

Tesis Doctoral

Resistencia a la inanición en *Drosophila melanogaster*: variación genética natural y su relación con la longevidad y las reservas energéticas

Goenaga, Julieta

2010

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Goenaga, Julieta. (2010). Resistencia a la inanición en *Drosophila melanogaster*: variación genética natural y su relación con la longevidad y las reservas energéticas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Goenaga, Julieta. "Resistencia a la inanición en *Drosophila melanogaster*: variación genética natural y su relación con la longevidad y las reservas energéticas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

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.

***Resistencia a la inanición en *Drosophila melanogaster*:
variación genética natural y su relación con la
longevidad y las reservas energéticas***

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

JULIETA GOENAGA

Director de Tesis: Dr. Esteban Hasson
Director Asistente: Dr. Juan José Fanara
Consejero de Estudio: Dr. Esteban Hasson

Buenos Aires, 2010

***Resistencia a la inanición en *Drosophila melanogaster*:
variación genética natural y su relación con la longevidad y las
reservas energéticas***

Resumen

En la naturaleza los organismos están expuestos a un ambiente continuamente cambiante que los fuerza a desarrollar adaptaciones que alivian las consecuencias del estrés ambiental. La escasez de alimentos es un factor de estrés que afecta a todos los organismos en su hábitat natural, de modo que es esperable que desarrollen adaptaciones que maximicen la resistencia a la inanición (RI). El potencial evolutivo de cualquier carácter está determinado por su arquitectura genética. En el presente trabajo estudiamos la arquitectura genética de la RI en poblaciones naturales de *Drosophila melanogaster*. En primer lugar analizamos la variación genética a diferentes escalas geográficas en aislamientos derivadas de poblaciones naturales. A continuación, examinamos la contribución del cromosoma 2 (que representa cerca del 40% total del genoma) a la variación fenotípica de la RI, con el fin de establecer qué proporción de la variación está regulada por esta región del genoma. Posteriormente, mediante pruebas de complementación genética identificamos variación alélica natural en genes implicados en la RI. Además, estudiamos las asociaciones entre la RI y otros caracteres, la longevidad (L) y el contenido de lípidos (CL). Los principales resultados muestran que las poblaciones naturales de *D. melanogaster* cuentan con variación genética para la RI y que la variación interpoblacional es menor que la intrapoblacional. Asimismo, revelan que una fracción importante de la variación genética es dependiente del sexo. En general, la RI muestra un dimorfismo sexual (DS) a favor de las hembras, sin embargo la magnitud del DS varía entre los genotipos analizados. Además, demostramos que el cromosoma 2 explica una fracción importante de la variación fenotípica en la RI. Finalmente, los ensayos de complementación genética indicaron que 5 de los 6 genes implicados en la RI (*Rya-44F*, *crol*, *l(2)rG270*, *l(2)k17002* y *l(2)k00611*) contribuyen a su variación natural. Los resultados de los estudios de asociación revelaron que la variación en el CL es un importante determinante de la RI. En conclusión, la RI mantiene un alto potencial evolutivo en poblaciones naturales y una fracción importante de su variación genética se atribuye a factores localizados en el cromosoma 2. Asimismo, genes que regulan el metabolismo, la reproducción y la asignación de los recursos energéticos son responsables de la variación natural en la RI.

Palabras claves: resistencia a la inanición, variación genética natural, dimorfismo sexual, *Drosophila melanogaster*, asociaciones genéticas, variación alélica natural.

Starvation resistance in *Drosophila melanogaster*: natural genetic variation and its relation with longevity and energy reserves

Summary

In nature, organisms are often exposed to a wide range of fluctuating environmental conditions that force the evolution of specific adaptations to alleviate the consequences of environmental stress. Food shortage is a stress factor that affects all organisms in their natural habitat. Therefore, individuals need to develop adaptations to tolerate food shortage or starvation resistance (SR). The genetic architecture of a trait is essential because it describes and determines the variational properties of traits, and thus their potential to evolve. In this Thesis, we studied the genetic architecture of SR in natural populations of *Drosophila melanogaster*. First, we analyzed genetic variation at different geographic scales in sets of lines derived from natural populations. Then, we examined the contribution of chromosome 2 (which accounts for approximately 40% of the whole genome) to total phenotypic variation in SR. Finally, we performed genetic complementation tests to identify genes with natural variation for SR. In addition; we studied the relationship between SR and longevity (L) and lipid content (CL). Our results showed that natural populations of *D. melanogaster* harbor substantial amounts of genetic variation for SR and that the contribution of among population variation explains a smaller amount of total trait variation than within population variation. We also detected that an important fraction of genetic variation is sex-specific. Moreover, females tended to outlive males, though the SD magnitude varied among genotypes. An important fraction of genetic variation could be accounted by factors located in chromosome 2. Finally, complementation genetic tests indicated that 5 out of 6 genes that affect SR (*Rya-44F*, *crol*, *l(2)rG270*, *l(2)k17002* y *l(2)k00611*) contribute to natural variation. In addition, a statistically significant relationship between SR and LC was found in both sexes. In conclusion, SR has evolutionary potential in nature, and some chromosome 2 loci can account for a relevant fraction of variation. The genes involved in natural variation of SR regulate essential pathways related to metabolism, reproduction and the mobilization of energy reserves.

Key words: starvation resistance, genetic variation, sexual dimorphism, genetic association, *Drosophila melanogaster*, natural allelic variation

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Establecimiento y mantenimiento de las líneas experimentales.....	22
3.1.1. Recolección de individuos <i>D. melanogaster</i> en los sitio de muestreo.....	22
3.1.2. Establecimiento de las isolíneas de origen natural.....	24
3.1.3. Establecimiento de líneas isogénicas de sustitución cromosómica.....	24
3.1.4. Mantenimiento de las diferentes líneas de trabajo.....	27
3.2. Ensayos fenotípicos.....	27
3.2.1. Diseño experimental.....	27
3.2.2. Resistencia a la inanición.....	28
3.2.3. Longevidad.....	29
3.2.4. Contenido de lípidos.....	29
3.3. Análisis estadísticos.....	30
3.3.1. Análisis de varianza.....	30
3.3.2. Estimación de parámetros genéticos cuantitativos.....	32
3.3.3. Análisis de regresión múltiple lineal.....	33
3.3.4. Análisis de correlaciones entre caracteres.....	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. Variación genética natural en la resistencia a la inanición a diferentes escalas geográficas en <i>D. melanogaster</i>	35
4.1.1. Introducción.....	36
4.1.2. Resultados.....	37
4.1.3. Discusión.....	47
4.2. Variación en la resistencia a la inanición y su relación con la longevidad y el contenido de lípidos en <i>isolíneas</i> derivadas de poblaciones naturales de <i>D. melanogaster</i>	50
4.2.1. Introducción.....	51
4.2.2. Resultados.....	53
4.2.2.1. Resistencia a la inanición.....	53
4.2.2.2. Longevidad.....	62
4.2.2.3. Contenido de Lípidos.....	67
4.2.2.4. Correlaciones entre caracteres.....	71
4.2.3. Discusión.....	73
4.3. Variación en la resistencia a la inanición y su relación con la longevidad en <i>líneas de sustitución para el cromosoma 2</i> derivadas de poblaciones naturales de <i>D. melanogaster</i>	80

