

Tesis Doctoral

# Identificación y caracterización de genes con variación natural para el tiempo de desarrollo a partir de mutantes heterocrónicos de *Drosophila*

Mensch, Julián

2009

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:

Mensch, Julián. (2009). Identificación y caracterización de genes con variación natural para el tiempo de desarrollo a partir de mutantes heterocrónicos de *Drosophila*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mensch, Julián. "Identificación y caracterización de genes con variación natural para el tiempo de desarrollo a partir de mutantes heterocrónicos de *Drosophila*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**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.

**Identificación y caracterización de genes con  
variación natural para el tiempo de  
desarrollo a partir de mutantes  
heterocrónicos de *Drosophila*.**

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

**Julián Mensch**

Director de tesis: Dr. Juan José Fanara

Consejero de estudios: Dr. Esteban Hasson

Buenos Aires, Argentina

Abril, 2009

# **Identificación y caracterización de genes con variación natural para el tiempo de desarrollo a partir de mutantes heterocrónicos de *Drosophila*.**

## Resumen

Comprender la arquitectura genética de caracteres ecológicamente relevantes requiere la contribución tanto de la biología evolutiva como de la biología del desarrollo. El tiempo requerido para alcanzar la edad reproductiva es un carácter adaptativo conocido como tiempo de desarrollo. El impacto del tiempo de desarrollo sobre el *fitness* particularmente en los insectos holometábolos que explotan habitats efímeros, como las moscas de la fruta, es aún más drástico. El presente trabajo es uno de los primeros estudios sistemáticos sobre la arquitectura genética del tiempo de desarrollo, en el cual además evaluamos el impacto de la variación ambiental en la expresión de este carácter. Analizamos 179 líneas mutantes artificiales generados por inserciones de elementos móviles *P[GT1]* en *Drosophila melanogaster*, con el objetivo de identificar genes candidatos que afecten el tiempo de desarrollo en moscas criadas a 25°C. El sesenta por ciento de las líneas mostró un fenotipo heterocrónico, lo que sugiere que una gran cantidad de genes afectan al carácter. Los mutantes *Merlin* y *Karl* mostraron los fenotipos más extremos del estudio, exhibiendo una reducción y un aumento de 2 y 4 días en relación al control, respectivamente. Además, a partir de una submuestra de 42 líneas seleccionadas al azar de las 179 iniciales, se cuantificó el tiempo de desarrollo a 17°C. Interesantemente, la interacción gen-ambiente contribuyó con el 52% de la varianza fenotípica total. De esta manera, se encontraron un gran número de genes candidatos con normas de reacción plásticas. En la siguiente etapa del proyecto encontramos gran variación genética natural para el tiempo de desarrollo asociada al cromosoma II en respuesta a gradientes altitudinales. A partir de estos resultados realizamos ensayos de complementación genética para varios mutantes heterocrónicos plásticos para la temperatura, con el objetivo final de identificar genes con variación natural para el carácter. De esta manera, pudimos determinar que una importante fracción de la variación natural está asociada a la variación a nivel de las secuencias de *invected*, *mastermind*, *cricket* y *CG14591*. En conclusión, nuestros resultados enfatizan la necesidad de tomar en cuenta el efecto que las vías de señalización metabólicas ejercen sobre la arquitectura genética de este complejo carácter de historia de vida.

Palabras clave: tiempo de desarrollo, mutantes heterocrónicos, clima, genes de caracteres cuantitativos, *Drosophila melanogaster*.

**Identification and characterization of genes affecting developmental time natural variation by means of heterochronic mutants of *Drosophila*.**

**Abstract**

Understanding the genetic architecture of ecologically relevant adaptive traits requires the contribution of developmental and evolutionary biology. The time to reach the age of reproduction is a complex life history trait commonly known as developmental time. In particular, in holometabolous insects that occupy ephemeral habitats, like fruit flies, the impact of developmental time on fitness is further exaggerated. The present work is one of the first systematic studies of the genetic architecture of developmental time, in which we also evaluate the impact of environmental variation on the expression of the trait. We analyzed 179 co-isogenic single *P[GT1]*-element insertion lines of *Drosophila melanogaster* to identify novel genes affecting developmental time in flies reared at 25°C. Sixty percent of the lines showed a heterochronic phenotype, suggesting that a large number of genes affect this trait. Mutant lines for the genes *Merlin* and *Karl* showed the most extremes phenotypes exhibiting a developmental time reduction and increase, respectively, of over 2 days and 4 days relative to the control. In addition, a subset of 42 lines selected at random from the initial set of 179 lines was screened at 17°C. Interestingly, the gene-by-environment interaction accounted for 52% of total phenotypic variance. Plastic reaction norms were found for a large number of developmental time candidate genes. In the next part of the project we found an altitudinal clinal variation for second chromosome natural substitution lines. As a consequence, we performed genetic complementation tests for a number of heterochronic temperature-plastic mutants to identify genes with natural variation. We were able to establish that an important fraction of the genetic natural variation is attributed to *invected*, *mastermind*, *cricket* and *CG14591*. Taken together, our results stress the need to take into account the effect of metabolic signaling pathways on the genetic architecture of this complex life-history trait.

Key words: developmental time, heterochronic mutants, cline, quantitative trait genes, *Drosophila melanogaster*.

## Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente a Juanjo por todos estos años de trabajo compartido. Por su respaldo, confianza y sabiduría a la hora de orientar los miles de potenciales caminos que tiene una investigación como la presente.

A Esteban por su entusiasmo sin límites por el gusto de hacer ciencia. Su lectura crítica y discusión de este trabajo ayudó enormemente al destino final del mismo.

Párrafo aparte para mis compañeros Nicolás Lavagnino, Julieta Goenaga y Valeria Carreira. El trabajo en equipo que pudimos generar todos estos años se refleja en los resultados de esta Tesis. Me resulta imposible pensarla sin su participación, discusión y felicidad por hacer lo que nos gusta hacer.

Miro para atrás y se asoman Guille Folguera y Romi Piccinali. Si bien fuimos los tres casi los becarios (pre) históricos del laboratorio y ellos tomaron hace tiempo sus propios caminos en ciencia, es un orgullo poder contar con su ayuda cada vez que necesito un consejo de los *buenos*.

Muchas gracias al enorme equipo del Laboratorio de Evolución por acompañarme muy de cerca en este recorrido. A Juli, Nico, Nacho, Vale, Cris, Pao, Pau, Edu, Patri, Marcos, María, Juan, Juanjo y Esteban. Muchas gracias!!!!

A Hernán Dopazo por su gran colaboración en el análisis de evolución molecular y por sembrar mi gusto por la bioinformática.

A Lau, por su dulzura, alegría, ayuda, paciencia y amor. Son miles las canciones de Café que explotan en su mirada.

## INDICE

### **Capítulo 1. Introducción general**

Evolución adaptativa y tiempo de desarrollo .....	1
<i>Drosophila melanogaster</i> : especie modelo	
en biología de desarrollo y evolución . .....	4
Heterocronía.....	14
Variación genética natural	
de caracteres cuantitativos.....	20
Objetivos Generales....	23

### **Capítulo 2. Identificación de mutantes y genes heterocrónicos**

Introducción.....	26
Materiales y Métodos.....	29
Resultados.....	35
Discusión.....	48

### **Capítulo 3. Interacción genotipo-temperatura de los mutantes heterocrónicos**

Introducción.....	52
Materiales y Métodos.....	57
Resultados.....	60
Discusión.....	69

#### **Capítulo 4. Variación genética natural del tiempo de desarrollo**

Introducción.....	71
Materiales y Métodos.....	76
Resultados.....	80
Discusión.....	89

#### **Capítulo 5. Genes con variación natural del tiempo de desarrollo**

Introducción.....	92
Materiales y Métodos.....	94
Resultados.....	97
Discusión.....	105

#### **Capítulo 6. Conclusiones Generales**

Conclusiones generales (y últimos resultados).....	111
Variación natural vs. Variación mutacional: evidencias de selección natural.....	112
Variación ambiental del tiempo de desarrollo.....	120
De la genética cuantitativa a la mendeliana (y viceversa): Perspectivas para identificar redes genéticas del tiempo de desarrollo.....	121
<b>Bibliografía.....</b>	<b>123</b>

# Capítulo 1

## Introducción General



En este primer capítulo introduciremos los conceptos claves que contribuyen a la formulación de las preguntas abordadas a través de la presente Tesis Doctoral, empezando por la presentación del carácter de estudio (1.1) y el sistema modelo utilizado (1.2). Seguidamente, desarrollaremos el concepto de heterocronía, que vincula los estudios de evolución y desarrollo (1.3). Luego, abordaremos el problema de la variación genética natural de los caracteres cuantitativos (1.4) presentando los parámetros genéticos relevantes para su análisis. Por último, plantearemos los objetivos generales de la Tesis (1.5) así como las hipótesis y preguntas particulares de cada capítulo.

### **1.1. Evolución adaptativa y tiempo de desarrollo: el carácter de estudio como componente del *fitness*.**

La selección natural es el proceso que moldea la conformación genética de una población como producto de la variación en el éxito reproductivo diferencial (*fitness*) entre distintos fenotipos. En este sentido, la evolución adaptativa es el cambio genético de una población producto de la acción de la selección natural. ¿Cuáles son los caracteres fenotípicos asociados al éxito reproductivo? Posiblemente la manera de dilucidar este interrogante es utilizando el marco de la Teoría de historia de vida, la cual investiga la evolución de los diferentes caracteres relacionados al *fitness* en base a modelos de optimización (Stearns, 1992; Roff, 1992). El objetivo de la Teoría de historia de vida es explicar la variación de los organismos en características relevantes para el *fitness* como el tamaño al nacer, la tasa de crecimiento, el tiempo y el tamaño hasta alcanzar la edad reproductiva, el número de crías, la tasa mortalidad y la longevidad, entre los más destacados. La evolución de los caracteres de historia de vida está influenciada por factores intrínsecos y extrínsecos a los organismos, así como también por sus interacciones (Stearns, 2000). Entre los factores intrínsecos que

afectan la variación genética se destacan las restricciones (*trade-offs*) producto de las correlaciones genéticas negativas entre caracteres así como las restricciones filogenéticas y de desarrollo. Entre los extrínsecos se destacan los factores ecológicos y ambientales que impactan sobre la supervivencia y la reproducción de los organismos.

El tiempo que le lleva a un organismo completar su desarrollo ontogenético y alcanzar la edad reproductiva es un carácter de gran importancia adaptativa, conocido como tiempo de desarrollo. Este rasgo cuantitativo, de base poligénica, presenta variación genética en diferentes especies (Ambros & Horvitz, 1984, Laurila y col., 2002; Kause & Morin, 2001; Cortese y col., 2002), y está afectado por factores ambientales (Gotthard & Nylin, 1995; Laurila y col., 2002). Entre los insectos, el tiempo de desarrollo es muy variable encontrándose valores que van (a 25°C) desde los 5 días en *Rhopalosiphum prunifoliae* (especies partenogenética de áfido) (Noda, 1960), 11 días en *Aedes aegypti* (mosquito vector del dengue) (Rueda y col., 1990), 15 en la mosca de la arena *Phlebotomus papatasi* (vector de Leishmaniasis) (Kasap & Alten, 2005), 36 días en *Hypsipyla grandella* (lepidóptero plaga de especies forestales tropicales) (Taveras y col., 2004) y 94 días en *Rhodnius domesticus* (una de las especies vectoras del *Tripanosoma cruzi*) (Guarneri y col., 1998). En particular, en las especies del género *Drosophila*, el tiempo de desarrollo también tiene gran variación desde 10 días en especies del grupo *melanogaster* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae*) hasta 24 días en especies grupo *virilis* (Markow & O'Grady, 2005).

De acuerdo a la Teoría de historia de vida, bajo condiciones ambientales favorables (alimentación de buena calidad, rango de temperatura óptimo para el desarrollo) los organismos que se desarrollan más rápidamente tienen un alto *fitness* debido a que comienzan a reproducirse antes y de esta forma sus descendientes estarán proporcionalmente más representados en la siguiente

generación (Stearns, 1992,). Adicionalmente, la maduración temprana está asociada a una menor mortalidad juvenil, como consecuencia de un menor período de exposición frente a patógenos y predadores en este período crítico del ciclo de vida. En cambio, bajo condiciones ambientales adversas (alimentación pobre, temperaturas extremas) los organismos con maduración temprana tienen un costo negativo generalmente asociado a una reducción en el tamaño corporal, lo que repercute desfavorablemente en la fecundidad.

Debido a que, entre las características distintivas, los caracteres de historia de vida afectan las tasas de crecimiento poblacional, también se los conocen como caracteres *demográficos* (Futuyma, 1997). Con el objetivo último de manejar y controlar el crecimiento poblacional de especies con importancia económica y sanitaria, resulta fundamental estudiar y caracterizar la evolución de rasgos demográficos, como el tiempo de desarrollo. En este sentido, el estudio de caracteres ecológicamente relevantes requiere la complementación de disciplinas como la biología evolutiva y la biología del desarrollo. Lamentablemente, son escasos los organismos donde se pueden investigar en profundidad características genético-evolutivas y de desarrollo que puedan confluir en una interpretación integradora de ambas corrientes de la Biología. En el siguiente apartado mostraremos las singularidades más relevantes que llevaron a *Drosophila* a ser uno de los pocos modelos que permite abordar estos temas de forma multidisciplinaria.

## **1.2. *Drosophila melanogaster*: especie modelo en biología del desarrollo y evolución.**

### **1.2.1. Evolución y *Drosophila*.**

El planteo que inició Darwin y que sostiene la biología evolutiva moderna, es que la evolución es un proceso de dos pasos, primero existe variación entre individuos y después se producen cambios en la proporción de las diferentes variantes a través de las generaciones (Futuyma, 1997). No cualquier tipo de variación produce evolución, es indispensable que sea heredable (*i.e.*, genética) para que el cambio sea sostenido a través de las generaciones. Los estudios evolutivos hacen foco en los factores que afectan el patrón de variación genética, así como también en los procesos naturales que actúan sobre la cantidad y calidad de la misma. En este sentido, varias especies del género *Drosophila*, fundamentalmente *D. melanogaster*, han sido utilizadas como organismos modelo para estudiar la variación genética natural de características relevantes en términos evolutivos. La variación genética adaptativa es variación generada como consecuencia de la selección natural. En cambio la variación genética no adaptativa es atribuible a procesos demográficos, sin una vinculación relacionada a un mayor éxito reproductivo diferencial (*fitness*) que determinada variante le confiere al organismo portador. En particular, la variación geográfica dentro de las especies es la característica que ha contribuido más claramente con evidencias sobre el proceso de selección natural. Entre los trabajos pioneros que investigaron el nivel de variación genética en poblaciones naturales se destaca el estudio de Lewontin y Hubby (1966) en la especie *D. pseudoobscura*, en el cual se observó que el 30% los *loci* enzimáticos evaluados resultaron ser polimórficos. Años más tarde Oakeshott y colaboradores (1982) fueron más allá y detectaron evidencias de

selección natural a partir del patrón de variación genética para el locus *Adh* (alcohol deshidrogeanasa) en *D. melanogaster*. En tres áreas independientes de su distribución, la especie mostró el mismo patrón de variación genética para el locus *Adh*: la frecuencia del alelo rápido (en relación al lento) se incrementa a mayores latitudes en los tres continentes estudiados (Asia, Europa y Norteamérica). Como se verá en profundidad a través de la Tesis, una clina es un cambio gradual en la frecuencia de un rasgo y/o alelo a través de una transecta geográfica (en el ejemplo mencionado es la distancia desde el ecuador). La repetición de este patrón de variación que se da de manera independiente en diferentes continentes sugiere que su naturaleza es adaptativa, es decir, moldeada por selección natural (Endler, 1986). Estos resultados se complementaron con los primeros estudios de genética de poblaciones utilizando marcadores moleculares de ADN, realizados por Martin Kreitman (1983). El gen *Adh* mostró 42 polimorfismos sinónimos y un único cambio aminoacídico sobre un total de 2721 pares de bases, siendo este último el responsable de las diferencias de movilidad entre los alelos electroforéticos ADH<sup>Rápido</sup> y ADH<sup>Lento</sup> (Kreitman, 1983). Los genetistas de poblaciones de *Drosophila* fueron de los primeros investigadores que pudieron realizar una asociación directa entre genotipo y fenotipo, individualizando las características de importancia adaptativa, entre las que se destacan la viabilidad, el tamaño corporal, la longevidad, la fecundidad y el tiempo de desarrollo (Stearns, 1992; Roff, 1992). En particular, para el tiempo de desarrollo Oudman y colaboradores (1991) descubrieron que los genotipos homocigotas ADH<sup>Rápido</sup> presentaban un tiempo de desarrollo más rápido que los heterocigotas ADH<sup>Rápido</sup>/ADH<sup>Lento</sup> que a su vez exhibían un desarrollo más rápido que los individuos homocigotas ADH<sup>Lento</sup>. Sorprendentemente, se observó una correlación entre el aumento en la frecuencia del alelo ADH<sup>Rápido</sup> a mayores latitudes y una aceleración del tiempo de desarrollo (Oudman y col., 1991).

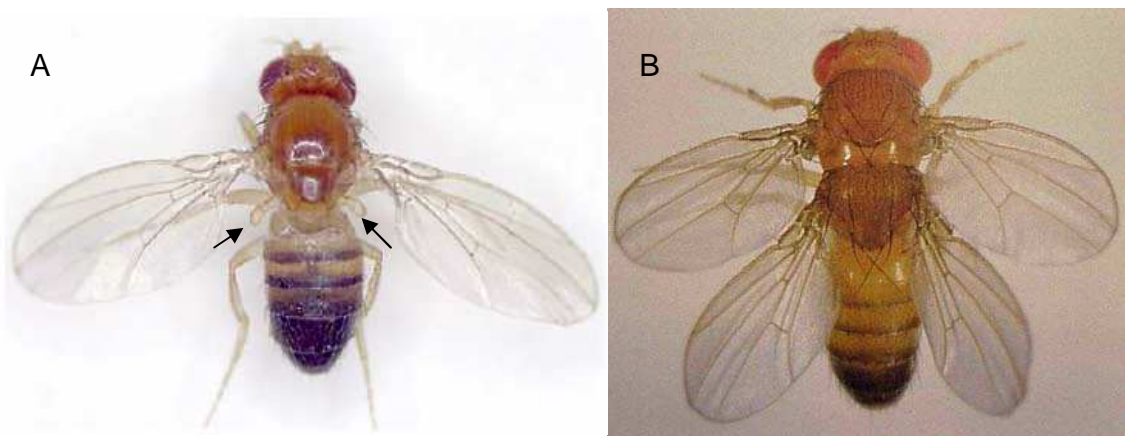
Además de los estudios genético-poblacionales de las diferentes especies del género *Drosophila*, los evolucionistas que utilizan este organismo de estudio cuentan con gran cantidad de información adicional. Entre las más destacadas se encuentran el conocimiento de la historia de vida de muchas de las especies del género (Markow & O'Grady, 2005), la ecología evolutiva de las mismas (Reaume & Sokolowski, 2006; Fanara y col., 2004; Fanara y col., 2006), sus relaciones filogenéticas (Ko, David & Akashi, 2003) y adicionalmente se cuenta con gran cantidad de herramientas genético-moleculares (Mackay, 2004) que posibilitan y facilitan la implementación de diseños experimentales impensables en otros organismos. La reciente finalización de la secuenciación de 11 genomas completos (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007) junto con el ya secuenciado de *D. melanogaster* (Adams y col., 2000), ha posibilitado contar con 12 genomas de especies representativas de los diferentes linajes del género *Drosophila*, y de hecho varios laboratorios han avanzado en la consecución de nuevos proyectos genómicos que involucran más especies. Actualmente, el desafío radica en la interpretación de la enorme cantidad de datos provenientes de áreas distantes del conocimiento en hipótesis evolutivas integrales.

### **1.2.2. Biología del desarrollo y *Drosophila*.**

El desarrollo ontogenético es un proceso dependiente del tiempo que puede pensarse como la constitución del fenotipo adulto a partir de un determinado genotipo. Desde sus comienzos, los estudios de anatomía comparada dieron cuenta que, independientemente de la diversidad de formas externas, los cuerpos y sus partes están contruidos por unidades anatómicas evidentes. La modularidad u organización del cuerpo de un animal en módulos es la división de grandes estructuras y procesos en conjuntos de unidades internamente integradas. El biólogo

inglés William Bateson fue uno de los primeros autores que abordaron formalmente el tema de la modularidad a finales del siglo XIX. Sus investigaciones fueron muy útiles como marco para estudiar la *lógica* del diseño animal y entender los mecanismos evolutivos que generaron variaciones sobre las diferentes unidades a lo largo de la historia natural. Bateson reconocía que las diferencias fenotípicas más evidentes entre diferentes linajes de un grupo particular de animales se podían atribuir al número y tipo de estructuras repetidas. Es decir, tomando como ejemplo el caso de la construcción modular de la columna vertebral de los vertebrados, puede verse que los diferentes linajes poseen distinto número y clase de vértebras en su columna, siendo las mismas las unidades estructurales repetidas a lo largo del eje antero-posterior del animal. El número de vértebras varía desde menos de una docena en sapos, pasando por treinta y tres en humanos, llegando a más de un centenar en serpientes. En cuanto al tipo de vértebras, las diferencias entre ellas radican en el tamaño y la forma de las mismas, dando lugar a una clasificación en vértebras cervicales, torácicas, lumbares, sacras y caudales. Un patrón similar se puede observar en la forma y diversidad de estructuras en artrópodos. Dentro de este grupo, el número de segmentos repetidos varía desde unos pocos en insectos a decenas en miriápodos. En particular el cuerpo de los insectos consiste en tres partes (cabeza, tórax y abdomen), cada una compuesta por varios segmentos. La cabeza contiene la boca, las antenas y los ojos; los segmentos del tórax cuentan con apéndices como las patas y las alas; los del abdomen poseen el aparato digestivo y las estructuras genitales. Bateson acuñó el término *homeósis* para referirse a las transformaciones drásticas en las que un segmento del cuerpo de un animal es reemplazado por otro. En 1915, Calvin Bridges aisló un mutante espontáneo en *Drosophila*, que llamó bitórax, cuyo fenotipo consistía en que parte del haltério se transformaba en ala, es decir que el tercer segmento torácico (que normalmente tiene un par de halterios)

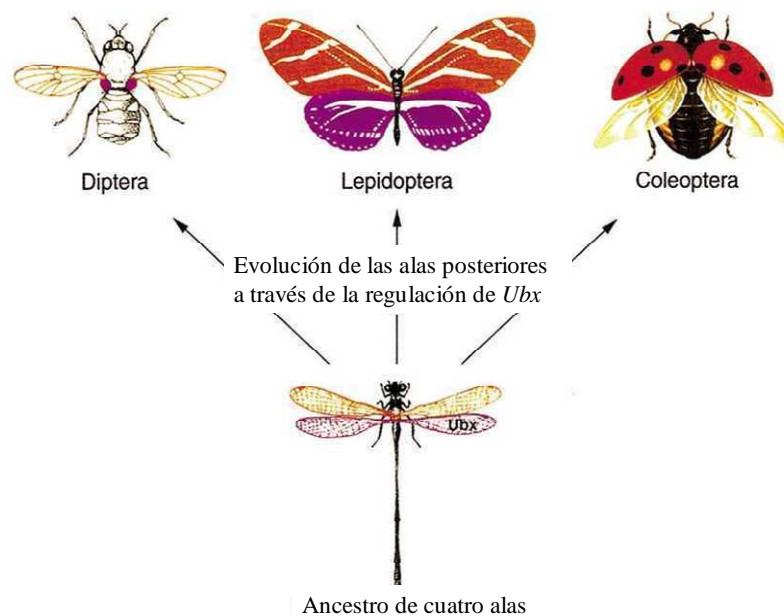
adquiría similitud con el segundo (que normalmente lleva un par de alas). Desde entonces, el abordaje experimental para entender la ontogenia de un animal consistió en la obtención de mutantes con efectos mayores en el patrón corporal. Con esta lógica y años de investigación E.B. Lewis, a finales de la década del setenta, hizo un descubrimiento revolucionario al identificar los genes que controlan la identidad de los segmentos abdominales en *Drosophila*. Lewis demostró que mutaciones en regiones no codificantes del gen homeótico *Ultrabithorax (Ubx)* cambian la identidad del tercer segmento torácico y en su lugar produce un fenotipo en el que dicho segmento se parece al segundo. En un individuo salvaje de *D. melanogaster*, *Ubx* inhibe la expresión de varios genes (como *wingless*, *D-SRF* y *achaete*) requeridos para la formación correcta del ala, por lo que se genera un apéndice reducido que es el halterio. Sin embargo, mutaciones que determinan la pérdida de función de *Ubx* en el tercer segmento torácico conducen a la formación de un segundo par de alas, suprimiendo el desarrollo de los halterios (ver Figura 1.1) (Weatherbee y col., 1998).



**Figura 1.1.** (A) Mosca Salvaje. Las flechas indican los halterios del tercer segmento torácico. (B) Mutante *Ubx*. La mutación homeótica genera el desarrollo de un segundo par de alas, en lugar de los halterios.



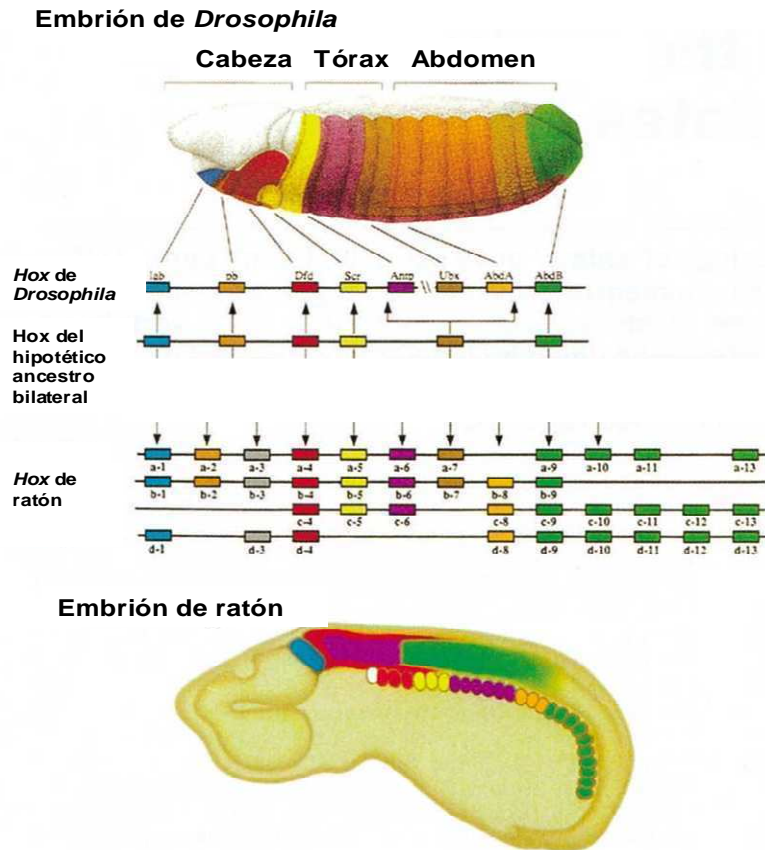
Experimentos posteriores demostraron que *Ubx* inhibe la expresión de *wingless* uniéndose a las regiones regulatorias del gen. Por el contrario, en lepidópteros (que poseen dos pares de alas) *Ubx* no suprime el desarrollo de alas en el tercer segmento torácico posiblemente porque las regiones cis-regulatorias de los genes río abajo de *Ubx* carecen de sitios de unión para este factor de transcripción (Carroll y col., 2005). En resumen, debido a que el ancestro común de los dípteros y lepidópteros presumiblemente poseía dos pares de alas, las evidencias sugieren que con posterioridad a la divergencia de estos dos linajes (hace 200 millones de años), en dípteros, *Ubx* adquirió una función inhibitoria de genes como *wingless* (Weatherbee y col., 1999) dando como resultado la supresión de la formación de un segundo par de alas (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Evolución de la diversidad morfológica de las alas posteriores de los insectos. A partir de una hipotética especie ancestral en la cual las alas anteriores y posteriores tenían la misma morfología se derivaron los distintos linajes de insectos alados. En los dípteros, *Ubx* adquiere una función inhibitoria de *wingless*, lo que habría conducido a la formación de un único par de alas. Tomado de Carroll (2005).

Este es un claro ejemplo de cómo cambios a nivel molecular en regiones regulatorias de genes jerárquicamente relevantes en la ontogenia, contribuyen a la diversificación de los planes corporales en la Clase Insecta. Pero no sólo mutaciones en *Ubx* generan cambios drásticos en el fenotipo. Son varios los genes homeóticos (genes *Hox*) que cumplen roles muy importantes en la formación del eje antero-posterior durante la ontogenia de *Drosophila* (Gilbert, 2006). Efectivamente, mutaciones que provocan tanto la pérdida como la ganancia de función en estos genes inducen a cambios drásticos en el fenotipo (Gilbert, 2006). Esta evidencia sugiere que se trata de genes candidatos cuyas modificaciones ocurridas de forma natural pudieron haber conducido a la diversificación de los planes corporales (Vervoort, 2002). Utilizando como sonda porciones regulatorias de los genes homeóticos se logró, con el tiempo, identificar genes que regulan la identidad de segmentos corporales en vertebrados. En este sentido, Carrasco y colaboradores (1984) predijeron que "... Si los genes clonados de rana eventualmente resultan tener funciones similares respecto de los genes de la moscas de la fruta, estaríamos identificando los primeros genes que controlan el desarrollo en vertebrados". El tiempo les dio la razón, y la profunda homología de los genes que regulan el desarrollo de un invertebrado y un vertebrado pasó a ser una regla y un pilar de los estudios enmarcados en la naciente disciplina evo-devo (Figura 1.3). La semejanza en los genes de desarrollo de animales tan distantes como una mosca (*Drosophila*) y un ratón (*Mus*) llevaron al genetista del desarrollo Edward Lewis (De Robertis, 2008) a sentenciar "...Todos venimos de una planaria...", haciendo referencia irónicamente al hipotético organismo bilateral ancestral del cual derivaron los diferentes linajes animales. En la actualidad se están llevando adelante proyectos que estudian las funciones y los procesos

evolutivos de estos antiguos genes de *Urbilateria*, el ancestro de los animales bilaterales (Matsui y col., 2009).



**Figura 1.3.** Genes *Hox* y Evolución morfológica. La expresión de los genes *Hox* regulan la identidad de las regiones del embrión a lo largo del eje antero-posterior tanto en *Drosophila* como en vertebrados. Los diferentes cuadrados de colores representan a los ocho genes *Hox*. Nótese que en vertebrados existen cuatro copias de cada *Hox*, las cuales evolucionaron a partir de una doble duplicación génica en este linaje. Tomado de Carroll (2005).

### 1.2.3. Los estadios del ciclo de vida de *Drosophila*.

El ciclo de vida de los insectos holometábolos (con metamorfosis completa) comprende, luego de una etapa embrionaria, una serie secuencial de estadios larvales, cuyo número es característico de cada especie, seguido de una etapa pupal, finalizando con el estadio adulto (Figura 1.4). En particular, las etapas juveniles de *Drosophila* constan de

tres estadios larvales a través de los cuales el individuo en crecimiento va aumentando de tamaño fundamentalmente como consecuencia del incremento en el tamaño y en el número de células.



**Figura 1.4.** Estadios del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. H: huevo, L: larvas (1º, 2º y 3º estadio), P: pupa y A: adulto

Marcando la finalización de cada estadio larval y el comienzo del siguiente se produce la muda que consiste en la síntesis de una nueva cutícula, exoesqueleto rígido que recubre el cuerpo del individuo en crecimiento, y el reemplazo de la anterior. Durante el tercer estadio larval, el individuo se alimenta hasta alcanzar un peso mínimo umbral, estadio conocido como peso crítico para la pupación, el cual constituye la mínima ganancia nutricional necesaria para comenzar la metamorfosis. Alcanzado este estadio, en función de claves hormonales y ambientales se da comienzo a la metamorfosis (Nijhout, 2003; Davidowitz y col., 2004). Durante la misma, diversos tejidos indiferenciados hasta esa etapa del desarrollo, conocidos como discos imaginales, reemplazan a viejos tejidos específicos de la larva remodelando los órganos existentes y generando otros *de novo*, como las alas y los ojos. Concluida la metamorfosis se produce la última muda, proceso que determina que la morfología externa y consecuentemente el tamaño del imago, permanezcan inalterables a lo largo de la vida adulta.

#### **1.2.4 Regulación hormonal de la ontogenia en función de claves ambientales: efectos sobre tiempo de desarrollo.**

Los programas ontogenéticos que controlan los estadios juveniles del ciclo de vida involucran vías de señalización tanto sistémicas como locales, las cuales responden a factores ambientales que coordinan los diferentes pasos a través del desarrollo (Flatt y col., 2005). Tanto las diferentes mudas como la transformación metamórfica de larva a pupa están coordinadas y reguladas por hormonas (Nijhout, 1994). Las principales hormonas que regulan estos procesos de desarrollo son la ecdisona y la hormona juvenil (HJ). A su vez, la secreción de la ecdisona desde la glándula protorácica está gatillada por la hormona protoracicotrófica en el cerebro (Gilbert, 2006). Próximo a la finalización de cada estadio larval se libera un pulso de ecdisona que regula la formación y expansión de la nueva cutícula. Junto con la liberación del pulso de ecdisona, los niveles de HJ presentes en ese momento determinan la identidad de la muda: si los niveles de HJ se encuentran en una concentración superior a un determinado umbral, se producirá una muda larva-larva, por el contrario si los niveles de HJ están por debajo de ese umbral se dará lugar al comienzo de la metamorfosis (muda larva-pupa) (Truman & Riddiford, 2002; Emlen & Allen 2004).

