on morphological characters along a cline in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 74:569-581.

**Louis, J.; J. David, J. Rouault & P. Capy. 1982.** Altitudinal variations of Afro-tropical *D. melanogaster* populations. *Dros. Inf. Serv.* 58: 100-101

**Lukacsovich, T.; Z. Asztalos, W. Awano, K. Baba, S. Kondo, et al. 2001.** Dual-tagging gene trap of novel genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 157: 727-742.

**Lyman, R. F.; C. Lai & T. F. C. Mackay. 1999.** Linkage disequilibrium mapping of molecular polymorphisms at the *scabrous* locus associated with naturally occurring variation in bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics Research* 74 : 303-311.

**Lyman, R. F.; F. Lawrence, S.V. Nuzhdin & T. F. C. Mackay. 1996.** Effects of single *P*-element insertions on bristle number and viability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 143: 277-292.

**Lyman, R. F. & T. F. C. Mackay. 1998.** Candidate quantitative trait loci and naturally occurring phenotypic variation for bristle number in *Drosophila melanogaster*: the *Delta-Hairless* gene region. *Genetics* 149: 983–998.

**Machin, K. E.; J. W. S. Pringle & M. Tamasige. 1962.** The physiology of insect fibrillar muscle IV. The effect of temperature on a beetle flight muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 155: 493-499.

**Mackay, T. F. C. 2004.** The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. & Dev.* 14: 253–257.

**Mackay, T. F. C. & R. R. H. Anholt. 2007.** Ain't misbehavin'? Genotype-environment interactions and the genetics of behavior. *Trends Genet.* 23 (7): 311-314.

**Madhavan, M. M. & H. A. Schneiderman. 1977.** Histological analysis of dynamics of growth of imaginal disks and histoblast nests during larval development of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch. Devel. Biol.* 183: 269–305.

**Malpica, J.; J. Vasallo, A. Frias & F. Fuentes-Bol. 1987.** On recombination among *In(2L)t*, *aGpdh* and *Adh* in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 115: 141–142.

**Mani, M. S. 1968.** *Ecology and Biogeography of High Altitude Insects*. Dr W. Junk, The Hague.

**Mann, R. S. & G. Morata. 2000.** The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 243-271.

**Marcus, L. F. 1990.** Traditional morphometrics. En: *Proceedings of the Michigan morphometrics workshop*. Editores: Rohlf, F. J. & F. L. Bookstein. Págs. 77-122. Spec. Publ. N° 2. University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor.

**Marden, J. H. 1989.** Effects of load-lifting constraints on the mating system of a dance fly. *Ecology* 70: 496–502.

**Marden, J. H. 1995.** Evolutionary adaptation of contractile performance in muscle of ectothermic winter-flying moths. *J. Evol. Biol.* 198: 2087–2094.

**Marenda, D. R.; A. D. Vrailas, A. B. Rodrigues, S. Cook, M. A. Powers, et al. 2006.** MAP kinase subcellular localization controls both pattern and proliferation in the developing *Drosophila* wing. *Development* 133: 43–51.

**Martin-Blanco, E.; F. Roch, E. Noll, A. Baonza, J. B. Duffy, et al. 1999.** A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* 126: 5739–5747.

**Martin-Castellanos C. & B. A. Edgar. 2002.** A characterization of the effects of *Dpp* signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing. *Development* 129: 1003–1013.

**Matta, B. P. & 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.

**Matthews, K. A.; T. C. Kaufman & W. M. Gelbart. 2005.** Research resources for *Drosophila*: the expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 6: 179-193.

**Mauricio, R. 2005.** Natura non facit saltum. *Genetica* 123: 1–2.

**Maynard-Smith, J. 1978.** Optimization theory in evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 9: 31-56.

**McCabe, J & L. Partridge. 1997.** An interaction between environmental temperature and genetic variation for body size for the fitness of adult female of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 51: 1164-1174.

**McCabe, J.; V. French & L. Partridge. 1997.** Joint regulation of cell size and cell number in the wing blade of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res. Camb.* 69: 61-68.