4.3.1. Introducción.....	81
4.3.2. Resultados.....	82
4.3.2.1 Resistencia a la inanición.....	82
4.3.2.2. Longevidad.....	91
4.3.2.3. Correlaciones entre caracteres.....	96
4.3.3. Discusión.....	98
4.4. Variación alélica natural en genes asociados a la expresión de la resistencia a la inanición en poblaciones de <i>D. melanogaster</i>	102
4.4.1. Introducción.....	103
4.4.2. Materiales y Métodos.....	106
4.4.3. Resultados.....	111
4.4.4. Discusión.....	124
5. CONCLUSIÓN.....	129
6. BIBLIOGRAFÍA.....	142
7 ANEXO.....	160

1

INTRODUCCIÓN

1.1. Los organismos y el estrés ambiental

La distribución geográfica de cualquier especie tanto vegetal como animal depende de la distribución de los hábitats en los que las condiciones bióticas y abióticas son propicias para su desarrollo. El rango de distribución generalmente refleja la tolerancia de los individuos a los factores abióticos, y además está determinado por barreras geográficas naturales, la capacidad de dispersión de los organismos y la interacción con otras especies, incluido el ser humano. En la naturaleza, los organismos están expuestos a ambientes que cambia continuamente a lo largo de gradientes espacio-temporales, y muchas veces deben afrontar condiciones ambientales potencialmente estresantes que reducen su aptitud biológica (*fitness*). **Las variables ambientales que someten a los organismos a condiciones de estrés se denominan factores de estrés** (Koehn & Bayne, 1989).

Los organismos desarrollan cambios morfológicos y despliegan una amplia variedad de mecanismos fisiológicos y comportamentales que les permiten aliviar las consecuencias del estrés ambiental (Hoffmann & Parsons, 1991; Randall *et al.*, 1997). Los factores de estrés ambiental, entre los que se encuentran las temperaturas extremas, la escasez de humedad o la falta de fuentes de alimento (entre otras), son potentes agentes selectivos. Por estas razones, no es sorprendente que los biólogos evolutivos estén interesados en entender las bases genéticas y moleculares de la adaptación a diferentes tipos de estrés ambiental.

Las especies del género *Drosophila* (moscas de la fruta o del vinagre) han sido ampliamente utilizadas como modelo para el estudio de la evolución de los mecanismos de respuesta al estrés ambiental. Las más de 2000 especies de *Drosophila* exhiben patrones de distribución geográfica diversos que reflejan la distribución de los recursos específicos que explotan, así como sus rangos de tolerancia eco-fisiológica (Kellermann *et al.*, 2009). La Figura 1.1 es un resumen que ilustra los diferentes tipos de recursos utilizados por las especies de *Drosophila*. La mayoría de estas especies pertenecen a uno de los dos subgéneros principales, *Sophophora* y *Drosophila* (Markow & O'Grady, 2006). Algunas de las especies del subgénero *Sophophora* se han convertido en comensales del hombre y han alcanzado una distribución casi cosmopolita, mientras que otras especies tienen una distribución más restringida (Markow & O'Grady, 2006). Tanto las especies casi cosmopolitas como las de distribución más restringida viven en ambientes tropicales y templados donde se

alimentan y crían en los frutos en descomposición de una amplia gama de especies vegetales (Markow & O'Grady, 2007, 2008). A su vez, las del subgénero *Drosophila* están asociadas a las necrosis de tejidos vegetales y habitan una amplia diversidad de ambientes, desde xéricos donde los sustratos de cría son cactáceas hasta ambientes másicos donde explotan otros tipos de recursos como por ejemplo hongos, flores y hojas; desplegando sofisticadas especializaciones (Markow & O'Grady, 2006, 2008). Dependiendo del recurso que utilizan y del ambiente abiótico en el cual desarrollan su ciclo de vida, en las diferentes especies han evolucionado mecanismos que les permiten evitar o atenuar los efectos perjudiciales de los principales factores de estrés ambiental como la desecación, la exposición a temperaturas extremas y la inanición.

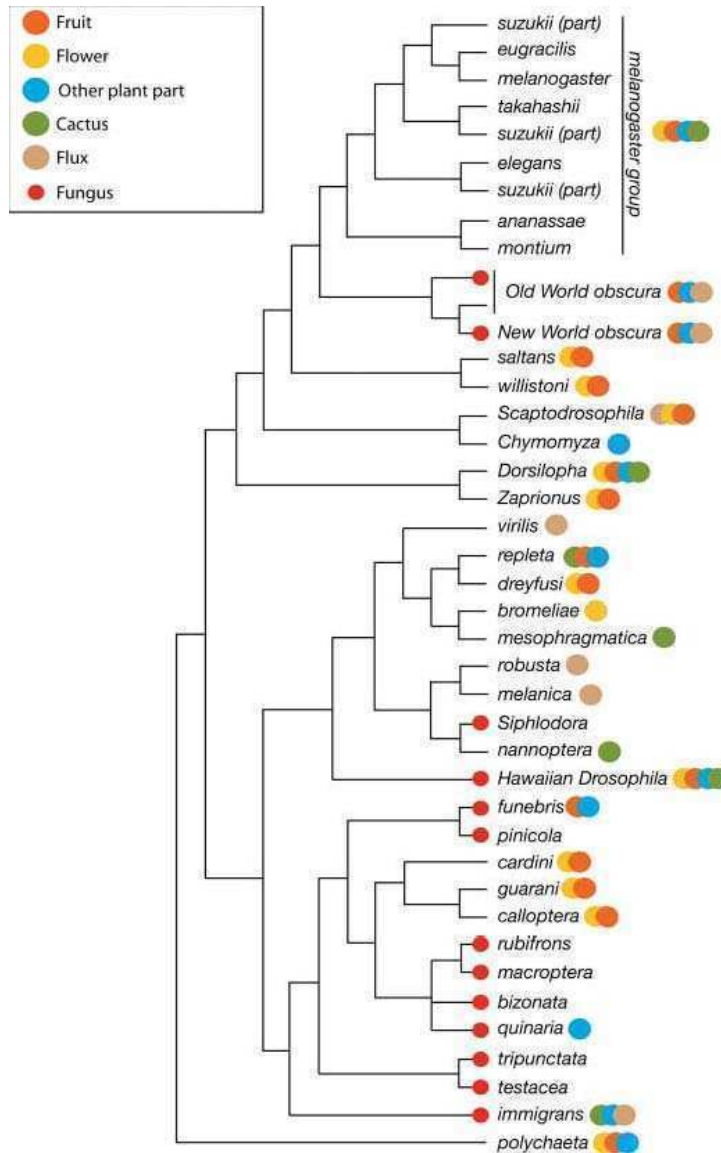


Figura 1.1. Tipos de recursos explotados por 40 especies de *Drosophila* (Modificada de Markow & O'Grady, 2008)

Tales mecanismos engloban procesos fisiológicos y comportamentales dependientes del hábitat. Por ejemplo, el mayor desafío ambiental que deben enfrentar las especies que viven en desiertos es la escasez de agua y la exposición a temperaturas extremas. En estos casos los mecanismos fisiológicos que permiten mantener el balance hídrico son: 1) el incremento de la cantidad de agua corporal, 2) la reducción de la pérdida de

agua y 3) el aumento de la tolerancia a la pérdida de agua (Gibbs & Matzkin, 2001). De ellos, el mecanismo principal es la reducción de la pérdida de agua (Gibbs & Matzkin, 2001, Matzkin *et al.*, 2009a). A su vez, las especies que enfrentan temperaturas altas muestran un patrón de actividad locomotora bifásico, es decir, dos picos de actividad, uno matutino y otro vespertino, y durante las horas en que la temperatura es extrema las moscas disminuyen considerablemente su actividad (Joshi, 1999; Klarsfeld *et al.*, 2003). En cuanto a los mecanismos fisiológicos/moleculares, que les permiten evitar el daño celular por exposición a altas temperaturas, se encuentra la inducción de la expresión de proteínas chaperonas de resistencia al choque térmico de la familia Hsp (por su denominación en inglés: *Heat Shock Proteins*) (Lindquist, 1986; Morimoto, 1993).