El tiempo requerido para que los estadios inmaduros (embrión, larvas y pupa) completen su desarrollo dependen fundamentalmente de factores ambientales como la nutrición, el fotoperíodo y la temperatura de desarrollo. Por ejemplo, en buenas condiciones nutricionales, con un período de luz-oscuridad 12:12 y a 25°C, todo el proceso de desarrollo dura aproximadamente 10 días. Contrariamente, tanto en pobres condiciones nutricionales (De Moed y col., 1999), como en ciclos de luz-oscuridad de mayor período (Paranjpe y col., 2005) y bajo menores temperaturas de desarrollo (Partridge y col., 1994; Folguera y col., 2008) la duración del desarrollo se incrementa. El caso opuesto también es

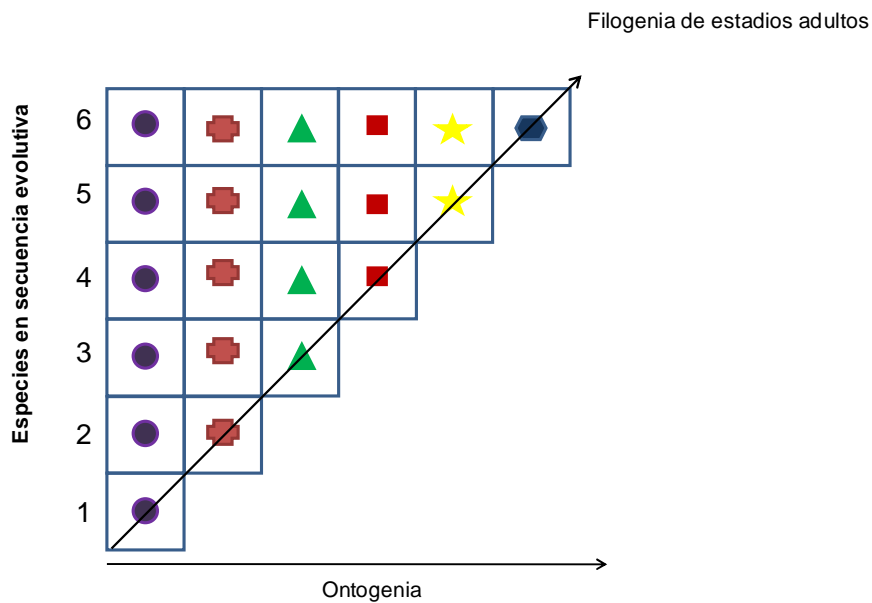
posible, observándose una aceleración del tiempo de desarrollo en tratamientos de luz continuos (Paranjpe y col., 2005) y en rangos de temperatura entre los 25°C y 28°C (Trotta y col., 2006). En el marco de estudios de adaptación térmica, se ha observado que el efecto de la temperatura de desarrollo no sólo influencia la duración de los estadios juveniles sino que además afecta el tamaño corporal del animal (Partridge & French, 1996).

### 1.3. Heterocronía

#### 1.3.1. Haeckel: el origen de la heterocronía.

En su intento por interpretar a los procesos naturales de una manera holista y unificadora, el biólogo alemán Ernst Haeckel planteó a mediados del siglo XIX un vínculo directo entre la ontogenia y la filogenia. Haeckel (1905) sostenía que "...Estas dos ramas de nuestra ciencia están vitalmente conectadas...La conexión entre ellas no es superficial, sino profunda, intrínseca y causal". Su teoría de la recapitulación plantea que los estadios **juveniles** de las especies descendientes constituyen una repetición rápida y condensada las formas **adultas** de las especies ancestrales (Figura 1.5) (Gould, 1977). En consecuencia, para los evolucionistas contemporáneos al embriólogo alemán, las semejanzas en las etapas embrionarias de diferentes especies, eran consideradas como evidencias de ancestralidad común. No es casual que Ernst Haeckel, haya sido quien diseminara las ideas evolucionistas de Darwin en Alemania y uno de sus más fervientes defensores. Haeckel acuñó el término *heterocronía* como excepción no recapitulacionista a la relación entre la ontogenia y la filogenia. Este fue el primer significado de heterocronía; y no sería el último. La recapitulación planteada por Haeckel, y varios otros alemanes contemporáneos, sustentaba la unión entre la ontogenia y la filogenia

de una manera causal y unidireccional: la filogenia era considerada el motor de la ontogenia, dejando a esta última en un *status* causalmente dependiente de la primera. Sin embargo, no era desconocido para este autor que había excepciones a la teoría recapitulacionista. En efecto, un desplazamiento temporal relativo entre diferentes caracteres a lo largo de la ontogenia alteraría lo propuesto por la filogenia. De esta forma, la primera concepción del término heterocronía representa la contracara de la idea de recapitulación.



**Figura 1.5.** Diagrama esquemático del mecanismo de recapitulación propuesto por Haeckel. La evolución de las especies consiste en la incorporación de nuevas características en los estadios adultos conservando la ontogenia de las especies ancestrales. Por ejemplo, para la especie 4 el estadio adulto está representado por el cuadrado rojo. Durante su ontogenia la misma pasa por las etapas juveniles “triángulo verde”, “forma marrón” y “círculo violeta” que a su vez constituyen los estadios adultos de las especies 3, 2 y 1, respectivamente. Modificado de Gould (1977).

Tras años de buena reputación, la teoría de la recapitulación (también conocida como Ley Biogenética) enfrenta duras críticas provenientes de estudios que muestran que hay numerosas adaptaciones propias de los estadios juveniles que no resultan ser un reflejo de los estadios adultos ancestrales (Gould, 1977). En otras palabras, el cuestionamiento apunta al planteo de Haeckel de que la ontogenia estaría subordinada a la filogenia. Más allá de las críticas, uno de los mayores logros que actualmente reconocemos del planteo recapitulacionista es que por primera vez se relacionaron dos niveles diferentes del tiempo biológico: el ontogenético y el evolutivo.

### **1.3.2. De Beer: genes de desarrollo y heterocronía**

En su libro *Embriones y ancestros* (1930) Galvin de Beer intenta desvincular el concepto de heterocronía de la idea de la recapitulación y demostrar cómo diferentes cambios en el tiempo de desarrollo podían generar cambios a nivel evolutivos (Smith, 2003). De Beer profundiza la idea de que las innovaciones evolutivas pueden ocurrir en cualquier etapa del desarrollo, lo que genera patrones ontogenéticos que se apartan de la recapitulación. De esta manera, para de Beer, las heterocronías surgen a partir del desplazamiento temporal de un determinado carácter a través de la ontogenia en relación con el tiempo en que ese mismo carácter surge en la forma ancestral. En su intento de acercar la Embriología comparada a la *Síntesis evolutiva*, de Beer rechaza la relación causal entre la filogenia y la ontogenia, otorgándole un *status* independiente a esta última y destacando su importancia en la evolución de los organismos. Gargstang, contemporáneo de de Beer, sentencia: "la ontogenia no recapitula la filogenia, la crea" (1922). Este embriólogo evolutivo británico consideró a la heterocronía como un proceso, aunque la forma que utilizó para presentarla fue una clasificación de diferentes patrones de relación



entre la ontogenia y la filogenia. Bajo esta perspectiva, la filogenia dejó de considerarse como el motor de la ontogenia. de Beer fue el primero que postuló que cambios en los genes que controlan la tasa de desarrollo de un individuo conducen a heterocronías y consecuentemente, a cambios morfológicos (Brigandt, 2006). Indudablemente, esta visión prioriza a la ontogenia como el factor responsable de las diferencias fenotípicas entre las especies, a través de la acción de los genes que gobiernan el desarrollo. Nuevos enfoques y metodologías surgirán a partir de esta redefinición de la heterocronía donde por lo que entendemos, la transmutación del concepto ganó su significado moderno.

### **1.3.3. Gould: el resurgimiento de la heterocronía.**

Hoy, a treinta años de su publicación, podemos decir que el libro *Ontogenia y Filogenia* (1977) de Stephen Jay Gould es un clásico de la literatura en temas de evolución y desarrollo. Esta obra marcó un hito en la historia de la disciplina por varios motivos: 1) es una extensa y exquisita revisión de los estudios que unieron a la ontogenia y a la filogenia desde la época de Haeckel, 2) detalla la odisea (propias palabras de Gould) del concepto de heterocronía, 3) realiza una valiosa propuesta en relación a la integración de los caracteres de tamaño y forma de los organismos con el tiempo que les lleva alcanzar el estadio adulto, 4) unifica los marcos conceptuales de disciplinas como la genética, la embriología, la fisiología y la paleontología.

Alberch, Gould y colaboradores (1979) centraron sus estudios en las heterocronías de crecimiento, y de esta manera restringieron el análisis al tamaño y la forma de la estructura estudiada (Klingenberg, 1988). Sin embargo, existen modelos donde la medición directa del tiempo de desarrollo posibilita el estudio de las heterocronías sin la necesidad de cuantificar estimadores indirectos. En este sentido, en la siguiente

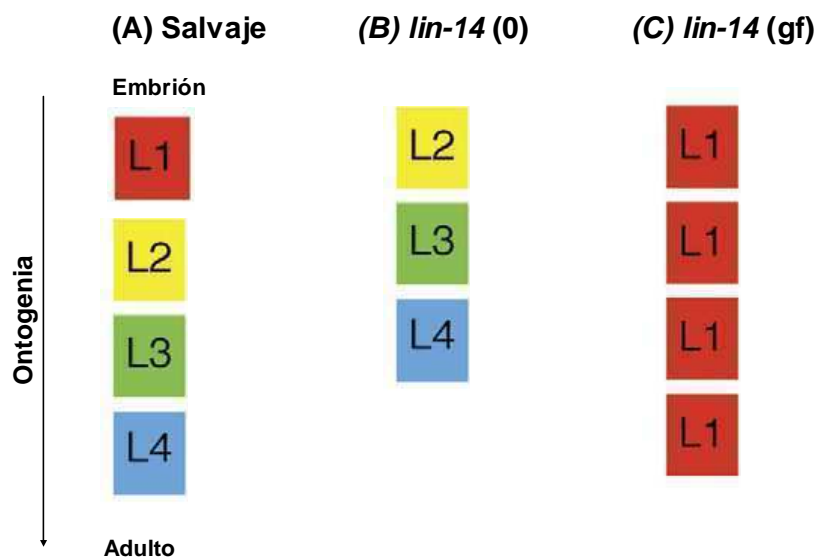
sección mostraremos de qué manera el corto tiempo de desarrollo de un organismo, así como también la posibilidad de manipulaciones genéticas, resultaron en las principales características para estudiar las bases genéticas de la heterocronía.

#### **1.3.4. Mutantes y genes heterocrónicos.**

La heterocronía según de Beer, resulta del desplazamiento temporal de un carácter en relación al momento del desarrollo que ese mismo carácter surge en el linaje ancestral. Esta relación ancestro-descendiente, originalmente acuñada para establecer vínculos entre especies ancestrales y derivadas, la reinterpretaremos en términos genéticos. Entonces, consideramos que un mutante heterocrónico es aquel genotipo que cambia la duración del desarrollo ontogenético requerido para llegar a la edad reproductiva en relación al genotipo salvaje, en este caso genealógicamente ancestral. En los términos de los dos procesos que Gould toma como mecanismos heterocrónicos (Gould, 1977), los mutantes pueden acelerar o retardar el desarrollo respecto del genotipo salvaje. **El análisis de las bases genéticas responsables del fenotipo tiempo de desarrollo, resultará en la identificación de genes heterocrónicos.**

Los primeros mutantes heterocrónicos fueron descritos en otro animal modelo para estudios de desarrollo, el gusano nemátodo *Caenorhabditis elegans*. En este caso se generaron mediante mutagenización con químicos y radiación a partir de una línea salvaje de *C. elegans* (Ambros & Horvitz, 1984). Los fenotipos fueron analizados en base a defectos en la morfología de la cutícula y el comportamiento de muda. En este primer estudio se logró la identificación de 6 genes cuyas mutaciones resultaron en un fenotipo heterocrónico. Tomando el caso del mutante *lin-14*, Ambros (1989) obtuvo mediante manipulaciones genéticas sobre este locus ambos fenotipos

heterocrónicos (aceleración y retraso del desarrollo) producto de alteraciones temporales en el destino de las células (*cell fate*) laterales hipodérmicas las cuales son responsables de la formación de la cutícula del animal. Por un lado, mutantes *lin-14* pérdida de función omitieron el destino de las células hipodérmicas característico del estadio larval 1 (L1) y tomaron el destino celular específico de este tejido de etapas más tardías del desarrollo, proceso que llevó a la aceleración del tiempo de desarrollo del animal (Figura 1.6 B). Por el contrario, la sobreexpresión de *lin-14* condujo a la reiteración del estadio L1, lo que repercutió en un retraso en la duración del desarrollo (Figura 1.6 C). En el caso de los mutantes de *C. elegans*, el patrón heterocrónico no se restringe únicamente al tejido hipodérmico, encontrándose mutantes en otros linajes celulares como el intestino, los músculos y las neuronas (Moss, 2007).



**Figura 1.6.** Representación de los mutantes heterocrónicos de *C. elegans*. El mutante pérdida de función *lin-14* omite el estadio larval 1 lo que acelera el desarrollo (B). El mutante *lin-14* ganancia de función (gf) retarda el desarrollo reiterando repetidas veces el estadio L1 (C). Modificado de Moss (2007).

#### **1.4. Variación genética natural de caracteres cuantitativos: patrones y procesos.**

La variación de los caracteres fenotípicos producto de manipulaciones experimentales en el laboratorio denota la capacidad de cambio de los sistemas genéticos. Sin embargo, en qué medida esa variación observada en condiciones experimentales puede tener lugar en procesos naturales es uno de los interrogantes más grandes de la biología evolutiva. En este sentido, a lo largo de la historia de la disciplina, los drásticos efectos fenotípicos generados por mutaciones artificiales han contribuido negativamente a la construcción teórica de lo que significa el cambio evolutivo. En este contexto, Stern (2000) se refiere a las “mutaciones evolutivamente relevantes” como aquellas variantes genéticas frecuentes en las poblaciones naturales responsables de las diferencias a los fenotípicas entre individuos.

Para todo carácter cuantitativo, la variación fenotípica natural resulta de la segregación de alelos en múltiples *QTLs* (loci de caracteres cuantitativos) los cuales generalmente son sensibles a variación ambiental (Mackay, 2001). En este sentido, la arquitectura genética de un carácter cuantitativo se refiere al patrón de efectos genéticos que controlan un determinado carácter fenotípico y sus propiedades de variación (Hansen, 2006). La descripción de la arquitectura genética requiere establecer los genes que, necesariamente, están implicados en la expresión del carácter y su modo de acción, es decir si el fenotipo es el resultado de la suma de los efectos de cada locus individual, o en cambio, existen interacciones epistáticas entre loci que causan efectos no lineales a nivel fenotípico (Mackay, 2004; Demuth & Wade, 2006). Asimismo, el identificar los efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres de interés proporciona la posibilidad de explorar las restricciones genéticas (trade-off), mediante el análisis de co-variaciones lo cual permite estudiar las causas que restringen el cambio evolutivo

(Promislow, 2004; Palaima, 2007). Indudablemente se debe realizar un estudio integrado que permita conocer la arquitectura genética de caracteres complejos, ya que se debe establecer: i) qué proporción de los genes involucrados en el carácter son variables en las poblaciones naturales, ii) si los efectos fenotípicos de los QTLs son independientes de las condiciones ambientales, iii) las bases moleculares de la variación entre alelos (polimorfismos de nucleótidos o SNPs –Single Nucleotide Polymorphisms) y iv) las fuerzas evolutivas que gobiernan el cambio evolutivo de los QTLs. Esta enumeración pone de manifiesto que si bien la tarea de descifrar la arquitectura genética de caracteres complejos no es fácil, promueve nuevas miradas en el estudio de la variación genética de las poblaciones naturales (Sambandan y col 2008; Harbison y col., 2009) y de la divergencia, puesto que tendremos la posibilidad de establecer si los genes responsables de la variación cuantitativa dentro de una población, son los mismos que están implicados en la divergencia entre poblaciones y/o entre especies (Gompel & Carroll, 2003; Sucena y col., 2003). En este contexto, el interés de la genómica ecológica evolutiva radica no solo en cuantificar la diversidad genética que hay en las poblaciones naturales sino también en la dilucidación de los mecanismos y procesos que modulan los cambios de la arquitectura genética durante la evolución adaptativa. Aún cuando podemos correlacionar la diversidad genética y el potencial evolutivo debemos diferenciar muy bien las propiedades de cada componente a fin de evitar errores de interpretación y de concepto. Por ejemplo, la heredabilidad (en sus dos acepciones: amplia y estrecha) expresa la potencialidad de un determinado carácter de responder a la selección (Lynch & Walsh, 1998; Visscher y col., 2008) mientras que la capacidad de evolucionar (*evolvability* en inglés) se utiliza para referirnos al potencial evolutivo de una arquitectura genética determinada (Partridge y Barton 2000; Pigliucci 2008).

En un punto en el tiempo y el espacio, solo una fracción de los componentes de la arquitectura genética contribuye a la diversidad genética de una población. Parte de esta diversidad tiene impacto a nivel fenotípico y constituye la “variación genética visible” mientras que otras variantes genéticas comúnmente no son detectadas ya sea porque sus efectos no son medibles a nivel fenotípico (como por ejemplo las sustituciones sinónimas) o porque sus efectos se hacen visibles bajo condiciones genéticas o ambientales específicas (Schlichting & Pigliucci 1998). Esta última variación se la conoce como “variación genética criptica u oculta” en donde la epistasis e interacciones genotipo ambiente dan sustento a la misma (Gibson & Dworkin, 2004; Masel, 2006).

Como es de imaginar, debido a la complejidad y extensión requerida para la descripción completa de la arquitectura genética de un carácter relevante para el *fitness*, actualmente son escasos los rasgos para los que se conoce la totalidad de parámetros e información, inclusive en *Drosophila*.

### 1.5. Objetivos generales.

Los objetivos generales de esta Tesis Doctoral son, en primer lugar, identificar y caracterizar genes asociados a la expresión fenotípica del tiempo de desarrollo en *D. melanogaster*; en segundo lugar, establecer los patrones de la variación genética de este carácter en poblaciones naturales, y por último, determinar regiones del genoma responsables de la variación genética natural. En relación a los últimos dos puntos nos interesa estudiar además los procesos que generaron la variación genética observada en los genes asociados a la arquitectura genética del tiempo de desarrollo en el género *Drosophila*. Para cumplir con estos objetivos, utilizaremos a lo largo de la Tesis tanto mutantes artificiales como genotipos con variación natural para el tiempo de desarrollo. El orden de nuestro estudio será de los genes a las poblaciones, investigando las propiedades más importantes de cada nivel analizado. El análisis funcional de la Tesis se centrará en los procesos biológicos de los genes heterocrónicos identificados, sus interacciones genético-ambientales y su grado de pleiotropía. El análisis genético-evolutivo hará foco en los patrones y procesos reflejados en la variación natural del tiempo de desarrollo. De esta manera, el trabajo se estructurará en cuatro partes que conforman unidades de análisis con objetivos particulares pero complementarios.

En el Capítulo 2 presentamos un estudio destinado a la identificación de genes candidatos para el tiempo de desarrollo utilizando un conjunto de líneas mutantes artificiales. Al ser el tiempo de desarrollo un carácter cuantitativo tenemos como hipótesis que el mismo está afectado por un gran número de *loci*. En esta sección nos interesa responder, entre otras, las siguientes preguntas: i) ¿en qué proporción se identifican mutantes heterocrónicos respecto del control?, ii) ¿cuántos aceleran el tiempo de desarrollo?, iii) ¿cuántos lo retrasan?, iv) ¿qué genes modifican la

expresión del carácter?, v) ¿qué procesos biológicos cumplen dichos genes?

En el Capítulo 3 evaluamos el papel que juega la variación ambiental sobre el tiempo de desarrollo utilizando una muestra de mutantes artificiales caracterizados en el Capítulo anterior. En particular, estudiamos el efecto que temperatura de desarrollo tiene sobre los mutantes heterocrónicos. Al ser la temperatura uno de los factores ambientales determinantes en el desarrollo de un individuo planteamos la hipótesis que la misma afectará significativamente la expresión del carácter. A esta altura de la Tesis pretendemos contestar, entre otras, las siguientes preguntas: i) ¿los mutantes heterocrónicos son independientes de las condiciones térmicas durante el desarrollo?, ii) ¿se altera la magnitud de cambio frente a las nuevas condiciones térmicas?, iii) ¿es posible identificar genes plásticos que afecten al carácter en función de la temperatura de desarrollo?

En el Capítulo 4 estudiamos la variación genética para el tiempo de desarrollo a partir de genotipos derivados de poblaciones naturales de Argentina. Se pondrán a prueba hipótesis térmicas adaptativas que expliquen la estructuración de la variación genética encontrada. Nos interesa abordar, entre otras, las siguientes preguntas: i) ¿hay diferenciación genética para el tiempo de desarrollo entre las poblaciones naturales estudiadas?, ii) en el caso de encontrar diferencias poblacionales, ¿la variación está estructurada siguiendo un patrón macrogeográfico? iii) ¿qué grado de variación genética aditiva tienen las poblaciones para responder a procesos evolutivos?

En el Capítulo 5 realizamos cruzamientos entre los mutantes heterocrónicos identificados en el Capítulo 2 y los genotipos naturales más extremos individualizados en el Capítulo 4, con el objetivo de diseccionar las bases genéticas que contribuyen a la variación natural para varios genes candidatos. Entre las preguntas desarrolladas se destacan: i) ¿existen alelos diferentes de los genes heterocrónicos que contribuyen



a las diferencias fenotípicas observadas entre las poblaciones estudiadas?, ii) ¿la selección natural moldea tal diferenciación genética?

En el Capítulo 6 exponemos las conclusiones generales, integrando los principales resultados de toda la Tesis desde un enfoque cuantitativo, funcional, genómico y evolutivo del tiempo de desarrollo.

# Capítulo 2

## Identificación de mutantes y genes heterocrónicos

## 2.1. Introducción

Comprender la ontogenia de los caracteres de historia de vida, especialmente el control genético de la duración de los eventos más importantes en el desarrollo de un organismo, es un tema pendiente en evo-devo. Entre las etapas más importantes del ciclo de vida de un insecto se destaca la eclosión, evento de la ontogenia en el cual el imago abandona el pupario finalizando de esta forma el único estadio sésil del ciclo (con excepción del embrionario). En *Drosophila* el ritmo de eclosión está regulado por la interacción entre los marcapasos centrales y periféricos del sistema neuroendócrino (Myers y col., 2003), los cuales controlan los ciclos endógenos de 24 horas, conocidos como ritmos circadianos. Los relojes circadianos son una adaptación cuya alteración afecta aspectos muy importantes tanto de índole fisiológico como comportamental (Sharma, 2003). Alteraciones en componentes relevantes del reloj biológico determinan cambios en el tiempo de desarrollo, como se pudo observar por ejemplo en mutantes *period* (Kyriacou y col., 1990). En este sentido, existen evidencias que sugieren que los organismos con relojes rápidos aceleran el tiempo de desarrollo e inversamente, aquellos con relojes lentos, lo retardan (Paranjpe & Sharma, 2005; Kumar y col., 2006).

Históricamente, una estrategia para estudiar experimentalmente la evolución de caracteres relacionados al *fitness*, es la implementación de fuertes regímenes de selección artificial a lo largo de generaciones sucesivas, y de esta forma estudiar el impacto que tuvo la misma sobre los caracteres de interés (Falconer & Mackay, 1996). Para el caso del tiempo de desarrollo, diversos grupos de investigación llevaron adelante protocolos de selección artificial, y estudiaron no sólo la respuesta

fenotípica del carácter, sino también las respuestas genéticas correlacionadas que mostraron otros caracteres de relevancia adaptativa, tanto morfológicos, fisiológicos como de historia de vida (revisado en Prasad & Joshi, 2002). En efecto, experimentos de selección artificial destinados a reducir el tiempo de desarrollo condujeron a respuestas negativamente correlacionadas sobre el peso del adulto al momento de la eclosión (Nunney, 1996), el tamaño del adulto (Nunney, 1996; Zwaan y col., 1995; Chippindale y col., 1997; Prasad y col., 2001; Chippindale y col., 2004), la viabilidad (Chippindale y col., 1997; Prasad y col., 2001) y longevidad (Chippindale y col., 2004). La aceleración del tiempo de desarrollo repercute negativamente sobre el tamaño corporal y la resistencia a la inanición, patrón conocido como *síndrome del desarrollo rápido*, fenómeno que pone de manifiesto la conexión directa entre los estadios juveniles y adultos a través de compromisos (*trade-offs*) energéticos (Chippindale y col., 2004). Este tipo de resultados destacan las correlaciones genéticas negativas entre el tiempo de desarrollo y una gran cantidad de caracteres adultos, hecho que sugiere que los genes involucrados en el desarrollo temprano de un organismo tienen efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres de adulto. La pleiotropía es la propiedad de un gen de afectar a dos o más caracteres simultáneamente. De esta manera, la magnitud de la correlación genética inducida por la pleiotropía expresa en qué medida los caracteres están influenciados por los mismos genes (Falconer & Mackay, 1996). Si bien los estudios de selección artificial sobre el tiempo de desarrollo son apropiados para investigar la variación genética que presenta una determinada población como respuesta a los regímenes de selección y las asociaciones genéticas con otros caracteres, el enfoque es limitado en cuanto a la identificación de los genes que contribuyen a la variación fenotípica del

carácter, así como también a la individualización de *loci* con efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres adaptativos (Leroi y col., 2005).

Uno de los proyectos genómico funcionales más ambiciosos es el de disrupción génica de *D. melanogaster*, componente del proyecto Genoma de *Drosophila* llevado adelante por la Universidad de California en Berkeley. El mismo consiste en una extensa colección de cepas mutantes homocigotos para todos los loci (isogénicas), derivado de una línea de la cepa salvaje Canton-S. Cada línea isogénica mutante fue derivada de un esquema de cruzamientos mediante los cuales se lograron inactivar genes individuales (uno por línea) mediante la inserción de elementos móviles (Spradling y col., 1995). La implementación de elementos móviles como vectores mutagénicos posibilita la inferencia de la función normal de un gen determinado a través de la manifestación de un fenotipo mutante, debido a que la inserción del elemento móvil genera una mutación de efecto mucho más localizado que la producida por diferentes químicos mutágenos como el Etil Metil Sulfonato (Keightley & Ohnishi, 1998). De esta manera, la mutagénesis por inserción de elementos transponibles permite identificar y caracterizar la función de gran cantidad de genes que hasta el momento formaban parte de una porción funcionalmente desconocida del genoma.

El presente capítulo tiene como objetivo realizar una búsqueda de mutantes heterocrónicos utilizando 192 líneas del Proyecto Genoma de *Drosophila* de Berkeley. A partir de estos resultados identificamos parte de la base genética del tiempo de desarrollo, es decir genes candidatos a estar involucrados en la expresión fenotípica de este carácter lo que nos permitirá conocer los procesos biológicos en los que estos *loci* se encuentran implicados, así como también las vías de señalización de las cuales forman parte. De manera global, caracterizaremos el perfil

funcional del conjunto de genes heterocrónicos candidatos. Además, estudiaremos los efectos pleiotrópicos que los genes tienen sobre otros caracteres adaptativos. Al ser el tiempo de desarrollo un carácter cuantitativo, tenemos como hipótesis de trabajo que el mismo estaría influenciado por un gran número de *loci*. A su vez, tal como lo sugieren los estudios de selección artificial, se espera identificar genes con efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres adaptativos.

Las preguntas centrales que se pretenden abordar en el presente capítulo son:

(1) ¿La mutagénesis por inserción de elementos móviles provoca fenotipos heterocrónicos? ¿En qué proporción las líneas mutagenizadas manifiestan fenotipos heterocrónicos? ¿Qué proporción de estos mutantes heterocrónicos aumentan el tiempo de desarrollo respecto del control? ¿Se encuentran mutantes que disminuyan el tiempo de desarrollo?

(2) ¿Los mutantes afectan diferencialmente a ambos sexos?

(3) ¿Cuáles son los genes involucrados en la expresión del carácter? ¿Forman parte de vías de señalización relevantes durante la ontogenia? ¿Qué funciones biológicas cumplen?

4) ¿Los genes heterocrónicos candidatos tiene efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres relacionados al *fitness*, como la viabilidad, el ritmo de eclosión, el tamaño corporal y la longevidad?

## 2.2. Materiales y Métodos

### Stocks de *Drosophila* y ensayos fenotípicos

Los ensayos de tiempo de desarrollo los realizamos en un panel de 192 líneas mutagenizadas con inserciones de elementos transponibles *P[GT1]* (ver Figura 2.1). Estas líneas poseen el mismo fondo genético derivado del stock *Canton-S* línea *B* (de aquí en adelante *Canton-S B*) (Lukacsovich, 2001). Las mismas fueron gentilmente cedidas por la Dra. Trudy Mackay (*North Carolina State University, USA*).



**Figura 2.1.** Esquema del elemento *P[GT1]*. El plásmido pUC8 contiene un sitio de origen de replicación bacteriano y un gen de resistencia a antibióticos. Ambas herramientas se utilizan para clonar la secuencia flanqueante a la inserción.

Los ensayos se realizaron en bloques de entre 30 y 40 líneas cada uno. Simultáneamente con cada bloque se corrió una línea control, la cual tiene el mismo fondo genético del resto de las líneas (*Canton-S B*) y está libre de inserciones mutacionales. Por cada línea, se colocaron 300 parejas de moscas sexualmente maduras en cajas de recolección de embriones durante 8 horas. Cada caja contenía una placa de *Petri* rellena con un gel de agar (2% en agua) sobre el que se colocó granos de levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) seca que sirvió como estímulo para oviposición. Este procedimiento permitió la obtención de una enorme cantidad de embriones los cuales fueron depositados por las hembras en

la superficie del gel de agar. Las placas con embriones se incubaron a 25°C por 16 hs para permitir la eclosión de las larvas de primer estadio. Una vez producida la eclosión se sembraron 30 larvas (4 réplicas por línea) en tubos con medio de cultivo preparado con puré de papa instantáneo (Roberts, 1998). A esta densidad se considera que no hay efecto denso-dependiente. Todos los tubos se mantuvieron en un incubador a 25°C ± 0.5, con un fotoperíodo de 12:12 h luz:oscuridad y una humedad de 60-70%.

**Tiempo de Desarrollo.** Una vez alcanzado el estadio pupal, se comenzó a registrar la emergencia de los adultos cada 12 horas (a las 9:00 y 21:00 hs de cada día). El tiempo de desarrollo se estimó como el tiempo (medido en horas) transcurrido entre la siembra de las larvas de primer estadio hasta la emergencia del adulto para cada sexo por separado. Es necesario destacar que el registro de emergidos cada 12 horas es menor al tiempo que estuvieron los adultos en la cajas de recolección de embriones (8 horas).

**Viabilidad pre-adulta.** Al finalizar la eclosión de los adultos de cada tubo, se registró el número de individuos que alcanzó dicho estadio, con el fin de estimar la supervivencia en cada réplica. Al tratarse de un cociente (# de individuos sembrados / # de individuos emergidos) se utilizó la transformación angular [arcseno (pi)<sup>1/2</sup>, donde pi es el porcentaje de supervivencia] para los sucesivos análisis estadísticos.

**Momento de eclosión.** Por cada réplica analizada, se agrupó a la totalidad de los individuos recolectados en los registros de las 9:00 horas, y se los consideró como emergidos en el intervalo de oscuridad, mientras que aquellos individuos que fueron recolectados en los registros de las 21:00 horas se los clasificó como eclosionados en los intervalos de luz. Es decir que por cada réplica se obtuvo la proporción de individuos emergidos en



el intervalo de luz respecto del total de individuos eclosionados sexo por separado.

**Identificación de los genes.** Con el objetivo de identificar a los genes mutados responsables de la variación fenotípica, se utilizaron como sondas *in silico* las regiones flanqueantes a la inserción del elemento *P[GT1]* y se buscaron regiones homólogas en el genoma de *D. melanogaster*. Este procedimiento se realizó con el Release 5 del genoma de *D. melanogaster* utilizando las herramientas de BLAST de NCBI y Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>).

### **Análisis Estadístico**

#### **Análisis Genético cuantitativo.**

Se realizaron análisis de varianza (ANOVAs) para cuantificar la varianza genética mutacional para el tiempo de desarrollo. Con el objetivo de evitar efectos específicos de la supervivencia sobre el tiempo de desarrollo, se excluyeron del análisis aquellas líneas cuya viabilidad pre-adulta resultó ser menor al 50% de la exhibida por el control. De esta manera, de las 192 líneas se excluyeron 13, y se procedió con el análisis del tiempo de desarrollo con las restantes 179. Con el objetivo de incluir todas las líneas ensayadas en diferentes bloques en un único análisis, se procedió a tomar a la unidad experimental como la desviación respecto a la media del control contemporáneo de cada individuo emergido. De manera general, la unidad experimental tomó la siguiente forma:  $(X_{ijz} - X_c)$ , donde  $X_i$  es el tiempo de desarrollo del individuo  $i$  de la réplica  $j$  de la línea  $z$  y  $X_c$  es la media del tiempo de desarrollo de la línea control contemporánea por cada sexo por separado. Los valores de las líneas se obtuvieron a partir del promedio de las réplicas. Se realizó un ANOVA de 3 factores mixto según el siguiente modelo:

$$Y = \mu + L + S + L \times S + E,$$

donde  $\mu$  es la media general, L el efecto línea (aleatorio), S el efecto del factor sexo (fijo) y E representa el término del error. Un resultado significativo para el factor línea indica que hay varianza genética mutacional para el tiempo de desarrollo. En el caso de observarse diferencias significativas para la interacción L x S, se atribuye ese resultado a la interacción genotipo-ambiente, lo cual sugiere que el efecto de la inserción del elemento móvil es dependiente del sexo. A partir de este ANOVA se estimó la contribución relativa de todos los factores aleatorios (Línea, Línea x Sexo y Error) a la varianza fenotípica total.