- Mensch J., V. P. Carreira, N. Lavagnino, M. Imberti, E. Hasson, et al. 2007.** Quantitative genetic analysis of natural variation in developmental time in *Drosophila melanogaster* second chromosome. *V Simpósio de Ecologia, Genética e Evolução de Drosophila. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.*
- Mensch J., N. Lavagnino, V. P. Carreira, A. Massaldi, E. Hasson, et al. 2008.** Identifying candidate genes affecting developmental time in *Drosophila melanogaster*: pervasive pleiotropy and gene-by-environment interaction. *BMC Dev. Biol.* 8: 78.
- Mezey, J. & D. Houle. 2005.** The dimensionality of genetic variation for wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 59: 1027–1038.
- Mezey, J. G.; D. Houle & S. V. Nuzhdin. 2005.** Naturally segregating quantitative trait loci affecting wing shape of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 169: 2101–2113.
- Micchelli, C. A.; E. J. Rulifson & S. S. Blair. 1997.** The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless, and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* 124: 1485–1495.
- Mikkers, H., J. Allen, P. Knipscheer, L. Romeijn, A. Hart, et al. 2002.** High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer. *Nat. Genet.* 32: 153–159.
- Minami, M.; N. Kinoshita, Y. Kamoshida, H. Tanimoto & T. Tabata. 1999.** *brinker* is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* 398: 242–246.
- Mirth, C. 2005.** Ecdysteroid control of metamorphosis in the differentiating adult leg structures of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 278: 163–174.
- Mirth, C.; J. W. Truman & L. M. Riddiford. 2005.** The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15: 1796–1807.
- Mirth, K. & L. M. Riddiford. 2007.** Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *BioEssays* 29: 344–355.
- Misra, R. K. 1966.** Vectorial analysis for genetic clines in body dimensions in populations of *Drosophila subobscura* Coll. and comparison with those of *D. robusta* Sturt. *Biometrics* 22: 469–487.
- Misra, R. R. & E. C. R. Reeve. 1964.** Clines in body dimensions in populations of *Drosophila subobscura*. *Genet. Res.* 5: 240–256.
- Mitchell, K. J., K. I. Pinson, O. G. Kelly, J. Brennan, J. Zupicich, et al. 2001.** Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat. Genet.* 28: 241–249.
- Mohler, J.; M. Seecoomar, S. Agarwal, E. Bier & J. Hsai. 2000.** Activation of *knot* (*kn*) specifies the 3–4 intervein region in the *Drosophila* wing. *Development* 127: 55–63.
- Montagne, J.; J. Groppe, K. Guillemain, M. A. Krasnow, W. J. Gehring, et al. 1996.** The *Drosophila Serum Response Factor* gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to *blistered*. *Development* 122: 2589–2597.
- Morata, G. & P. Ripoll. 1975.** Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* 42: 211–221.
- Moreteau, B.; P. Gibert, J. C. Pétavy, R. B. Huey & J. R. David. 2003.** Morphometrical evolution in a *Drosophila* clade: the *Drosophila obscura* group. *J. Zool. Syst. Evol. Research* 41: 64–71.
- Moreteau, B.; A. G. Imasheva, J. P. Morin & J. R. David. 1998.** Wing shape and developmental temperature in two *Drosophila* sibling species: different wing regions exhibit different norms of reaction. *Russ. J. Genet.* 34: 183–192.
- Morin, J. P.; B. Moreteau, G. Pétavy & J. R. David. 1999.** Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *J. Evol. Biol.* 12: 329–339.
- Morin, J. P.; B. Moreteau, G. Pétavy, R. Parkash & J. R. David. 1997.** Reaction norms of morphological traits in *Drosophila*: adaptive shape changes in a stenotherm circumtropical species? *Evolution* 51: 1140–1148.
- Mullor, J. L. & I. Guerrero. 2000.** A gain-of-function mutant of patched dissects different responses to the hedgehog gradient. *Dev. Biol.* 228: 211–224.
- Munjal, A. K.; D. Karan, P. Gibert, B. Moreteau, R. Parkash, et al. 1997.** Thoracic pigmentation in *Drosophila melanogaster*: latitudinal and altitudinal clines in Indian populations. *Genet. Sel. Evol.* 29: 601–610.
- Murray, M. A.; L. I. Fessler & J. Palka. 1995.** Changing distributions of extracellular matrix components during early wing morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 168: 150–165.
- Neat, F.; K. Fowler, V. French & L. Partridge. 1995.** Thermal evolution of growth efficiency in *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc. London B* 260: 73–78.
- Neufeld, T. P. 2003.** Body building: regulation of shape and size by PI3K/TOR signaling during development. *Mech. Dev.* 120: 1283–1296.