Las especies que habitan en áreas templadas, por otro lado, deben sobrevivir a las bajas temperaturas invernales, las cuales están acompañadas por una disminución en la cantidad de horas de luz solar. Estos factores ambientales disparan un reloj natural endógeno en los organismos que regula ritmos anuales, y que se manifiesta en diferentes aspectos comportamentales y fisiológicos que mejoran su adaptación a las condiciones estacionales (Morgan, 2004). En insectos, uno de los ritmos estacionales es la entrada en un período de inactividad denominado “síndrome de diapausa”, que está regulado por control neuroendocrino (Tauber *et al.*, 1986; Saunders *et al.*, 1989; Tatar & Yin, 2001; Tatar *et al.*, 2001). La diapausa es un mecanismo fisiológico evolutivamente conservado que se expresa con mayor frecuencia en insectos que habitan regiones templadas. Este, es un estado de resistencia que disminuye las consecuencias del estrés ambiental durante la época invernal, incrementando las posibilidades de supervivencia de los individuos (Tauber *et al.*, 1986; Tatar & Yin, 2001; Schmidt *et al.*, 2005a, b). En *Drosophila*, la expresión de la diapausa se manifiesta en adultos y es un estado de quiescencia reproductiva en el que se detienen la oogenesis, la vitelogénesis, la actividad de las glándulas accesorias masculinas y el cortejo (Tatar & Yin, 2001). La expresión del síndrome de diapausa es una clásica adaptación a la estacionalidad ambiental y está acompañado por una extensión de la longevidad, una elevada resistencia a la inanición, a la desecación y a las bajas temperaturas (Tatar *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2005a, b; Schmidt & Paaby, 2008, Hahn & Denlinger, 2007).

Los insectos enfrentan las bajas temperaturas mediante la estimulación de la expresión de compuestos anti-congelantes o crioprotectores como el glicerol, los azúcares y los alcoholes polivalentes (Kelty & Lee, 1999). En *Drosophila*, las bajas

temperaturas inducen en adultos un coma por frío (pérdida de la capacidad locomotora por alteración de la función neuromuscular), que se revierte cuando las temperaturas aumentan. El tiempo que tardan las diferentes especies de *Drosophila* en recuperarse del coma inducido por frío depende del tiempo de exposición a las bajas temperaturas y del hábitat de origen, de manera que las especies originarias de áreas templadas se recuperan más rápidamente que las especies tropicales (Gibert *et al.*, 2001). El ciclo diario de temperaturas característico de los hábitats templados obliga a los organismos a desarrollar la capacidad de resistir al frío y recuperarse rápidamente como una adaptación a la temporada invernal (Gibert *et al.*, 2001).

De este modo, ya que en la mayoría de los hábitats los factores de estrés ambiental se presentan juntos, todo parece indicar que los caracteres de resistencia al estrés ambiental no responderían de manera independiente a las presiones selectivas, sino que se combinarían en un mecanismo general de resistencia. En este contexto, en *Drosophila* los caracteres de resistencia a diferentes tipos de estrés parecen compartir, parcialmente, una base genética común (Bubliy & Loeschcke, 2005; Hoffmann *et al.*, 2005b; Schmidt *et al.*, 2005b; Schmidt & Paaby, 2008; Sisodia & Singh, 2010) lo cual darían una base mecanicística a la respuesta generalizada al stress. Sin embargo, esta relación no es global ya que depende de la especie y de las condiciones ecológicas de su hábitat (Kellermann *et al.*, 2009; Matzkin *et al.*, 2009b).

Resistencia a la inanición

La ausencia o escasez de fuentes alimenticias se encuentra entre los factores de estrés ambientales más poderosos, y obliga a los organismos a desarrollar adaptaciones que les permitan incrementar su tolerancia a la falta de alimento. En *Drosophila*, la resistencia a la inanición es un carácter de estrés relacionado al *fitness* del adulto que en regiones templadas adquiere una relevancia especial durante los meses de invierno, caracterizados por la disminución drástica de la disponibilidad de fuentes de alimento (Izquierdo, 1991; Mitrovski & Hoffmann, 2001; Boulétreau-Merle & Fouillet, 2002). Los adultos enfrentan la inanición mediante la activación del mecanismo de diapausa reproductiva, durante el cual el individuo no se alimenta. Sin embargo, existe una intrincada red de procesos fisiológicos que se estimulan en condiciones de inanición que involucran la estimulación de la macroautofagia (degradación de contenidos citoplasmáticos y secuestro de macromoléculas) en los cuerpos grasos, además de la inhibición de la síntesis proteica (Scott *et al.*, 2004; Rusten *et al.*, 2004). De este modo,

las limitadas reservas energéticas se desvían al mantenimiento somático (Scott *et al.*, 2004). La principal vía fisiológica que regula la respuesta a la falta de alimento se denomina TOR (por su nombre en inglés *Target of Rapamycin*) y su mecanismo de acción se encuentra evolutivamente conservado desde levaduras hasta mamíferos (Wullschleger *et al.*, 2006; Bjedov *et al.*, 2010)

Desde un punto de vista energético, los organismos pueden aumentar su resistencia a la inanición mediante 1) el incremento de las reservas energéticas, 2) la reducción de la tasa de consumo de estas reservas y 3) la disminución del consumo de energía para la supervivencia (Rion & Kawecky, 2007). En *Drosophila*, el mecanismo principal de resistencia a la falta de recursos alimenticios es el aumento de las reservas energéticas, principalmente en forma de lípidos (Ballard *et al.*, 2008; Matzkin *et al.*, 2009a, b; Arrese & Soulage, 2010; Sisodia & Singh, 2010).

Asimismo, el aumento en la resistencia a la inanición puede ser el resultado de un mecanismo general de respuesta al estrés impulsado principalmente por los factores de estrés ambiental como, por ejemplo, la asociación de la resistencia a la inanición con la tolerancia a temperaturas extremas. De hecho, existen evidencias de una asociación entre la resistencia a la inanición y la resistencia a bajas temperaturas (Hallas *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2005b; Kenny *et al.*, 2008), mientras que no existe una relación con un choque de calor (Bubliy & Loeschke, 2005). Por otro lado, hay evidencias que demuestran que los mecanismos fisiológicos de respuesta a la resistencia a la inanición y a la desecación parecen estar parcialmente compartidos en *D. melanogaster* (Van Herrewege & David, 1997; Bubliy & Loeschke, 2005; Hoffmann *et al.*, 2005b). Sin embargo, la extensión de este tipo de estudio a otras especies de *Drosophila* muestra que tal asociación no es universal ya que puede variar entre especies (Matzkin *et al.*, 2009b).