El ANOVA descripto recién no permite identificar las líneas responsables de la variación genética encontrada. Por esta razón, se realizó otro ANOVA con los mismos factores descriptos en el análisis anterior, si bien en este caso el factor Línea (L) pasó a ser fijo. Asimismo, este análisis se realizó para cada bloque por separado incorporándose además la línea control de genotipo salvaje *Canton-S B*. En aquellos bloques donde el factor L resultó significativo se procedió a realizar un contraste de *Dunnett* para identificar cuáles fueron las líneas que difirieron significativamente respecto del control. Aquellas líneas que mostraron diferencias fenotípicas significativas respecto al control (líneas heterocrónicas) fueron consideradas como líneas portadoras de una mutación en la que la inserción del elemento *P[GT1]* ocurrió en un gen candidato, es decir involucrado en la arquitectura genética del tiempo de desarrollo (mutante heterocrónico). El test de *Dunnett* se utilizó también para identificar líneas diferentes respecto del control en cuanto a la viabilidad pre-adulta y al momento de eclosión.

### **Reconfirmación de las líneas.**

Una vez analizadas la totalidad de las líneas, se eligieron 40 mutantes heterocrónicos al azar, con el objetivo de revalidar los resultados obtenidos en el primer ensayo. El análisis consistió en comparar cada una de las líneas con la línea control considerando que se utilizaron varios bloques diferentes. El modelo de ANOVA en este caso fue el siguiente:

$$Y = \mu + L + S + E + L \times S + S \times E + L \times E + L \times E \times S + R(L \times E \times S) + Er,$$

donde  $\mu$  es la media general, L es el efecto línea (fijo) con dos niveles: línea heterocrónica candidata y línea control, S es el efecto del factor sexo (fijo), E es el factor ambiental que se refiere a las diferencias ambientales entre el bloque original y el de re-testeo (fijo), R es el factor réplica que se encuentra anidado en la interacción L x S x E (aleatorio), y Er representa el término del error. En caso de observarse que el factor Línea resultara significativo, este resultado se consideró como una reconfirmación de las observaciones previas. En el 80% de las líneas incluidas en el análisis de confirmación se obtuvo el mismo resultado que en el ensayo inicial, por lo que consideramos que la metodología empleada es eficaz y de alta repetibilidad.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete STATISTICA (StatSoft, Inc. 1999, 2001).

### **Análisis Funcional**

Los genes candidatos fueron clasificados en los diferentes procesos biológicos de acuerdo a su asociación con los términos de gene-ontology (GO) (The Gene Ontology Consortium, 2000). Este análisis se realizó automáticamente con la ayuda del programa FatiGO+, del paquete de herramientas bioinformáticas del sitio Babelomics, disponible en

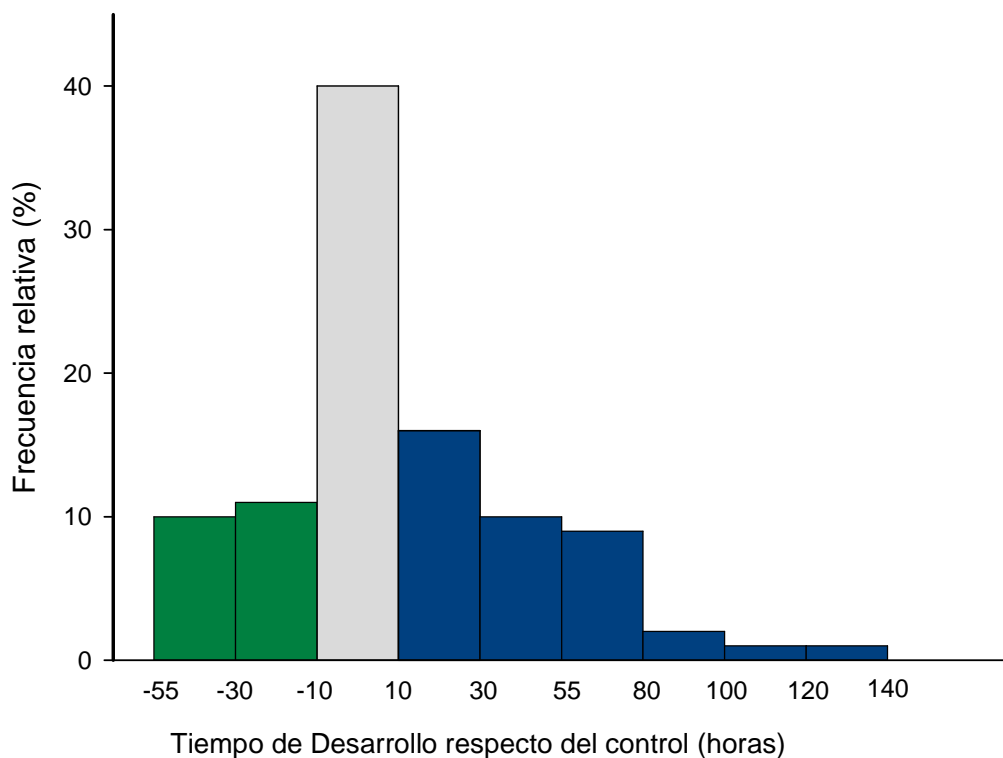
<http://www.fatigo.org/> (Al-Shahrour, 2005). Este programa distribuye a los genes en términos de GO de una forma no excluyente (un gen puede estar asociado a más de un término de GO). Utilizando el mismo programa realizamos una comparación de la distribución de términos de GO entre la muestra de líneas que aceleraron su tiempo de desarrollo respecto a la población de líneas que lo retrasaron, con el objetivo de identificar términos de GO que se encontraban sobre-representados o sub-representados en alguna de las muestras. Además, realizamos una comparación funcional entre la muestra de genes utilizada en el presente estudio y el genoma completo de *D. melanogaster*, con el propósito de establecer si la misma resultó ser una fracción representativa de los distintos procesos biológicos de GO de la totalidad de los genes del genoma. La hipótesis nula de esta prueba plantea que la distribución de funciones biológicas de la muestra analizada (las 179 líneas) es semejante a la distribución de funciones del genoma completo (Al-Shahrour, 2005). El rechazo de la hipótesis nula implica en la muestra analizada existe una sobre o subrepresentación de una función biológica de GO determinada.

### **2.3. Resultados**

#### **Patrones de variación genética del tiempo de desarrollo.**

Lo primero que se puede observar es que existe una gran variabilidad fenotípica para el tiempo de desarrollo entre las 179 líneas analizadas. Como se puede apreciar en la Figura 2.2, el tiempo de desarrollo no se diferenció del control en 72 (40%) de las líneas analizadas (columna gris de la Figura 2.2), mientras que en un número similar el tiempo de desarrollo se extendió significativamente respecto del control (columnas azules en la Figura 2.2). Esta prolongación del tiempo de desarrollo no es un patrón

inesperado, ya que es razonable suponer que mutaciones como las producidas con este tipo de elementos móviles provoquen mayoritariamente efectos detrimentales sobre el fenotipo. El restante 20% de las líneas mostraron una aceleración del tiempo de desarrollo respecto del control (columnas verdes de la Figura 2.2). Al igual que en los experimentos de selección artificial donde la respuesta a la selección es menor en regímenes destinados a acelerar el desarrollo (Sang & Clayton, 1957; Clarke y col. 1961; Zwaan y col., 1995), encontramos que el doble de mutantes prolongan el tiempo de desarrollo respecto de los que lo aceleran.



**Figura 2.2.** Histograma de frecuencias de las 179 líneas analizadas para el tiempo de desarrollo. La barra gris representa las líneas que mostraron un tiempo de desarrollo similar al control (40%). Las barras azules son las líneas que retardaron la duración de la ontogenia (40%). Las verdes son las que aceleraron el proceso (20%). Los valores de tiempo de desarrollo se expresan como desviaciones respecto del control.

Los fenotipos más extremos fueron observados en las líneas BG01543 y BG01412. La primera fue entre 60 y 50 horas más rápida que el control en machos y hembras, respectivamente, en tanto que la segunda presentó un tiempo de desarrollo 119 y 146 horas (machos y hembras, respectivamente) más lento que el control.

El análisis estadístico mostró que las líneas se diferenciaron significativamente lo que indica la existencia de varianza genética mutacional para el tiempo de desarrollo (Tabla 2.1). Más aún, el factor Línea permitió explicar el 84% de la varianza fenotípica total, un valor que es 5 veces mayor que la varianza explicada por el Error. También el factor Sexo fue significativo, siendo los machos más rápidos, en promedio, que las hembras. Por último cabe destacar, que la interacción Línea x Sexo no fue significativa, lo que sugiere que el efecto de la inserción en las diferentes líneas no es dependiente del sexo.

**TABLA 2.1. Análisis de varianza de los efectos mutacionales sobre el tiempo de desarrollo**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b><math>\sigma^2</math></b>
Línea	178	54,68	< 0,0001	84
Sexo	1	46,87	< 0,0001	Fijo
Línea x Sexo	178	0,76	0,99	0
Error	1066			16

g.l.: grados de libertad;  $\sigma^2$ : componente de varianza

### **Identificación de los genes heterocrónicos**

En la Tabla 2.2 se muestran los valores medios de las líneas significativas. Entre las líneas más rápidas, se destacan BG01543 y BG01902, las cuales presentaron un tiempo de desarrollo 2 días más rápido que el control. En la BG01902 el elemento *P[GT1]* interrumpe la secuencia nucleotídica del gen *mastermind* (*mam*) que juega un rol importante como regulador transcripcional de la vía de señalización *Notch* (Artavanis-Tsakonas y col., 1999; Helms y col., 1999; Petcherski & Kimble, 2000; Fryer y col., 2002). La vía de *Notch* participa en forma destacada en la señalización celular que controla un amplio espectro de destinos celulares durante la ontogenia en gran parte de los metazoos (Lai, 2004; Bray, 2006; Oyama y col., 2007). En humanos, deficiencias en la vía de *Notch* están vinculadas con gran número de enfermedades, como es el caso de la leucemia aguda de linfocitos T (Chan y col., 2007) y con patologías relacionadas a disfunciones de la válvula de la aorta (Garg y col., 2005). En la línea BG01543, la inserción del elemento *P[GT1]* interrumpe la secuencia nucleotídica del gen *Merlin* (*Mer*), un conocido regulador negativo de la proliferación celular de los discos imaginales en *Drosophila* (Hariharan & Bilder, 2006). *Mer* es un componente de la vía de señalización *Hippo*, la cual juega un rol fundamental en la regulación del tamaño de los órganos en crecimiento durante el desarrollo (Hamaratoglu y col., 2006). Diversas evidencias experimentales sugieren que *Mer* controla el crecimiento tisular regulando la endocitosis de receptores de membrana celular en el epitelio de los discos imaginales (Okada y col., 2007). Nuevamente, es muy interesante notar que el ortólogo de *Mer* en humanos es un gen supresor de tumores conocido como *Neurofibromatosis Type 2* (*NT2*) el cual está involucrado en la desregulación de la proliferación celular en patologías tumorales del

sistema nervioso central (Hariharan & Bilder, 2006; McClatchey & Giovannini, 2005).

Otro gen involucrado en una vía de proliferación celular que tuvo efectos sobre TD en nuestro estudio es *forkhead box, sub-group O (foxo)*. La inserción próxima a la secuencia de *foxo* (BG01573) incrementó el tiempo de desarrollo respecto al control en 24 horas en ambos sexos. *foxo* es un componente regulatorio clave en la vía de señalización de la insulina, la cual en *Drosophila* regula el control del crecimiento de las células, órganos, y todo el cuerpo en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Jünger y col., 2003). Puig y colaboradores establecieron que *foxo* activa la transcripción tanto río arriba como río abajo de esta vía mediante un mecanismo de *feedback* transcripcional que regula el crecimiento y la proliferación celular. Existen evidencias que sugieren que la vía de la insulina regula la proliferación celular en los discos imaginales, si bien la duración de la fase de proliferación está controlada por la hormona juvenil y por la ecdisona, las cuales no están reguladas por la vía de la insulina (Shingleton y col., 2005). Pulsos prematuros de ecdisona durante la ontogenia provocan la emergencia de adultos de desarrollo rápido y de tamaño pequeño, mientras que una expresión tardía de la misma genera individuos con un tiempo de desarrollo prolongado y un tamaño corporal mayor (Nijhout, 2003). Estudios recientes mostraron que la actividad de la vía de la insulina en la glándula protorácica modula el pulso de ecdisona, influyendo tanto la duración como la tasa de crecimiento larval (Caldwell y col., 2005; Mirth y col., 2005; Colombani y col., 2005). Por otro lado, existen evidencias que sugieren que el neuropéptido *Amnesiac (Amn)* participa en la regulación de la síntesis de la ecdisona en la glándula protorácica de *Drosophila* (Caldwell y col., 2005). Es interesante destacar que en nuestro estudio, la línea BG02286, mutante del gen *Amn*, prolongó el tiempo de



desarrollo en más de 2 días respecto del control en ambos sexos (Tabla 2.2).

Nuestro estudio permitió además identificar fenotipos heterocrónicos extremos, particularmente en la dirección de un incremento en el tiempo de desarrollo (Tabla 2.2). Por ejemplo, la inserción en la secuencia del gen *Karl* (BG01010) extendió el tiempo de desarrollo en más de 100 horas en ambos sexos. La predicción en función de la secuencia del gen sugiere que se trata de una proteína con unión a retinol sin una asociación clara a un proceso biológico. En la línea BG00372 registramos un retraso en el tiempo de desarrollo de 93 y 108 horas en machos y hembras, respectivamente. En este caso la inserción del elemento *P[GT1]* ocurrió 1498 pares de bases río abajo del gen *CG1678*. Tanto la función molecular como los procesos biológicos en los que está involucrado este gen son desconocidos. La línea BG01412 mostró el fenotipo más extremo del estudio, extendiendo el tiempo de desarrollo en 119 y 146 horas en machos y hembras, respectivamente. Lamentablemente, no disponemos de información acerca de la secuencia flanqueante a la inserción de esta línea, por lo que no podemos conocer la identidad del gen mutado ni los procesos biológicos o funciones moleculares en las que pudiera estar implicado.

**TABLA 2.2. Mutantes heterocrónicos.** Los valores de tiempo de desarrollo se expresan como desviaciones respecto del control. Los positivos indican retraso y los negativos aceleración. NS: no significativo. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,0001; p<0,00001. Sin secuencias: no se cuenta con la información de la secuencia flanqueante a la inserción del elemento móvil.

Línea	Gen	Machos	Hembras	Línea	Gen	Machos	Hembras
BG00177	<i>CG9894</i>	-29.29****	-24.68****	BG01218	<i>CG6767</i>	-24.54****	-19.86****
BG00369	<i>CG13333</i>	-44,50***	-56,99**	BG01228	<i>derailed</i>	-10.20*	NS
BG00372	<i>CG1678</i>	93.78****	108.42****	BG01247	<i>SRY1</i>	52.64****	75.16****
BG00373	<i>CG11226</i>	16,22*	23,52**	BG01257	<i>1.28</i>	15.83*	39.5****
BG00386	<i>Nmdar1</i>	-30,73***	-36,13***	BG01279	<i>CG17836</i>	46.18****	58.33****
BG00489	<i>Osiris 9</i>	18.41*	23.55**	BG01290	<i>Btk29A</i>	20.12**	31.38****
BG00524	<i>pri</i>	59.79****	59.09****	BG01297	<i>CG33691</i>	23.55****	19.17****
BG00664	<i>sin secuencia</i>	40.24****	56.64****	BG01339	<i>clt</i>	39,14***	29,46***
BG00735	<i>Schizo</i>	20.55**	22.14****	BG01361	<i>CG6854</i>	18.01***	30.48***
BG00846	<i>invected</i>	79.04****	77.95****	BG01412	<i>sin secuencia</i>	119.0****	146.65****
BG00985	<i>sin secuencia</i>	-13.54**	NS	BG01488	<i>musashi</i>	-19,40**	-26,76***
BG00992	<i>CG17574</i>	42.49****	58.88****	BG01491	<i>tramtrack</i>	45.36****	54.02****
BG01007	<i>Nemy</i>	20.46**	25.55**	BG01498	<i>CKIa</i>	16.73***	10.81*
BG01010	<i>Karl</i>	104.76****	116.92****	BG01520	<i>E2f</i>	58.23****	48.52****
BG01011	<i>Misshapen</i>	48.73****	49.61****	BG01543	<i>Merlin</i>	-60.87****	-49.77****
BG01014	<i>spichthyin</i>	42.21****	41.98****	BG01548	<i>α-Est10</i>	63.42****	77.27****
BG01017	<i>CG14579</i>	51.61****	54.43****	BG01563	<i>CG16708</i>	-18.91*	NS
BG01019	<i>sin secuencia</i>	15.35**	NS	BG01565	<i>Dnr1</i>	26.29****	29.44****
BG01028	<i>Trl</i>	NS	-21,81**	BG01566	<i>arrest</i>	18.79**	19.08**
BG01037	<i>βv Integrin</i>	NS	14.25**	BG01568	<i>CG32560</i>	-34.18****	-35.26****
BG01045	<i>Ninjurin A</i>	49.4****	65.47****	BG01573	<i>foxo</i>	22.96**	26.63**
BG01047	<i>Frizzled</i>	-31.85****	-29.41****	BG01600	<i>CG31666</i>	60.8****	65.27****
BG01062	<i>brother of iHog</i>	55.26****	69.12****	BG01618	<i>CG6398</i>	58.66****	82.01****
BG01065	<i>Visgun</i>	-23.66***	-27.78****	BG01649	<i>clt</i>	66.08****	76.04****
BG01081	<i>Got1</i>	42.09****	49.54****	BG01655	<i>CG32038</i>	16.00****	8.11*
BG01127	<i>muscleblind</i>	57.82****	81.9****	BG01660	<i>sin secuencia</i>	NS	28.84***
BG01214	<i>sgl</i>	-16,82*	-28,59***	BG01662	<i>LanA</i>	-26.5***	NS

TABLA 2.2 (continuación)

Línea	Gen	Machos	Hembras	Línea	Gen	Machos	Hembras
BG01672	CG14591	-27,40**	NS	BG02106	CG31145	57.57****	68.78****
BG01683	CG32572	-41.16****	-33.68****	BG02113	LanA	59.71****	71.32****
BG01689	sin secuencia	47.54****	57.26****	BG02132	sin secuencia	NS	9.57**
BG01713	4EHP	81.32****	86.51****	BG02159	CG32666	29,51***	NS
BG01716	paps	NS	-22,74**	BG02173	NFAT	12.44****	8.83*
BG01735	CG13130	NS	-19,91**	BG02192	boule	75.42****	71.14****
BG01736	CG5966	36.87****	45.43****	BG02219	Smrter	-30.33****	-28.72****
BG01763	CG33960	34,41***	NS	BG02239	CG11550	29,40***	22,72***
BG01769	Beadex	-44.98****	-36.28****	BG02240	bip1	8.27*	9.26**
BG01780	CG11226	-20,18*	-32,31***	BG02262	Smrter	NS	-21.37*
BG01784	Bunched	38.1****	40.41****	BG02286	amn	57.44****	72.44****
BG01828	sin secuencia	-26.21****	-25.92****	BG02292	CG2865	70.82****	95.29****
BG01835	sin secuencia	82.88****	97.87****	BG02327	Pipsqueak	27.61****	22.90****
BG01858	ade5	47.62****	46.72****	BG02386	Sema-5C	9.54*	NS
BG01859	sin secuencia	40.91****	56.11****	BG02398	CG41475	14.82***	11.40*
BG01892	sin secuencia	88.46****	104.18****	BG02439	CG32556	21.11***	52.96****
BG01898	sin secuencia	-41.14****	-39.11****	BG02480	CG31176	66.79****	69.13****
BG01902	mam	-47,64***	-53,05***	BG02546	sin secuencia	-18.55****	-24.86****
BG01912	pxb	-33,10***	-45,92***	BG02560	CG9674	13.94**	NS
BG01949	ade5	NS	7.71*	BG02563	capricious	50.14****	67.38****
BG01990	CG30492	-35,87***	-46,05***	BG02566	Calreticulin	37.69****	46.41****
BG02023	Fasciclin3	-21.07*	-15.14*	BG02690	CG14478	-32,02***	-37,68***
BG02034	lilliputian	-14.39*	NS	BG02727	Escargot	NS	11.27***
BG02065	Toucan	15.36**	NS	BG02747	rut	28,00***	NS
BG02067	Aats-ile	-32.07****	-29.86****	BG02823	scyl	17,44*	NS
BG02095	Echinoid	NS	12.83*	BG02830	Lsd-2	41.14****	78.6****
BG02102	CG13434	-16,73*	-17,89*				

### **Análisis funcional**

Nuestra búsqueda incluyó una fracción reducida de los genes que forman parte del genoma de *D. melanogaster*. Sin embargo, al comparar el perfil funcional de los genes que formaron parte de la muestra analizada con la del genoma completo en base a los términos asociados de *gene-ontology* (GO), pudimos comprobar que los genes estudiados son una muestra representativa del genoma tanto a nivel de los diversos procesos biológicos donde intervienen, como en las numerosas vías de señalización de las que forman parte. En otras palabras, si bien de ningún modo estudiamos la totalidad del genoma, la fracción que evaluamos del mismo es una muestra aleatoria de los procesos biológicos que realizan el conjunto de genes de *Drosophila*.

De manera global, los genes heterocrónicos tienen un perfil funcional similar al de la totalidad de la muestra analizada, y cumplen una amplia gama de funciones biológicas de acuerdo a su asociación con términos de GO (Tabla 2.3). Entre las principales, el 58% de los genes heterocrónicos cumplen funciones relacionadas a procesos metabólicos celulares y el 40% están implicados en el desarrollo orgánico. No encontramos diferencias significativas entre los grupos de genes que aceleraron el tiempo de desarrollo respecto de los que lo retrasaron en cuanto a su asociación con términos de GO, lo que sugiere que las vías ontogenéticas responsables de ambos fenotipos heterocrónicos serían similares.

**TABLA 2.3. Frecuencia de los procesos biológicos relacionados a los genes heterocrónicos candidatos en base a su asociación con términos de *gene-ontology* (GO).**

<b>Procesos Biológicos</b>	<b>% de genes</b>
Procesos metabólicos celulares	58
Desarrollo organísmico multicelular	40
Desarrollo de estructuras anatómicas	34
Regulación de procesos biológicos	32
Procesos de desarrollo celular	32
Comunicación celular	29
Reproducción sexual	18
Comportamiento	10
Respuesta al <i>stress</i>	10
Proliferación celular	10
Adhesión celular	10
Ciclo celular	8

### **Pleiotropía de los genes heterocrónicos**

El protocolo que empleamos para estimar el tiempo de desarrollo de las líneas utilizadas nos permitió además cuantificar la viabilidad pre-adulta y el ritmo de eclosión de las mismas. A su vez, debido a que las líneas estudiadas en el presente trabajo también fueron utilizadas en *screenings* de variación en otros caracteres, es posible cuantificar el grado de asociación genética que guarda el tiempo de desarrollo con otros rasgos adaptativamente importantes. Utilizando la misma metodología que en este trabajo se ha estudiado el tamaño del cuerpo (Carreira, Mensch & Fanara, 2009) y caracteres fisiológicos como la longevidad (Magwire, 2007) y la resistencia a la inanición (Harbison y col., 2004). Los análisis de correlación muestran que existe una asociación genética negativa significativa entre el tiempo de desarrollo y la viabilidad, y que no hay

evidencias de asociaciones genéticas entre el tiempo de desarrollo y el resto de los caracteres mencionados (Tabla 2.4). Como se puede observar en la Tabla 2.3, la mayoría de los genes tienen funciones biológicas relacionadas al metabolismo celular, hecho que es consistente con la asociación genética observada entre el tiempo de desarrollo y la viabilidad. Por otro lado, llamativamente no se encontró correlación alguna entre el carácter estudiado ni con el tamaño corporal ni con la longevidad, resultado que sugiere que existe un mayor grado de asociación genética entre caracteres juveniles. Para el caso del tamaño corporal, los mutantes con los mayores efectos fenotípicos sobre el tamaño del ala, no afectaron el tiempo de desarrollo, con la excepción de *invected* (Carreira, Mensch & Fanara, 2009).

**TABLA 2.4. Correlaciones genéticas entre caracteres.**

Par de Variables	N	R Spearman	P
TD & RE	182	- 0,07	NS
TD & TA	186	- 0,07	NS
<b>TD &amp; VT</b>	<b>186</b>	<b>- 0,26</b>	<b>0,0003</b>
TD & LG	186	- 0,09	NS
TD & RI	186	0,01	NS

TD: tiempo de desarrollo, RE: ritmo de eclosión, TA: tamaño del ala; VT: viabilidad total; LG: longevidad; RI: resistencia a la inanición. NS: no significativo.

Entre las líneas estudiadas, identificamos 25 que mostraron una disminución en la viabilidad pre-adulta respecto del control. Los genes identificados, que se muestran en la Tabla 2.5, mayoritariamente cumplen funciones en el metabolismo celular y algunos de ellos también fueron caracterizados en

este estudio como mutantes heterocrónicos. Este es el caso de tres de ellos: el receptor glutamatérgico *Nmda 1* (*Nmdar1*), la esterasa *cricket* (*clt*) y el *CG33207* (*pxb*).

**TABLA 2.5. Líneas con baja viabilidad y sus genes correspondientes.**

<b>Línea</b>	<b>Gen</b>
BG00386	<i>Nmdar1</i>
BG00429	sin secuencia
BG00528	<i>Osiris 9</i>
BG00683	<i>Furin / CG5127</i>
BG01066	sin secuencia
BG01339	<i>clt</i>
BG01613	<i>canoe / CG12161</i>
BG01628	<i>Malic enzyme</i>
BG01672	<i>CG14591</i>
BG01674	<i>Neuroglian</i>
BG01709	<i>kermit</i>
BG01716	<i>PAPS synthetase</i>
BG01763	<i>CG33960</i>
BG01780	<i>CG11226</i>
BG01912	<i>pxb</i>
BG02065	<i>toucan</i>
BG02081	<i>Rtn11</i>
BG02088	<i>CG15309</i>
BG02107	<i>tlk</i>
BG02157	<i>CG42268</i>
BG02159	<i>CG32666</i>
BG02386	<i>Sema-5C</i>
BG02462	<i>CG34460</i>
BG02510	<i>chameau</i>
BG02747	<i>rutabaga / CG14408</i>

En cuanto al patrón de eclosión en relación a la cantidad de individuos que emergieron durante las horas de oscuridad y las horas de luz, encontramos los siguientes resultados: tanto en la línea control como en la mayoría de las líneas analizadas, la emergencia se produjo equitativamente entre las horas de luz y las de oscuridad (datos no mostrados). Esta homogeneidad en el ritmo de eclosión contrasta con la gran variabilidad observada para el tiempo de desarrollo entre los mutantes heterocrónicos, resultado que indicaría que éstos no serían mutantes circadianos. Como excepción, las líneas BG01081 (*Glutamate oxaloacetate transaminase 1*), BG01633 (*scalloped*) y BG02042 (*easily shocked*) eclosionaron mayoritariamente durante las horas de luz. Estos resultados debilitarían la hipótesis que plantea una influencia del reloj biológico sobre el tiempo de desarrollo (Kyriacou y col., 1990; Kumar y col., 2006) al menos sobre el papel que tiene el ritmo de eclosión sobre el carácter. En base a nuestros resultados, la observación de que el mutante *period* afectó el tiempo de desarrollo (Kyriacou y col., 1990) parecería ser un caso particular de este gen y no se trataría de una generalidad de los mutantes heterocrónicos. Sin embargo, no podemos descartar un efecto del reloj sobre eventos más tempranos en la ontogenia como puede ser la metamorfosis, si bien es menos probable, ya que organismos portadores de mutaciones que afectan fuertemente el sistema circadiano, no exhiben efectos heterocrónicos mayores (Schultz & Kay, 2003).



## **2.4. Discusión**

### **Arquitectura genética del tiempo de desarrollo.**

La cantidad de genes implicados en la expresión fenotípica de un carácter es uno de los determinantes de sus propiedades de variación, es decir, su potencial evolutivo o evolucionabilidad (*evolvability*) (Houle, 1992). Nuestro estudio identificó 107 mutantes heterocrónicos, en otras palabras, gran cantidad de genes potencialmente involucrados en la expresión del tiempo de desarrollo. Los genes identificados están involucrados en vías directamente relacionadas con mecanismos de control temporal del desarrollo, como por ejemplo la vía de la ecdisona y la de la insulina (Shingleton y col., 2005; Bateman & McNeill, 2004; Li & White, 2003) y componentes de vías no relacionadas al mismo. Una característica común a la mayoría de los genes heterocrónicos es su intervención en procesos del metabolismo celular. Si bien la tasa metabólica es un carácter de suma importancia para el desarrollo de un individuo, no forma parte de los caracteres generalmente estudiados en genética cuantitativa de *Drosophila* (como puede ser el mismo tiempo de desarrollo, el tamaño corporal del adulto, la viabilidad), posiblemente por su complejidad experimental. De acuerdo al perfil funcional de los genes de tiempo de desarrollo, nuestros resultados sugieren una asociación entre los procesos metabólicos tanto a nivel celular como orgánico y la duración del desarrollo, es decir que los genes implicados en el metabolismo tienen efectos pleiotrópicos sobre la duración del desarrollo. De estos resultados y de la gran variación genética observada, evaluamos que la intervención sobre el metabolismo puede tener extensas aplicaciones si se quiere modificar la duración de un determinado proceso ontogenético. El patrón observado podría ser sencillamente visualizado si como consecuencia de una determinada mutación se observa una reducción de la tasa

metabólica del organismo en desarrollo y como consecuencia de ello se produce un retraso en la duración del desarrollo. Sin embargo, nuestro *screening* permitió identificar, además, mutantes heterocrónicos que aceleraron el desarrollo. El mutante de *Merlin* (línea BG01543) fue la línea más rápida que reveló nuestro *screening*. Este ortólogo del gen supresor de tumores *NF2* en humanos es un regulador negativo de la proliferación celular en los discos imaginales de *Drosophila*. En la línea BG01543, la inserción del elemento *P[GT1]* interrumpió la secuencia del exón 1 de *Merlin*, lo que en comparación con el control, generó una disminución en los niveles de ARN mensajero de ese gen en el estadio embrionario, en la larva de tercer estadio y en el adulto, no así en la pupa (Sambandan y col., 2006). Estos resultados sugieren que el fenotipo heterocrónico de *Mer* se origina por disfunciones previas a la metamorfosis. Partiendo de esta hipótesis, para caracterizar en profundidad a este mutante de interés, medimos la duración de los estadios larvales y el pupal en *Merlin* y la línea control. En congruencia con los resultados de expresión, observamos que *Merlin* acelera significativamente el tiempo de desarrollo en la etapa larval ( $F=45$ ;  $p<0,0001$ ), estadio donde los niveles de ARN mensajero del mutante fueron inferiores respecto del control, mientras que no presenta diferencias sobre la duración de la pupa ( $p>0,05$ ) momento del desarrollo donde los niveles de expresión no se diferencian de los del control. La regulación negativa que *Mer* ejerce sobre la proliferación celular parece ser un mecanismo consistente con el menor tiempo de desarrollo que mostró su mutante. Debido a que los insectos no crecen de tamaño con posterioridad a la emergencia del imago del pupario (Edgar, 2006), el tamaño final de una mosca está dado por la tasa de crecimiento y la duración de las etapas larvales. Sorprendentemente, la línea mutante de *Merlin* no mostró diferencias significativas respecto al control para una variedad de caracteres morfológicos como el largo de cabeza, el largo de

tórax y del ala lo que sugiere un mecanismo de regulación del tiempo de desarrollo independiente del tamaño corporal (Carreira, Mensch & Fanara, 2009). En concordancia con esto último, un trabajo reciente mostró que la reducción de la tasa de proliferación celular de los discos imaginales tratados con rayos X retarda el tiempo de desarrollo sin afectar el tamaño final del animal (Stieper y col., 2008), resultados que enfatizan el rol que tiene el crecimiento de los discos imaginales sobre la regulación del tiempo de desarrollo.

En cuanto al efecto del sexo en los mutantes heterocrónicos, los machos se desarrollaron en promedio más rápidamente que las hembras, una observación que no concuerda con la extensa bibliografía de *Drosophila* que muestra que las hembras alcanzan la adultez más rápido que los machos en todas las especies estudiadas hasta el momento (Markow & O'Grady, 2005). Sin embargo, es importante aclarar que la línea utilizada como control en nuestro estudio (que comparte el mismo fondo genético que las líneas mutantes) no mostró ningún signo de dimorfismo sexual, lo que enfatiza la importancia de tomar en consideración el fondo genético en la expresión del carácter. Frecuentemente la expresión fenotípica de algunas mutaciones puede depender del fondo genético, realizando el papel que las interacciones epistáticas tienen en la variación fenotípica (Leips & Mackay, 2000; Carlborg y col., 2000). Simultáneamente, el factor Línea x Sexo resultó ser no significativo lo que indica una ausencia de plasticidad para el dimorfismo sexual del tiempo de desarrollo, resultados congruentes con los obtenidos a partir de selección artificial (Zwaan y col., 1995). Como fue comentado anteriormente, en los últimos años un conjunto similar de líneas fue utilizado para estudiar la arquitectura genética de varios caracteres adaptativos. En todos los casos la interacción Línea x Sexo contribuyó con proporciones significativas a la

varianza fenotípica total. En este contexto, nuestro estudio mostró un valor nulo en esta categoría. El resto de los caracteres mostraron los siguientes valores: el número de quetas esternopleurales (5%), el tamaño del ala (8), el comportamiento olfativo del adulto (13%), el número de quetas abdominales (21%), el ancho de cabeza (25%), el largo de tórax (42%) y la resistencia a la inanición (66%). Entre los mutantes heterocrónicos, 9 mostraron efectos macho-específicos mientras que sólo 7 afectaron el tiempo de desarrollo exclusivamente en las hembras. Es importante destacar que ninguno mostró efectos opuestos entre sexos, en otras palabras, no encontramos líneas que disminuyeran el tiempo de desarrollo en un sexo y lo aumentaran en el otro. En conclusión, nuestros resultados indican que existen características de la arquitectura genética del tiempo de desarrollo que están altamente conservadas en ambos sexos.

El análisis de la arquitectura genética de un carácter requiere no sólo la identificación de los genes que contribuyen a la expresión fenotípica del mismo, sino también su respuesta a la variación de factores ambientales relevantes. En el próximo capítulo estudiaremos cómo afecta el cambio de temperatura de desarrollo sobre la duración de la ontogenia de los mutantes heterocrónicos.