- Neufeld, T. P., A. F. A. de la Cruz, L. A. Johnston & B. A. Edgar. 1998. Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 93: 1183-1193.
- Neumann, C. J. & S. M. Cohen. 1996. Distinct mitogenic and cell fate specification functions of *wingless* in different regions of the wing. *Development* 122: 1781-1789.
- Ng, M.; F. J. Diaz Benjumea, J. P. Vincent, J. Wu & S. M. Cohen. 1996. Specification of the wing by localized expression of *wingless* protein. *Nature* 381: 316-318.
- Nichols, J. T.; A. Miyamoto, S. L. Olsen, B. D'Souza, C. Yao, *et al.* 2007. DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J. Cell Biol.* 176: 445-458.
- Nijhout, H. F. 1981. Physiological control of molting in insects. *Am. Zool.* 21: 631-640.
- Nijhout, H. F. 1994. *Insect Hormones*. Princeton University Press, Princeton.
- Nijhout, H. F. 2003. The control of body size in insects. *Dev. Biol.* 261: 1-9.
- Nijhout H. F., G. Davidowitz, D. A. Roff. 2006. A quantitative analysis of the mechanism that controls body size in *Manduca sexta*. *J. Biol.* 5: 16-30.
- Nijhout, H. F. & D. J. Emlen. 1998. Competition among body parts in the development and evolution of insect morphology. *PNAS* 95: 3685-3689.
- Nijhout, H. F. & C. M. Williams. 1974a. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.): growth of the last-instar larva and the decision to pupate. *J. Exp. Biol.* 61: 481-491.
- Nijhout, H. F. & C. M. Williams. 1974b. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.): cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation. *J. Exp. Biol.* 61: 493-501.
- Noach, E. J. K.; G. de Jong & W. Scharloo. 1996. Phenotypic plasticity in morphological traits in two populations of *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 9: 831-844.
- Norga, K. K.; M. C. Gurganus, C. L. Dilda, A. Yamamoto, R. F. Lyman, *et al.* 2003. Quantitative analysis of bristle number in *Drosophila* mutants identifies genes involved in neural development. *Curr. Biol.* 13: 1388-1397.
- Norry, F. M.; O. A. Bublik & V. Loeschcke. 2001. Developmental time, body size and wing loading in *Drosophila buzzatii* from lowland and highland populations in Argentina. *Hereditas* 135: 35-40.
- Norry, F. M. & V. Loeschcke. 2002. Temperature-induced shifts in associations of longevity with body size in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 56(2): 299-306.
- Norry FM, J. C. Vilardi; P. Fernandez Iriarte & E. Hasson. 1997a. Correlations among size-related traits affected by chromosome inversions in *Drosophila buzzatii*: the comparison within and across environments. *Hereditas* 126: 225-231.
- Norry, F. M.; J. C. Vilardi & E. Hasson. 1997b. Correlations among size-related traits are affected by chromosome inversions in an adaptive polymorphism in *Drosophila buzzatii*. *Heredity* 79: 585-90.
- Norry FM, J. C. Vilardi & E. Hasson. 1997c. Genetic and phenotypic correlations among size-related traits, and heritability variation between body parts in *Drosophila buzzatii*. *Genetica* 101: 131-139.
- Norry, F. M., J. C. Vilardi & E. Hasson. 2000. Negative genetic correlation between traits of the *Drosophila* head, and interspecific divergence in head shape. *Heredity* 85:177-183.
- Nunney, L. & W. Cheung. 1997. The effect of temperature on body size and fecundity in female *Drosophila melanogaster*: evidence for adaptive plasticity. *Evolution* 51: 1529-1535.
- Oh, S. W., T. Kingsley, H. H. Shin, Z. Zheng, H. W. Chen, *et al.* 2003. A P-element insertion screen identified mutations in 455 novel essential genes in *Drosophila*. *Genetics* 163: 195-201.
- O'Kane, C. J. & W. J. Gehring. 1987. Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *PNAS* 84: 9123-9127.
- Oldham S. & E. Hafen. 2003. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol.* 13: 79-85.
- Oldham, S.; J. Montagne, T. Radimerski, G. Thomas & E. Hafen. 2000. Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev.* 14: 2689-2694.
- Palsson, A. & G. Gibson. 2000. Quantitative developmental genetic analysis reveals that the ancestral dipteran wing vein prepatter is conserved in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genes Evol.* 210: 617-622.
- Palsson, A. & G. Gibson. 2004. Association between nucleotide variation in *Egfr* and wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167: 1187-1198.
- Pan, D. 2007. Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev.* 2: 886-897.
- Parkash, R.; D. Karan, S. K. Kataria & A. K. Munjal. 1999. Phenotypic variability of quantitative traits in Indian populations of *Drosophila kikkawai*. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 37: 13-17.
- Parkash, R.; P. K. Tyagi, I. Sharma & S. Rajpurohit. 2005. Adaptations to environmental stress in

altitudinal populations of two *Drosophila* species. *Physiol. Entomol.* 30: 353–361.

**Parks, A. L.; K. M. Klueg, J. R. Stout & M. A. Muskavitch. 2000.** Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127: 1373–1385.

**Partridge, L.; B. Barrie; N. H. Barton; K. Fowler & V. French. 1995.** Rapid laboratory evolution of adult life-history traits in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution* 49: 538–544.

**Partridge, L.; B. Barrie; K. Fowler & V. French. 1994.** Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution* 48: 1269–1276.

**Partridge, L. & M. Farquhar. 1983.** Lifetime mating success of males fruitflies (*Drosophila melanogaster*) is related to their size. *Anim. Behav.* 31: 871–877.

**Partridge, L. & K. Fowler. 1993.** Responses and correlated responses to artificial selection on thorax length in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 47: 213–226.

**Partridge, L.; A. Hoffman & J. C. Jones. 1987.** Male size and mating success in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila pseudoobscura* under field conditions. *Anim. Behav.* 35: 468–476.

**Partridge, L.; R. Langelan, K. Fowler, B. Zwaan & V. French. 1999.** Correlated responses to selection on body size in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 74: 43–54.

**Pasyukova, E. G.; C. Vieira & T. F. C. Mackay. 2000.** Deficiency Mapping of Quantitative Trait Loci Affecting Longevity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 156: 1129–1146.

**Pavlopoulos, E.; C. Pitsouli, K. M. Klueg, M. A. Muskavitch, N. K. Moschonas, et al. 2001.** *neuralized* encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. *Dev. Cell* 1: 807–816.

**Pearson, K. 1895.** Note on regression and inheritance in the case of two parents. *Proc. R. Soc. Lond.* 58: 240–242.

**Pegueroles, G.; M. Papacit, A. Quintana, A. Guillén, A. Prevosti, et al. 1995.** An experimental study of evolution in progress: clines for quantitative traits in colonizing and Palearctic populations of *Drosophila*. *Evol. Ecol.* 9: 453–465.

**Pétavy, G.; J. R. David, V. Debat, P. Gibert & B. Moreteau B. 2004.** Specific effects of cycling stressful temperatures upon phenotypic and genetic variability of size traits in *Drosophila melanogaster*. *Evol. Ecol. Res.* 6: 873–890.

**Pétavy, G.; J. R. David, P. Gibert & B. Moreteau. 2001a.** Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes. *J. Therm. Biol.* 26: 29–39.

**Pétavy, G.; B. Moreteau, P. Gibert, J. P. Morin & J. R. David. 2001b.** Phenotypic plasticity of body size in *Drosophila*: effects of a daily periodicity of growth temperature in two sibling species. *Physiol. Entomol.* 26: 351–361.