El estudio de las respuestas de los organismos a los principales factores de estrés ambiental es fundamental para la comprensión de la adaptación ecológica y de los patrones de distribución geográfica de las especies. El análisis de la variación genética natural en caracteres de resistencia al estrés, como la resistencia a la inanición, a lo largo de un gradiente geográfico así como de caracteres relacionados permite ahondar más en el conocimiento de las bases genéticas de la adaptación de los organismos a las condiciones ambientales locales. Además, permite evaluar el potencial evolutivo de este carácter de estrés en poblaciones naturales. El estudio de la variación geográfica provee una adecuada oportunidad para identificar caracteres relacionados con el *fitness* así

como para identificar regiones genómicas y/o genes asociados a los gradientes ambientales, contribuyendo, así, a dilucidar si la selección natural es la principal fuerza evolutiva que moldea la variación en este tipo de caracteres en la naturaleza.

1.2. Variación natural en caracteres cuantitativos

En la naturaleza, los organismos despliegan una rica diversidad fenotípica en cuanto a su fisiología, morfología, comportamiento, resistencia al estrés ambiental y también a su susceptibilidad frente a las enfermedades. **La mayor parte de esta variación fenotípica natural es cuantitativa, de modo que está influenciada por la acción simultánea de múltiples genes cuya expresión es dependiente del ambiente genético, de su condición sexual y de factores externos** (Falconer & Mackay, 1996; Mackay, 2001a, b; Mackay & Anholt, 2006).

Un elemento fundamental en la comprensión de la variación natural de los caracteres cuantitativos es el estudio de **la arquitectura genética** subyacente. La **arquitectura genética** es el patrón de factores genéticos que determinan y controlan un fenotipo y su variación (Hansen, 2006). Un aspecto importante del estudio de la **arquitectura genética** es el de identificar regiones del genoma que afectan a la variación del carácter (QTLs, por su denominación en inglés *Quantitative Trait Locus*), a los genes e incluso las variantes en la secuencia de nucleótidos responsables de la variación fenotípica natural del carácter (Barton & Keightley 2002, Mackay, 2009; Mackay & Anholt, 2006). Asimismo, para comprender la **arquitectura genética** de los caracteres es necesario conocer, además de la manera en la que la variación genética se relaciona con la variación fenotípica, la influencia que ejerce el ambiente sobre la expresión fenotípica del carácter. Un enfoque integrado en el estudio de la variación fenotípica puede, además, contribuir a identificar las fuerzas evolutivas involucradas en el mantenimiento de la variación, y que gobiernan su evolución a largo plazo.

La genética cuantitativa proporciona los conceptos teóricos necesarios para unir los mecanismos genéticos a los correspondientes fenotipos resultantes, estudiando la evolución del cambio fenotípico tanto a corto como a largo plazo. Sin embargo, no permite identificar las causas del cambio evolutivo. De este modo, la genética cuantitativa describe la evolución fenotípica en términos de parámetros que se pueden estimar en las poblaciones naturales, que son la media del carácter, su varianza y la covarianza con otros caracteres. La variación fenotípica de un carácter está determinada

por la variación genética (constituida por variación genética aditiva y no aditiva), por la variación ambiental y por la relación entre ambos componentes (efecto de interacción genotipo-ambiente). La variación genética aditiva implica la existencia de diferentes alelos de los múltiples genes que contribuyen de manera independiente y lineal al valor fenotípico de un carácter; mientras que la variación genética no aditiva modifica el valor fenotípico de un carácter (generalmente de manera no lineal) mediante interacciones intragénicas (dominancia/recesividad) e intergénicas (epístasis). Los componentes genéticos aditivos condicionan la respuesta a la selección del carácter. Desde el punto de vista de la genética cuantitativa los efectos genéticos no aditivos se consideran una molestia ya que reducen la respuesta a la selección, al menos a corto plazo. No obstante, estos efectos pueden ser potencialmente importantes en la evolución de los caracteres, ya que la varianza genética aditiva puede incrementarse significativamente como consecuencia de la conversión de varianza genética no aditiva en variación aditiva cuando, por ejemplo, una población atraviesa un cuello de botella (Wolf *et al.*, 2000). Por tanto, la varianza genética no aditiva es un componente de la variación genética que no debe ser ignorado.

Hay dos aspectos de la **arquitectura genética** de un carácter complejo que deben ser considerados. El primero de ellos está relacionado con el carácter cuantitativo en sí mismo e incluye el conocimiento de 1) los genes que afectan la expresión del carácter y el subconjunto de estos genes que albergan variantes alélicas responsables de la variación natural del carácter, 2) la magnitud del efecto de cada uno de los genes sobre el carácter, 3) los efectos de las interacciones epistáticas, 4) los efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres, 5) la variación del efecto de los genes sobre el carácter frente a variaciones del ambiente externo y sexual, y 6) las bases moleculares de la variación alélica (Mackay, 2001b; 2009; Phillips, 2005). El segundo aspecto que debe estudiarse tiene que ver con los componentes de la variación genética poblacional, que nos ayudan a conocer el potencial de respuesta a las diferentes fuerzas evolutivas (como por ejemplo la selección natural). Es fundamental tener en cuenta que la **arquitectura genética** de un carácter complejo puede variar dentro de las poblaciones naturales, además de evolucionar bajo la influencia de la selección natural y/o de la deriva génica, pudiendo también variar con el ambiente. Esta visión es diferente a la visión de la genética de poblaciones clásica, la cual considera a la **arquitectura genética** como estática y que puede describirse en base a parámetros invariables. De esta forma, no

sólo la media poblacional de un carácter complejo puede evolucionar, sino que también puede hacerlo los componentes que definen su **arquitectura genética**; o sea, el número de genes involucrados en su expresión, la magnitud de sus efectos, las interacciones epistáticas, la magnitud de la pleiotropía y la sensibilidad ambiental (Fox & Wolf, 2006).

A pesar de los grandes avances en la identificación de la base y la **arquitectura genética** de caracteres adaptativos complejos (Harbison *et al.*, 2004; Mensch *et al.*, 2008; Carreira *et al.*, 2009; Paaby & Schmidt, 2009; Magwire *et al.*, 2010), es necesario profundizar en la identificación de las bases genéticas y moleculares responsables de su variación en poblaciones naturales. Además, quedan por investigar los niveles, la producción y el mantenimiento de la variación genética natural adaptativa, que son clave para afrontar los cambios predecibles y no predecibles del ambiente.

1.3. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo de experimentación

Entre las especies utilizadas como modelos de experimentación en investigaciones biológicas, *Drosophila melanogaster* ocupa un lugar privilegiado. Es una de las pocas especies que cumple con muchos de los requisitos deseables para un modelo experimental en diversos campos de la biología como la neurobiología, la fisiología, la genética, la cronobiología, la genética funcional, la endocrinología y en los últimos años se detectó su potencial utilidad para el estudio de enfermedades humanas como el alcoholismo, el abuso de drogas y trastornos del sueño (Matthews *et al.*, 2005; Venken & Bellen, 2005; Mackay & Anholt, 2006).