# Capítulo 3

## Interacción genotipo-temperatura de los mutantes heterocrónicos

### 3.1. Introducción

El fenotipo de un individuo está determinado no sólo por sus genes, sino también por factores del ambiente entre los que se destacan la nutrición, la temperatura, la humedad y las condiciones lumínicas. En este contexto, la plasticidad fenotípica se define como la capacidad de un determinado genotipo en producir fenotipos alternativos a nivel morfológico, fisiológico y/o comportamental en respuesta a cambios ambientales (West-Eberhard, 2003; Schlichting & Pigliucci, 1998; Fordyce, 2006; Mackay, 2007). La norma de reacción de un genotipo es la gama de diferentes fenotipos producto de la exposición a diferentes ambientes (Futuyma, 1998). Las normas de reacción pueden ser plásticas o no serlo, es decir, el fenotipo puede cambiar o permanecer fijo en respuesta a los cambios ambientales (Schlichting & Pigliucci, 1998). Cuando los efectos producidos por los cambios ambientales varían entre diferentes genotipos de una determinada población, la varianza fenotípica incorpora un componente producto de la interacción genotipo- ambiente (Figura 3.1 B y C). A su vez, la interacción genotipo-ambiente se puede descomponer en variación de la respuesta plástica de los diferentes genotipos producto de cambios en el orden de *performance* en cada ambiente (Figura 3.1 B) (cambio de *ranking*) o cambios en la varianza de los genotipos (cambio de escala) (Figura 3.1C). Por el contrario, en el caso donde todos los genotipos tienen normas de reacción paralelas, no existe interacción genotipo-ambiente (Figura 3.1 A) (Futuyma, 1998).

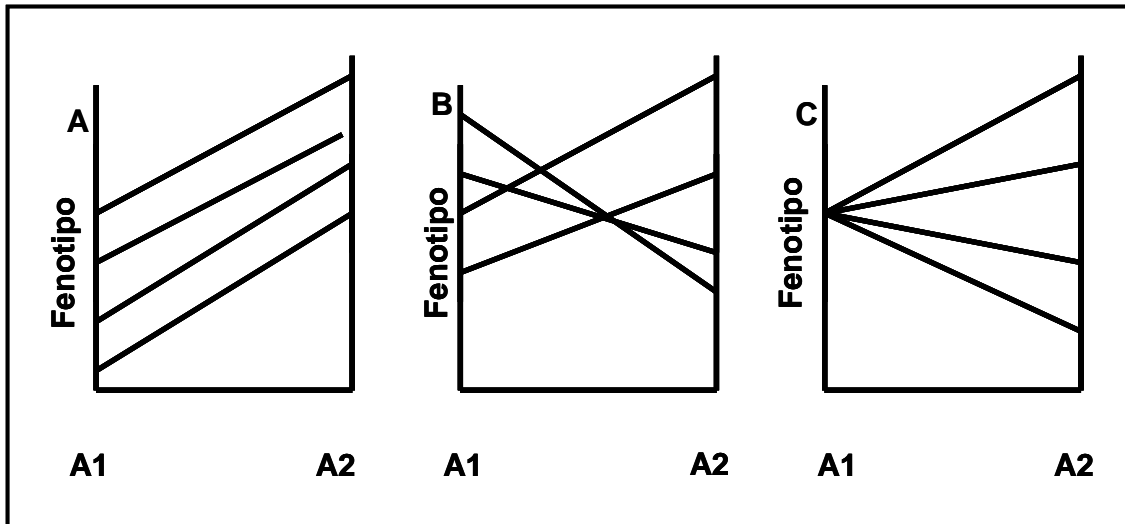


Figura 3.1. Interacción genotipo x ambiente (G X E). Cada línea representa la norma de reacción de un genotipo. La expresión fenotípica de cada uno de los 4 genotipos se manifiesta en dos ambientes diferentes (A1 y A2). En el caso A, las normas de reacción son paralelas, por lo que no existe interacción G X E. En caso B, las normas de reacción se cruzan entre sí, evidenciando de esta manera, una interacción G X E por cambios de *ranking*, y en el caso C por cambios de varianza (escala).

Las normas de reacción plásticas tienen 3 atributos fundamentales: la *magnitud de cambio*, el patrón y el *momento particular del desarrollo* en el cual el sistema ontogenético responde en función de los cambios ambientales (Schlichting & Pigliucci, 1998). A modo de ejemplo, tomemos el caso del tiempo de floración de *Arabidopsis thaliana*. En plantas, el tiempo de floración se define como el período requerido hasta alcanzar el desarrollo de los órganos reproductivos, lo que en términos evolutivos podría considerarse análogo al tiempo de desarrollo en animales. Mozley y Thomas (1995) midieron el tiempo de floración de ciertos mutantes bajo diferentes condiciones de luz-oscuridad. Sus

resultados mostraron que los mutantes aceleraron el tiempo de floración bajo una específica condición de luz-oscuridad y únicamente en un determinado estadio de desarrollo, el cual se caracterizó como el momento de expresión de las moléculas receptoras de estímulos lumínicos (Bagnal y col., 1995). A partir de este ejemplo podemos repasar los tres atributos de las normas de reacción mencionados anteriormente. En este caso la *magnitud de cambio* se refiere al grado de aceleración del tiempo de floración de las líneas mutantes respecto de la salvaje en respuesta a los tratamientos de luz-oscuridad. El *patrón* de las normas de reacción da cuenta de si la aceleración en el tiempo de floración es monotónicamente constante en función de los tratamientos o si en determinado régimen de luz-oscuridad la respuesta fenotípica cambia de manera más abrupta que en otros. Por último, en este análisis se evidencia que el *momento de la ontogenia* es relevante en función del fenotipo encontrado, ya que el mismo corresponde a una ventana temporal puntual del desarrollo de la planta en el cual se sintetizan las moléculas implicadas en la detección del estímulo ambiental.

La gran variación genética para el tiempo de desarrollo entre líneas mutantes con inserciones móviles caracterizada en el Capítulo anterior, llevó a la identificación de genes candidatos, que en su mayoría cumplen funciones biológicas relacionadas al metabolismo celular. Sin embargo, el análisis de la arquitectura genética de un carácter requiere además de la identificación de los genes que contribuyen a la expresión del mismo, la determinación de la respuesta del carácter a cambios ambientales relevantes. En otras palabras, evaluar la existencia de plasticidad fenotípica para el carácter en estudio (Mackay, 2004; Alonso & Ecker, 2006; Sambandan y col., 2006). En insectos, la variación en la temperatura es uno de los factores ambientales más relevantes que influye en la distribución de las especies en la naturaleza (Clarke,



1996). En este sentido, el crecimiento y el desarrollo de los organismos ectotérmicos está determinado en gran medida por su ambiente térmico (Angilletta y col., 2004; Trotta y col., 2006). Las tasas en que se producen todos los procesos fisiológicos están fuertemente influenciadas por la temperatura de desarrollo, lo que repercute profundamente en su ecología, genética y evolución (Heinrich, 1981; Gilchrist y col., 1994; David y col., 1983). En particular, la temperatura de desarrollo ejerce una fuerte influencia que moldea la evolución de los caracteres larvales (Trotta y col., 2006; Folguera y col., en prensa; Stillwell & Fox, 2005). De hecho, las respuestas fenotípicas a cambios térmicos pueden ser el producto de adaptaciones frente a ese agente selectivo y/o a cambios involuntarios consecuencia de la fisiología del desarrollo en respuesta a la temperatura (Stillwell & Fox, 2005). Debido al amplio rango de temperaturas que los ectotérmicos están expuestos a lo largo del día y en diferentes estaciones a través del año, es lógico pensar que este es uno de los principales factores ambientales relevantes en la variación fenotípica de caracteres pre-adultos. En particular, en su historia evolutiva *Drosophila melanogaster* enfrentó importantes desafíos térmicos en su expansión demográfica desde su origen Afrotropical (al sur del desierto del Sahara) hasta alcanzar su rango de distribución cosmopolita actual. Su distribución fuera de África comenzó por Europa y Asia, donde las evidencias indican que las nuevas poblaciones fueron transportadas pasivamente por el hombre a América y Oceanía (David & Capy, 1988). De manera coincidente con esta dispersión desde un nicho tropical hacia uno templado, es de esperar que se hayan producido adaptaciones que se evidencien en la arquitectura genética de los caracteres de historia de vida.

La adaptación térmica ha sido extensamente estudiada combinando enfoques ecológicos, genético-cuantitativos y moleculares (Hoffman y col., 2003). Hasta el momento, en relación al tiempo de desarrollo, la

adaptación térmica se ha abordado desde dos perspectivas diferentes, siempre por medio del análisis de la plasticidad fenotípica. Por un lado, bajo un enfoque de evolución térmica experimental, existen proyectos de investigación que consisten en la cría de moscas bajo regímenes de temperaturas diferentes por varios años de selección en el laboratorio y con posterioridad se evalúa la plasticidad fenotípica del tiempo de desarrollo en respuesta a similares y diferentes tratamientos térmicos en relación al régimen de selección aplicado (Partridge y col., 1994). Por otro lado, con una estrategia complementaria, se han desarrollado investigaciones donde se realizaron experimentos con líneas derivadas de contrastantes ambientes térmicos naturales (tropicales y templados) de la amplia distribución de *D. melanogaster* y se evaluó su respuesta frente a diferentes tratamientos de temperatura durante el desarrollo (Trotta y col., 2006; Folguera y col., 2008). Bajo ambos enfoques, los resultados arrojan conclusiones similares: la existencia de gran variación genética asociada al régimen de selección tanto natural como experimental. Si bien, como resultado de los estudios realizados (utilizando los dos criterios descritos más arriba) permitieron caracterizar genotipos plásticos que responden a diferentes temperaturas de desarrollo, el interrogante último de cuáles son los genes responsables de tal plasticidad fenotípica aún continúa sin respuesta. Como resultado de los estudios realizados en el Capítulo anterior, contamos con genes heterocrónicos candidatos para evaluar su plasticidad fenotípica en función de una determinada temperatura de desarrollo (25°C). A esta altura de la Tesis pretendemos contestar, entre otras, las siguientes preguntas: i) ¿Los mutantes heterocrónicos son independientes de la temperatura de desarrollo? En otras palabras, los genes candidatos identificados en el Capítulo 2 ¿continúan teniendo un fenotipo mutante a una nueva temperatura de desarrollo? ii) ¿Es posible identificar mutantes con un fenotipo heterocrónico en respuesta a la nueva temperatura de desarrollo pero que se comportaron como el control a

25°C? iii) ¿En qué porcentaje se identifican líneas mutantes temperatura-dependiente?; iv) ¿Se altera la magnitud de cambio frente a las nuevas condiciones térmicas?; v) ¿Existe una manifestación fenotípica diferencial de la interacción genotipo-ambiente dependiente del sexo, es decir hay diferencias entre sexos en los normas de reacción de los diferentes genes candidatos heterocrónicos?

### **3.2. Materiales y Métodos**

#### **Mutantes heterocrónicos a 17°C.**

Se eligieron 42 líneas al azar de las 179 líneas con las que se trabajó en el Capítulo II. De esta forma, se volvió a evaluar de duración de desarrollo de estos genotipos pero esta vez bajo una condición térmica de 17°C. El protocolo experimental fue el mismo que el descrito en el Capítulo 2, aunque en ese caso todas las líneas, además de la línea control (libre de inserciones y con el mismo fondo genético), se analizaron en un único bloque. Con el propósito de establecer si hay varianza genética mutacional a 17°C se procedió a realizar un estudio donde se cuantificó el tiempo de desarrollo de las 42 líneas y se lo analizó mediante el modelo mixto de ANOVA:  $Y = \mu + L + S + L \times S + E$ , donde  $\mu$  es la media general, L es el factor línea (aleatorio), S es el factor sexo (fijo) con dos niveles (machos y hembras) y E representa el término del error. En caso de detectarse un resultado significativo para cualquiera de los factores aleatorios: línea y/o línea x sexo, se procedió a estimar el porcentaje de varianza explicado por cada uno de estos factores. Dado que uno de los objetivos de este capítulo es identificar genes involucrados en la manifestación de este fenotipo cuando las larvas se desarrollaron a 17°C, se analizó el tiempo de desarrollo de las 42 líneas y se incluyó en este caso la línea control (*Canton S-B*) de acuerdo al siguiente modelo

fijo de ANOVA:  $Y = \mu + L + S + L \times S + E$ , donde  $\mu$  es la media general, L es el factor línea, S es el factor sexo y E representa el término del error. Dado que se obtuvo un resultado significativo para la interacción entre la línea y el sexo, se analizó el tiempo de desarrollo en cada sexo por separado mediante el siguiente modelo de ANOVA:  $Y = \mu + L + E$ , donde  $\mu$  es la media, L es el factor línea (fijo) y E representa el término del error. Como el factor línea resultó significativo, se determinó qué líneas son las responsables de dicho efecto mediante comparaciones con la línea control (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 tiempo de desarrollo.

Al igual que en el Capítulo 2, para identificar los genes potencialmente afectados por la inserción del elemento *P[GT1]* 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 secuencia genómica de *D. melanogaster* disponible en el sitio de Internet de Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>; quinta publicación). De este modo se individualizaron los genes involucrados en la expresión del tiempo de desarrollo y se determinó si dicha expresión es sexo-específica.

### **Estudio de la plasticidad fenotípica e interacción genotipo-ambiente de los genes heterocrónicos**

Estudiamos la expresión fenotípica diferencial de los genes heterocrónicos dependiendo de la temperatura de desarrollo en las líneas que se estudiaron a ambas temperaturas. Este estudio se realizó a través de la cuantificación de las diferencias relativas para el tiempo de desarrollo de cada línea respecto al control contemporáneo utilizado (*Canton S-B*) en cada temperatura. Estas diferencias se analizaron con el siguiente modelo mixto de ANOVA,  $Y = \mu + L + S + T + L \times S + L \times T + S \times T + L \times S \times T + E$ , donde  $\mu$  es la media general, L es el factor línea (aleatorio), S es el factor sexo (fijo), T es el factor temperatura de desarrollo (fijo) y E representa el término del error. Un resultado significativo para la interacción L x T indicaría que hay expresión fenotípica diferencial de los genes heterocrónicos según la temperatura de desarrollo. Por su parte, un resultado significativo para la interacción L x T x S sugiere que la expresión fenotípica diferencial explicada en la oración anterior es sexo-dependiente. Debido a que sólo se detectó resultado significativo para la interacción L x T, se estudiaron las posibles causas de la significativa interacción L x T. En efecto, una interacción significativa que puede deberse a: (1) las diferencias entre varianzas entre los ambientes (cambio de escala) y/o (2) desviaciones de la unidad de la correlación genética entre ambientes ( $r_{G \times E} < 1$ , ver abajo) (cambio de *ranking*). La contribución de ambas fuentes de variación se analizó a través de la ecuación de Robertson (1959),  $V_{G \times E} = [(\sigma_{E1} - \sigma_{E2})^2 + 2\sigma_{E1}\sigma_{E2}(1 - r_{G \times E})]/2$ , donde  $V_{G \times E}$  es el componente de varianza del factor G x E,  $r_{G \times E}$  es correlación genética entre ambientes,  $\sigma_{E1}$  y  $\sigma_{E2}$  es la raíz cuadrada de la varianza de los componentes de los dos tratamientos térmicos estudiados (Ungerer y col., 2003; Fanara y col., 2006). El primer término de la ecuación propuesta por Robertson (1959) corresponde a la varianza entre

tratamientos térmicos mientras que el segundo se refiere a las desviaciones de la perfecta correlación entre ambientes ( $r_{G \times E} < 1$ ). La correlación genética entre ambientes ( $r_{G \times E} < 1$ ) refleja el grado en el cual los mismos genes controlan la expresión del carácter entre ambientes.  $r_{G \times E}$  se estimó como:  $COV_{E1E2} / \sigma_{E1} \sigma_{E2}$ , donde  $COV_{E1E2}$  es la covarianza de las líneas en diferentes ambientes mientras que  $\sigma_{E1}$  y  $\sigma_{E2}$  es la raíz cuadrada de la varianza de los componentes de los dos tratamientos térmicos estudiados.

Finalmente, estudiamos la plasticidad fenotípica de los genes heterocrónicos a través de la magnitud de cambio respecto de la línea control. El análisis se realizó para cada uno de los mutantes heterocrónicos en ambos tratamientos térmicos, utilizando el siguiente modelo fijo de ANOVA:  $Y = \mu + T + S + T \times S + E$ , donde T corresponde al tratamiento térmico, S al efecto del sexo y E representa el término del error. Todas aquellas líneas que resulten significativas para el factor T serán consideradas como línea candidata heterocrónica que frente a la variación térmica presenta una respuesta plástica para el tiempo de desarrollo mientras que la interacción T x S indica que la plasticidad es sexo-dependiente.

### **3.3 RESULTADOS**

#### **Identificación de genes heterocrónicos a 17°C.**

El estudio permitió determinar que hay varianza genética mutacional, para el tiempo de desarrollo cuando la temperatura de desarrollo fue 17°C, ya que los factores línea y línea x sexo, exhibieron diferencias significativas (datos no mostrados). Más aún la cuantificación de la varianza explicada por cada uno de estos factores mostró que el factor línea explica un 49% mientras que la interacción explica solamente el 1% de la varianza fenotípica total observada. Estos resultados sugieren que

el carácter expresado a esta temperatura es poligénico. Por esta razón, realizamos los estudios necesarios para identificar genes heterocrónicos candidatos. Estos estudios determinaron que 27 de las 42 líneas analizadas (64%) el tiempo de desarrollo fue significativamente diferente al de la línea control (Tabla 3.1, machos y hembras a 17°C) indicando que los genes que representan cada una de esas líneas son candidatos a conformar la base genética del tiempo de desarrollo en larvas criadas a 17°C .

El número de líneas en los cuales se incrementó o disminuyó el tiempo de desarrollo fue similar, ya que se verificó un aumento del mismo en 14 líneas mientras que en 13 se estableció el patrón opuesto. Cabe resaltar que (tal como paso en el ensayo a 25°C) en ninguna de las líneas analizadas se observó un cambio de patrón dependiente del sexo, es decir un significativo incremento del tiempo de desarrollo en un sexo y una disminución significativa en el otro, aunque se comprobaron efectos sexo-específicos.

**TABLA 3.1** Genes heterocrónicos a 17°C y 25°C.

Línea	Gen	Machos 17°C	Machos 25°C	Hembras 17°C	Hembras 25°C	S	T	S x T
BG00369	<i>CG13334</i>	-34.25*	-44,50***	-44,73**	-56,99**	NS	***	NS
BG00373	<i>CG11226</i>	84.18***	16,22*	72.11**	23,52***	NS	***	NS
BG00386	<i>Nmdar1</i>	NS	-30,73***	54.81**	-36,13***	NS	***	*
BG00737	<i>Hsp27</i>	-64.24***	NS	-55,94***	NS	**	***	NS
BG00930	sin secuencia	45.08***	NS	NS	NS	**	***	NS
BG01028	<i>CG33260</i>	-35.5*	NS	-41,24**	-21,81**	NS	**	NS
BG01214	<i>CG10064</i>	47.86***	-16,82*	NS	-28,59***	***	***	NS
BG01339	<i>clt</i>	92.63***	39,14***	93,64***	29,46***	NS	***	NS
BG01354	<i>CG30492</i>	NS	NS	41,53**	NS	**	***	NS
BG01488	<i>msi</i>	NS	-19,40**	-41,18**	-26,76***	NS	*	NS
BG01672	<i>CG14591</i>	-85.53***	-27,40**	-48,45**	NS	NS	***	NS
BG01716	<i>paps</i>	-38.8*	NS	-39,38*	-22,74**	*	***	NS
BG01726	<i>CG11382</i>	-39.82**	NS	-38,27*	NS	NS	***	NS
BG01735	<i>bib</i>	NS	NS	NS	-19,91**	NS	NS	*
BG01763	<i>CG33960</i>	173***	34,41***	166,28***	NS	NS	**	NS
BG01780	<i>CG11226</i>	42.8**	-20,18*	49,4057***	-32,31***	NS	***	NS
BG01822	<i>Imp</i>	-47.95**	NS	-52,38**	NS	NS	***	NS
BG01902	<i>mam</i>	-59.92***	-47,64***	-62,62***	-53,05***	NS	*	NS
BG01912	<i>pxb</i>	-79.85***	-33,10***	-97,30***	-45,92***	NS	***	NS
BG01990	<i>CG30492</i>	-43.82**	-35,87***	-43,86**	-46,05***	NS	NS	NS
BG02042	<i>eas</i>	47.78**	NS	NS	NS	NS	***	NS
BG02088	<i>CG15309</i>	49.55**	NS	46,28**	NS	NS	***	NS
BG02102	<i>CG13434</i>	-61.79***	-16,73*	-70,34***	-17,89*	*	***	NS
BG02157	<i>CG8177</i>	90.67***	NS	76,60***	NS	NS	***	NS
BG02159	<i>CG32666</i>	-85.12***	29,51***	-96,73***	NS	NS	***	*
BG02239	<i>CG11550</i>	63.36***	29,40***	60,57***	22,72***	NS	***	NS
BG02462	<i>CG6301</i>	50.77***	NS	38,37*	NS	*	***	NS
BG02690	<i>CG14478</i>	NS	-32,02***	NS	-37,68***	NS	***	NS
BG02747	<i>rut</i>	136.73***	28,00***	129,40***	NS	NS	***	NS
BG02823	<i>scyl</i>	NS	17,44*	NS	NS	NS	***	NS

Los valores se expresan como la desviación respecto al control contemporáneo. Los asteriscos de las columnas S, T y SxT representan los efectos significativos de la magnitud de los factores sexo, tratamiento térmico y sexo x tratamiento térmico en respuesta a cambios ambientales (ver Materiales y métodos). \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; NS: no significativo.

En efecto, de las 27 líneas que mostraron un cambio significativo respecto al control, en 3 de ellas (BG00930, BG01214 y BG02042) se verificó que la inserción afectó el tiempo de desarrollo únicamente en machos. En dos de estas líneas se pudo identificar el gen afectado por la inserción (*CG10064* y *eas* para la líneas BG01214 y BG01214, respectivamente) mientras que para la línea BG00930 no fue posible la identificación del gen mutagenizado. En cuanto al efecto hembra-específico, el mismo se observó en las líneas BG00386, BG01354 y



BG01488 donde las inserciones afectaron a los genes *Nmdar1*, *CG30492* y *msi*, respectivamente. Los valores extremos de tiempo de desarrollo, se observaron en las líneas BG01763 y BG02159. En la primera se detectó un incremento del carácter en 173 horas en machos y de 166 horas en hembras respecto al control siendo el gen identificado para esa línea el *CG33960*. Por el contrario, la línea BG02159 mostró el desarrollo más rápido de todo el bloque analizado ya que se detectó una disminución de la duración del desarrollo respecto al control de 85 horas para machos y de 96 horas para hembras. En este caso el gen identificado para esa línea fue el *CG32666*.

### **Interacción Genotipo-Ambiente**

Dado que se utilizaron las mismas líneas para identificar genes heterocrónicos a dos temperaturas de desarrollo diferentes (17°C y 25°C) nos fue posible investigar el patrón de variación en respuesta a cambios térmicos. El análisis mostró que los factores principales Línea, Sexo y Temperatura presentaron diferencias significativas (Tabla 3.2). El resultado significativo del factor Línea explicó un 30% de la variabilidad fenotípica total sugiriendo que en las nuevas condiciones térmicas también existe variación genética mutacional para este carácter adaptativo. Es notable que en el ensayo a 25°C el factor Línea manifestara el 84% de la variabilidad fenotípica (Capítulo II), en el ensayo a 17°C el 49% mientras que en el ensayo de plasticidad este valor cayó al 30%. Las interacciones significativas Línea x Sexo y Línea x Temperatura indican que el comportamiento del genotipo depende tanto del sexo como de la temperatura. En este aspecto, el hecho que la interacción Línea x Sexo x Temperatura mostrara un resultado no significativo, fuertemente sugiere que la expresión fenotípica diferencial por el cambio de temperatura durante el desarrollo de las diferentes

líneas no depende del sexo, es decir que las correlaciones líneas por temperatura son paralelas para ambos sexos.

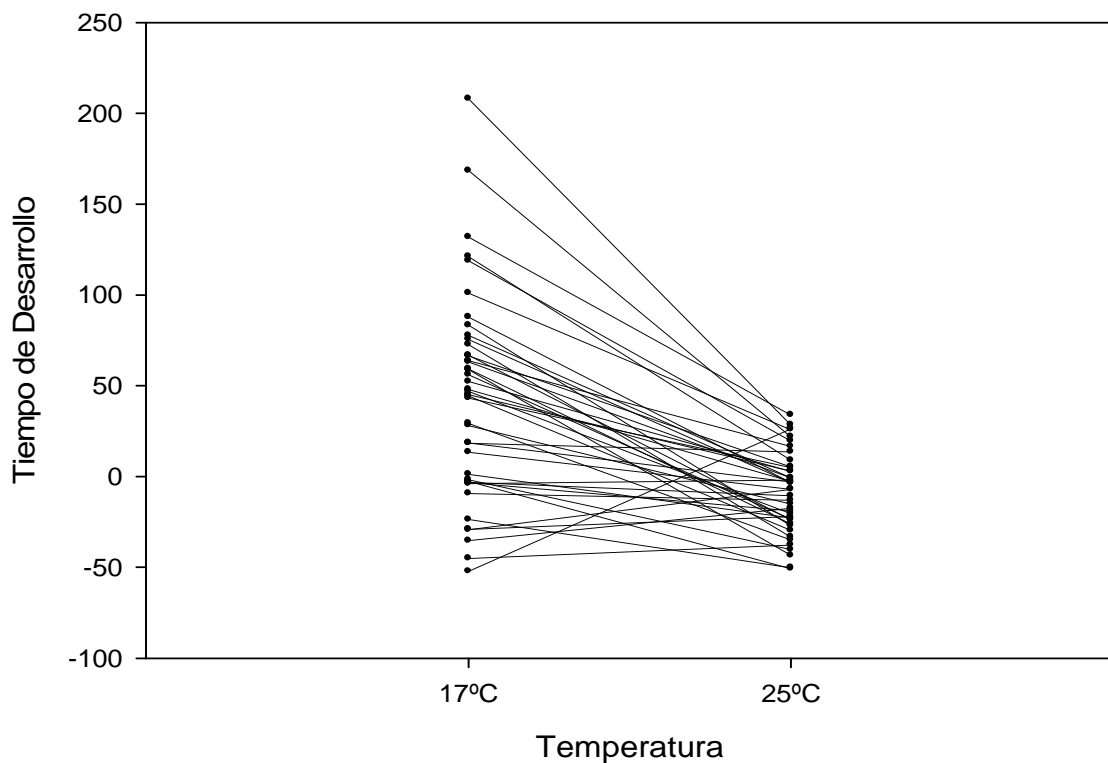
**TABLA 3.2 Análisis de varianza de las 42 líneas analizadas a 17°C y 25°C**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b><math>\sigma^2</math></b>
Línea (L)	41	2,11	< 0,01	30
Sexo (S)	1	8,82	< 0,01	Fijo
Temperatura (T)	1	4,56	0,03	Fijo
L x S	41	1,73	0,04	1
L x T	41	41,4	< 0,0001	52
S x T	1	9,26	< 0,01	Fijo
L x S x T	41	0,56	0,98	0
Error	479			17

g.l.: grados de libertad;  $\sigma^2$ : componente de varianza expresado en porcentaje

Es importante resaltar que los resultados obtenidos demuestran que hay gran diferencia entre el aporte de ambas interacciones (Línea x Sexo y Línea x Temperatura) a la varianza fenotípica total ya que la interacción con el sexo explicó únicamente el 1% de la varianza total, mientras que la interacción con la temperatura aporta la mitad de la variabilidad fenotípica total observada (52%) (Tabla 3.2). Este resultado pone de manifiesto la importancia que esta interacción (Línea x Temperatura) tiene en la en la expresión fenotípica de este carácter y concomitantemente como factor preponderante en la conformación de la arquitectura genética del tiempo de desarrollo. Por esta razón, decidimos descomponer la varianza explicada por el factor Línea x Temperatura a fin de esclarecer las causas que determinaron dicha interacción y determinar qué proporción de la misma se puede explicar

por un *cambio de escala* o un *cambio de ranking* (ver Materiales y Métodos). Nuestros resultados permitieron establecer que la mitad de la varianza de la interacción genotipo-ambiente se debe a *cambios de escala* que reflejan una mayor varianza en el tratamiento de 17°C mientras que la otra mitad, puede atribuirse al *cambio de ranking* de las líneas, lo que manifiesta que el orden de los genotipos en relación al tiempo de desarrollo depende de la temperatura de desarrollo (Figura 3.1). En otras palabras, nuestros ensayos evidenciaron que algunas líneas se encuentran entre las más rápidas en un tratamiento térmico y entre las más lentas en el otro, resultado que se puede visualizar en el cruce de normas de reacción de la Figura 3.1.

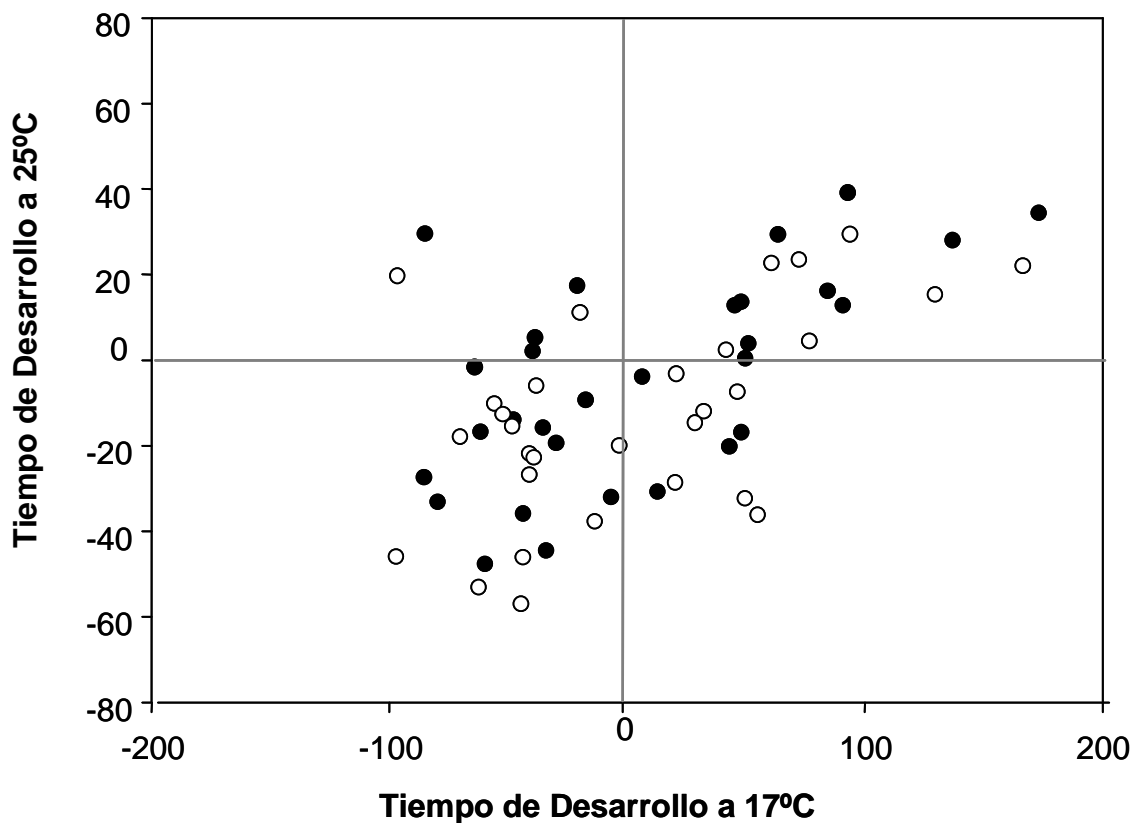


**Figura 3.1. Normas de reacción de las 42 líneas con inserciones *P[GT1]* desarrolladas a 17°C y 25°C.** Los valores se muestran como la desviación respecto a la línea control.