**Pétavy, G.; J. P. Morin, B. Moreteau & J. R. David. 1997.** Growth temperature and phenotypic plasticity in two *Drosophila* sibling species: Probable adaptive changes in flight capacities. *J. Evol. Biol.* 10: 875–887.

**Pezzoli, M. C.; D. Guerra; G. Georgi; F. Garoia & S. Cavicchi. 1997.** Developmental constraints and wing shape variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 79: 527–572.

**Phillips, P. C. 2005.** Testing hypotheses regarding the genetics of adaptation. *Genetica* 123: 15–24.

**Pigliucci, M.; C. J. Murren & C. D. Schlichting. 2006.** Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J. Exp. Biol.* 209: 2362–2367.

**Plasterk, R. H. 1993.** Reverse genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* 14: 629–633.

**Plasterk, R. H. 1999.** The year of the worm. *BioEssays* 21: 105–109.

**Postlethwait, J. H. & H. A. Schneiderman. 1970.** Effects of an ecdysone on growth and cuticle formation of *Drosophila* imaginal discs cultured in vivo. *DIS* 45: 124.

**Potter, C. J. & T. Xu. 2001.** Mechanisms of size control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 279–286.

**Preston, C. R. & W. R. Engels. 1996.** *P*-element-induced male recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* 144: 1611–1622.

**Preston, C. R., J. A. Sved & W. R. Engels. 1996.** Flanking duplications and deletions associated with *P*-induced male recombination in *Drosophila*. *Genetics* 144: 1623–1638.

**Prout, M., Z. Damania, J. Soong, D. Fristrom & J. W. Fristrom. 1997.** Systematic recovery of autosomal mutations affecting adhesion between wing surfaces. *A. Dros. Res. Conf.* 38: 155B.

**Puig, O.; M. T. Marr, M. L. Ruhf & R. Tijan. 2003.** Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev.* 17: 2006–2020.

**Rako, L.; A. R. Anderson, C. M. Sgro, A. J. Stocker & A. A. Hoffmann. 2006.** The association between inversion *In(3R)Payne* and clinally varying traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 128: 373–384.

**Ralston, A. & S. S. Blair. 2005.** Long-range Dpp signaling is regulated to restrict BMP signaling to a crossvein competent zone. *Dev. Biol.* 280: 187–200.

**Rankinen, T.; A. Zuberi, Y. C. Chagnon, S. J. Weisnagel, G. Argyropoulos, B. Walts, L. Perusse & C.**

- Bouchard. 2006.** The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14: 529-644.
- Ray, R. P. & K. A. Wharton. 2001.** Context-dependent relationships between the BMPs *gbb* and *dpp* during development of the *Drosophila* wing imaginal disk. *Development* 128: 3913-3925.
- Reddy, B. V. V. G. & K. D. Irvine. 2008.** The Fat and Warts signaling pathways: new insights into their regulation, mechanism and conservation. *Development* 135: 2827-2838.
- Reed, S. C.; C. M. Williams & L. E. Chadwick. 1942.** Frequency of wing-beat as a character for separating species, races and geographic varieties of *Drosophila*. *Genetics* 27: 349-361.
- Reeve, M. W.; K. Fowler & L. Partridge. 2000.** Increased body size confers greater fitness at lower experimental temperature in male *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 13: 836-844.
- Reich, A. & B. Z. Shilo. 2002.** Keren, a new ligand of the *Drosophila* epidermal growth factor receptor, undergoes two modes of cleavage. *EMBO J.* 21: 4287-4296.
- Rice, W. R. 1984.** Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution* 38: 735-742.
- Richtsmeier, J. T.; V. Burke Deleon & S. R. Lele. 2002.** The Promise of Geometric Morphometrics. *Yearbook of physical anthropology* 45: 63-91.
- Roberts, D. B. 1998.** *Drosophila*, a practical approach. Second edition. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Robertson, F. W. 1957.** Studies in quantitative inheritance XI. Genetic and environmental correlation between body size and egg production in *Drosophila melanogaster*. *J. Genet.* 55: 428-443.
- Robertson, F. W. 1959.** Studies in quantitative inheritance. XII. Cell size and number in relation to genetic and environmental variation of body size in *Drosophila*. *Genetics* 44: 869-896.
- Robinson, S. J. W. & L. Partridge. 2001.** Temperature and clinal variation in larval growth efficiency in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 14: 14-21.
- Roff, D. A. 1977.** Dispersal in dipterans: its costs and consequences. *J. An. Ecol.* 46(2): 443-456.
- Roff, D. A. 1992.** *The Evolution of Life Histories*. Chapman and Hall, New York.
- Roff, D. A. 1997.** *Evolutionary Quantitative Genetics*. Chapman & Hall, New York.
- Roff, D. A. 2000.** Trade-offs between growth and reproduction: an analysis of the quantitative genetic evidence. *J. Evol. Biol.* 13: 434-445.
- Rohlf, F. J. 1993.** Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. En *Contributions to morphometrics*. Editores: Marcus, L. F.; E. Bello & A. Garcia-Valdecasas. Págs. 131-159. Monografías. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid.
- Rohlf, F. J. 1999.** Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *J. Class.* 16: 197-223.
- Rohlf, F. J. 2000.** tpsRegr©. Versión 1.26. Software de distribución gratuita disponible en <http://morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.
- Rohlf, F. J. 2001.** tpsDig©. Versión 1.31. Software de distribución gratuita disponible en <http://morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.
- Rohlf, F. J. 2003a.** tpsSmall©. Versión 1.20. Software de distribución gratuita disponible en <http://morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.
- Rohlf, F. J. 2003b.** tpsRelw©. Versión 1.31. Software de distribución gratuita disponible en <http://morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.
- Rohlf, F. J. 2004.** tpsSpln©. Versión 1.18. Software de distribución gratuita disponible en <http://morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.
- Rohlf, F. J. & L. F. Marcus. 1993.** A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.* 8: 129-132.
- Rohlf, F. J. & D. Slice. 1990.** Extensions of the procrustes method for the superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* 39: 40-59
- Rohlf, F. J. & R. R. Sokal. 1972.** Comparative morphometrics by factor analysis in two species of Diptera. *Z. Morphol. Tiere* 72: 36-45.
- Rollmann, S. M.; M. M. Magwire, T. J. Morgan, E. D. Ozsoy, A. Yamamoto, et al. 2006.** Pleiotropic fitness effects of the *Tre1-Gr5a* region in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 38: 824-829.
- Romero-Alcaraz, E. & J. M. Avila. 2000.** Effect of elevation and type of habitat on the abundance and diversity of Scarabaeoid dung beetle (Scarabaeoidea) assemblages in a mediterranean area from southern Iberian Peninsula. *Zool. Stud.* 39: 351-359.
- Rørth, P. 1996.** A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *PNAS* 93: 12418-12422.
- Rørth, P., K. Szabo, A. Bailey, T. Laverly, J. Rehm, et al. 1998.** Systematic gain-of-function genetics in