D. melanogaster es un organismo modelo muy apropiado para el estudio de caracteres adaptativos complejos ya que:

- Tiene un tiempo generacional corto
- Es fácil de manipular y criar en el laboratorio
- Las condiciones para su cultivo son simples, económicas y fáciles de controlar
- Su número de cromosomas es bajo
- Se cuenta con un sinnúmero de herramientas que permiten su manipulación genética
- Su genoma está completamente secuenciado (Adams *et al.*, 2000)
- Se cuenta con marcadores genéticos de fácil monitoreo
- Se dispone de una extensa base de datos genéticos (<http://www.flybase.org>).
- Es posible contar con una extensa colección de mutantes y líneas con pérdida

específica de expresión que se mantienen en varios centros como Bloomington *Drosophila* Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>); Vienna *Drosophila* RNAi Center, (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>), National Institute of Genetics, Japan (<http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/index.jsp>)

- o La secuencia de los genomas completos de 11 especies representativas de los principales linajes del género están actualmente disponibles (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007)

D. melanogaster es un insecto holometábolo que tiene un ciclo de vida que en el laboratorio es de alrededor de 10 días cuando se la cría en un medio nutritivo y a temperatura constante de 25° C. El ciclo de vida comienza con una etapa embrionaria, el huevo, que generalmente eclosiona transcurridas 18 a 24 h desde su puesta. No obstante, las hembras pueden retener sus huevos y depositarlos más tarde en un estado de desarrollo avanzado si no dispone de un sustrato de oviposición adecuado, disminuyendo así el tiempo de eclosión. A continuación, el estadio larval es la etapa principal de alimentación y consta de 3 estadios que duran, en conjunto, aproximadamente 4 días. Transcurrido este tiempo, la larva deja de alimentarse, entra en el estadio de pupa y comienza el proceso de metamorfosis. Esta etapa dura aproximadamente 3 días, al cabo de los cuales emerge una mosca adulta que alcanza la madurez sexual a las 3 h los machos y a las 7 h las hembras (Figura 1.2; Roberts, 1998). Los adultos viven alrededor de 35-40 días, aunque el tiempo de vida difiere considerablemente entre individuos y depende de las condiciones ambientales del laboratorio.

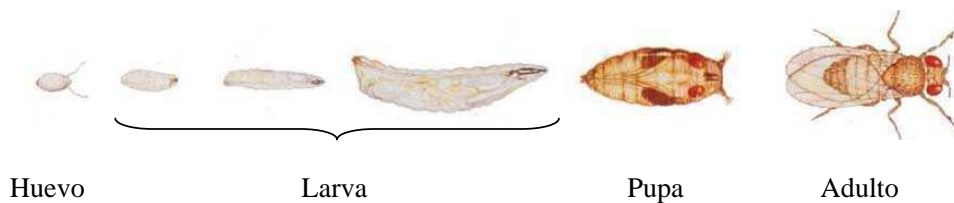


Figura 1.2. Estadios del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Con un genoma de aproximadamente el 5% del tamaño del genoma de un mamífero, *D. melanogaster* comparte alrededor de un 75% de sus genes (homólogos) con este

grupo de vertebrados, además de la mayoría de las familias génicas, y de los mecanismos regulatorios básicos del metabolismo. De este modo, *D. melanogaster* puede proporcionar información esencial para investigar trastornos metabólicos como por ejemplo la diabetes y la obesidad (Baker & Thummel, 2007). Su información genética se encuentra distribuida en 3 pares de cromosomas autosómicos (denominados 2, 3 y 4) y un par de cromosomas sexuales (X e Y). El 60 % de la información genética se encuentran en los pares de cromosomas 2 y 3, el par 4 es muy pequeño y se denomina cromosoma puntiforme (*'dot chromosome'*).

Finalmente, esta especie presenta un marcado dimorfismo sexual en muchos caracteres biológicos, como la morfología (las hembras suelen ser más grandes que los machos), la historia de vida, el funcionamiento de diversos mecanismos fisiológicos, e incluso la resistencia al estrés.

2

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es contribuir a la caracterización de la arquitectura genética de la resistencia a la inanición, utilizando como modelo experimental a *D. melanogaster*. Para la consecución de este objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Cuantificar el aporte de las fuentes de variación genética que contribuyen a la variación fenotípica total de la resistencia a la inanición en diferentes poblaciones naturales de *D. melanogaster*.
- Estimar el grado de asociación genética entre la resistencia a la inanición y la longevidad y el contenido de lípidos en poblaciones naturales de *D. melanogaster*.
- Cuantificar el aporte del cromosoma 2 a la variación fenotípica natural de la resistencia a la inanición.
- Identificar variantes alélicas responsables de la variación natural de la resistencia a la inanición en genes que se sabe participan de la expresión del carácter.
- Analizar la influencia del sexo sobre la variación genética natural de la resistencia a la inanición.

Los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de esta Tesis se verán reflejados en las siguientes publicaciones:

Goenaga, J., Fanara, J.J., Hasson, E. 2010. A quantitative genetic study of starvation resistance at different geographic scales in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics Research* (en prensa)

Goenaga, J., Mensch, J., Fanara, J.J., Hasson, E. 2010. The benefits of mating: increase of the starvation resistance in a group of *Drosophila melanogaster* wild females. (en revisión).

Goenaga, J.; Fanara, J.J.; Hasson, E. Starvation resistance is positively correlated with lipid content in five natural populations of *Drosophila melanogaster*. (en preparación).

Trabajos en los que el doctorando ha participado activamente durante la realización de su Tesis doctoral:

Mensch, J., Carreira, V., Lavagnino, N., **Goenaga, J.**, Folguera, G., Hasson, E., Fanara, J.J. 2010. Stage-specific Effects of Candidate Heterochronic Genes on Variation in Developmental Time along an Altitudinal Cline of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 5(6): e11229. Doi:10.1371/journal.pone.0011229.

Soto E.M.; **Goenaga J.**; Hurtado J.P. & E. Hasson. Oviposition resource preference and breeding resource effects on the life history traits of cactophilic *Drosophila* species. En revisión

Además, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han sido objeto de 11 presentaciones en diferentes congresos y simposios tanto nacionales como internacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Establecimiento y mantenimiento de las líneas experimentales

3.1.1. Recolección de individuos de *D. melanogaster* en los sitio de muestreo

Se recolectaron individuos de *D. melanogaster* en 11 localidades distribuidas a lo largo de un gradiente geográfico en el oeste argentino, desde Güemes (latitud 24° 41'S, provincia de Salta) hasta Neuquén (latitud 38° 58'S, provincia de Neuquén) (Tabla 3.1). Las moscas se colectaron en el campo mediante el uso de trampas que consistían en baldes con fruta (banana y naranja) fermentada con levadura de panificación, y la ayuda de redes entomológicas. Del conjunto de insectos atraídos hacia las trampas se seleccionaron únicamente las hembras de *D. melanogaster*, las cuales fueron aisladas individualmente en tubos de plástico conteniendo alimento hasta su llegada al laboratorio.