### **Genes candidatos de plasticidad**

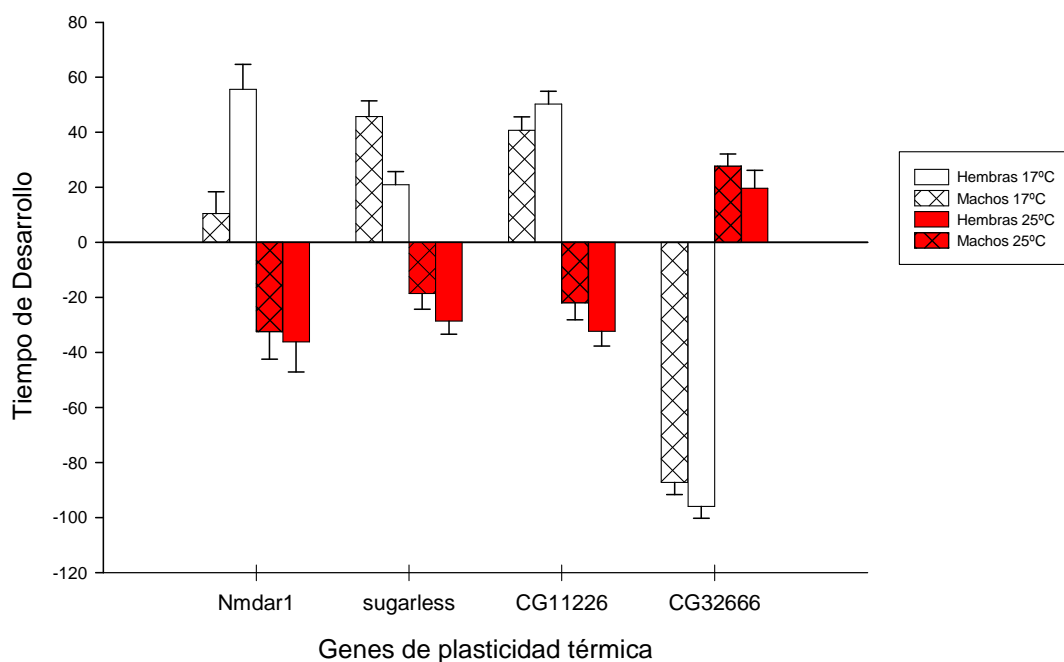
La enorme variación que los genotipos mostraron en respuesta a las condiciones térmicas abre una excelente oportunidad para estudiar las bases genéticas de la plasticidad fenotípica del tiempo de desarrollo. En efecto, 30 de las 42 líneas (el 71%) sometidas a ambas temperaturas resultaron significativamente diferentes respecto del control en uno y/o ambos tratamientos (ver Tabla 3.1). A fin de poder dilucidar las bases genéticas de la plasticidad para el tiempo de desarrollo analizamos, para cada uno de los genes, el cambio en la expresión fenotípica producto de los diferentes tratamientos térmicos durante el desarrollo en cada sexo. Es notable que la magnitud del efecto producido por la inserción en todas los mutantes heterocrónicos dependa de la condición térmica de desarrollo (columna T de la Tabla 3.1), con excepción de la línea BG01735 y BG01990. Más aún, la gran mayoría de los genes mostraron que la manifestación de los mutantes heterocrónicos según la temperatura de desarrollo es independiente del sexo (columna S x T de la tabla 3.1). Este resultado refleja la contribución individual de cada mutante heterocrónico a la enorme variabilidad genotipo-ambiente mencionada anteriormente. Una línea interesante para destacar es la BG01990 donde el gen candidato es CG30492. Este fue el único gen que no mostró variación alguna para los factores analizados (Sexo, Temperatura y la interacción entre ambos) sugiriendo que el efecto que provoca la mutación en este gen es independiente de los factores ambientales que se estudiaron en esta Tesis. Retomando el patrón general observado, la variación en la magnitud de los efectos provocados por las temperaturas de desarrollo puede observarse en la Figura 3.2. En esta figura puede visualizarse una correlación positiva y significativa del tiempo de desarrollo de los mutantes heterocrónicos entre los diferentes ensayos térmicos para ambos sexos (machos:  $r: 0.61$ ,  $p < 0.05$ ; hembras:  $r: 0.55$ ,  $p < 0.05$ ). Estos resultados indican que la

mayoría de las mutaciones que afectan el tiempo de desarrollo lo hacen en la misma dirección fenotípica (aumentan o retrasan el carácter). El 47% de las líneas mostraron este patrón (cuadrante izquierdo de abajo y derecho arriba de la Figura 3.2). Sin embargo, también identificamos un conjunto de líneas en las cuales la mutación provocó un efecto dependiente de la temperatura, lo que sugiere que los *loci* mutados son potenciales candidatos de plasticidad (genes plásticos).



**Figura 3.2 – Correlación de los 30 *P[GT1]* mutantes heterocrónicos desarrollados a 17°C y 25°C.** Los valores se muestran como la desviación respecto del control contemporáneo para cada sexo por separado; machos (círculos negros) y hembras (círculos blancos).

En este sentido, cuarenta por ciento de las líneas afectó el tiempo de desarrollo en una única temperatura. Por ejemplo a 25°C, se observaron 3 líneas heterocrónicas exclusivas de este tratamiento. La línea cuya inserción interrumpe la secuencia del gen *CG14478* es un ejemplo de este patrón. En contraposición, nueve líneas mostraron efectos heterocrónicos únicamente a 17°C. Por ejemplo, la línea que afecta la expresión de *Imp* mostró diferencias respecto al control en ambos sexos sólo a 17°C y no así a 25°C. Sorpresivamente, cuatro líneas (13%) afectaron el tiempo de desarrollo con fenotipos opuestos según el tratamiento. Por un lado, la línea BG02159, mutante para el gen *CG32666*, prolongó y aceleró el tiempo de desarrollo a 17°C y 25°C, respectivamente. Por otro lado, las líneas mutantes para los genes *Nmdar*, *sugarless* y *CG11226* mostraron un patrón opuesto (Figura 3.3).



**Figura 3.3. Mutantes heterocrónicos con efectos fenotípicos opuestos en función de la temperatura de desarrollo.** El ensayo de 17°C se muestra con barras blancas, mientras que el de 25°C con barras rojas. Los machos están representados por barras cruzadas, y las hembras por barras sin dibujo. Los valores de tiempo de desarrollo se estandarizaron respecto del control correspondiente a cada ensayo.

### 3.4. DISCUSIÓN

En la naturaleza los cambios de temperatura tanto a través del día como entre estaciones constituyen un factor ambiental relevante en la vida de los organismos. Sin embargo, la influencia de su efecto sobre la variación en genes que afectan al *fitness* está escasamente estudiada. Nuestros resultados muestran que la mayoría de los mutantes heterocrónicos afectan al carácter con una magnitud cualitativa y cuantitativamente diferente en relación a las condiciones térmicas utilizadas. Este hecho es la causa de la gran interacción gen-ambiente observada (Tabla 3.2). Los ejemplos más llamativos de este patrón son las normas de reacción de las líneas portadores de mutaciones en los genes *CG11226*, *CG32666*, *Nmdar1* y *sugarless* (Figura 3.3). El producto del gen *CG11226* todavía no se ha descrito, el del gen *CG32666* es una proteína receptora con actividad serina/treonina kinasa, *NMDAR1* es un receptor glutamato ionotrópico mientras que *SUGARLESS* es una proteína con actividad UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, lo que indica que estos genes relacionados al metabolismo celular son sensibles a cambios ambientales. Por el contrario, la línea BG01990 que se corresponde con el gen *CG30492* fue la única línea que no presento variación alguna en cuanto a la magnitud y/o sentido del cambio para el tiempo de desarrollo para ambas temperaturas. El producto del gen *CG30492* es una proteína de unión a iones Zinc cuya función biológica es desconocida. Ninguno de los genes mencionados en esta discusión, presentan información que relacione su actividad con el tiempo de desarrollo lo cual establecería que este es la primera asociación entre estos genes y el carácter adaptativo estudiado.

La variación genética "oculta" o "críptica" se define como la parte de la diversidad genética que tiene el potencial de afectar la expresión del fenotipo pero no se expresa en las condiciones genéticas y/o ambientales cotidianas (Le Rouzic & Carlborg, 2008). Los mecanismos

moleculares responsables de esta particular variación genética son la epístasis y la interacción genotipo-ambiente. En nuestro caso, además de la plasticidad de las normas de reacción mostrada por las líneas, gran parte de la interacción genotipo-ambiente es producto del gran aporte de la mayor varianza en el tratamiento de 17°C (Figura 3.1). Es posible que a 25°C la variación genética haya sido tamponada (efecto "buffer") en comparación a la variabilidad expresada a 17°C, una temperatura inusual para estas líneas.

En conclusión, nuestros resultados destacan la capacidad de variación para el tiempo de desarrollo que exhibe el genoma de *Drosophila* en respuesta a cambios de temperatura. Sin embargo, debe considerarse que este patrón fue observado en líneas de laboratorio, por lo que estos resultados no son directamente extrapolables a los procesos que tienen lugar en las poblaciones naturales. De cualquier manera, a la luz de estos descubrimientos, es posible especular, como se verá en los futuros capítulos, con el efecto de la temperatura de desarrollo en relación a la generación de variación genética en la naturaleza. En este sentido, la variación en la temperatura ambiental se impone como factor de *stress* sobre los organismos, lo que generaría la evolución de mecanismos genéticos adaptativos que posibilitan lidiar con temperaturas extremas en condiciones naturales (Hoffman & Parsons, 1991). De aquí en adelante desde una perspectiva evolutiva, abordaremos esta hipótesis para los genes heterocrónicos, haciendo foco en los procesos naturales.



# Capítulo 4

## Variación Genética Natural del Tiempo de Desarrollo

## 4.1 Introducción

Como se describió en los Capítulos anteriores, la arquitectura genética describe las propiedades de variación fenotípica de los caracteres, es decir, su potencial evolutivo (Hansen, 2006). Hasta el momento hemos observado gran variación genética para el tiempo de desarrollo generada por mutaciones de inserciones de elementos móviles (Capítulo 2 y 3), con un efecto destacado de la temperatura en la expresión de tal variación (Capítulo 3). Estas mutaciones artificiales con efectos mayores nos permitieron conocer componentes de diferentes vías de señalización involucradas en la expresión fenotípica del tiempo de desarrollo, sin embargo son poco informativas en relación al nivel de polimorfismo que tienen estos genes en la naturaleza, es decir su variación natural. Este tipo de información resulta relevante a la hora de estimar el potencial evolutivo del carácter. Considerando que, de acuerdo a la Teoría Sintética, evolución es el cambio en las frecuencias de los alelos que participan en carácter, la *evolucionabilidad* de este dependerá de la variación genética aditiva que se encuentre disponible en las poblaciones naturales (Houle, 1992). Dejando atrás a la variación artificial obtenida por mutagénesis, nos adentramos de aquí en adelante en la *naturaleza* del tiempo de desarrollo. La variación fenotípica de un carácter cuantitativo, como es el tiempo de desarrollo, está determinada por el ambiente, por la segregación de gran cantidad de *loci* que intervienen en la expresión de dicho carácter (Mackay, 2001; Lynch & Walsh, 1998), denominados *loci* de caracteres cuantitativos o QTLs (Falconer & Mackay, 1996), y por la interacción entre ambos factores (Viera y col., 2000). De esta manera, la varianza fenotípica en una población dada puede descomponerse en componentes de varianza genética (que responden a la variación aditiva, a la de dominancia y la de epistasia), a la variación ambiental y a la varianza debida a la interacción genotipo-ambiente. La variación

de los caracteres cuantitativos es el material sobre el cual actúan las fuerzas evolutivas produciendo diversidad fenotípica y adaptaciones (Mackay, 2001; Mauricio, 2001). De lo expuesto queda claro que para determinar si las variaciones fenotípicas observadas en la naturaleza no son exclusivamente producto de la variación ambiental, es decir que nada tienen que ver con la potencialidad de evolución del carácter ni con las fuerzas evolutivas que actuaron en las generaciones pasadas, es preciso determinar qué proporción de la variación fenotípica es producto de la varianza genética, en especial la varianza genética aditiva. A lo largo de este capítulo utilizaremos diversos estimadores de la varianza genética aditiva como la heredabilidad ( $h^2$ ) y el coeficiente de variación genética ( $CV_G$ ) para cuantificar la magnitud de variación genética susceptible y producto de procesos evolutivos.

En términos mecanísticos, la porción de la variación fenotípica total debida a factores genéticos puede ser consecuencia de un sinnúmero de procesos a nivel molecular como alteraciones en el momento de expresión de un gen a través de la ontogenia, cambios en el nivel de síntesis de su ARN mensajero, variaciones en la afinidad entre el producto del gen y otras proteínas de la vía de señalización con las que interactúa, etc. Sin embargo, para llegar a comprender las diversas causas que pueden generar la diversidad necesaria para que el carácter en cuestión pueda cambiar (evolucionar) necesariamente se debe establecer, como primer paso, la existencia de variación genética natural, para que con posterioridad (mediante diversas estrategias que discutiremos más adelante) sea posible identificar los *loci* que contribuyen a la expresión de tal variación. En el presente capítulo comenzaremos a recorrer ese camino en la búsqueda de variación genética natural para el tiempo de desarrollo en poblaciones naturales de *Drosophila melanogaster*.

**Variación geográfica y clinas: variación genética en respuesta a factores ambientales.**

Entendemos por variación geográfica las diferencias espaciales en las frecuencias alélicas de los genes que intervienen en la expresión del carácter. En otras palabras, existe variación geográfica si las poblaciones se diferencian genéticamente a lo largo de un gradiente ambiental. La variación geográfica de un carácter puede encontrarse estructurada en respuesta a variables ambientales relevantes, como la temperatura, la humedad y la disponibilidad de recursos. Sin embargo, no siempre es posible identificar los factores ambientales relevantes a la hora de explicar el patrón de diferenciación genética estudiado. Para entender el planteo a lo largo de este Capítulo en la búsqueda de variación genética es necesario introducir previamente el concepto de clina, desarrollado extensamente por Endler (1977, 1986). Una clina es un gradiente en un carácter mensurable, donde su pendiente es una medida de la amplitud de la variación geográfica (Endler, 1977). Lo interesante del planteo de Endler, es que las clinas constituyen excelentes herramientas para testear si la selección natural está actuando sobre los caracteres fenotípicos de interés. De todas formas, es sabido que los patrones clinales pueden surgir en ausencia de selección natural en escenarios de recientes expansiones poblacionales (Hoffman & Weeks, 2007). Un caso paradigmático en este tipo de estudios es el de las clinas latitudinales para el tamaño corporal de *Drosophila* en diferentes continentes (Australia, América del Norte, Europa y Asia) (Capy y col., 1993; James y col., 1995; Huey y col., 2000; Hallas y col., 2002; De Jong & Bochadanovits, 2003), patrón que sugiere la acción de la selección natural en el modelado de tal variación genética.

Ya sea por expansiones poblacionales o factores selectivos, la variación clinal nos brinda la oportunidad de identificar caracteres y genes cuya

variación se encuentra asociada a ciertas condiciones ambientales. Entonces, el objetivo particular de este Capítulo es investigar si existe variación genética natural para el tiempo de desarrollo, como paso previo para estudiar si tal variación se encuentra estructurada de manera clinal en respuesta a factores geográficos y/o ambientales relevantes.

El grupo de L. Partridge (*University College London*) en colaboración con el grupo de A. Hoffman (*Center for Environmental Stress and Adaptation Research, Australia*) caracterizaron hace unos años una clina para el tiempo de desarrollo en el este de Australia a lo largo de una transecta latitudinal de 2500 kilómetros. En particular, observaron una relación inversa entre el tiempo de desarrollo larval y la latitud (James & Partridge, 1995; James, Acevedo & Partridge, 1995; Hoffman & Weeks, 2007). Bajo una hipótesis adaptativa, la temperatura es la principal condición ambiental asociada a la variación geográfica, a la cual se le atribuye la causa última del patrón clinal observado (Hoffman & Weeks, 2007). Si este fuera el caso, ¿porqué no buscar una clina paralela en Sudamérica? Su existencia sería una fuerte evidencia en relación a la acción de la selección natural en la generación de dicho patrón, siendo la temperatura el posible agente selectivo. Para poner a prueba esta hipótesis, tenemos a nuestro favor el hecho de que Australia y Argentina se encuentran en continentes completamente aislados a latitudes similares del hemisferio sur. Ya que existen investigaciones que destacan la importancia del cromosoma II en la variación natural del carácter (Van't Land y col., 1999; De Jong & Bochdanovits, 2003) privilegiaremos en un principio la búsqueda de variación en esta porción del genoma empleando técnicas genético-cuantitativas.

Una de las herramientas más utilizadas en estudios de genética cuantitativa, es el uso de líneas altamente endocriadas para realizar mapeos de caracteres complejos (Lynch & Walsh, 1998). Particularmente utilizaremos la metodología denominada *sustitución*

*cromosómica*, que consiste en poner en homocigosis un cromosoma proveniente de una población natural en un fondo genético homogéneo, que es de uso frecuente en *Drosophila*. Entre los beneficios que brinda el empleo de esta herramienta podemos mencionar que resulta muy útil a la hora de caracterizar genotipos provenientes de la naturaleza permitiendo cuantificar estimadores de variación genética aditiva. Asimismo, estas líneas pueden mantenerse como bibliotecas vivientes es decir, conservar la información genética de los cromosomas naturales en forma intacta a través de las generaciones. Esta característica permite, entonces, continuar su estudio sin alteraciones genéticas producto de la adaptación a las condiciones de laboratorio (requisito fundamental si la intención es estudiar procesos naturales). Además, como veremos en el próximo Capítulo, las sustituciones cromosómicas son herramientas muy utilizadas para el mapeo de QTLs (*quantitative trait loci*) de caracteres complejos como el tiempo de desarrollo.

A esta altura de la Tesis nos interesa responder, entre otras, las siguientes preguntas:

i) ¿Hay diferenciación genética entre las poblaciones argentinas para el tiempo de desarrollo asociada al cromosoma estudiado?, ¿cuáles son los genotipos más extremos?, ii) en el caso de encontrar diferencias poblacionales, ¿La variación está estructurada siguiendo un patrón geográfico? ¿La variación encontrada es sexo-dependiente? ¿Existe una asociación con variables ambientales?, iii) ¿Existe polimorfismo en todas las poblaciones?, es decir, ¿Qué grado de variación genética aditiva tienen las poblaciones para responder a procesos evolutivos?

## 4.2 Materiales y Métodos

Se muestrearon seis poblaciones naturales a lo largo de una transecta latitudinal de 1500 kilómetros desde la ciudad de Neuquén hasta las cercanías de la ciudad de Güemes, Salta (ver Figura 4.1). Las coordenadas geográficas se muestran en la Tabla 4.1. En todos los casos, con la excepción de Güemes, la colecta del material se realizó en cultivos frutales de uva, manzana y membrillo. Para el caso de Güemes las moscas se obtuvieron en una zona de vegetación autóctona a escasos kilómetros del Parque Nacional El Rey. Las campañas se realizaron entre 2004 y 2005.

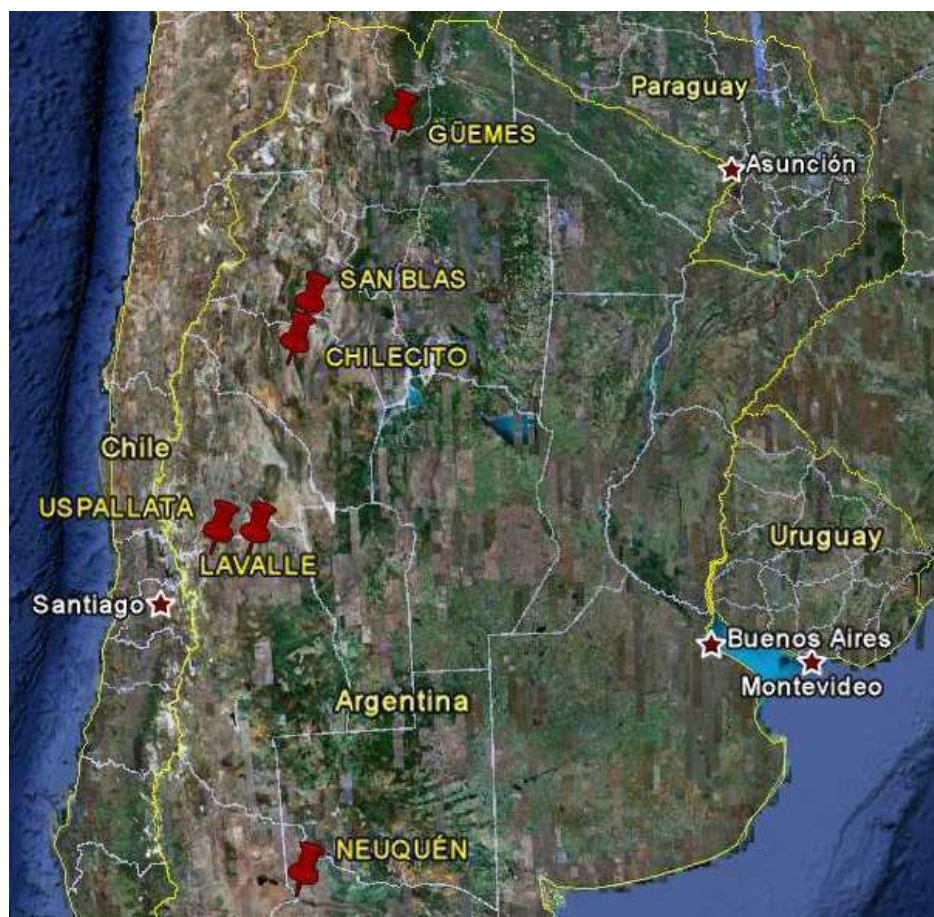


Figura 4.1. Localidades de las 6 poblaciones naturales estudiadas: Güemes, San Blas, Chilecito, Uspallata, Lavalle y Neuquén.

### Líneas con sustituciones cromosómicas de poblaciones naturales

Por cada población se obtuvieron aproximadamente 40 líneas derivadas de hembras fecundadas en el campo (isolíneas). A continuación, mediante un esquema de cruzamientos con cepas balanceadoras, se pusieron en homocigosis cromosomas II enteros (Figura 4.2). En todos los casos el fondo genético es idéntico al de la línea control del Capítulo 2, es decir, los genotipos obtenidos luego del proceso de isogenización consistieron en individuos homocigotas para un cromosoma II de la naturaleza con un fondo genético *Canton-S B*. En el transcurso de la isogenización se fueron perdiendo líneas producto de la baja viabilidad, fundamentalmente en el último paso del esquema de cruzamientos, como resultado de la expresión de alelos letales recesivos. En promedio, se obtuvieron 8 líneas por población. Con las mismas se determinó la variación genética natural para el tiempo de desarrollo dentro y entre poblaciones, así como también se estimó la variación genética aditiva para cada una de ellas.

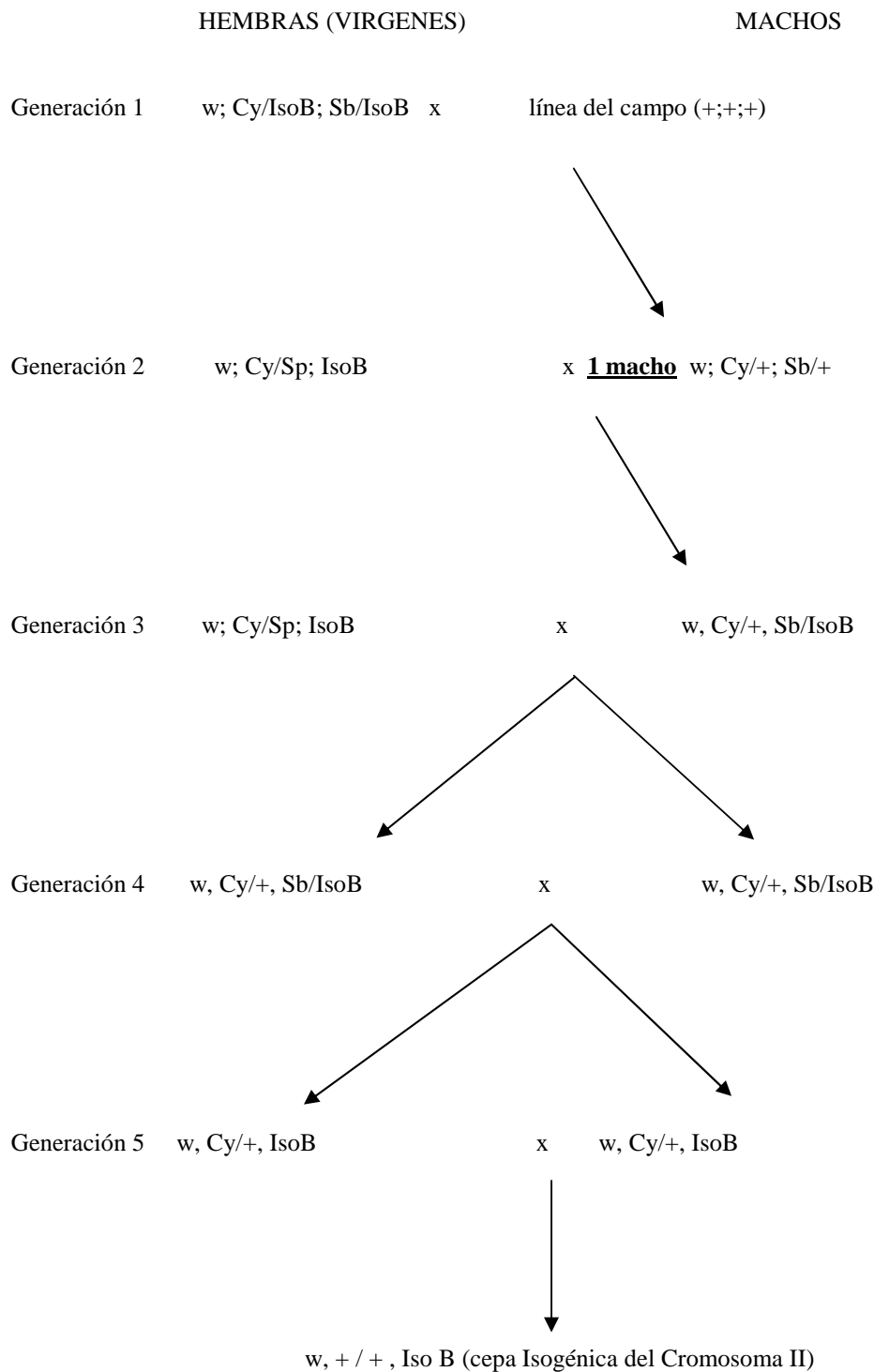
**Tabla 4.1. Poblaciones estudiadas y sus respectivas variables geográficas.**

Población	Latitud	Longitud	Altitud (metros)	N
Güemes	24° 38'	65° 03'	739	9
San Blas	28° 25'	67° 06'	1061	8
Chilecito	29° 10'	67° 28'	1043	10
Uspallata	32° 35'	69° 22'	1915	6
Lavalle	32° 50'	68° 28'	647	6
Neuquén	38° 58'	68° 08'	260	9

N: número de líneas analizadas por cada población.



**OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS II ISOGÉNICOS**



**Figura 4.2. Esquema de cruzamientos realizados para la obtención de líneas isogénicas.** w: ojos blancos; Cy: alas curly marcador fenotípico para el cromosoma II, Sb: quetas cortas del tórax (*stubble*) marcador fenotípico del cromosoma III; + cromosoma salvaje/ natural; Iso B: fondo genético Canton S B. Cy y Sb son marcadores dominantes.

*Análisis Estadístico.* Se estimó el tiempo de desarrollo en bloques de 25 líneas isogénicas. Para reducir la variación ambiental entre bloques, se estimó el tiempo de desarrollo de 8 réplicas de la línea control con fondo genético *Canton-S B*. De esta forma, los valores de todas las réplicas se relativizaron al del control contemporáneo por cada sexo por separado. Un ANOVA de tres vías se aplicó siguiendo el siguiente modelo mixto:  $Y = \mu + P + L(P) + S + L(P) \times S + P \times S + E$ , donde  $\mu$  es la media general, P es el factor población (fijo), S es el factor sexo (fijo), L es el factor Línea (aleatorio) el cual se encuentra anidado en P y E representa el término del error. Además, evaluamos la contribución relativa de los factores aleatorios (Línea (P), Línea (P) x Sexo, y error) a la varianza fenotípica total. Para estudiar las diferencias genéticas entre pares de poblaciones se realizaron contrastes ortogonales *a priori*.

Con el objetivo de asociar la variación genética observada con variables geográficas y climatológicas se realizaron regresiones múltiples (*forward stepwise regressions*) con los datos geográficos (latitud y altitud) y climatológicos (temperatura media, temperatura mínima media, temperatura máxima media y amplitud térmica diaria) en análisis independientes. La información de las variables climatológicas se extrajo del servicio meteorológico nacional ([www.smn.gov.ar](http://www.smn.gov.ar)).

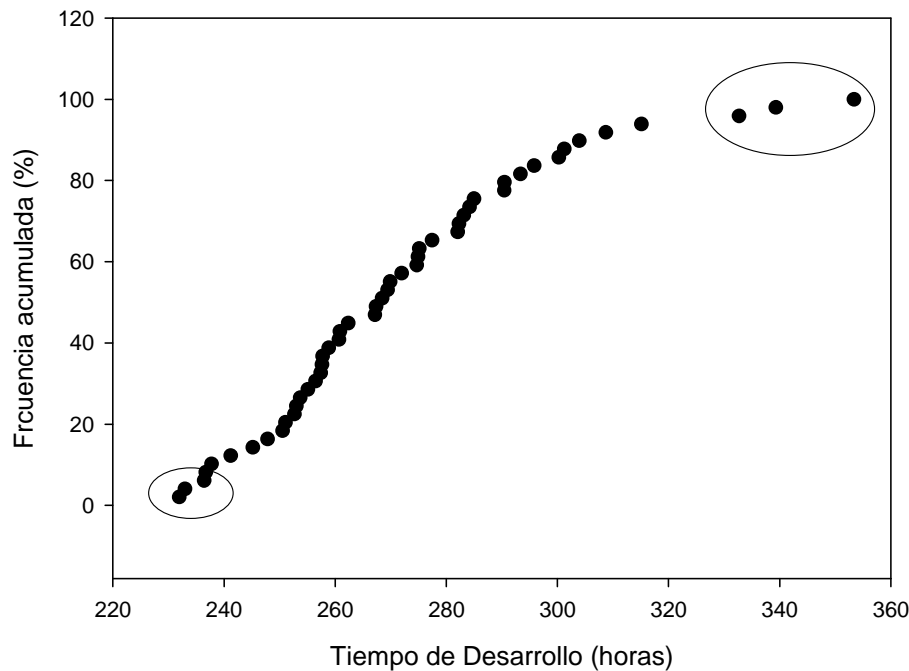
*Parámetros genético-poblacionales.* Para cuantificar la variación genética aditiva de cada una de las poblaciones estudiadas se determinó en cada caso la varianza genética ( $V_G$ ), la varianza ambiental ( $V_E$ ), la varianza fenotípica ( $V_P$ ), la heredabilidad ( $h^2$ ) y el coeficiente de variación genética ( $CV_G$ ). Para líneas completamente homocigotas, como es el caso de las líneas con sustituciones cromosómicas naturales, el coeficiente de endocria es de 1 ( $F = 1$ ), por lo que  $V_G = \frac{1}{2} \sigma^2_L + \sigma^2_{LS}$ , donde  $\sigma^2_L$  es la varianza entre líneas y  $\sigma^2_{LS}$  corresponde a la varianza de la interacción línea x sexo (Falconer & Mackay, 1996, Mackay y col., 1996). La estimación de la varianza ambiental ( $V_E$ ) corresponde a la varianza del error, y la varianza

fenotípica ( $V_P$ ) se estima como la suma de la varianza genética más la ambiental ( $V_P = V_G + V_E$ ). De esta manera, la heredabilidad del tiempo de desarrollo corresponde a la proporción de la varianza genética respecto de la varianza fenotípica ( $h^2 = V_G / V_P$ ). A su vez, con la idea de utilizar un índice que sea independiente de la varianza fenotípica de cada población, se calculó la variación genética en relación a la media poblacional, estimador conocido como coeficiente de variación genética [ $CV_G = 100 (V_G)^{1/2} / X$ , donde  $X$  se refiere a la media poblacional del tiempo de desarrollo]. En todo el análisis se asume que la varianza genética es una buena estimación de la varianza genética aditiva, ya que no existen componentes de la varianza genética de dominancia (al tratarse de cromosomas homocigotas) y la varianza genética epistática es reducida (al tener todas las líneas un fondo genético común e isogénico).

### 4.3 Resultados

#### **Patrón de variación genética de las líneas de *sustitución cromosómica natural***

Lo primero que se puede observar es que existe una gran variabilidad fenotípica para el tiempo de desarrollo entre las 48 líneas de *sustitución cromosómica natural* para el cromosoma II. Las líneas más rápidas fueron Güemes 286, Lavalle 14 y Güemes 269 con valores de tiempo de desarrollo de 231,9 horas, 233 horas y 236,7 horas, respectivamente. En cambio, las líneas con desarrollo más lento fueron Uspallata 10, Lavalle 12 y San Blas 45 con un tiempo de desarrollo de 353,4 horas, 339,3 horas y 332,7 horas, respectivamente. Estos resultados indican que entre las líneas más rápidas y las más lentas hubo una diferencia de 5 días de tiempo de desarrollo (FIGURA 4.3)



**Figura 4.3. Frecuencias acumuladas del tiempo de desarrollo de las líneas con sustituciones naturales para el cromosoma II.** Los círculos marcan los valores extremos de menor (Güe286, Lav14, Güe269) y mayor (Sbl45, Lav 12, Usp10) tiempo de desarrollo.

El análisis de varianza muestra que el factor línea (anidado en población) resultó altamente significativo (Tabla 4.2) y fue responsable del 75% de la varianza fenotípica total. Sorprendentemente, las poblaciones no mostraron diferencias significativas ( $p=0.43$ ). Desde una aproximación puramente estadística, de acuerdo al diseño empleado, la varianza del factor Población fue comparada con la varianza del factor Línea (dentro de Población), de esta forma los resultados indican que existen comparativamente mayor varianza genética dentro de las poblaciones que entre las mismas. Como veremos más adelante, este resultado no implica que las poblaciones no presenten diferenciación genética entre sí, sino que existe una alta variación genética intrapoblacional para el tiempo de desarrollo asociada al cromosoma II. Además, el ANOVA mostró diferencias significativas entre sexos, siendo

las hembras las que en promedio se desarrollaron más rápidamente que los machos. Con relación a las interacciones que involucran al sexo, los resultados del ANOVA muestran que ninguna de las dos interacciones: línea (población) x sexo y población por sexo presentaron diferencias significativas sugiriendo que el tiempo de desarrollo no presenta variación para el dimorfismo sexual.