*Drosophila. Development* 125: 1049–1057.

**Rüber L. & D. C. Adams. 2001.** Evolutionary convergence of body shape and trophic morphology in cichlids from Lake Tanganyika. *J. Evol. Biol.* 14: 325–332.

**Rubin G. M. & E. B. Lewis. 2000.** A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. *Science* 287: 2216–2218.

**Rulifson, E. J.; S. K. Kim & R. Nusse. 2002.** Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* 296: 1118–1120.

**Salzberg, A., S. N. Prokopenko, Y. He, P. Tsai, M. Pal, et al. 1997.** P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: mutations affecting embryonic PNS development. *Genetics* 147: 1723–1741.

**Sambandan, D.; A. Yamamoto, J. J. Fanara, T. F. C. Mackay & R. R. Anholt. 2006.** Dynamic genetic interactions determine odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 174: 1349–1363.

**Sambucetti, P.; V. Loeschcke & F. M. Norry. 2006.** Developmental time and size-related traits in *Drosophila buzzatii* along an altitudinal gradient from Argentina. *Hereditas* 143: 77–83.

**Sanicola, M.; J. Sekelsky, S. Elson & W. M. Gelbart. 1995.** Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: negative regulation of *Decapentaplegic* and *patched* expression by *Engrailed*. *Genetics* 139: 745–756.

**Santos, M.; W. Céspedes, J. Belanyà, V. F. Trotta, C. F. Calboli, et al. 2005.** Temperature-related genetic changes in laboratory populations of *Drosophila subobscura*: evidence against simple climatic-based explanations for latitudinal clines. *Am. Nat.* 165: 258–273.

**Santos M., A. Ruiz, A. Barbadilla, J. E. Quesada Díaz, E. Hasson, et al. 1988.** The evolutionary History of *Drosophila buzzatii*. XIV. Larger flies mate more often in nature. *Heredity* 61: 255–262.

**Santos, M.; A. Ruiz; J. E. Quesada-Díaz; A. Barbadilla & A. Fontdevila. 1992.** The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XX. Positive phenotypic covariance between field adult fitness components and body size. *J. Evol. Biol.* 5: 403–422.

**Saucedo L. J. & B. A. Edgar. 2007.** Filling out the Hippo pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 613–621.

**Scheiner, S.M.; R. L. Caplan & R. F. Lyman. 1991.** The genetics of phenotypic plasticity. III. Genetic correlations and fluctuating asymmetries. *J. Evol. Biol.* 4: 51–68.

**Schlichting, C. & M. Pigliucci. 1998.** *Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

**Schmalhausen, I. I. 1949.** *Factors of Evolution: The Theory of Stabilizing Selection*. Blakiston, Philadelphia.

**Schmidt-Nielsen, K. 1984.** *Scaling: Why is Animal Size so Important?* Cambridge University Press, Cambridge.

**Schnepp, B.; G. Grumblin, T. Donaldson & A. Simcox. 1996.** Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev.* 10: 2302–2313.

**Schweitzer, R.; R. Howes, R. Smith, B. Z. Shilo & M. Freeman. 1995.** Inhibition of *Drosophila* EGF receptor activation by the secreted protein *Argos*. *Nature* 376: 699–702.

**Segal, D. & W. M. Gelbart. 1985.** Shortvein, a new component of the decapentaplegic gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 109: 119–143.

**Sehnal, F. & P. J. Bryant. 1993.** Delayed pupariation in *Drosophila* imaginal disc overgrowth mutants is associated with reduced ecdysteroid titer. *J. Insect Physiol.* 39: 1051–1059.

**Sekelsky, J. J., K. S. McKim, L. Messina, R. L. French, W. D. Hurley, et al. 1999.** Identification of novel *Drosophila* meiotic genes recovered in a P-element screen. *Genetics* 152: 529–542.

**Sepp, K. J. & V. J. Auld. 1999.** Conversion of lacZ enhancer trap lines to GAL4 lines using targeted transposition in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 151: 1093–1101.