Tabla 3.1. Características geográficas y ambientales de las localidades de captura de individuos de *D. melanogaster*

Poblaciones	Latitud (Sur)	Longitud (oeste)	Altitud (metros)	Recurso alimenticio	T media anual (° C)	T media anual máxima(° C)	T media anual mínima(° C)
Güemes	24° 41'	65° 03'	695	uva	20,18	27,1	14,4
Cachi	25° 07'	69° 09'	2280	uva	14,8	22	10
San Blas	28° 25'	67° 06'	1061		-	-	-
Chilecito	29° 10'	67° 28'	1043	uva	17,1	25,5	10,4
Jáchal	30° 12'	68° 45'	1238	uva y membrillo	16,0	-	-
San Juan	31° 27'	68° 31'	671	uva	17,7	23,2	5
Barreal	31° 32'	69° 27'	1610		17,6	-	-
Lavalle	32° 40'	68° 15'	647	uva y membrillo	17,1	24,6	10
Uspallata	32° 50'	68° 28'	1900	manzana y membrillo	12,2	21,2	2,6
San Rafael	34°35'	69° 00'	800	uva	15,0	21,0	9
Neuquén	38° 58'	68° 08'	260	Manzana, ciruelas y peras	14,7	22,4	7,7

3.1.2. Establecimiento de isolíneas de origen natural

Una vez en el laboratorio las hembras de *D. melanogaster* previamente aisladas en tubos individuales sirvieron como base para generar las correspondientes isolíneas. Para ello, cada hembra fue traspasada a un nuevo recipiente (tubo o frasco de vidrio o de plástico) que contenía medio estándar de cultivo, generándose de esta manera las isolíneas. En la primera generación nacida en el laboratorio se comprobó la identidad específica de las isolíneas, ya que en los lugares de captura también se verificó la presencia de *D. simulans*, que muestra un alto grado de similitud externa con *D. melanogaster*.

Mediante esta metodología se establecieron aproximadamente 40 isolíneas por sitio de muestreo.

3.1.3. Establecimiento de líneas isogénicas de sustitución cromosómica

En *Drosophila*, la disponibilidad de cepas portadoras de cromosomas balanceadores da paso al desarrollo de una metodología ampliamente utilizada en esta especie denominada *sustitución cromosómica*. Esta técnica consiste en sustituir dentro de un fondo genético homogéneo un único cromosoma completo procedente de otra cepa no relacionada. De esta forma, las líneas isogénicas de sustitución cromosómica comparten un fondo genético idéntico y sólo difieren en el cromosoma que ha sido sustituido. En la presente Tesis se generaron líneas isogénicas de sustitución para el cromosoma 2.

Las líneas isogénicas de sustitución para el cromosoma 2 se obtuvieron siguiendo un esquema de cruzamientos entre hembras vírgenes de cepas portadoras de cromosomas balanceadores y machos de isolíneas derivadas de las poblaciones naturales listadas en la Tabla 3.1. Las cepas portadoras de cromosomas balanceadores presentan tres propiedades esenciales para la extracción de cromosomas enteros de una población, a) múltiples inversiones en el orden de los genes que suprimen la recombinación entre cromosomas homólogos; b) marcadores morfológicos dominantes en los distintos cromosomas; c) al menos una mutación letal recesiva que determina que sólo los heterocigotas para el cromosoma balanceador sean viables (Fox & Wolf, 2006).

El esquema de cruzamientos utilizado para obtener líneas isogénicas de sustitución para cromosoma 2 se resume en Figura 3.1. Brevemente el protocolo consta de los siguientes pasos. El primer cruzamiento (G_1) se realizó entre una hembra homocigota para el gen marcador que confiere ojos blancos (*w*, que se encuentra en el cromosoma

X) y heterocigota para el cromosoma 2 (que contienen el gen marcador Cy; Curly) y el cromosoma 3 (que contienen el gen marcador Sb; Stubble), los homólogos de estos cromosomas procedieron de la cepa *Canton-S B* (denominada también como IsoB), y un macho de una aislínea natural portador de cromosomas salvajes (+; +; +). De la descendencia de este cruzamiento (G_1) se eligieron los machos con fenotipo w, Cy, Sb que llevaban uno de los cromosomas 2 y 3 aportados por el macho de la aislínea natural utilizada. El segundo cruzamiento (G_2) se efectuó entre un solo macho de fenotipo w; Cy; Sb y una hembra de una cepa homocigota para el gen w y el cromosoma 3 IsoB y heterocigota para los genes marcadores presentes en el cromosoma 2: un homólogo lleva Cy y el otro el marcado fenotípico Sternopleural (Sp). Este alelo, al igual que Cy y Sb, es un marcador fenotípico dominante pero letal recesivo. De la descendencia de este cruzamiento (G_2) se eligieron machos con el fenotipo w; Cy; Sb, estos machos son los únicos descendientes portadores del cromosoma 2 natural, mientras que el cromosoma 3 natural fue reemplazado por el IsoB. El tercer cruzamiento (G_3) se realizó entre los machos elegidos y hembras de la misma cepa utilizada en el cruzamiento G_2 . De la descendencia de G_3 se eligieron machos y hembras con el fenotipo w; Cy. En adelante, el objetivo fue poner en homocigosis el cromosoma 2 derivado de la aislínea natural utilizada en el cruzamiento G_1 . De esta manera, de los descendientes del cuarto cruzamiento entre hermanos (G_4) se descartaron todas las moscas con el fenotipo Cy y se cruzaron entre sí las moscas con ojos blancos (w) y fenotipo salvaje para el resto de los caracteres, generando de esta manera una línea de sustitución cromosómica para cromosoma 2 de origen natural. Las líneas isogénicas construidas mediante el esquema de cruzamientos descrito difieren únicamente en el cromosoma 2 natural homocigota, el fondo genético fue homocigota idéntico a la línea IsoB. En total mediante esta técnica se obtuvieron alrededor de 60 líneas isogénicas de sustitución para el cromosoma 2.

En el esquema de cruzamientos detallado anteriormente las hembras utilizadas en cada cruzamiento fueron vírgenes (Roberts, 1998). El protocolo para la obtención de hembras vírgenes consistió en descartar los individuos adultos de los recipientes de cría (dejando las pupas y las larvas) y, al cabo de 5 h se recolectaron los nuevos adultos emergidos en cada recipiente (las hembras tardan aproximadamente 7 h en alcanzar la madurez sexual desde su eclosión del pupario). Posteriormente, los adultos se separaron por sexo y se colocaron en tubos con medio estándar de cultivo (10 individuos/tubo) bajo condiciones de temperatura (25 ± 1 °C), humedad (60%) y fotoperíodo (12:12 h

luz/oscuridad) controladas. Cuando las hembras alcanzaron los 3 días de edad se comprobó que no hubiera larvas para confirmar la virginidad de las hembras.