**Tabla 4.2. Análisis de varianza de las líneas con sustituciones cromosómicas naturales para el segundo cromosoma.**

Fuente de Variación	gl	F	P	$\sigma^2$
Población	5	0,99	0,43	Fijo
Línea (P)	43	27,38	< <b>0,00001</b>	75
Sexo	1	48,11	< <b>0,00001</b>	Fijo
Línea (P) X S	43	0,87	0,7	0
Pob X Sexo	5	0,79	0,56	Fijo
Error	281			25

gl: grados de libertad;  $\sigma^2$ : componente de varianza expresado en porcentaje

**Tabla 4.3. Contrastes a priori entre pares de poblaciones**

Población	Güemes	Lavalle	Neuquén	Chilecito	Uspallata	San Blas
<b>Güemes</b>		NS	< 0,05	0,02	0,01	NS
<b>Lavalle</b>	NS		< 0,05	NS	< 0,05	NS
<b>Neuquén</b>	< 0,05	< 0,05		< 0,0001	< 0,0001	< 0,05
<b>Chilecito</b>	0,02	NS	< 0,0001		NS	< 0,05
<b>Uspallata</b>	0,01	< 0,05	< 0,0001	NS		0,02
<b>San Blas</b>	NS	NS	< 0,05	< 0,05	0,02	

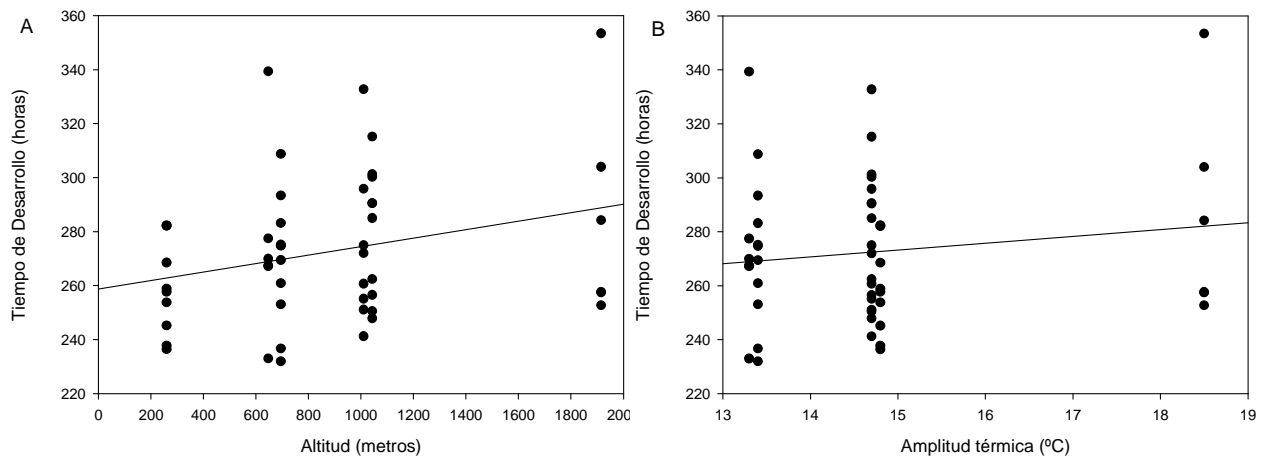
NS: no significativo.

De acuerdo a los contrastes, las poblaciones presentan diferencias significativas para el tiempo de desarrollo entre ellas (excepto las comparaciones Güemes-Lavalle, Güemes-San Blas, Lavalle-Chilecito,

Lavalle-San Blas y Uspallata-Chilecito), siendo Neuquén la única población que mostró diferencias con el resto de las poblaciones. El resultado de los contrastes sugiere por un lado que el tiempo de desarrollo presenta diferenciación genética significativa entre las poblaciones analizadas y por otro lado que la variación genética dentro de cada población es, como se expuso anteriormente, de tal magnitud que eclipsan las diferencias entre poblaciones.

Tal como se explico en la introducción de este capítulo, la variación inter-poblacional podría ser el resultado de procesos adaptativos. Con el objetivo de estudiar si las variaciones observadas en el tiempo de desarrollo pueden ser atribuidas a patrones de variación geográfica y/o de variables climatológicas de las localidades de donde son originarias las líneas analizadas realizamos regresiones múltiples con dichas variables. El análisis se realizó considerando dos conjuntos de regresiones múltiples: i) variables geográficas (altitud y latitud), y ii) variables térmicas (temperatura media, temperatura mínima media, temperatura máxima media y amplitud térmica diaria). Para las variables geográficas, el tiempo de desarrollo presentó una regresión altamente significativa con la altitud, siendo las líneas derivadas de las poblaciones de altura las que presentaron un tiempo de desarrollo mayor (Tabla 4.4, Figura 4.3). Por otro lado, en contra de nuestra hipótesis, manifestada en el muestreo latitudinal, la variación genética del tiempo de desarrollo no se encuentra asociado al gradiente latitudinal (Tabla 4.4). Respecto de las variables térmicas, la amplitud térmica es la única variable climatológica que presenta una asociación en relación a la variación del tiempo de desarrollo, observándose mayores valores fenotípicos en las poblaciones con mayor amplitud térmica diaria. Ambas asociaciones (altitud y amplitud térmica) son consistentes, ya que, son las localidades de altura las que presentan mayor amplitud térmica diaria. Folguera y colaboradores (2008), observaron la misma tendencia en relación a la altitud utilizando isolíneas de *D. melanogaster* derivadas

de un subconjunto de las localidades analizadas en esta Tesis, lo que sugiere que la amplitud térmica diaria es uno de los factores ambientales más relevantes, que en estos casos ejerce efectos sobre la prolongación del tiempo de desarrollo en poblaciones que se encuentran en localidades de altura.



**Figura 4.4. Regresiones del tiempo de desarrollo con la altitud (A) y la amplitud térmica (B).**

**Tabla 4.4. Regresiones múltiples significativas con las variables geográficas y climatológicas**

<b>Variables</b>	<b>Coef regresión</b>	<b>P</b>
Altitud	0,26	< 0,00001
Amplitud Térmica	0,5	0,0003

El resto de las variables analizadas no presentaron asociaciones significativas con el tiempo de desarrollo.

Estos resultados nos llevaron a considerar explícitamente el efecto del factor altitud sobre la variación genética observada para el tiempo de desarrollo. De esta manera, separamos a las líneas como derivadas de localidades de “altura” o “llanura”, según se sitúen por encima o por debajo de los 1000 metros de altura, respectivamente. Bajo este criterio las poblaciones de Güemes (695 metros), Lavalle (647 metros) y Neuquén (260 metros) se clasificaron como poblaciones de “llanura”, mientras que Chilecito (1043 metros), San Blas (1010 metros) y Uspallata (1915 metros) se catalogaron como poblaciones de “altura”. Los resultados de este análisis muestran que las líneas derivadas de poblaciones de “altura” presentan en promedio un tiempo de desarrollo significativamente mayor que las líneas de poblaciones de “llanura” tanto en machos ( $F=6,59$   $p=0,01$ ) como en hembras ( $F=7,72$ ,  $p=0,006$ ) (Tabla 4.5). En ambos sexos las líneas de “altura” tienen prolongado su tiempo de desarrollo, en promedio, por 12 horas. Un dato que necesariamente debe considerarse es el hecho que estos patrones de variación se atribuyen exclusivamente al cromosoma II, ya que, recordemos, el resto del fondo genético es similar entre todas las líneas analizadas. A esta altura del análisis, resta por cuantificar la varianza genética aditiva del carácter en las poblaciones estudiadas, requisito indispensable para evaluar su potencial evolutivo.

#### Tabla 4.5.

##### A. Análisis de varianza de las poblaciones de “altura” y “llanura”.

##### Machos.

Fuente de Variación	gl	F	P
Altitud	1	6,59	0,01
Error	185		



### B. Análisis de varianza de las poblaciones de “altura” y “llanura”. Hembras.

Fuente de Variación	gl	F	P
Altitud	1	7,72	< 0,01
Error	189		

#### Parámetros genético-poblacionales.

Del análisis pormenorizado de cada población, se destaca la gran variación intrapoblacional: en todos los casos se obtuvieron altos valores de heredabilidad para el carácter (desde 0,41 en Neuquén hasta 0,79 en Lavalle) lo que refleja la gran diferenciación genética en el cromosoma II para el tiempo de desarrollo en cada una de las poblaciones estudiadas (Tabla 4.6). Este resultado es interesante, teniendo en cuenta que Neuquén y Lavalle, las dos poblaciones con menor altura, mostraron el valor menor y mayor de heredabilidad, repectivamente, resultado que sugiere que no hay diferencias respecto a este parámetro entre las poblaciones de “llanura” y “altura”. Otro punto a resaltar es que en todos los casos la variación ambiental es menor a la genética, hecho que pone de manifiesto que el diseño experimental empleado fue satisfactorio en cuanto al propósito de minimizar la variación entre réplicas (error ambiental) En otras palabras, los resultados que obtuvimos muestran la real variación genética y por lo tanto el potencial de cambio (evolutivo) que presentan todas las poblaciones.

En la Tabla 4.7 se muestran los ANOVAs particulares para cada población analizada. En todos los casos el factor Línea resultó altamente significativo lo que indica, nuevamente, la gran variación genética intrapoblacional. Además, en todos los casos donde el factor sexo fue significativo (Neuquén, Chilecito y Uspallata) las hembras fueron las que

alcanzaron la etapa adulta más rápidamente.

**Tabla 4.6. Parámetros genético-poblacionales**

	<b>Güemes</b>	<b>Lavalle</b>	<b>Neuquén</b>	<b>Chilecito</b>	<b>Uspallata</b>	<b>San Blas</b>
<b><math>V_G</math></b>	271,5	691	142,5	283	679,5	462,7
<b><math>V_E</math></b>	246,6	180	201	262	401,6	221,6
<b><math>V_P</math></b>	518,1	871	343,5	545	1081,1	684,3
<b><math>h^2</math></b>	0,52	0,79	0,41	0,52	0,63	0,68
<b><math>CV_G</math></b>	62,6	20,1	60	6	4,1	36,7

$V_G$ : varianza genética;  $V_E$ : varianza ambiental;  $V_P$ : varianza fenotípica;  $h^2$ : heredabilidad;  $CV_G$ : coeficiente de variación genética; X: media poblacional.

## 4.7. Análisis de varianza de cada una de las poblaciones analizadas.

**Güemes**

Fuente de Variación	gl	F	P	$\sigma^2$
Línea	9	9,41	<b>0,001</b>	63
Sexo	1	3,86	0,08	Fijo
Línea x Sexo	9	1,67	0,11	3
Error	56			34

**Lavalle**

Fuente de Variación	gl	F	P	$\sigma^2$
Línea	5	44,97	<b>&lt; 0,001</b>	87
Sexo	1	4,49	0,08	Fijo
Línea x Sexo	5	1,36	0,26	1
Error	36			12

**Neuquén**

Fuente de Variación	gl	F	P	$\sigma^2$
Línea	8	25,9	<b>&lt; 0,0001</b>	59
Sexo	1	31,2	<b>&lt; 0,0001</b>	Fijo
Línea x Sexo	8	0,42	0,89	0
Error	50			41

**Chilecito**

Fuente de Variación	gl	F	P	$\sigma^2$
Línea	9	42,32	<b>&lt; 0,0001</b>	68
Sexo	1	16,7	<b>&lt; 0,001</b>	Fijo
Línea x Sexo	9	0,4	0,92	0
Error	57			32

**Uspallata**

Fuente de Variación	gl	F	P	$\sigma^2$
Línea	5	60,7	<b>&lt; 0,0001</b>	77
Sexo	1	18,1	<b>0,007</b>	Fijo
Línea x Sexo	5	0,4	0,81	0
Error	35			23

**San Blas**

Fuente de Variación	gl	F	P	$\sigma^2$
Línea	7	28,6	<b>&lt; 0,0001</b>	80
Sexo	1	2,43	0,16	Fijo
Línea x Sexo	7	1,16	0,33	0
Error	47			20

#### 4.4 Discusión

Los resultados obtenidos en este Capítulo destacan la importante contribución del cromosoma II a la variación genética natural para el tiempo de desarrollo. Si bien varios autores especulaban con esta posibilidad (Van't Land y col., 1999; De Jong & Bochdanovits, 2003) entendemos que este es el primer estudio que investiga la arquitectura del tiempo de desarrollo atribuible a esta porción del genoma empleando *sustituciones cromosómicas* de numerosas poblaciones. La variación genética encontrada sirve como primer paso hacia una localización genética (mapeo) más precisa de la diferenciación genética detectada. Los resultados obtenidos en este Capítulo muestran que la variación genética natural se encuentra geográficamente estructurada y el gradiente altitudinal explica una porción significativa de la misma. En otras palabras, el tiempo de desarrollo mostró una clina altitudinal. Nuestros experimentos se realizaron bajo un diseño de "jardín común", es decir, que independientemente de su origen, las líneas fueron sometidas a idénticas condiciones experimentales tanto de temperatura de desarrollo (25°C) como de fotoperíodo (12:12 L:O) y densidad larvaria (30 larvas por tubo). Las variaciones clinales que se observaron muestran que las líneas derivadas de las poblaciones de "altura" tuvieron en promedio un tiempo de desarrollo más prolongado que lo exhibido por las líneas derivadas de las poblaciones de "llanura". Este resultado puede ser interpretado como consecuencia de una respuesta fisiológica a ambientes con condiciones naturales de mayor *stress*, como las observados en ambientes de altura. En este sentido, los factores ambientales que podemos considerar como estresantes, en relación a la altitud son: 1) una disminución de la temperatura media, 2) un aumento de la amplitud térmica diaria, 3) una disminución de la presión parcial de oxígeno, y 4) un aumento en la intensidad de la

radiación UV (Navas, 2003). De estas variables pudimos identificar una asociación entre la amplitud térmica diaria de las poblaciones estudiadas y la variación para el tiempo de desarrollo. Por otro lado, no se encontraron asociaciones significativas con la temperatura media diaria. Las restantes dos condiciones ambientales no pudieron ser evaluadas ya que no contamos con registros de las localidades analizadas. Sin embargo, diversos estudios revelan que en condiciones de baja temperatura durante el desarrollo, los tratamientos de hipoxia tienen efectos relativamente modestos o no significativos sobre el tiempo de desarrollo (Frazier y col., 2001). Más aún, en el rango de altura con el que estuvimos trabajando (localidades por debajo de los 2000 metros) la incidencia que la disminución de O<sub>2</sub> puede tener sobre el desarrollo es escasa o nula en relación al efecto de la temperatura (Francisco Bozinovic y Guillermo Folguera, comunicación personal).

La importancia de la amplitud térmica como un factor selectivo fue planteada en estudios que analizaron las respuestas de ciertos caracteres de historia de vida a los cambios ambientales (Loeschcke y col., 1997; Pétavy y col., 2001). En ellos se ha registrado una fuerte consistencia en los efectos de la amplitud térmica sobre el tamaño corporal. En ese sentido, se ha observado una marcada disminución del tamaño en individuos sometidos a tratamientos de amplitud térmica respecto a otros con tratamientos de similar temperatura media pero sin variación diaria (Pétavy y col., 2001). Nuestros resultados convergen en la idea de que la amplitud térmica diaria registrada en la naturaleza ejerce efectos negativos sobre el *fitness*, ya que recordemos que la prolongación del tiempo de desarrollo está inversamente relacionada con el éxito reproductivo (Stearns, 1992; Zwaan y col., 1995).

Pero, no hay que olvidar que el muestreo inicial partió de una búsqueda de variación asociada a la latitud tal como fue observada en otras poblaciones (James & Partridge, 1995). En este aspecto no pudimos confirmar la hipótesis de la asociación del tiempo de desarrollo con el

gradiente latitudinal para las poblaciones estudiadas. Este resultado permite establecer que la clina paralela entre Australia y Sudamérica, lo cual motivó, en principio, nuestro estudio, no fue encontrada. Como explicación más prudente, apelamos a los factores históricos de cada área de distribución de la especie, como responsables de esta falta de asociación.

Dado que el objetivo final de esta investigación es identificar genes responsables de variación genética natural, mantenemos las expectativas que originaron el estudio debido a la alta variación genética observada dentro de las poblaciones y entre las poblaciones de "altura" y "llanura". La gran variación genética aditiva observada en todas las poblaciones será la llave para alcanzar el objetivo planteado. ¿Cuáles son los genes que contribuyen a la variación genética? ¿Existen alelos diferentes entre las poblaciones de "altura" y "llanura"? En el Capítulo V abordaremos este tipo de preguntas realizando cruzamientos entre las líneas genéticamente más divergentes identificadas en el presente Capítulo con varios mutantes heterocrónicos del cromosoma II caracterizados en los Capítulos 2 y 3.

# Capítulo 5

## Genes con Variación Natural para el Tiempo de Desarrollo

## 5.1 Introducción

En este último Capítulo integraremos gran parte de los resultados obtenidos a lo largo de la Tesis y destacaremos las principales conclusiones. Como primera etapa del recorrido de esta tesis identificamos genes con efectos mayores sobre el tiempo de desarrollo (Capítulo 2), los cuáles fueron calificados como heterocrónicos. Seguidamente, cuantificamos cuán importante es la variación de los efectos de los genes candidatos en respuesta a cambios térmicos durante el desarrollo (Capítulo 3). En el Capítulo 4 se descubrió que la variación del carácter correlaciona con la altitud en poblaciones naturales, y se propuso que la amplitud térmica podría jugar un papel como agente selectivo, e identificamos de esta manera genotipos naturales divergentes en cuanto a su efecto sobre el tiempo de desarrollo. Resta como último objetivo, la integración de los resultados, para lo cual abordaremos las siguientes preguntas: ¿existen alelos diferentes de los genes heterocrónicos que contribuyen a las diferencias fenotípicas observadas entre las poblaciones de altura y llanura? Y por último, ¿la selección natural moldea tal diferenciación genética?

La variación en los caracteres cuantitativos es la materia prima sobre la que actúan las fuerzas evolutivas produciendo diversidad fenotípica y adaptación (Mackay, 2001). Aunque son ingentes los esfuerzos para localizar las regiones genómicas (QTL) responsables de la variabilidad "potencialmente" adaptativa, son pocos los casos que lograron identificar las bases genéticas de la variación (ver revisiones en Rockman, 2008 y Mackay, 2009). Como en todo estudio de QTLs, lo importante es contar con líneas de fenotipos extremos cuyas diferencias tengan base genética. En este sentido, los extremos de las clinas representan genotipos con efectos fenotípicos opuestos, los cuales pueden utilizarse para realizar cruzamientos. Con estos antecedentes,



llevamos adelante ensayos para determinar si existen variantes alélicas de los genes heterocrónicos asociados a la manifestación de distintos fenotipos para el tiempo de desarrollo, y de esta forma profundizar en el conocimiento de la *naturaleza* genética de este complejo carácter adaptativo. El mismo protocolo de complementación genética que utilizamos para la identificación de alelos naturales del tiempo de desarrollo ha sido empleado también, con resultados satisfactorios, para estudiar genes con variación natural en caracteres complejos como la longevidad (Pasyukova y col., 2000; Flatt, 2004; Paaby & Schmidt, 2008), el comportamiento locomotor (Jordan y col., 2006), el comportamiento olfativo (Fanara y col., 2002) y el tamaño corporal en *Drosophila melanogaster*. Además, en ratones este procedimiento experimental permitió identificar alelos naturales del gen *Rgs2* (*Regulator of G-protein signalling 2*) implicados en la manifestación de comportamientos de ansiedad (Yalcin y col., 2004). Sin embargo, hasta el momento no existen estudios similares para el tiempo de desarrollo.

Siguiendo criterios que contemplan: a) los fuertes efectos de los mutantes heterocrónicos sobre el carácter b) la localización de estos genes en el cromosoma 2, c) la inserción del elemento transponible interrumpiendo la secuencia del gen candidato y d) la corroboración de que el efecto fenotípico de estos genes es sensible a los cambios de temperatura, elegimos a *invected* (BG00846), *cricket* (BG01339), *CG14591* (BG01672) y *mastermind* (BG01902) como genes candidatos heterocrónicos cuya variación genética se encontraría asociada a la variación natural del tiempo de desarrollo. Con ellos evaluamos su contribución genética particular a la variación fenotípica observada para el carácter.

## 5.2 Materiales y Métodos

En el Capítulo 4 individualizamos los genotipos más “rápidos” y más “lentos” con diferencias de hasta cinco días en su tiempo de desarrollo. Entre las líneas más “rápidas”, localizadas en poblaciones de “llanura” se destacaron Güemes 286 y Lavalle 14 con valores de tiempo de desarrollo de 231,9 y 233 horas, respectivamente. Entre las más “lentas” pertenecientes a poblaciones de altura se identificaron a San Blas 45 y Uspallata 10, con 353,4 y 332,7 horas, respectivamente. A fin de determinar las bases genéticas que subyace la variación fenotípica de este carácter, se realizó un ensayo de complementación genética cuantitativa (Mackay, 2004), mediante cruzamientos recíprocos entre las dos líneas “rápidas” y las dos líneas “lentas” con 4 mutantes heterocronicos [m] que se localizan en el cromosoma 2 y la línea control utilizada en el Capítulo 2 (fondo genético *Canton-S B*). Los 4 genes candidatos que se emplearon en esta etapa son: *invected* (BG00846), *clt* (BG01339), *CG14591* (BG01672) y *mastermind* (BG01902) (identificados en el Capítulo 2). De manera independiente, se estimó el tiempo de desarrollo para cada mutante heterocronico de la descendencia de estos cruzamientos (rápida / m; lenta / m; rápida / control; lenta / control). Las variaciones en el tiempo de desarrollo entre estos cuatro genotipos se analizaron mediante el siguiente modelo mixto de ANOVA:

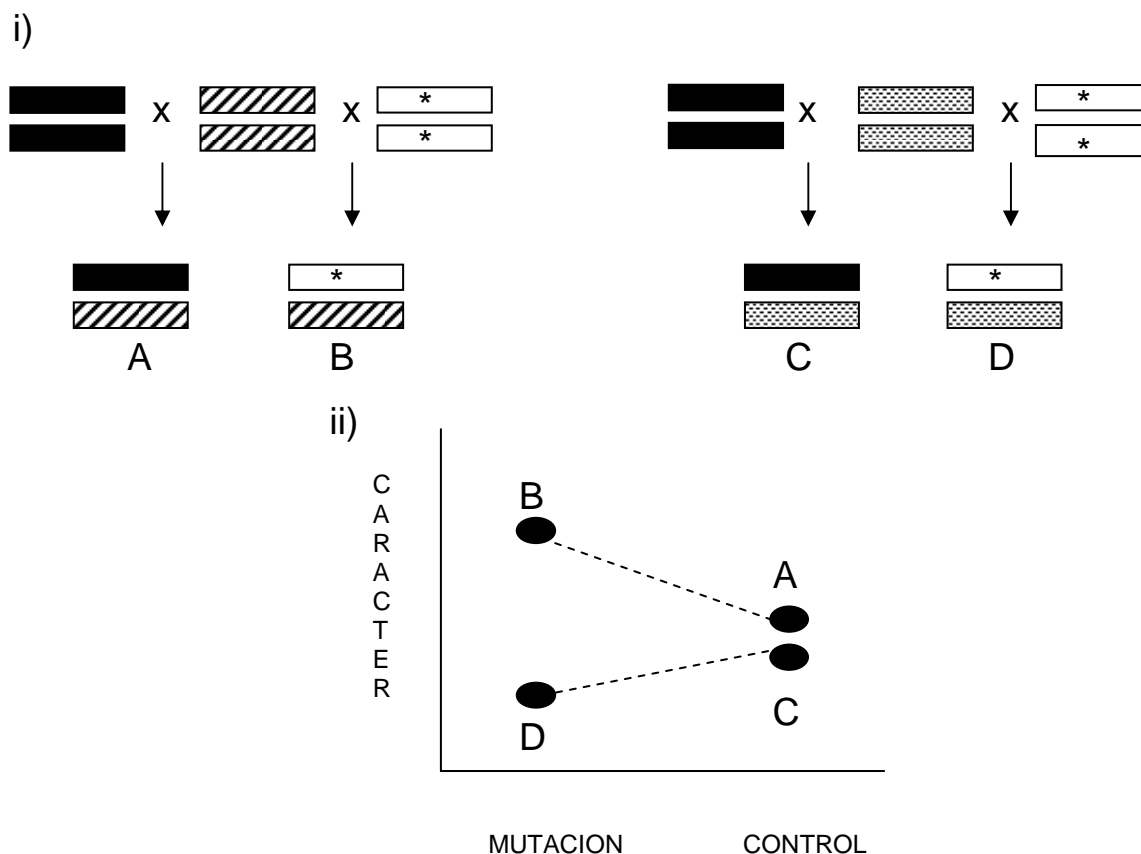
$$Y = \mu + L + C + S + C \times S + L \times C + L \times S + L \times S \times C + R(L \times C \times S) + E$$

donde  $\mu$  es la media general, L es el factor línea (fijo) que sería un indicador de la presencia de variación genética dada por las diferencias entre líneas naturales analizadas, C es el factor cruzamiento (fijo) que nos indica si hay diferencias entre la descendencia de los cruzamientos líneas naturales x mutante heterocronico (m) y líneas

naturales x línea control (*Canton-S B*), S es el factor sexo (fijo) con dos niveles (machos y hembras) y R es el factor réplica (aleatorio) anidado en la interacción triple mientras que E es el error. Una falla en la complementación genética, y por ende, la detección de un QTL con variación natural, se manifiesta con una interacción significativa en el factor L X C y/o en el factor L X C X S, existiendo en el último caso un efecto sexo-específico de la variación genética natural detectada. Una falla en la complementación genética tiene dos interpretaciones (Pasyukova y col., 2000; Jordan y col., 2006): (1) en la naturaleza existen alelos del gen heterocrónico que tienen efectos cuantitativamente diferentes sobre el tiempo de desarrollo (hipótesis de alelismo) y/o (2) existen interacciones epistáticas entre el QTL para el tiempo de desarrollo con otros loci en el cromosoma 2 natural o en el cromosoma *Canton-S B*, que, también contribuyen a la expresión fenotípica del carácter. Nuestro interés es detectar alelismo lo cual permitirá en un futuro realizar estudios de asociación entre el polimorfismo nucleotídico y la variación fenotípica. De todas formas al compartir todas las líneas el mismo fondo genético *Canton-S B*, bajo ambos escenarios estaríamos en presencia de variación genética natural para el gen heterocrónico (ver Discusión). En todos los casos donde el factor L X C resultó ser significativo se realizaron comparaciones *a posteriori* para determinar cuáles de los genotipos diferían significativamente entre sí. Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el paquete STATISTICA (StatSoft Inc., 2004).

Para realizar los cruzamientos se recolectaron hembras vírgenes de cada una de las líneas isogénicas naturales (LAV 14, USP 10, GÚE 286 Y SBL 45). En *D.melanogaster* las hembras permanecen vírgenes desde su emergencia del pupario por 6 horas. De esta forma, la metodología empleada para obtener hembras vírgenes consistió en descartar a todos los individuos adultos de los tubos de cría (dejando las pupas y las larvas del tubo), y transcurridas 5 horas se procedió a recolectar los

emergidos durante a ese período de tiempo. Inmediatamente los emergidos se separaron por sexo y se mantuvieron en forma aislada. Seguidamente, se colocaron 15 hembras por tubo con medio de cría y se las mantuvo a 25°C por seis días. Una vez transcurrido este lapso de tiempo, utilizando la lupa, se procedió a inspeccionar el medio de cría con el objetivo de visualizar larvas en el mismo, en cuyo caso las hembras de ese tubo eran descartadas (por no ser vírgenes). Reuniendo a todas las hembras de los tubos sin presencia de larvas (hembras vírgenes) se alcanzó un número de 100 por cruzamiento. Los cruzamientos se realizaron en cajas de acrílico de 5x20x12 cm donde se colocó una placa de Petri rellena con un gel de agar sobre el que se depositó granos de levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) seca que sirvió como estímulo de oviposición y también de alimento para las moscas. Transcurridas 8 horas, se retiró la placa de Petri de la caja y se las mantuvo a 25°C por 16 hs para permitir la eclosión de las larvas de primer estadio. Por cada réplica se sembraron 30 larvas (4 réplicas por cruzamiento) en tubos con medio de cultivo preparado con puré de papa instantáneo (Roberts, 1998). Todas los tubos se mantuvieron en un incubador a 25°C ± 0.5, con un fotoperíodo de 12:12 h luz:oscuridad y una humedad de 60-70%.



**Figura 5.1. Esquema de cruzamientos i) y resultados esperados ii) en el análisis de complementación.** Las líneas naturales isogénicas con fenotipos extremos para el tiempo de desarrollo ▨ y ▤ se cruzan con la línea control ■ y un mutante heterocrónico del cromosoma 2 □\*. En caso de observarse una ausencia de complementación producto de alelismo debería observarse un gráfico como el esquematizado en ii), donde los heterocigotas con el control (genotipos A y C) no se diferencian significativamente entre ellos (los alelos naturales son recesivos respecto al control), mientras que si se observan diferencias significativas con el fondo genético mutante (genotipos B y D).

### 5.3 Resultados

En todos los ANOVAs realizados para cada gen candidato heterocrónico, los factores principales Línea, Cruzamiento y Réplica fueron significativos con la excepción del factor Cruzamiento para el gen *CG14591* (TABLAS 5.1-5.4). El término de mayor interés en este análisis (ver materiales y métodos) es la interacción L x C que resultó

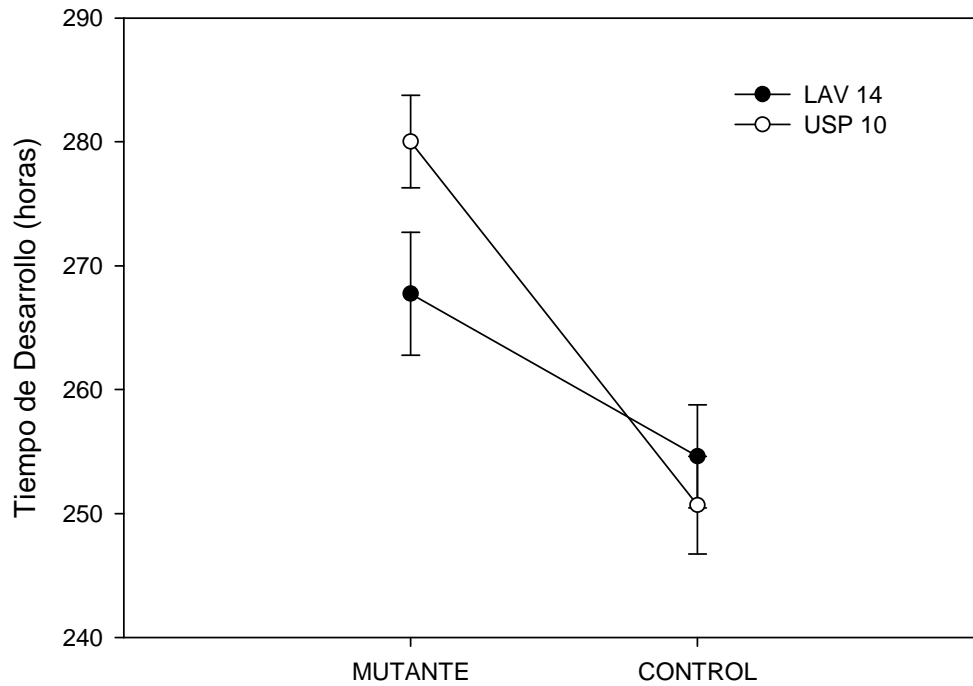
altamente significativa en todos los casos. Este es el factor que permite el análisis de complementación, ya que el resultado indica si las diferencias de tiempo de desarrollo entre el alelo de *Canton-S B* (control) y el alelo hipomórfico del cromosoma mutado (*m*) dependen de la información localizada en los cromosomas derivados de las poblaciones naturales. Es importante destacar además, que para ninguno de los 4 genes estudiados: *invected* (BG00846), *clt* (BG01339), *CG14591* (BG01672) y *mastermind* (BG01902) mostraron un resultado significativo para la interacción L x C x S, lo cual sugiere que la falta de complementación no es sexo específica, resultado coincidente con todos los otros análisis realizados en esta Tesis.

Por cada gen analizado, tomaremos aquellos casos de interés que ilustren la variación genética inferida a partir de la interacción L x C significativa.

### **Variación genética natural en el gen *invected*.**

Como se puede apreciar en la Figura 5.2, las diferencias entre los cromosomas LAV14 y USP10 cuando el cromosoma homólogo fue el de la línea control (*Canton-S B*) no fueron significativas indicando que los alelos provenientes de los cromosomas II de la naturaleza son recesivos respecto del alelo control. Sin embargo las diferencias en el tiempo de desarrollo fueron significativas ( $p < 0,0001$ ) cuando los cromosomas LAV14 y USP10 se encontraban en un fondo genético mutante para el gen *invected*. En esta última situación, ambos genotipos (LAV14/*m* y USP10/*m*) tienen un alelo nulo proveniente de la cepa portadora del mutante heterocrónico de *invected*, de modo que estaríamos observando la expresión de los alelos de *invected* presentes en LAV14 y USP10. Así podemos deducir que los alelos naturales de LAV14 y USP10 contribuyen de una manera cuantitativamente diferente a la expresión del carácter en estudio. En efecto, LAV14/*m* tiene un tiempo de desarrollo que es aproximadamente 12 horas menor que USP10/*m*,

mientras que LAV14/+ y USP10/+ no se diferencian en cuanto a su tiempo de desarrollo ( $p=0,29$ ). Así, podemos deducir que *invested*, es un gen candidato que presenta variación genética natural para el tiempo de desarrollo (QTG= *quantitative trait gene*).



**Figura 5.2. Variación natural para *invested*.** Los genotipos LAV14/ m y USP10/m tienen un tiempo de desarrollo significativamente diferente y no así los genotipos LAV14/ + y USP10/ +.