**Serpe, M., A. Ralston, S. S. Blair & M. B. O'Connor. 2005.** Matching catalytic activity to developmental function: Toll-like-related processes Sog in order to help specify the posterior crossvein in the *Drosophila* wing. *Development* 132: 2645–2656.

**Shingleton A. W., J. Das, L. Vinicius & D. L. Stern. 2005.** The temporal requirements for insulin signaling during development in *Drosophila*. *Plos Biol.* 3(9): e289.

**Shingleton A. W., W. A. Frankino, T. Flatt, H. F. Nijhout & D. J. Emlen. 2007.** Size and shape: the developmental regulation of static allometry in insects. *BioEssays* 29: 536–548.

**Simmonds, A. J.; W. J. Brook, S. M. Cohen & J. B. Bell. 1995.** Distinguishable functions for *engrailed* and *invected* in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature* 376: 424–427.

**Simmonds, A. J. ; X. Liu, K. H. Soanes, H. M. Krause, K. D. Irvine, et al. 1998.** Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12(24): 3815–3820.

**Simpson, P.; P. Berreur & J. Berreur-Bonnenfant. 1980.** The initiation of pupariation in *Drosophila*: dependence on growth of the imaginal discs. *J. Embryol. Exp. Morph.* 57: 155–165.

- Sisodia, S. & B. N. Singh. 2001.** Mating success and morphometric traits in *Drosophila ananassae*. *Curr. Science* 80: 1444-1447.
- Slice, D.; F. L. Bookstein, L. F. Marcus & F. J. Rohlf. 1998.** *A Glossary for Geometric Morphometrics*. Disponible en <http://life.bio.sunysb.edu/morph/glossary/gloss1.html>.
- Smith, D.; Y. Yanai, Y. -G. Liu, S. Ishiguro, K. Okada, et al. 1996.** Characterization and mapping of Ds-GUS-T-DNA lines for targeted insertional mutagenesis. *Plant J.* 10: 721-732.
- Sokoloff, A. 1965.** Geographic variation of quantitative characters in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 19: 300-310.
- Sokoloff, A. 1966.** Morphological variation in natural and experimental populations of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. *Evolution* 20: 47-71.
- Sømme, L. 1989.** Adaptations of terrestrial arthropods to the alpine environment. *Biol. Rev.* 64: 367-407.
- Sørensen, J. G., F. M. Norry, A. C. Scannapieco & V. Loeschcke. 2005.** Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *J. Evol. Biol.* 18: 829-837.
- Spradling, A. C.; D. Stern, A. Beaton, E. J. Rehm, T. Laverly, et al. 1999.** The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: single *P*-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* 153: 135-177.
- Spradling, A. C.; D. M. Stern, I. Kiss, J. Roote, T. Laverly et al. 1995.** Gene disruptions using *P* transposable elements: An integral component of the *Drosophila* genome project. *PNAS* 92: 10824-10830.
- Stalker, H. D. 1980.** Chromosome studies in wild populations of *Drosophila melanogaster*. II. Relationship of inversion frequencies to latitude, season, wing loading and flight activity. *Genetics* 95: 211-223.
- Stalker, H. D. & H. L. Carson. 1947.** Morphological variation in natural populations of *Drosophila robusta* Sturtevant. *Evolution* 1: 237-248.
- Stalker, H. D. & H. L. Carson. 1948.** An altitudinal transect of *Drosophila robusta* Sturtevant. *Evolution* 2: 295-305.
- Stalker, H. D. & H. L. Carson. 1949.** Seasonal variation in the morphology of *Drosophila robusta* Sturtevant. *Evolution* 3: 330-343.
- Starmer, W. T. & L. L. Wolf. 1989.** Causes of variation in wing loading among *Drosophila* species. *Biol. J. Linn. Soc.* 37: 247-261.
- StatSoft, Inc. 1999.** STATISTICA. Software para análisis de datos. <http://www.statsoft.com>.
- StatSoft, Inc. 2001.** STATISTICA. Software para análisis de datos. Versión 6. <http://www.statsoft.com>.
- StatSoft, Inc. 2004.** STATISTICA. Software para análisis de datos. Versión 7. <http://www.statsoft.com>.
- Stearns, S. C. 1992.** *The Evolution of Life Histories*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Stern, D. L. & D. J. Emlen. 1999.** The developmental basis for allometry in insects. *Development* 126: 1091-1101.
- Stevens, R. C.; S. Yokoyama & I. A. Wilson. 2001.** Global Efforts in Structural Genomics. *Science* 294: 89-92.
- Stevenson, R. D.; M. F. Hill & P. J. Bryant. 1995.** Organ and cell allometry in Hawaiian *Drosophila*: how to make a big fly. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 259: 105-110.
- Stevenson, R. D. & R. K. Josephson. 1990.** Effects of operating frequency and temperature on mechanical power output from moth flight muscle. *J. Exp. Biol.* 198:61-78.
- Strigini, M. & S. M. Cohen. 1999.** Formation of morphogen gradients in the *Drosophila* wing. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10: 335-344.
- Sturtevant, M. A. & E. Bier. 1995.** Analysis of the genetic hierarchy guiding wing vein development in *Drosophila*. *Development* 121: 785-801.
- Sundberg, P. 1989.** Shape and size-constrained principal component analysis. *Syst. Zool.* 38: 166-168.
- Takei, Y.; Y. Ozawa, M. Sato, A. Watanabe & T. Tabata. 2004.** Three *Drosophila* EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparin sulfate proteoglycans. *Development* 131: 73-82.
- Takeo, S.; T. Akiyama, C. Firkus, T. Aigaki & H. Nakato. 2005.** Expression of a secreted form of Dally, a *Drosophila* glypican, induces overgrowth phenotype by affecting action range of Hedgehog. *Dev. Biol.* 284: 204-218.
- Tanimoto, H.; S. Itoh, P. ten Dijke & T. Tabata. 2000.** Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol. Cell* 5: 59-71.
- Tantawy, A. O. 1964.** Studies on natural populations of *Drosophila*. III. Morphological and genetic differences of wing length in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* in relation to season. *Evolution* 18: 560-570.
- Teixeira, L.; C. Rabouille, P. Rorth, A. Ephrussi & N. F. Vanzo. 2003.** *Drosophila* perilipin/ADRP homologue *Lsd2* regulates lipid metabolism. *Mech. Dev.* 120: 1071-1081.