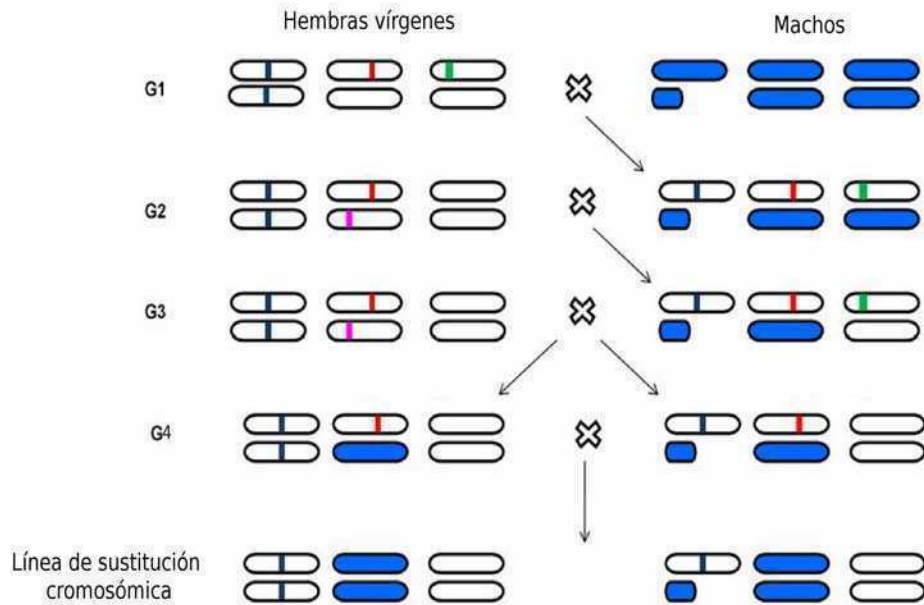


Figura 3.1. Esquema de cruzamientos empleado para obtener líneas de sustitución para el cromosoma 2. Los cromosomas IsoB se representan en blanco y los cromosomas naturales en azul. Los marcadores fenotípicos dominantes se representan con barras coloreadas dentro de los cromosomas: ojos blancos (negro); Curly (rojo); Sternopleural (rosa) y Stubble (verde) (Figura modificada de Mensch *et al.*, 2010)

3.1.4. Mantenimiento de las diferentes líneas de trabajo

Las isolíneas y las líneas isogénicas utilizadas en la presente Tesis se mantuvieron como poblaciones estables en el laboratorio. Las moscas adultas de las diferentes líneas se criaron en recipientes (tubos o frascos de vidrio o de plástico) con medio de cultivo estándar. Este medio de cultivo es alimento preparado a base de harina de maíz y azúcar, con el agregado de agar. Cada 15 días, aproximadamente, los adultos se transfirieron a recipientes estériles con medio fresco para evitar problemas de mortalidad larvaria denso-dependiente. Todas las líneas se mantuvieron en una cámara a temperatura (25 ± 1 °C) y humedad (60-70%) constantes y un fotoperíodo de 12:12 horas luz/oscuridad. Cuanto fue necesario obtener una gran cantidad de individuos de una isolínea y/o línea isogénica, el procedimiento de traspaso de adultos a medio fresco se realizó cada 3 días.

Generalmente, las isolíneas y las líneas isogénicas se mantuvieron en tamaños poblacionales grandes (mayor a 100 individuos/generación) durante 10 generaciones antes de efectuarse los ensayos fenotípicos.

3.2. Ensayos fenotípicos

3.2.1. Diseño experimental

Los ensayos fenotípicos llevados a cabo a lo largo de esta Tesis se realizaron con individuos adultos provenientes de isolíneas y líneas isogénicas derivadas de las poblaciones naturales de *D. melanogaster* mencionadas anteriormente (Tabla 3.1). Todos los adultos utilizados en los ensayos fenotípicos detallados en las subsiguientes Secciones se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo experimental que se detalla a continuación.

Por cada línea analizada, alrededor de 150 adultos maduros sexualmente de cada sexo se introdujeron en un recipiente de acrílico transparente de 5 x 20 x 12 cm., denominado cámara de recolección de huevos. Dentro de cada cámara se colocó una placa de Petri que contenía un medio de oviposición. Este medio fue preparado con 3 gramos agar en 175 mililitros de agua destilada cocinado hasta el hervor, una vez que el agar solidificó se espolvoreó con granos de levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) seca, que sirve como alimento para las moscas adultas y las larvas y, además, como estímulo para la oviposición. Mediante este procedimiento se obtuvo una gran cantidad de huevos. Transcurridas 8 h se retiraron las placas de Petri de las

cámaras de recolección y se incubaron a 25 °C durante 24 h hasta la eclosión de las larvas. Una vez producida la eclosión se sembraron 30 larvas de primer estadio por tubo con medio estándar de cultivo, en total se sembraron entre 10 a 12 tubos por línea. Todos los tubos recién sembrados se incubaron bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y fotoperíodo descritas en la Sección 3.1.4 y se monitorearon todos los días para determinar el día en que las moscas comenzaron a emerger. El uso del mismo procedimiento para obtener los adultos utilizados en los ensayos fenotípicos tuvo como objetivo minimizar posibles interferencias de otros factores en la medición de los caracteres estudiados. Se sabe que, variaciones en la densidad larvaria pueden afectar la resistencia a la inanición y el contenido lipídico en moscas adultas (Robinson *et al.*, 2000; Borash & Ho, 2001).

En los experimentos realizados con moscas *apareadas*, los adultos, machos y hembras, emergidos se mantuvieron durante 3 a 4 días en los mismos tubos para asegurar el apareamiento. Transcurrido este tiempo, se recolectaron los adultos, se separaron por sexo utilizando CO₂ como anestesia y se colocaron y mantuvieron en tubos con medio de cultivo estándar hasta alcanzar el número de moscas necesario para efectuar los ensayos fenotípicos.

En los experimentos realizados con moscas *vírgenes*, los adultos emergidos fueron recolectados cada 5 horas para asegurar su virginidad, se separaron por sexo y se mantuvieron en tubos con medio de cultivo estándar hasta alcanzar el número necesario para realizar los ensayos fenotípicos.

3.2.2. Resistencia a la inanición

La resistencia a la inanición se estimó como el tiempo (en horas) transcurrido desde que una mosca adulta se expuso al medio de inanición hasta su muerte. Este medio se preparó con 3 gramos de agar disueltos en 175 mililitros de agua destilada llevados a primer hervor. Cinco mililitros de este medio se vertieron en cada uno de los tubos individuales que se utilizaron en los ensayos de resistencia a la inanición. Es necesario hacer notar que el medio de agar proveyó humedad pero no alimento a las moscas adultas.

Durante el desarrollo del presente trabajo se siguieron dos diseños experimentales para estimar la resistencia a la inanición (RI) en moscas adultas.

Diseño experimental A (DEA): las mediciones de la RI se realizaron en adultos *apareados* de 2 a 7 días de edad. En cada tubo experimental (réplica) se incluyeron 10 adultos del mismo sexo.

Diseño experimental B (DEB): las mediciones de la RI se efectuaron en adultos *vírgenes* de 4 a 6 días de edad. En cada tubo experimental (réplica) se introdujeron 5 adultos del mismo sexo.

Todos los experimentos en los que se estimó la RI el registro de moscas muertas se efectuó a las 8:00, 14:00 y 20:00 h de cada día hasta la muerte de todos los individuos. Los registros de la RI por mosca se utilizaron para calcular la **resistencia a la inanición media por réplica**, que fue la variable considerada en todos los análisis estadísticos.

En ambos diseños experimentales el número de réplicas analizadas varió entre 7 y 10 por sexo y por línea.

3.2.3. Longevidad

La longevidad se estimó como el tiempo (en días) transcurrido desde que una mosca adulta se expuso a un medio con alimento hasta su muerte. El medio con alimento utilizado fue el mismo medio de cultivo estándar mencionado en la Sección 3.1.4. Las estimaciones de la longevidad se realizaron con moscas *vírgenes* de 4 a 6 días de edad. En cada réplica se introdujeron 5 adultos del mismo sexo, y el número de réplicas analizadas varió entre 7 y 10 por sexo y por línea. En todos los ensayos de longevidad el registro de moscas muertas se efectuó cada 24 h hasta la muerte de todos los individuos. Las moscas se transfirieron a tubos con medio de cultivo fresco cada 4 días.