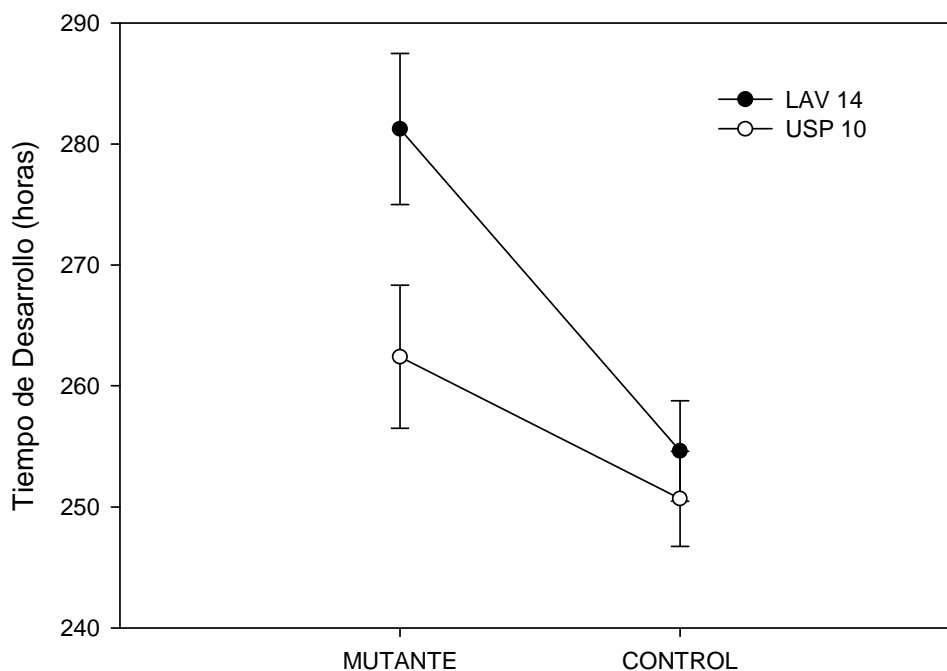
**Tabla 5.1. Análisis de varianza de los cruzamientos realizados con el mutante *invected***

<b>Fuende de Variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Linea</b>	3	4	<b>0,012</b>
<b>Mutante</b>	1	68,95	<b>&lt; 0,00001</b>
<b>Linea X Mutante</b>	3	25,54	<b>&lt; 0,00001</b>
<b>Rep(Linea*Mut*Sexo)</b>	48	3,64	<b>&lt; 0,00001</b>
<b>Sexo</b>	1	1,99	0,164
<b>Linea X Sexo</b>	3	1,37	0,261
<b>Mutante X Sexo</b>	1	0	1
<b>Linea X Mut X Sexo</b>	3	0,5	0,684
<b>Error</b>	739		

**Variación genética natural en el gen *mastermind (mam)* .**

Con la misma lógica que en el caso de *invected*, pudimos ver que LAV14 es portadora de un alelo de *mam* que afecta la duración del desarrollo, alargando el mismo en 19 horas respecto del alelo de *mam* del cromosoma 2 de USP10 (Figura 5.3) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Del mismo modo, podemos deducir que *mam* es, también, un gen candidato es decir un QTG.





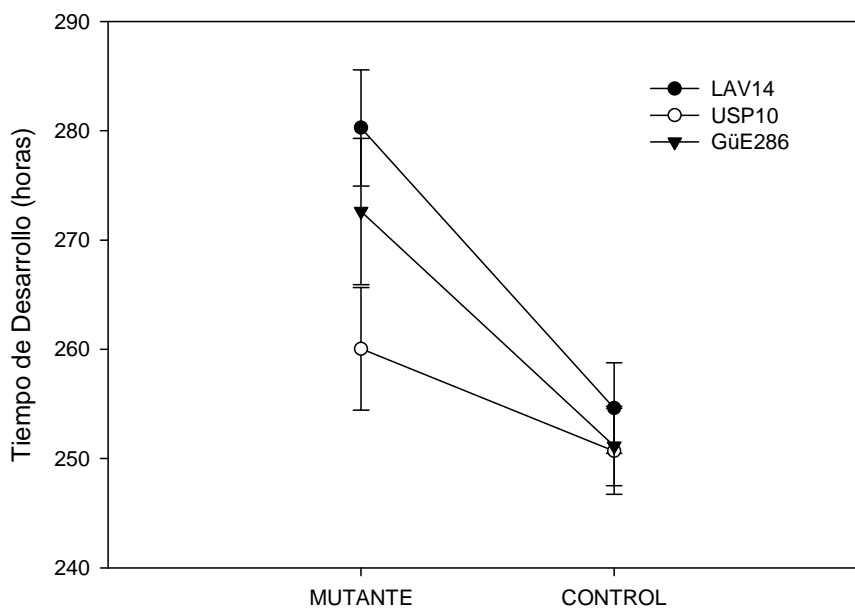
**Figura 5.3. Variación natural para *mam*.** Los genotipos LAV14/ m y USP10/m tienen un tiempo de desarrollo significativamente diferente y no así los genotipos LAV14/ + y USP10/ +.

**Tabla 5.2. Análisis de varianza de los cruzamientos realizados con el mutante *mastermind*.**

Fuente de Variación	g.l.	F	P
Linea	3	23,22	< 0,00001
Mutante	1	78,72	< 0,00001
Linea X Mutante	3	17,89	< 0,00001
REP(Linea*Mut*Sexo)	47	3,74	< 0,00001
Sexo	1	1,6	0,21
Linea X Sexo	3	0,87	0,46
Mutante X Sexo	1	0,05	0,83
Linea X Mut X Sexo	3	0,86	0,47
Error	740		

**Variación genética natural de *cricket* (*clt*).**

En el caso del gen *clt*, una vez más el cromosoma 2 de USP10 difiere significativamente en cuanto a su efecto sobre el tiempo de desarrollo respecto de los genotipos LAV14 ( $p < 0,0001$ ) y GÜE286 ( $p < 0,0001$ ). El alelo de *clt* presente en el cromosoma USP10 acelera el desarrollo en 20 horas respecto del alelo de LAV14, y en 12 horas respecto al de GÜE286. Considerando estos resultados, *clt* también es un gen candidato de ser un QTG para el tiempo de desarrollo.



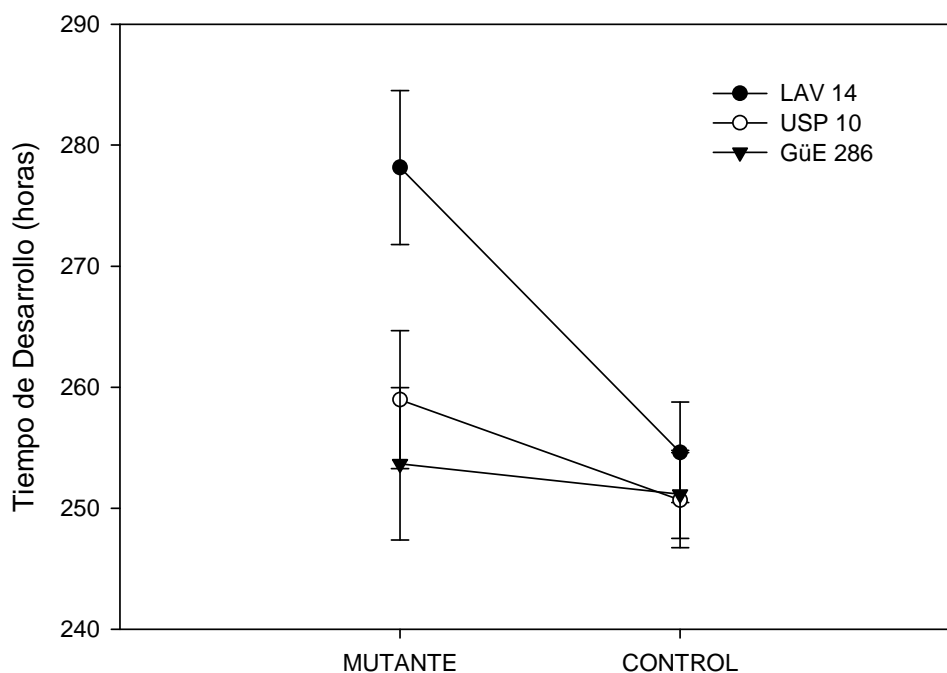
**Figura 5.4. Variación natural para *clt*.** Los genotipos LAV14/ m y USP10/m tienen un tiempo de desarrollo significativamente diferente y no así los genotipos LAV14/ + y USP10/ +. Además, los genotipos USP10/ m y GÜE286/ m también tienen un tiempo de desarrollo diferente, mientras que USP10/ + y GÜE286/ + no lo tienen.

**Tabla 5.3. Análisis de varianza de los cruzamientos realizados con el mutante *cricket*.**

	<b>g.l.</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Linea</b>	3	28,08	< <b>0,00001</b>
<b>Mutante</b>	1	87,57	< <b>0,00001</b>
<b>Linea X Mutante</b>	3	9,58	< <b>0,00001</b>
<b>Rep(Linea*Mut*Sexo)</b>	48	4,66	< <b>0,00001</b>
<b>Sexo</b>	1	0,4	0,53
<b>Mutante X Sexo</b>	1	0,58	0,45
<b>Linea X Sexo</b>	3	0,84	0,96
<b>Linea X Mut X Sexo</b>	3	0,1	0,49
<b>Error</b>	760		

#### **Variación genética natural de CG14591.**

Por último, para el locus *CG14591* los cruzamientos arrojan resultados similares a los encontrados para el resto de los genes. El alelo de *USP10* reduce significativamente ( $p < 0,0001$ ) el tiempo de desarrollo en 19 horas respecto a *LAV14*. A su vez, el alelo de *GÜE286* muestra un tiempo de desarrollo 5 y 24 horas menor respecto de *USP10* ( $p = 0,02$ ) y *LAV14* ( $p < 0,0001$ ), respectivamente. Nuevamente, estos resultados permiten postular a *CG14591* como un QTG.



**Figura 5.5. Variación natural para CG14591.** Los genotipos LAV14/ m y USP10/m tienen un tiempo de desarrollo significativamente diferente y no así los genotipos LAV14/ + y USP10/ +. Por otro lado, los genotipos USP10/ m y GÜE286/ m también tienen un tiempo de desarrollo diferente, mientras que USP10/ + y GÜE286/ + no lo tienen. Por último, los genotipos LAV14/ m y GÜE286/ m también tienen un tiempo de desarrollo diferente, y los respectivos LAV14/ + y GÜE286/ + no lo tienen.

**Tabla 5.4. Análisis de varianza de los cruzamientos realizados con el mutante CG14591.**

	g.l.	F	P
<b>Linea</b>	3	8,31	< 0,00001
<b>Mutante</b>	1	0,53	0,47
<b>Linea X Mutante</b>	3	27,55	< 0,00001
<b>Rep(Linea*Mut*Sexo)</b>	45	7,72	< 0,00001
<b>Sexo</b>	1	1,05	0,31
<b>Mutante X Sexo</b>	1	0,5	1
<b>Linea X Sexo</b>	3	0	0,69
<b>Linea X Mut X Sexo</b>	3	0,32	0,81
<b>Error</b>	754		

## 5.4 Discusión

### Asociando caracteres con genes de variación natural

La variación clinal en caracteres cuantitativos posibilita una oportunidad única para estudiar los procesos adaptativos en sus niveles fenotípicos y genéticos. Sin embargo, los estudios tradicionales de clinas no han hecho foco en las bases genéticas responsables de la variación clinal sino hasta tiempos recientes. Dos clases de abordajes se utilizan para asociar la variación clinal de los caracteres con los genes subyacentes. Bajo el primer enfoque, la estrategia es realizar estudios de asociación entre marcadores moleculares y la variación cuantitativa de los caracteres en líneas y/o individuos. En el segundo abordaje, mediante la implementación de un mapeo de QTLs se pueden identificar regiones cromosómicas que contribuyen a las diferencias genéticas entre extremos de una clina para el carácter. De la mano de este último enfoque logramos caracterizar cuatro genes que contribuyen a la variación genética natural del tiempo de desarrollo, los denominados QTGs (*quantitative trait genes*). Partiendo de una búsqueda de variación asociada a gradientes latitudinales, seguramente inspirados en las clinas australianas de caracteres adaptativos, nos sorprendimos con que la mayor parte variación genética no se encuentra, por lo menos para el tiempo de desarrollo, asociada a la distancia geográfica (como pueden ser las poblaciones de Salta y Neuquén, extremos del gradiente latitudinal estudiado), sino que las mayores diferencias genéticas se observan en poblaciones separadas por unos pocos kilómetros de distancia (menos de 80 km separan Lavalle y Uspallata) pero por cientos de metros de altitud. Los diferentes alelos identificados, que en varios casos contribuyeron con diferencias fenotípicas de más de 20 horas, se diferenciaron frecuentemente entre las poblaciones de Lavalle, situada a menos de 700 metros de altura, y Uspallata que está cercana a los 2000 metros.

Debido a que los cambios altitudinales ocurren en distancias relativamente cortas, esto genera comúnmente rápidos cambios en las condiciones ambientales, fundamentalmente en la temperatura (en la temperatura media y en la amplitud térmica), en comparación con distancias equivalentes a lo largo de gradientes latitudinales (Baur & Raboud, 1988). Como consecuencia para un cambio de magnitud de temperatura similar, por lo general, el flujo génico es mayor a través de un gradiente altitudinal en comparación al latitudinal (Blanckenhorn, 1997). Siguiendo este razonamiento, las diferencias genéticas altitudinales tienen una menor probabilidad de ser causadas por procesos no adaptativos, como la deriva genética. Seguramente, las diferencias entre poblaciones de “llanura” y “altura” son el resultado de la acción de la selección natural, y la temperatura podría ser el agente selectivo candidato más plausible (Collinge y col., 2006, Folguera y col., 2008). Sin embargo, sabemos que las clinas pueden generarse tanto por factores históricos (expansiones demográficas) como por selección natural. En nuestro caso, si bien existen fuertes evidencias a favor de la selección natural como proceso que moldeó la diferenciación genética entre poblaciones de distinta altura, queda para el futuro contrastar los patrones de variación fenotípicos con los patrones a nivel de marcadores genéticos neutros, por ejemplo microsatélites. Estudios de este tipo podrían proveer parámetros de diferenciación genética y fenotípica ( $F_{st}$  y  $Q_{st}$ , respectivamente), los cuales nos ayudarían a discernir entre factores históricos y adaptativos como causales de las clinas altitudinales observadas en las poblaciones argentinas de *D. melanogaster*. En este sentido es crucial la comparación de las pendientes del cambio fenotípico y de los marcadores moleculares. Si el cambio clinal del carácter o de la variación a nivel de genes candidatos es más pronunciado que lo observado para marcadores neutros, entonces podríamos inferir que las clinas son, mayormente, producto de la selección natural y no consecuencia de procesos

históricos no adaptativos (Hoffman & Weeks, 2007).

En el Capítulo 4, determinamos que una diferencia de cinco días de tiempo de desarrollo separan a los genotipos rápidos (de "llanura") de los lentos (de "altura") (Figura 4.3), lo que motivó en el presente Capítulo la búsqueda de genes responsables de tal diferenciación genética. El principal resultado de este Capítulo indica que una importante fracción de la variación genética natural estaría asociada a la variación a nivel de las secuencias de *invected*, *mastermind*, *cricket* y *CG14591*. Sin embargo, únicamente en el caso de *invected* pudimos observar que el alelo de "altura" (alelo de USP10) contribuyó al retraso en el tiempo de desarrollo respecto al aporte del alelo de "llanura" (alelo de LAV14) (Figura 5.2). Llamativamente, tanto en el caso de *mam*, como de *clt* y de *CG14591*, los efectos de los alelos de "altura" contribuyeron con una aceleración del desarrollo respecto de los de "llanura" (Figuras 5.3-5.5), es decir, el patrón opuesto al esperado. Todo un cromosoma se comporta de una manera y parte de sus genes de forma inversa ¿Cuál podría ser la explicación de este extraño resultado? Nuestra hipótesis es que la arquitectura genética es dinámica y compleja. No necesariamente el carácter es la suma de los efectos individuales de los *loci* involucrados en su expresión fenotípica (Lynch & Walsh, 1998; Greenspan, 2001; Anholt & Mackay 2004). Nuestros resultados indican que parte de la variación genética natural no sólo es aditiva sino que posiblemente componentes de dominancia y de epístasis estén jugando un rol preponderante. Para corroborar esto habría que realizar cruzamientos entre las líneas naturales extremas (por ejemplo LAV14 y USP10) y estudiar el efecto de la interacción entre ambos homólogos divergentes. Otra posibilidad, es que los efectos aditivos particulares de los alelos de *mam*, *clt* y *CG14591* afecten al tiempo de desarrollo de manera opuesta al efecto de la mayoría de los genes implicados en la diferenciación de "altura" y "llanura".

Los resultados que obtuvimos en este Capítulo indican que *invected*,

*mastermind*, *cricket* y CG14591 son genes que presentan variación natural para el tiempo de desarrollo, hecho que refuerza su condición de candidatos a contribuir a la expresión fenotípica del carácter (inicialmente postulada a través de mutantes artificiales). Es importante destacar que, según entendemos, este es el primer trabajo que reporta una asociación de estos genes con el carácter de estudio, sin bien en el caso de *invected* y *mastermind* existen gran cantidad de investigaciones que sustentan su participación en el desarrollo del sistema nervioso embrionario (Gustavson y col., 1996; Bhat, 1999; Urbach & Technau, 2004; Artavanis-Tsakonas y col., 1999). En lo que refiere a *invected*, el mismo es un gen estrechamente relacionado con *engrailed* (gene de polaridad de segmentos) tanto por su proximidad en el cromosoma, como por su alta identidad de secuencia y su similar patrón de expresión (Coleman y col., 1987), lo que hace pensar que se trata de genes parálogos, es decir, homólogos como consecuencia de una duplicación genética. Ambos factores de transcripción se expresan en las células neuroectodérmicas y de esa forma especifican (en combinación con otros genes) las regiones del embrión durante el desarrollo del sistema nervioso (Gustavson y col., 1995). Sin embargo, la expresión *invected* no se restringe a las etapas tempranas del desarrollo, además se sabe que *invected* está implicado en la determinación de la identidad antero-posterior de los discos imaginales del ala (Simmonds y col., 1995). En este sentido, el mutante *inv* fue, entre todos los mutantes utilizados en esta Tesis, la línea que disminuyó más drásticamente el tamaño del ala en hembras, así como también disminuyó el tamaño del tórax y el ancho de cabeza en ambos sexos (Carreira, Mench & Fanara, 2009). Por el lado de *mastermind*, componente de la vía de señalización de *Notch*, el mismo también está implicado en el desarrollo del sistema nervioso embrionario. Inicialmente *mam* fue catalogado como un neurgen en base al fenotipo de letalidad embrionaria en el cual se observó una proliferación desmedida de neuroblastos a expensas de



células epidérmicas (Lehmann y col., 1983). Al igual que *inv*, su expresión tampoco se restringe a la etapa embrionaria, teniendo altos niveles de expresión en el sistema nervioso central tanto en los estadios larvales como en la pupa (Schmid y col., 1998). Para el mutante *mam* (BG01902) no se encontraron efectos sobre los caracteres morfológicos (Carreira, Mensch & Fanara, 2009).

El caso de *cricket* se aparta del perfil funcional de los genes recién comentados: este gen metabólico codifica una esterasa presumiblemente relacionada al metabolismo de la hormona juvenil (Cambell y col., 2001). Es interesante notar que Oakeshoot y col. (1994) reportaron variación natural en la actividad de la esterasa 6 asociada a cambios en el tiempo de desarrollo en *D. melanogaster*. Además de la variación natural observada para este locus, en el *screening* de variación artificial, dos mutantes diferentes de *clt* (BG01339 y BG01649) mostraron un fenotipo heterocrónico similar, el retraso del tiempo de desarrollo de ambas líneas (Tabla 2.2). En conjunto, estos resultados sustentan fuertemente su implicancia en el carácter.

Por último, el gen *CG14591* no cuenta con ningún estudio que lo relacione con el tiempo de desarrollo, aunque sí existen evidencias de su vinculación con el comportamiento olfativo en adultos de *D. melanogaster* (Sambandan y col., 2006).

En conclusión, el camino que iniciamos en el Capítulo 2 a partir de variación artificial, se completa con la identificación de varios genes heterocrónicos con variación natural. Si bien es necesario profundizar los estudios, existen fuertes evidencias de la acción de la selección natural como proceso preponderante en la variación genética observada (ver Capítulo 6), ya que en varios casos la misma se alcanza en distancias geográficas reducidas, que favorece el flujo genético, pero en contrastantes regímenes de altitud (donde la amplitud térmica podría ser un factor ambiental determinante). Para el futuro queda pendiente la realización de estudios de asociación genética con el fin de

determinar los polimorfismos moleculares o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) que presentan los genes candidatos con la variación natural del tiempo de desarrollo (Carbone y col., 2006).

# Capítulo 6

## Conclusiones Generales

**Conclusiones generales (y últimos resultados).**

En este último Capítulo revisaremos los resultados más destacados de la Tesis con el objetivo de integrarlos en una discusión global. En segundo lugar, mostraremos resultados preliminares surgidos de nuevas investigaciones derivadas de la presente Tesis. Por último, brindaremos nuevas perspectivas mediante la proyección de futuras investigaciones. Pero previo a este desarrollo que proponemos llevar a cabo nos interesa señalar los cuatro resultados más importantes de este estudio:

- 1) Identificamos genes involucrados en la expresión fenotípica del tiempo de desarrollo a diferentes temperaturas
- 2) Caracterizamos las bases genéticas de la plasticidad fenotípica cuando temperatura de desarrollo varió
- 3) Establecimos que en la naturaleza hay variación genética localizada en el cromosoma 2 y que esa variación sería producto de la selección natural
- 4) Identificamos genes responsables de la variación genética observada en poblaciones naturales.

**Variación natural vs. Variación mutacional: evidencias de selección natural.**

A lo largo de toda la Tesis hemos trabajado fundamentalmente con dos clases de genotipos. Por un lado, utilizamos las líneas BDGP que son mutantes artificiales producto de la inserción del elemento móvil *P[GT1]* en la línea *Canton-S B*. Por otro lado, estudiamos líneas obtenidas mediante protocolos de sustitución cromosómica para cromosomas 2 de origen natural. Tanto las líneas BDGP como las líneas de sustitución cromosómica comparten ciertas características aunque difieren en otras. Entre las similitudes, se destacan que ambas clases de líneas son isogénicas, es decir, todos sus *loci* se encuentran en homocigosis. Además, todas las líneas comparten idénticos juegos de cromosomas X, 3 y 4 (derivados de la línea *Canton-S B*). En relación a las diferencias, la más notable es que el juego de cromosomas 2 de las líneas de sustitución proviene de genotipos naturales los cuales son producto de los diversos procesos evolutivos propios de cada población estudiada. A su vez, una característica exclusiva de las líneas mutantes artificiales consiste en que la inserción del elemento móvil en cada una de ellas interrumpe la secuencia de un gen particular generando un genotipo consistente, presumiblemente, en la pérdida de función, aunque se ha descrito un patrón diferente producto de la mutación. En efecto, Sambandan y col. (2006) observaron, que algunos genes como por ejemplo *escargot*, presentan un aumento de la expresión génica (medido por RT-PCR) en relación al control en un estudio realizado con líneas del proyecto BDGP.

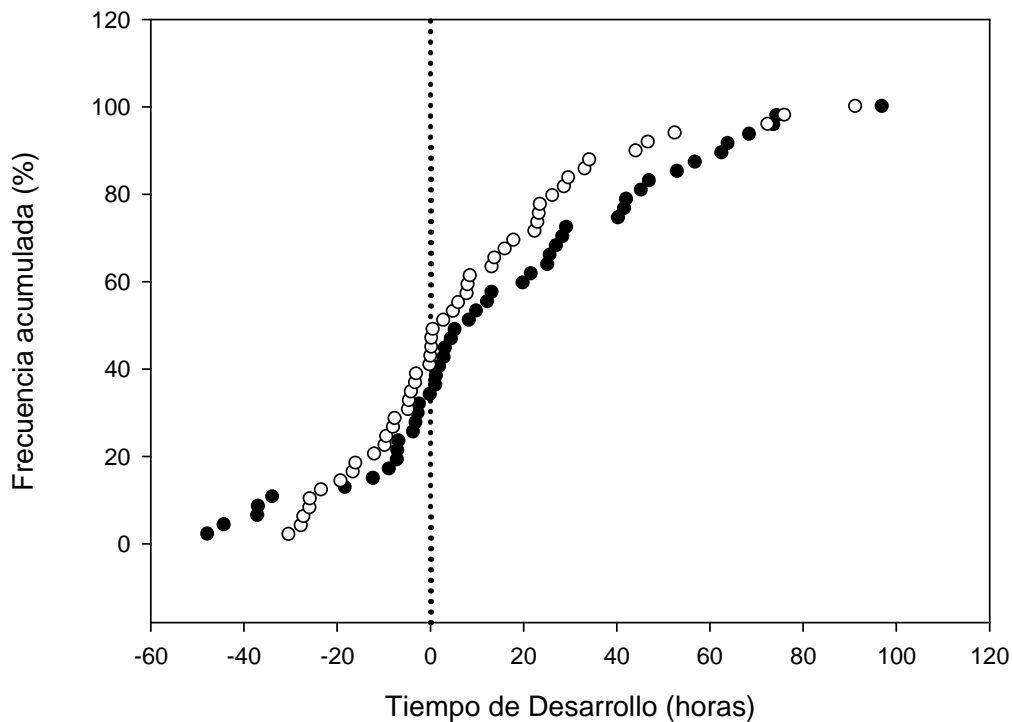
Como pudimos comprobar a lo largo de toda la Tesis, la variación genética aditiva de un carácter es informativa en relación a su *evolucionabilidad*. Asimismo, el coeficiente de variación genética aditiva (CVa) es un estimador muy utilizado para cuantificar la variación de una población dada. En la Tabla 6.1 se muestra el CVa de ambas clases de líneas.

**Tabla 6.1. Coeficientes de variación genética aditiva de las líneas naturales y mutantes.**

	n	CVa
Sustituciones cromosómicas naturales	44	5,79 ± 0,62
Líneas BDGP	179	8,98 ± 0,48
Líneas BDGP del cromosoma II	48	8,93 ± 0,92

Los resultados muestran que el CVa de las líneas mutantes ( $8,98 \pm 0,48$ ) es mayor de que el índice de variación de las líneas naturales ( $5,79 \pm 0,62$ ). Este resultado se mantiene si nos circunscribimos al CVa de las líneas mutagenizadas sólo en el cromosoma 2 (que fue de  $8,93 \pm 0,92$ ). A modo de ejemplo, lo que está indicando este resultado es que si tomamos al azar dos líneas provenientes de la misma muestra (mutante artificial o sustitución natural) y las comparamos entre sí, existen más diferencias genéticas en el tiempo de desarrollo entre dos genotipos mutantes artificiales que las que existen entre dos líneas de sustitución cromosómica derivadas de cualquier parte del rango de distribución de *D. melanogaster* estudiado en esta Tesis. Estas comparaciones sugieren que las diferencias en el tiempo de desarrollo entre líneas mutantes son mayores que entre las líneas naturales lo cual sugiere que la variación artificial sería mayor que la natural. Además, se puede verificar que varios mutantes artificiales exhiben un tiempo de desarrollo menor al extremo inferior del rango de variación observa en las líneas del cromosoma 2 sustituido derivado de poblaciones naturales. En efecto, en la Figura 6.1 se grafican las frecuencias acumuladas para el tiempo de desarrollo de las líneas mutantes artificiales del cromosoma 2 y de las líneas de sustituciones cromosómicas naturales. En el mismo puede

observarse que las líneas de fenotipo extremo para un desarrollo más rápido corresponden a líneas BDGP.



**Figura 6.1. Tiempo de desarrollo de los mutantes artificiales (círculos negros) y sustituciones cromosómicas naturales para el cromosoma 2 (círculos blancos).**

Las causas que pueden derivar en un resultado de estas características son varias, pero posiblemente la forma más directa de interpretar estos resultados es que la selección natural restringe la variación en el tiempo de desarrollo en las poblaciones naturales. Si no fuera así, ¿de qué manera se podría interpretar que una mutación puntual pueda generar mayores diferencias fenotípicas que las expresadas en la naturaleza?

La bibliografía postula al tiempo de desarrollo como un carácter de historia de vida, es decir, estrechamente relacionado al *fitness* (Stearns, 1992; Stearns, 2000). Nuestros resultados apuntan a que efectivamente la asociación del tiempo de desarrollo con el *fitness* es directa ya que es un blanco de la selección. Esta observación nos sugiere la existencia de

factores que restringen la variación del tiempo que tardan las moscas con genotipos naturales en alcanzar la edad reproductiva, probablemente como consecuencia de efectos pleiotrópicos negativos sobre otros caracteres de historia de vida, como podría ser el caso del tamaño corporal. Sin embargo, esta alternativa parecería ser poco factible, debido a que en nuestro caso encontramos para las líneas de sustitución cromosómica natural una asociación negativa entre el tiempo de desarrollo y el tamaño corporal, por lo que no estamos observando ningún tipo de costo sobre el *fitness* (pensado al mayor tamaño corporal como estimador de un mayor éxito reproductivo) si los individuos naturales aceleraran su desarrollo. ¿Entonces por qué no hay un mayor número de genotipos con un tiempo de desarrollo más rápido en la naturaleza? La respuesta podría ser que la selección natural esté actuando directamente sobre el tiempo de desarrollo, filtrando mutaciones que podrían llevar a un aumento de la frecuencia de genotipos rápidos. Este tipo de proceso puede ser especialmente frecuente (o importante) en poblaciones de "altura" donde observamos que en general los individuos prolongan su tiempo de desarrollo en comparación con los de las poblaciones de "llanura". Una vez más, nuestros resultados apuntan a que la selección natural estaría actuando en forma directa sobre el carácter, ya que, aún incluyendo el tamaño corporal como covariable en los análisis estadísticos, continuamos observando genotipos con un tiempo de desarrollo prolongado en las localidades de altura (datos no mostrados). Es decir que las diferencias genéticas entre poblaciones de distinta altitud no pueden ser explicadas como consecuencia indirecta de diferencias atribuibles al tamaño corporal. Lo que sí está claro es que la mayor amplitud térmica diaria, en las localidades de altura, constituye un factor de *stress* ambiental, como ya lo habían manifestado otros autores para otros caracteres de historia de vida como por ejemplo el tamaño corporal o la viabilidad (Loeschcke y col., 1997; Pétavy y col., 2001; Folguera, y col.,



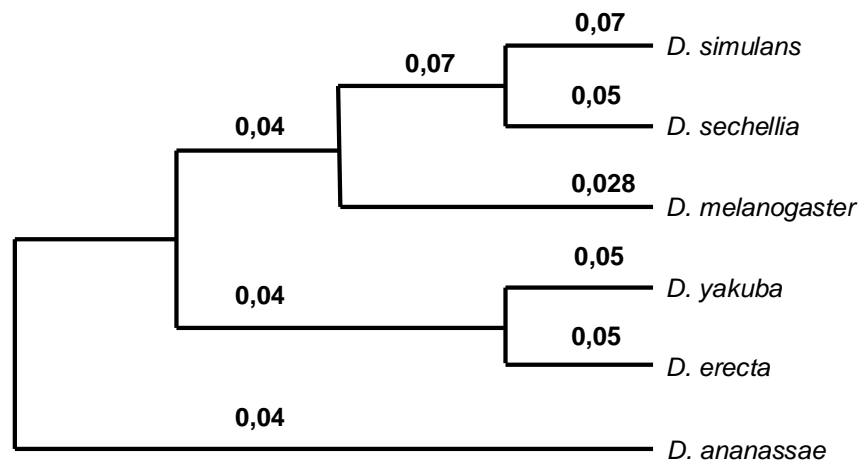
2008). Una interpretación conjunta de la bibliografía y nuestros resultados es que la temperatura afectaría *per se* al tiempo de desarrollo. Quedaría por revelar cuales son los genes que causan este patrón y el mecanismo fisiológico subyacente al mismo. En cuanto al primer punto es posible que sea sobre genes relacionados con el metabolismo celular, ya que, como vimos en el Capítulo 2, los mutantes de genes relacionados al mismo exhibieron tiempos de desarrollo mayores. En este sentido, *cricket*, gen metabólico, presentó variación natural asociada a gradientes altitudinales. Con relación al mecanismo fisiológico se sabe que a bajas temperaturas la contribución del tiempo hasta alcanzar el tamaño crítico para pupar se vuelve relativamente más importante en relación al intervalo de interrupción del crecimiento (Davidowitz & Nijhout, 2004). Estos patrones de crecimiento son compatibles con el mayor tiempo de desarrollo y el menor tamaño observado en las poblaciones de altura. En conclusión, nuestros resultados destacan que la variación altitudinal en el tiempo de desarrollo de *D. melanogaster* está genéticamente desacoplada de la variación para el tamaño corporal, hecho que enfatiza el efecto propio de los caracteres pre-adultos sobre el *fitness* de los individuos, relativizando la importancia de los caracteres adultos como el tamaño corporal en los patrones clinales reportados.

### **Variación interespecífica en los genes heterocrónicos: nuevas evidencias de selección natural.**

Una prueba alternativa, basada en una metodología diferente destinada a evaluar de qué manera los genes heterocrónicos están sujetos a presiones de selección natural, es llevando a cabo un análisis filogenético de la variabilidad sinónima y no sinónima de los genes candidatos. Con la finalización reciente de la secuenciación de 12 genomas de diferentes especies de *Drosophila* (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007), se cuenta con la información genética necesaria

para evaluar la evolución molecular de los genes vinculados al tiempo de desarrollo identificados en el Capítulo 2, entre los cuales están incluidos aquellos que presentaron variación genética natural (Capítulo 5). Como es sabido, la tasa de evolución proteica se cuantifica mediante el número de sustituciones en la secuencia de aminoácidos de una proteína por unidad de tiempo. De esta manera, la tasa de evolución de una proteína es la resultante, no sólo de la tasa de mutación, sino también de los efectos que tienen las mutaciones sobre el *fitness* de los portadores (deletéreos, ventajosos o selectivamente neutros). En otras palabras, la tasa de evolución de una proteína depende tanto de la tasa de mutación como de las restricciones funcionales a las que está sujeta (Li, 1997). Al ser el tiempo de desarrollo un carácter relacionado con el *fitness*, nuestra predicción es que la evolución de los genes vinculados a dicho carácter no será selectivamente neutra. Para cumplir con estos últimos objetivos de la Tesis en primer lugar se buscaron los ortólogos de los genes asociados al tiempo de desarrollo en las especies *D.simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta* y *D. ananassae*. Con las regiones codificantes de estos genes se realizó un alineamiento múltiple para cada grupo de ortólogos y se efectuó un análisis filogenético de la variabilidad sinónima y no sinónima por metodologías de máxima verosimilitud utilizando el paquete PAML (Phylogentic Analysis of Maximum Likelihood) (Yang, 1997). De es forma, se estimaron las tasas de sustitución no sinónima ( $d_N$ ) y sinónima ( $d_S$ ) de cada uno de los genes y utilizamos el cociente entre ambas tasas ( $\omega = d_N / d_S$ ) para analizar las presiones de selección que actúan sobre los genes asociados al tiempo de desarrollo. Bajo estricta neutralidad, las sustituciones sinónimas y no sinónimas ocurrirían a una misma tasa, dando como resultado un  $\omega$  igual a 1 ( $d_n = d_s$ ). En cambio si las mutaciones no sinónimas tienen en promedio un efecto perjudicial sobre la funcionalidad de la proteína, serán la materia prima de la selección purificadora, de modo que la tasa de sustitución sinónima

será mayor que la no sinónima, lo que redundará en un  $\omega$  menor a 1 ( $d_n < d_s$ ). Por el contrario, si las mutaciones no sinónimas tienen un efecto beneficioso, entonces su frecuencia se incrementará hasta la fijación por selección natural positiva, de manera que la tasa de sustitución no sinónima será mayor que la sinónima, dando lugar a un  $\omega$  mayor a 1 ( $d_n > d_s$ ). Cabe destacar que las especies del grupo *melanogaster* *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. ananassae* tardan, en promedio a 25°C, 10 días en alcanzar el estadio adulto, en tanto que *D. yakuba* lo hace en 11 días y *D. sechellia* y *D. erecta* en 12 días (Markow & O'Grady, 2007). Nuestros resultados destacan la relevancia de la selección purificadora en los genes heterocrónicos en las 6 especies del grupo *melanogaster*. Los valores de  $\omega$  variaron entre 0,028 en la especie *D. melanogaster* y 0,07 en *D. simulans*, lo que está indicando que, en promedio, ocurrieron 5 sustituciones no sinónimas por cada 100 sinónimas, reflejo del costo producido por los cambios en las secuencias aminoacídicas. En otras palabras, los resultados muestran que las mutaciones no sinónimas tienen, en promedio, un efecto perjudicial sobre las proteínas relacionadas con el tiempo de desarrollo, hecho que pone en evidencia la manera en que la selección natural moldea la variación a nivel de los genes heterocrónicos.