- The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. 2005.** Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 437: 69–87.
- The Gene Ontology Consortium. 2000.** Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genet* 25: 25–29.
- The International Human Genome Sequencing Consortium. 2001.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.
- The Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002.** Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–562.
- Thomas, R. H. & J. S. F. Barker. 1993.** Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 598–608.
- Thompson, J. N. Jr. & R. C. Woodruff. 1982.** Polygenic analysis of pattern formation: interdependence among veins in the same compartment of the *Drosophila* wing. *Genetica* 60: 71–76.
- Thompson, D. W. 1917.** *On Growth and Form*. Cambridge University Press, London.
- Thompson-Stewart, D., G. H. Karpen & A. C. Spradling. 1994.** A transposable element can drive the concerted evolution of transmembrane tandemly repetitious DNA. *PNAS* 91: 9042–9046.
- Timakov, B., X. Liu, I. Turgut & P. Zhang. 2002.** Timing and targeting of *P*-element local transposition in the male germline cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 160: 1011–1022.
- Török, T., G. Tick, M. Alvarado & I. Kiss. 1993.** *P-lacW* insertional mutagenesis on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*: isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. *Genetics* 135: 71–80.
- Tower, J., G. H. Karpen, N. Craig & A. C. Spradling. 1993.** Preferential transposition of *Drosophila P* elements to nearby chromosomal sites. *Genetics* 133: 347–359.
- Trotta, V., F. C. F. Calboli, M. Ziosi, D. Guerra, M. C. Pezzoli, et al. 2006.** Thermal plasticity in *Drosophila melanogaster*: A comparison of geographic populations. *BMC Evol. Biol.* 6: 67–79.
- Truman J. W., K. Hiruma, J. P. Allee, S. G. B. MacWhinnie, D. T. Champlin, et al. 2006.** Juvenile hormone is required to couple imaginal disc formation with nutrition in insects. *Science* 312: 1385–1388.
- Truman, J. W. & L. M. Riddiford. 1999.** The origins of insect metamorphosis. *Nature* 401: 447–452.
- Ungerer, M. C.; S. S. Halldorsdottir; M. D. Purugganan & T. F. C. Mackay. 2003.** Genotype-environment interactions at quantitative trait loci affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 165: 353–365.
- Unwin, D. M. & S. A. Corbet. 1984.** Wingbeat frequency, temperature and body size in bees and flies. *Physiol. Entomol.* 9: 115–121.
- van Delden, W. & A. Kamping. 1989.** The association between the polymorphisms at the *Adh* and *a-Gpdh* loci and the *In(2L)t* inversion in *Drosophila melanogaster* in relation to temperature. *Evolution* 43: 775–793.
- van Delden, W. & A. Kamping. 1991.** Changes in relative fitness with temperature among 2nd chromosome arrangements in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 127: 507–514.
- van't Land, J. 1997.** Latitudinal variation in *Drosophila melanogaster*. On the maintenance of the world-wide polymorphisms for *Adh*, *aGpdh* and *In(2L)t*. PhD Thesis, University of Groningen.
- van't Land, J.; P. Van Putten, B. Zwaan, A. Kamping & W. van Delden. 1999.** Latitudinal variation in wild populations of *Drosophila melanogaster*: heritabilities and reaction norms. *J. Evol. Biol.* 12: 222–232.
- van't Land, J.; W. F. Van Putten, H. Villarroel, A. Kamping & W. van Delden. 2000.** Latitudinal variation for two enzyme loci and an inversion polymorphism in *Drosophila melanogaster* from Central and South America. *Evolution* 54: 201–209.
- Varadarajan, S. & K. VijayRaghavan. 1999.** scalloped functions in a regulatory loop with vestigial and wingless to pattern the *Drosophila* wing. *Dev. Genes Evol.* 209(1): 10–17.
- Verrelli, B. C. & W. F. Eanes. 2001a.** Clinal variation for aminoacid polymorphisms at the *Pgm* locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 157: 1649–1663.
- Verrelli, B. C. & W. F. Eanes. 2001b.** The functional impact of *Pgm* aminoacid polymorphism on glycogen content in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 159: 201–210.
- Via, S. 1987.** Genetic constraints on the evolution of phenotypic plasticity. Pp. 47–71. En: *Genetic Constraints on Adaptive Evolution*. Loeschcke, V. (ed.). Springer-Verlag, Berlin.
- Via, S. & R. Lande. 1985.** Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39: 505–522.
- Waddington, C. H. 1942.** Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150: 563–565.
- Waddington, C. H. 1952.** Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature* 169: 278.
- Waddington, C. H. 1953.** Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* 7: 118–126.
- Waddington, C. H. 1961.** Genetic assimilation. *Adv. Genet.* 10: 257–290.

- Wade, M. J. & C. J. Goodnight. 1998. Perspective: the theories of Fisher and Wright in the context of metapopulations: when nature does many small experiments. *Evolution* 52: 1537-1553.
- Wallrath, L. L. & S. C. Elgin. 1995. Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev.* 9: 1263-1277.
- Weber, K. E. 1990. Selection on wing allometry in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 126: 975-989.
- Weber, K. E. 1992. How small are the smallest selectable domains of forms? *Genetics* 130: 345-353.
- Weber, K.; R. Eisman, S. Higgins, L. Morey, A. Patty, *et al.* 2001. An analysis of polygenes affecting wing shape on chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 159: 1045-1057.
- Weber, K.; R. Eisman, L. Morey, A. Patty, J. Sparks, *et al.* 1999. An analysis of polygenes affecting wing shape on chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153: 773-786.
- Weber, K. E.; R. J. Greenspan, D. R. Chicoine, K. Fiorentino, M. H. Thomas, *et al.* 2008. Microarray analysis of replicate populations selected against a wing-shape correlation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 178: 1093-1108.
- Weber, K., N. Johnson, D. Champlin & A. Patty. 2005. Many P-element insertions affect wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 169: 1461-1475.
- Weeks A. R., S. W. McKechnie & A. A. Hoffmann. 2002. Dissecting adaptive clinal variation: markers, inversions and size/stress associations in *Drosophila melanogaster* from a central field population. *Ecol. Lett.* 5: 756-763.
- Weigmann, K.; S. M. Cohen & C. F. Lehner. 1997. Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila Cdc2* kinase. *Development* 124: 3555-3563.
- Weis-Fogh, T. 1973. Quick estimates of flight fitness in hovering animals, including novel mechanisms for lift production. *J. Exp. Biol.* 59: 169-230.
- Welte, M. A.; S. Cermelli, J. Griner, A. Viera, Y. Guo, *et al.* 2005. Regulation of lipid-droplet transport by the perilipin homolog LSD2. *Curr. Biol.* 15: 1266-1275.
- Wessells, R. J.; G. Grumbling, T. Donaldson, S. H. Wang & A. Simcox. 1999. Tissue-specific regulation of Vein-EGF Receptor signaling in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 216: 243-259.
- West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental plasticity and evolution*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Wilkinson G. S.; K. Fowler & L. Partridge. 1990. Resistance of genetic correlation structure to directional selection in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 44: 1990-2003.
- Williams, J. A.; S. W. Paddock & S. B. Carroll. 1993. Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* 117: 571-584.
- Wilson, C., R. K. Pearson, H. J. Bellen, C. J. O'Kane, U. Grossniklaus, *et al.* 1989. P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes Dev.* 3: 1301-1313.
- Wolf, L. L.; W. T. Starmer; M. Polak & J. S. F. Barker. 2000. Genetic architecture of a wing size measure in *Drosophila hibisci* from two populations in eastern Australia. *Heredity* 85: 521-529.
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S. 1968. *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 1. Genetic and Biometric Foundations. University of Chicago Press, Chicago.
- Wu, S.; Y. Liu, Y. Zheng, J. Dong & D. Pan. 2008. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev. Cell* 14: 388-398.
- Wullschleger S., R. Loewith & M. N. Hall. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.
- Wurst W., J. Rossant, V. Prideaux, M. Kownacka, A. Joyner, *et al.* 1995. A large-scale gene-trap screen for insertional mutations in developmentally regulated genes in mice. *Genetics* 139: 889-899.
- Yurkiewicz, W. J. 1968. Flight range and energetics of the sheep blowfly during flight at different temperatures. *J. Insect. Physiol.* 14: 335-339.
- Yurkiewicz, W. J. & T. Smyth Jr. 1966a. Effect of temperature on flight speed of the sheep blowfly. *J. Insect. Physiol.* 12: 189-194.
- Yurkiewicz, W. J. & T. Smyth Jr. 1966b. Effect of temperature on oxygen consumption and fuel utilization by the sheep blowfly. *J. Insect. Physiol.* 12: 403-408.
- Yuval, B.; M. L. Holliday-Hanson & R. K. Washino. 1994. Energy budget of swarming male mosquitoes. *Ecol. Entomol.* 19: 74-78.
- Zambrowicz B. P., G. A. Friedrich, E. C. Buxton, S. L. Lilleberg, C. Person *et al.* 1998. Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* 392: 608-611.
- Zhang, L.; F. Ren, Q. Zhang, Y. Chen, B. Wang & J. Jiang. 2008. The TEAD/TEF family of transcription

factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev. Cell* 14: 377-387.

**Zhang, P. & A. C. Spradling. 1994.** Insertional mutagenesis of *Drosophila* heterochromatin with single *P* elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3539-3543.

**Zhang H. B., J. P. Stallock, J. C. Ng, C. Reinhard & T. P. Neufeld. 2000.** Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev.* 14: 2712-2724.

**Zimmerman, E. ; A. Palsson & G. Gibson. 2000.** Quantitative trait loci affecting components of wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 155: 671-683.

**Zwaan, B. J.; R. B. R. Azevedo; A. C. James; J. Van't Land & L. Partridge. 2000.** Cellular basis of wing size variation in *Drosophila melanogaster*: a comparison of latitudinal clines on two continents. *Heredity* 84: 338-347.