**Figura 6.2. Restricciones selectivas en los genes heterocrónicos para las 6 especies del grupo *melanogaster*.** Los valores por encima de las ramas muestran la mediana del parámetro  $\omega$  ( $d_N / d_S$ ) para cada linaje obtenido de 66 genes heterocrónicos.

Otra posible derivación de esta Tesis esta relacionada con posibles estudios genéticos poblacionales moleculares. En efecto, como resultado del análisis de complementación genética (Capítulo 5), demostramos que los genes *invected*, *cricket*, *CG14591* y *mastermind* presentan variabilidad genética natural asociada al cambio fenotípico para el tiempo de desarrollo. Estos genes constituyen, por lo tanto, una herramienta excelente a fin de realizar estudios de variación intraespecífica a nivel de las secuencias de nucleótidos en genes asociados a la variación fenotípica para el tiempo de desarrollo (QTN: *quantitative trait nucleotides*). Por lo tanto, mediante este tipo de análisis es posible identificar los nucleótidos responsables de la variación fenotípica observada en las líneas de sustituciones naturales a través de

un estudio de asociación genotipo-fenotipo y establecer las causas que podrían explicar el mantenimiento de la variabilidad genética natural (Carbone y col., 2006).

### **Variación ambiental del tiempo de desarrollo.**

No toda la variación en el tiempo de desarrollo resultó ser de origen genético. Dos fueron los factores ambientales que se analizaron con el propósito de establecer el efecto que causan en la variación del tiempo de desarrollo: sexo y temperatura. Respecto al primero, fue realmente notable la baja incidencia o ausencia de un efecto genético dependiente del sexo. Cabe recordar acá que las interacciones líneas por sexo en los análisis realizados con las líneas BDGP representaron un porcentaje bajo o nulo de la variabilidad fenotípica total observada tanto a 25°C (interacción no significativa) como a 17°C. Mas aun, el estudio llevado a cabo con las líneas de sustitución cromosómica (líneas isogénicas naturales) mostró que ninguna de las interacciones que involucraron al sexo (Línea x Sexo y Población x Sexo) fueron significativas (Capítulo 4). Este patrón estaría sugiriendo que el tiempo de desarrollo no presentaría variación genética para el dimorfismo sexual, independientemente del grupo de líneas que se analice (BDGP o cromosomas 2 sustituidos). En otras palabras, la arquitectura genética de este carácter adaptativo no diferiría entre sexos a diferencia de lo estudiado para otros caracteres complejos como la resistencia al hambre (Harbison y col., 2004), comportamiento olfativo en adultos (Sambandan y col., 2006) y tamaño corporal (Carreira, Mensch & Fanara, 2009).

Con relación al efecto de la temperatura, nuestros resultados mostraron un significativo aporte de este factor en la expresión fenotípica de este carácter (Capítulo 3). En efecto, el 52% de la variabilidad total observada cuando se estudio el tiempo de desarrollo a diferentes

temperaturas se explicó por la interacción Línea x Tratamiento térmico. Más aún, en ese estudio se detectó que la interacción Línea x Sexo solamente pudo explicar el 1% de la varianza total confirmando lo expresado en el párrafo anterior. El significativo aporte del factor ambiental temperatura en la expresión diferencial de los genes heterocrónicos, indicaría que la arquitectura genética de este carácter es plástica. Esto podría interpretarse de la siguiente forma: tanto los participantes (genes) como las relaciones entre los mismos (fundamentalmente epistáticas) cambian con la temperatura generando diferentes conformaciones (plasticidad) en la arquitectura genética. Esta hipótesis podría ser la explicación de la significativa diversidad detectada entre las líneas con sustituciones cromosómicas naturales, donde recordemos el 75% de la variabilidad total correspondió a las diferencias entre líneas (Capítulo 4).

**De la genética cuantitativa a la mendeliana (y viceversa): perspectivas para identificar redes genéticas del tiempo de desarrollo.**

El recorrido que tomamos en la búsqueda de variación natural del tiempo de desarrollo, comenzó con el estudio de la variación entre cromosomas naturales enteros (Capítulo 4) hasta la identificación de diferentes alelos naturales que contribuyen a la diferenciación genética del carácter (Capítulo 5). Resulta paradójico que analizando un rasgo de variación cuantitativa, terminemos aislando bases genéticas involucradas en la expresión del carácter y evaluemos su contribución alélica como si se tratara de un carácter mendeliano. La identificación de un escaso número de bases genéticas asociadas a la variación natural no nos debe hacer olvidar la naturaleza cuantitativa y compleja del carácter estudiado. De los resultados más importantes en la búsqueda de genes involucrados en la expresión del tiempo de

desarrollo (Capítulo 2), se destaca el gran número de genes candidatos o implicados en la arquitectura genética del carácter. Des esta manera, no deberíamos pensar que toda la variación genética natural se deba a la contribución de unos pocos genes. Una forma de retomar un enfoque cuantitativo del análisis es evaluar la variación genética no ya únicamente de un escaso número de *loci* sino de la totalidad de los genes de las vías genéticas de las cuales esos genes forman parte o a nivel del genoma completo. Los estudios de expresión a escala genómica, como los *microarrays*, posibilitan este tipo de abordajes experimentales estudiando la variación de la expresión de una gran proporción del genoma de manera simultánea y bajo condiciones experimentales controladas.

Con la identificación de algunas de las vías que guardan variación natural para el tiempo de desarrollo, será posible analizar cómo cambian los niveles de expresión de los genes implicados en esas vías de señalización celular (como la *Notch signalling pathway* a la cual *mastermind* pertenecen) bajo diferentes regímenes térmicos durante la ontogenia. Sólo a través de este tipo de estudios lograremos identificar las redes genéticas responsables de la variación natural para el tiempo de desarrollo, regresando de esta forma al análisis genómico-cuantitativo que merece este tipo de caracteres, pero con vías candidatas para la evaluación de su variación a nivel de expresión.

**FIN**

# Bibliografía



- Adams y col. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science. 287: 2185-2195.
- Alberch P, Gould SJ, Oster GF, Wake DB. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. Paleobiology, 5: 296-317.
- Alonso JM, Ecker JR. 2006. Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. Nat Rev Genet. 7:524-536.
- Al-Shahrour F, Minguez P, Vaquerizas JM, Conde L, Dopazo J. 2005. BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. Nucleic Acids Res. 33: 460-464.
- Ambros V, Horvitz HR. 1984. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science. 226:409-416.
- Ambros V. 1989. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. Cell. 57:49-57
- Angilletta M, Steury T, Sears M. 2004. Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. Integr Comp Biol. 44: 498-509.
- Anholt RR, Mackay TF. 2004. Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. Nat Rev Genet. 5:838-849.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. 1999. *Notch* signaling: Cell fate control and signal integration in development. Science. 284: 770-776.
- Bagnall DJ, King RW, Whitelam GC, Boylan MT, Wagner D, Quail PH. 1995. Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Physiol. 108:1495-503.
- Barton NH, Keightley PD. 2002. Understanding quantitative genetic variation. Nat Rev Genet. 3:11-21.
- Bateman JM, McNeill H. 2004. Temporal control of differentiation by the insulin receptor/Tor pathway in *Drosophila*. Cell. 119: 87-96.
- Baur B, Raboud C. 1988. Life history of the land snail *Arianta arbustorum* along an altitudinal gradient. J. Anim. Ecol. 57: 71– 87.

- Bhat KM. 1999. Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *BioEssays*. 21:472--485.
- Blanckenhorn WU. 1997. Altitudinal life history variation in the dung flies *Scathophaga stercoraria* and *Sepsis cympea*. *Oecologia*. 109: 342-352.
- Bray SJ. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7: 678-689.
- Brigandt I. 2006. Homology and heterochrony: the evolutionary embryologist Gavin Rylands de Beer (1899-1972). *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 306:317-28
- Caldwell PE, Walkiewicz M, Stern M. 2005. Ras activity in the *Drosophila* prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release. *Curr Biol*, 15: 1785-1795.
- Campbell PM, Harcourt RL, Crone EJ, Claudianos C., Hammock, BD, Russell RJ, Oakeshott JG. 2001. Identification of a juvenile hormone esterase gene by matching its peptide mass fingerprint with a sequence from the *Drosophila* genome project. *Insect Biochem. Molec. Biol*. 31: 513--520.
- Capy P, Pla E, David JR. 1993. Phenotypic and genetic variability of morphometrical traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. I. Geographic variations. *Genetics, selection, evolution. GSE*. 25: 517-536.
- Carbone MA, Jordan KW, Lyman RF, Harbison ST, Leips J, Morgan TJ, DeLuca M, Awadalla P, Mackay TF. 2006. Phenotypic variation and natural selection at *catsup*, a pleiotropic quantitative trait gene in *Drosophila*. *Curr Biol*.16:912-9.
- Carlborg O, Jacobsson L, Ahgren P, Siegel P, Andersson L. 2000. Epistasis and the release of genetic variation during long-term selection. *Nat. Genet*. 38: 418–420.
- Carrasco AE, McGinnis W, Gehring WJ, De Robertis EM. 1984. Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes. *Cell*. 37:409-414.
- Carreira VP, Mensch J, Fanara JJ. 2009. Body size in *Drosophila*: genetic architecture, allometries and sexual dimorphism. *Heredity*.102:246-56.
- Carrol S. 2005. From DNA to diversity. Blackwell Publishing.
- Carrol S. 2005. Endless forms most beautiful. WW Norton & Company.
- Chan SM, Weng AP, Tibshirani R, Aster JC, Utz PJ. 2007. Notch signals positively regulate activity of the mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*.110: 278-286.

- Chippindale AK, Alipaz JA, Chen H, Rose M. 1997. Experimental evolution of accelerated development in *Drosophila*. Developmental speed and larval survival. *Evolution*. 51: 1536-1551.
- Chippindale AK, Alipaz JA, Rose MR. 2004. Experimental evolution of accelerated development in *Drosophila*. 2. Adult fitness and the fast development syndrome. In *Methuselah Flies: A case study in the evolution of aging*. Editado por Rose MR, Passananti HB, Matos M. Singapore: World Scientific. 413-435.
- Clarke A. 1996. The influence of climate change on the distribution and evolution of organisms. En *Animals and temperature*. Editado por Johnson, Benet. Cambridge University Press. 377-408
- Clarke JM, Maynard Smith J, Sondhi KC. 1961. Asymmetrical response to selection for rate of development in *Drosophila subobscura*. *Genet. Res.* 2:70-81.
- Coleman KG, Poole SJ, Weir MP, Soeller WC, Kornberg T. 1987. The invected gene of *Drosophila*: sequence analysis and expression studies reveal a close kinship to the engrailed gene. *Genes Dev.* 1: 19-28.
- Collinge JE, Hoffmann AA, McKechnie SW. 2006. Altitudinal patterns for latitudinally varying traits and polymorphic markers in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *J Evol Biol.* 19:473-482.
- Colombani J, Bianchini L, Layalle S, Pondeville E, Dauphin-Villemant C, Antoniewski C, Carré C, Noselli S, Léopold P. 2005. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science*, 310: 667-670.
- Cortese MD, Norry FM, Piccinali R, Hasson E. 2002. Direct and correlated responses to artificial *selection* on developmental time and wing length in *Drosophila buzzatii*. 56: 2541-2547.
- David JR, Capy P. 1988. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. *Trends Genet.* 4:106-11
- David JRB, Moreteau JP, Gauthier G, Pétavy A, Stockel, E, Imasheva R. 1994. Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in *Drosophila melanogaster*: an isofemale line analysis. *Genetics, selection, evolution: GSE.* 26:229-251.
- Davidowitz G, Nijhout F. 2004. The physiological basis of reaction norms: the interaction among growth rate, the duration of growth and body size. *Integr Comp Biol.* 44: 443-449.

- De Beer. 1930. Embryos and ancestros.
- De Jong G, Bochdanovits Z. 2003. Latitudinal clines in *Drosophila melanogaster*: body size, allozyme frequencies, and the insulin-signalling pathway. *Journal of Genetics*. 82: 207-223.
- De Moed GH, Kruitwagen CLJJ, De Jong G, Scharloo W. 1999. Critical weight for the induction of pupariation in *Drosophila melanogaster*: genetic and environmental variation. *Journal of Evolutionary Biology*.12: 852–858.
- Demuth JP and MJ Wade. 2006. Experimental methods for measuring gene interactions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37:289–316.
- De Robertis EM. 2008. Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell*. 132:185-95
- *Drosophila* 12 Genomes Consortium. 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*. 450:203-218.
- Edgar B. 2006. How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat Rev Genet*. 7: 907-916.
- Emlen DJ, Allen CE. 2004. Genotype to Phenotype: physiological control of trait size and scaling in insects. *Int Comp Biol*. 43:617–634.
- Endler JA. 1977. *Geographic Variation, Speciation and Clines*. Princeton University Press
- Endler JA.1986. *Natural selection in the wild*. Princeton University Press.
- Falconer DS, Mackay TFC.1996. *Introduction to quantitative genetics*. 4<sup>th</sup> ed. Longman, Essex, England.
- Fanara JJ, Folguera G, Iriarte PF, Mensch J, Hasson E. 2006.Genotype by environment interactions in viability and developmental time in populations of cactophilic *Drosophila*. *J Evol Biol*.19: 900-908.
- Fanara JJ, Robinson KO, Rollmann SM, Anholt RR, Mackay TF. 2002 Vanaso is a candidate quantitative trait gene for *Drosophila* olfactory behavior. *Genetics*.162:1321-1328.
- Fanara JJ, Mensch J, Folguera G, Hasson E. 2004. Developmental time and thorax length differences between the cactophilic species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* reared in different natural hosts. *Evolutionary Ecology*. 18:203-214
- Flatt T, Tu MP, Tatar M. 2005. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bioessays*. 999-1010.

- Flatt T. 2004. Assessing natural variation in genes affecting *Drosophila* lifespan. *Mech Ageing Dev.* 125:155-159.
- Folguera G, Ceballos S, Spezzi L, Fanara JJ, Hasson E. 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.
- Fordyce JA. 2006. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J Exp Biol.* 209: 2377-2383.
- Frazier MR, Woods HA, Harrison JF. 2001. Interactive effects of rearing temperature and oxygen on the development of *Drosophila melanogaster*. *Physiol Biochem Zool.* 74:641-50.
- Fryer CF, Lamar E, Turbachova I, Kintner C, Jones KA. 2002 Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the *Notch* enhancer complex. *Genes Dev.* 16:1397-1411.
- Futuyma, D.J. 1997. *Evolutionary Biology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. 2005. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature.* 437: 270-274.
- Garstang W.. 1922. The theory of recapitulation: a critical restatement of the Biogenetic Law. *Proc. Linn. Soc. Lond. Zool.* 35: 81-101.
- Gibson G and I Dworkin. 2004. Uncovering cryptic genetic variation. *Nature Review Genetics* 5:681-690.
- Gilbert SF. 2006. *Developmental Biology*, Eighth Edition. Sinauer Associates, Inc.
- Gilchrist GW, Huey RB, Partridge L. 1997. Thermal sensitivity of *Drosophila melanogaster*: evolutionary responses of adults and eggs to laboratory natural selection at different temperatures. *Physiol Zool.* 70:403-414.
- Gompel N and SB Carroll. 2003. Genetics mechanisms and constraints governing the evolution of correlated trait in drosophilid flies. *Nature* 424:931-935.
- Gotthard, K, Nylin, S. 1995. Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: a selective review of plasticity in animal morphology and life history. *Oikos.* 74: 3-17.
- Gould SJ. 1977. *Ontogeny and phylogeny*. Harvard University Press.

- Guarneri AA, Pinto CJ, Schofield CJ, Steindel M. 1998. Population biology of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 93:273-276.
- Gustavson, E., Goldsborough, A.S., Ali, Z., Kornberg, T.B. 1996. The *Drosophila* engrailed and invected genes: Partners in regulation, expression and function. Genetics. 142:893-906.
- Haeckel E. 1905. The evolution of man. Watts & company
- Hallas R, Schiffer M, Hoffmann AA. 2002. Clinal variation in *Drosophila serrata* for stress resistance and body size. Genetical research. 79:141-148.
- Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, Tao C, Jafar-Nejad H, Halder G. 2006. The tumour-suppressor genes *NF2/Merlin* and *Expanded* act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. Nat Cell Biol. 8: 27-36.
- Hansen TF. 2006. The evolution of genetic architecture. Annual Review of Ecology and Systematics. 37:123 - 157
- Harbison ST, Yamamoto AH, Fanara JJ, Norga KK, Mackay TF. 2004. Quantitative trait loci affecting starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. Genetics.166:1807-1823.
- Harbison ST, Carbone MA, Ayroles JF, Stone EA, Lyman RF and Mackay TFC. 2009. Co-regulated transcriptional networks contribute to natural genetic variation in *Drosophila* sleep. Nature Genetics 41:371 - 375
- Hariharan IK, Bilder D. 2006. Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*. Annu Rev Genet. 40:335-361.
- Heinrich, B. 1981. Insect thermoregulation. New York: Wiley
- Helms W, Lee H, Ammerman M, Parks AL, Muskavitch MA, Yedvobnick B. 1999. Engineered truncations in the *Drosophila* mastermind protein disrupt Notch pathway function. Dev Biol. 215: 358-374.
- Hoffman AA, Parson PA. 1991. Evolutionary Genetics and environmental Stress. Oxford University Press.
- Hoffmann AA, Sorensen JG, Loeschke V. 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. J. Thermal Biol. 28:175-216.
- Hoffmann AA, Weeks AR. 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. 129:133-47.

- Houle D. 1992. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics*. 130:195-204.
- Huey RB, Gilchrist GW, Carlson ML, Berrigan D, Serra L. 2000. Rapid evolution of a Geographic Cline in Size in an Introduced Fly. *Science*, 287: 308-309.
- James AC, Partridge L. 1995. Thermal evolution of rate of larval development in *Drosophila melanogaster* in laboratory and field populations. *Journal of Evolutionary Biology*. 8: 315-330.
- James AC, Azevedo R, Partridge L. 1995. Cellular basis and developmental timing in size cline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 140: 659-666.
- Jordan KW, Morgan TJ, Mackay TF. 2006. Quantitative trait loci for locomotor behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 174:271-84.
- Jünger MA, Rintelen F, Stocker H, Wasserman JD, Végh M, Radimerski T, Greenberg ME, Hafen E. 2003. The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *J Biol*. 2: 20.
- Kasap OE, Alten B. 2005. Laboratory estimation of degree-day developmental requirements of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *J Vector Ecol*. 30:328-33.
- Kause A, Morin J. 2001. Seasonality and genetic architecture of development time and body size of the birch feeding sawfly *Priophorus pallipes*. *Genet. Res. Camb*. 78: 31-40.
- Keightley PD, Ohnishi O. 1998. EMS-induced polygenic mutation rates for nine quantitative characters in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 148:753-66.
- Klingenberg CP. 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 73:79-123
- Ko WY, David RM, Akashi H. 2003. Molecular phylogeny of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *J Mol Evol* . 57:562-73.
- Kreitman M. 1983. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 304:412-417.

- Kumar S, Vaze KM, Kumar D, Sharma VK. 2006. Selection for early and late adult emergence alters the rate of pre-adult development in *Drosophila melanogaster*. *BMC Dev Biol*: 6:57.
- Kyriacou CP, Oldroyd M, Wood J, Sharp M, Hill M. 1990. Clock mutations alter developmental timing in *Drosophila*. *Heredity*. 64: 395-401.
- Lai EC. 2004. *Notch* signalling: control of cell communication and cell fate. *Development*. 131: 965-973.
- Laurila A, Karttunen S, Merila J. 2002. Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution* 56: 617-627.
- Le Rouzic A, Carlborg O. 2008. Evolutionary potential of hidden genetic variation. *Trends Ecol Evol*, 23: 33-37.
- Lehmann, R., Jimenez, F., Dietrich, U., Campos-Ortega, J.A., 1983. On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch. Dev. Biol.* 192, 62–74.
- Leips J, Mackay TF. 2000. Quantitative trait loci for life span in *Drosophila melanogaster*: interactions with genetic background and larval density. *Genetics*. 155: 1773-1788.
- Leroi AM, Bartke A, De Benedictis G, Franceschi C, Gartner A, Gonos ES, Fedei ME, Kivisild T, Lee S, Kartaf-Ozer N, Schumacher M, Sikora E, Slagboom E, Tatar M, Yashin AI, Vijg J, Zwaan B. 2005. What evidence is there for the existence of individual genes with antagonistic pleiotropic effects? *Mech Ageing Dev*. 126:421-9.
- Lewontin RC, Hubby JL. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*. 54:596-609
- Li T, White KP. 2003. Tissue-specific gene expression and ecdysone-regulated genomic networks in *Drosophila*. *Developmental Cell*. 5: 59-72.
- Li W .1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates
- Loeschcke VRA, Krebs J, Dahlggaard P Michalak. 1997. High-temperature stress and the evolution of thermal resistance in *Drosophila*. En Bijlsma, Loeschcke (ed) *Environmental stress, Adaptation and evolution*. Birkhäuser-Verlag, Basel.



- Lukacsovich T, Asztalos Z, Awano W, Baba K, Kondo S, Niwa S, Yamamoto D. 2001. Dual-tagging gene trap of novel genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 157: 727-742.
- Lynch M, Walsh JB. 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Mackay TF, Hackett JB, Lyman RF, Wayne ML, Anholt RR. 1996. Quantitative genetic variation of odor-guided behavior in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 144:727-735.
- Mackay TFC, Anholt R. 2007. Ain't misbehavin'? Genotype–environment interactions and the genetics of behavior. *Trends Genet*. 23: 311-314.
- Mackay TFC. 2004. The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*. 14: 253-257.
- Mackay TFC. 2001. Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics* 2: 11-20.
- Mackay TF. 2009. The genetic architecture of complex behaviors: Lessons from *Drosophila*. *Genetica* DOI 10.1007/s10709-008-9310-6
- Magwire MM. 2007. *Mutations Increasing Drosophila melanogaster*
- Life Span. Tesis Doctoral.
- Markow T, O'Grady P: 2005. *Drosophila: a guide to species identification and use*. Academic Press.
- Markow TA, O'Grady PM. 2007. *Drosophila* biology in the genomic age. *Genetics*. 177:1269-76.
- Matsui T; Yamamoto T, Wyder S, Zdobnov EM, Kadowaki T. 2009 Expression profiles of urbilaterian genes uniquely shared between honey bee and vertebrates. *BMC Genomics*. 10:17
- Mauricio R. 2001. Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nat Rev Genet*. 2:370-381.
- Masel J. 2006. Cryptic genetic variation is enriched for potential adaptations. *Genetics* 172:1985–1991
- McClatchey A, Giovannini M. 2005. Membrane organization and tumorigenesis: the NF2 tumor suppressor, Merlin. *Genes Dev*. 19:2265-2277.
- Mirth C, Truman JW, Riddiford LM. 2005. The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*, 15: 1796-1807.

- Moss EG. 2007. Heterochronic genes and the nature of developmental time. *Current Biology*. 17: 425-434.
- Mozley D, Thomas B. 1995. Developmental and photobiological factors affecting photoperiodic induction in *Arabidopsis thaliana Heynh. Landsberg erecta* . *Journal of Experimental Botany*.46:173-179.
- Myers EM, Yu J, Sehgal A. 2003. Circadian control of eclosion: interaction between a central and peripheral clock in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*. 13:526-33.
- Navas CA. 2003. Anfibios y lagartos de alta montaña: ecofisiología evolutiva y límites altitudinales. En Bozinovic, F. (ed) *Fisiología Ecológica & Evolutiva*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile.
- Nijhout HF. 2003. The control of growth. *Development*. 130: 5863-5867.
- Nijhout HF. 1994. *Insect hormones*. Princeton University Press.
- Noda I. 1960. The emergence of winged viviparous female in aphids. VI. Difference in the rate of development between the winged and the unwinged forms. *Jap. J. Ecol*. 10: 97-102.
- Nunney L. 1996, The response to selection for fast larval development in *Drosophila melanogaster* and its effect on adult weight: an example of a fitness trade-off. *Evolution*. 50:1193-1204.
- Oakeshott JG, Gibson JB, Anderson PR, Knibb WR, Anderson DG, Chambers GK. 1982. Alcohol dehydrogenase and glycerol -3-phosphate dehydrogenase clines in *Drosophila melanogaster* on different continents. *Evolution* 36: 86-96.
- Oakeshott JG, Saad M, Game AY, Healy MJ. 1994. Causes and consequences of esterase 6 enzyme activity variation in pre-adult *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. 73:160-169.
- Okada T, You L, Giancotti F. 2007. Shedding light on *Merlin*'s wizardry. *Trends Cell Biol*. 17: 222-229.
- Oudman L, Van Delden W, Kamping A, Bijlsma R. 1991. Polymorphism at the *Adh* and *alpha Gpdh* loci in *Drosophila melanogaster*: effects of rearing temperature on developmental rate, body weight, and some biochemical parameters. *Heredity*. 67:103-15
- Oyama T, Harigaya K, Muradil A, Hozumi K, Habu S, Oguro H, Iwama A, Matsuno K, Sakamoto R, Sato M, Yoshida N, Kitagawa M. 2007. Mastermind-1 is required for *Notch* signal-dependent steps in lymphocyte development in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 104: 9764-9769.

- Paaby AB, Schmidt PS. 2008. Functional significance of allelic variation at methuselah, an aging gene in *Drosophila*. PLoS ONE. 3:e1987
- Palaima A. 2007. The fitness cost of generalization: Present limitations and future possible solutions. Biological Journal of the Linnean Society 90:583-590
- Paranjpe D, Sharma VK. 2005. Evolution of temporal order in living organisms. J Circadian Rhythms. 3: 7.
- Paranjpe DA, Anitha D, Chandrashekar MK, Joshi A, Sharma VK. 2005. Possible role of eclosion rhythm in mediating the effects of light-dark environments on pre-adult development in *Drosophila melanogaster*. BMC Developmental Biology. 5: 5.
- Partridge L and NH Barton. 2000. Evolving evolvability. Nature 407:457-458.
- Partridge L, Barrie B, Fowler K, French V. 1994. Thermal Evolution of pre-adult life history traits in *Drosophila melanogaster*. Journal of Evolutionary Biology. 7: 645-663.
- Pasyukova EG, Vieira C, Mackay TF. 2000. Deficiency mapping of quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 156:1129-1146.
- Pétavy GJR, Gibert D, Moreteau D. 2001. Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes. Journal of Thermal Biology, 26: 29-39.
- Petcherski, AG, Kimble J. 2000. Mastermind is a putative activator for Notch. Curr Biol. 10: 471-473.
- Pigliucci M. 2008. Is evolvability evolvable. Nature Review Genetics 9:75-82.
- Prasad NG, Shakarad M, Anitha D, Rajamani M, Joshi A. 2001. Correlated responses to selection for faster development and early reproduction in *Drosophila*: the evolution of larval traits. *Evolution*, 55: 1363-1372.
- Promislow DE. 2004. Protein networks, pleiotropy and the evolution of senescence. Proc. Biol. Sci. 271: 1225-1234.
- Reaume CJ, Sokolowski MB. 2006. The nature of *Drosophila melanogaster*. Curr Biol. 16:R623-628.
- Robertson A. 1959. The sampling variance of the genetic correlation coefficient. Biometrics. 15: 469-485.

- Rockman, M.V. 2008. Reverse engineering the genotype-phenotype map with natural genetic variation. *Nature*. 456:738-744
- Roff DA. 1992. *Evolutionary Quantitative Genetics*. Chapman and Hall. New York.
- Rueda LM, Patel KJ, Axtell RC, Stinner RE. 1990. Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 5:892-898.
- Sambandan D, Yamamoto A, Fanara JJ, Mackay TF, Anholt R. 2006. Dynamic genetic interactions determine odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 174: 1349-1363.
- Sambandan D, MA Carbone, RRH Anholt, TFC Mackay. 2008. Phenotypic plasticity and genotype by environment interaction for olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 179:1079-1088.
- Sang JH, Clayton GA. 1957. Selection for larval development time in *Drosophila*. *J. Hered.* 48:265-270.
- Schlichting C, Pigliucci M. 1998. *Phenotypic Evolution: a reaction norm perspective*. Sinauer Associates.
- Schmid AT, Tinley TL, Yedvobnick B. 1996. Transcription of the neurogenic gene mastermind during *Drosophila* development. *J Exp Zool*. 274:207-20.
- Schultz TF, Kay SA. 2003. Circadian clocks in daily and seasonal control of development. *Science*. 301:326-328
- Sharma VK. 2003. Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiol Int*. 20:901-919.
- Shingleton AW, Das J, Vinicius L, Stern DL. 2005. The temporal requirements for insulin signaling during development in *Drosophila*. *Plos Biol*, 3: e 289.
- Simmonds, AJ, Brook WJ, Cohen SM, Bell JB. 1995. Distinguishable functions for engrailed and invected in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature*. 376: 424--427.
- Smith KK. 2003. Time's arrow: heterochrony and the evolution of development. *Int J Dev Biol*. 47: 613-621.
- Spradling AC, Stern DM, Kiss I, Roote J, Laverly T, Rubin GM. 1995. Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci*. 92:10824-10830.
- Stearns SC. 2000. Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften*. 87:476-86.

- Stearns SC 1992. The evolution of Life Histories. Oxford University Press.
- Stern DL. 2000. Evolutionary developmental biology and the problem of variation. *Evolution*. 54:1079-1091.
- Stieper BC, Kupershtok M, Driscoll MV, Shingleton AW. 2008. Imaginal discs regulate developmental timing in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 321:18-26.
- Stillwell RC, Fox CW. 2005. Complex patterns of phenotypic plasticity: interactive effects of temperature during rearing and oviposition. *Ecology*, 86: 924-934.
- Sucena E, I Delon, I Jones, F Payres, D Sterns. 2003. Regulatory evolution of shavenbaby/ovo underlies multiple cases of morphological parallelism. *Nature* 424: 935-938.
- Visscher PM, WG Hill, NR Wray. 2008. Heritability in the genomics era: concepts and misconceptions. *Nature Review Genetics* 9:255-266
- Taveras R, Hilje L; Hanson P, Mexzón R, Carballo M and Navarro C. 2004. Population trends and damage patterns of *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) in a mahogany stand, in Turrialba, Costa Rica. *Agricultural and Forest Entomology*. 6:89-98.
- The Gene Ontology Consortium. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genet*. 25:25-29.
- Trotta V, Calboli FC, Ziosi M, Guerra D, Pezzoli MC, David JR, Cavicchi S: 2006. Thermal plasticity in *Drosophila melanogaster*: a comparison of geographic populations. *BMC Evol Biol*. 6: 67.
- Truman JW, Riddiford LM. 2002. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects *Annu Rev Entomol*. 47:467-500
- Ungerer MC, Halldorsdottir SS, Purugganan MD, Mackay TF. 2003. Genotype-environment interactions at quantitative trait loci affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 165:353-365.
- Urbach R, Technau GM. 2004. Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *BioEssays*. 26:739-751.
- Van 't Land J, Van Putten WF, Villarroel H, Kamping A, Van Delden W. 2000. Latitudinal variation for two enzyme loci and an inversion polymorphism in *Drosophila melanogaster* from Central and South America. *Evolution*. 54:201-209.

- Vervoort M. 2002. Functional evolution of Hox proteins in arthropods. *Bioessays*. 9:775-779.
- Vieira, C., Pasyukova EG, ZengA, HackettJB, Lyman RF, Mackay TF. 2000. Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 154: 213-227.
- Weatherbee SD, Halder G, Kim J, Hudson A, Carroll S. 1998. Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes Dev*. 12:1474-1482.
- Weatherbee SD, Nijhout HF, Grunert LW, Halder G, Galant R, Selegue J, Carroll S. 1999. Ultrabithorax function in butterfly wings and the evolution of insect wing patterns. *Curr Biol*. 9:109-15.
- West-Eberhard MJ. 2003. Developmental plasticity and evolution. Oxford University Press.
- Yalcin B, Willis-Owen SA, Fullerton J, Meesaq A, Deacon RM, Rawlins JN, Copley RR, Morris AP, Flint J, Mott R. 2004 Genetic dissection of a behavioural quantitative trait locus shows that Rgs2 modulates anxiety in mice. *Nat Genet*. 36:1197-1202.
- Yang Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci*..13:555-556.
- Zwaan BJ, Bijlma R, Hoekstra RF. 1995. Artificial selection for development time in *Drosophila melanogaster* in relation to the evolution of aging: direct and correlated responses. *Evolution*. 49: 635-648.