Los registros de longevidad por mosca se utilizaron para calcular la **longevidad media por réplica** que, al igual que para la RI, fue la variable considerada en los análisis estadísticos.

3.2.4. Contenido de lípidos

Para estimar el contenido total de lípidos por mosca se efectuó una extracción con éter siguiendo la metodología implementada por Robinson *et al.* (2000) que se describe en el segundo párrafo. Las mediciones del contenido total de lípidos por mosca se realizaron con moscas *vírgenes* de 4 a 6 días de edad. Las muestras se mantuvieron en un congelador a - 80° C hasta la cuantificación del contenido lipídico.

Las moscas adultas se retiraron del congelador y se secaron a 60 °C en estufa durante

24 h. Transcurrido este tiempo, se retiraron de la estufa y se pesaron en grupos de 10 individuos en una microbalanza Sartorius (0,00001 g), obteniéndose así el *peso seco por grupo*. A continuación, las moscas de cada grupo se traspasaron a un tubo eppendorf que contenía 1 - 1,5 mL de dietíl-éter y se incubaron a temperatura ambiente con agitación continua suave durante las siguientes 24 h. Posteriormente, se removió el dietíl-éter y las moscas se secaron a 60° C en estufa durante las siguientes 24 h. Cumplido este tiempo, los grupos de moscas se pesaron nuevamente obteniéndose así el *peso seco libre de lípidos por grupo*. La diferencia entre el peso seco (PS_G) y el peso seco libre de lípidos de cada grupo (PSLL_G) dividido por el número de moscas (N = 10) es una estimación del contenido total de lípidos por mosca (CL_M). El número de réplicas (=grupos) analizado varió entre 4 y 5 por sexo y línea.

$$CL_M = (PS_G - PSLL_G) / N$$

3.3. Análisis estadísticos

3.3.1. Análisis de la varianza

El análisis de varianza (ANOVA) es la herramienta estadística más comúnmente utilizada en estudios genéticos cuantitativos (Anholt & Mackay, 2004). Durante el desarrollo de la presente Tesis se recolectaron datos de la resistencia a la inanición, de la longevidad y del contenido de lípidos en experimentos con isolíneas y con líneas isogénicas derivadas de diferentes poblaciones naturales. El conjunto de datos recolectado para cada carácter se analizó mediante un ANOVA (mixto) de tres vías acorde al modelo:

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

donde μ es la media general del carácter bajo estudio, P es el factor Población (aleatorio), con tanto niveles como poblaciones analizadas, L es el factor Línea (aleatorio, anidado en el factor Población), con tantos niveles como líneas (isolíneas o líneas isogénicas, dependiendo del experimento) analizadas, S es el factor Sexo (fijo) con dos niveles y ϵ es el término del error que da cuenta de la variación entre réplicas. Además, se realizaron análisis de componentes de varianza con el fin de estimar la contribución relativa de cada fuente de variación aleatoria a la varianza fenotípica total. Así, el componente de varianza asociado al factor Población puede considerarse como un estimador de la variación genética *interpoblacional*, mientras que los componentes asociados a los factores Línea y la interacción Línea x Sexo pueden considerarse, en

conjunto, como estimadores de la variación genética *intrapoblacional*. Finalmente, el factor Sexo permitió evaluar el dimorfismo sexual de los caracteres bajo estudio.

Dado que de resultar significativo el factor Línea no es posible determinar qué población presenta variabilidad genética *intrapoblacional*, se efectuaron análisis por población. En este caso el modelo de ANOVA (mixto) de dos vías es el siguiente:

$$y = \mu + L + S + L \times S + \epsilon,$$

Estos ANOVAs se realizaron para evaluar el efecto de los factores Línea (isolínea o línea isogénica, dependiendo del experimento), Sexo y de la interacción Línea x Sexo sobre los caracteres de interés en cada población por separado. Finalmente, se efectuaron ANOVAs de una vía analizando el efecto del factor Línea para cada sexo por separado y se computó el componente de varianza correspondiente.

En todos los ANOVAs realizados en esta Tesis es primordial comprender que cada isolínea y línea isogénica representa a un único genotipo particular. Por lo tanto, el efecto del factor Línea (*genotipo*) puede interpretarse como la presencia de un componente genético en la variación fenotípica del carácter bajo estudio. A su vez, la interacción Línea x Sexo es considerada como un estimador de la interacción Genotipo x Sexo (*G x S*) que, indica que los efectos de los genotipos (líneas) sobre el carácter en estudio son específicos del sexo. Asimismo, esta interacción se puede entender como la presencia de variación genética para el dimorfismo sexual, que se expresa con cambios específicos del genotipo en la magnitud y/o sentido del dimorfismo sexual.

La interacción *G x S* puede resultar significativa como consecuencia de: 1) diferencias en la magnitud de la varianza entre genotipos en hembras y machos (*cambio de escala*) y/o 2) cambios en el orden de los valores fenotípicos de los genotipos entre los sexos, que también se identifica como la desviación de la unidad del coeficiente de correlación genético entre sexos ($r_{MH} < 1$) (*cambio de orden en el rango*). Una manera de visualizar fácilmente esta interacción es graficando las normas de reacción de cada genotipo a través de los sexos. En el **Anexo** se detallan los posibles patrones de variación en las normas de reacción para diferentes genotipos y, el resultado del ANOVA asociado. La contribución de ambos componentes mencionados anteriormente a la interacción *G x S* se puede evaluar mediante la ecuación de Robertson (1959):

$$V_{G \times S} = [(\sigma_M - \sigma_H)^2 + 2\sigma_M\sigma_H(1 - r_{HM})]/2,$$

donde $V_{G \times S}$ es el componente de varianza de la interacción $G \times S$, r_{HM} es la correlación genética entre sexos y, σ_H y σ_M son la raíz cuadrada del componente de varianza entre líneas en hembras y en machos, respectivamente (Ungerer *et al.*, 2003). Los valores σ_H y σ_M se obtuvieron a partir de los ANOVAs de una vía realizados para cada sexo por separado. En esta ecuación el primer componente indica el aporte del *cambio de escala* y el segundo el aporte del *cambio de orden en el rango*.

La correlación genética entre sexos (r_{HM}) es la correlación genética entre los valores de un mismo carácter medido en cada sexo y, puede considerarse un indicador del grado en el cual los mismos genes controlan la expresión del carácter en hembras y en machos (Falconer, 1952; Muir *et al.*, 1992). r_{HM} se estimó para cada carácter por separado en los experimentos efectuados con isolíneas y con líneas isogénicas, de acuerdo con la ecuación:

$$r_{HM} = \text{Cov}_{HM} / \sigma_H \sigma_M,$$

donde Cov_{HM} es la covarianza entre sexos; y σ_H y σ_M son la raíz cuadrada del componente de varianza entre líneas de hembras y machos, respectivamente.

Previo a los ANOVAs, los datos fueron transformados, cuando fue necesario, utilizando una transformación logarítmica natural [$\ln(X)$], X es el carácter. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el procedimiento GLM (por su denominación en inglés: *General Lineal Model*). Los componentes de la varianza se calcularon con el procedimiento VARCOMP y cuando fue necesario se utilizó el método REML (Máxima Verosimilitud Restringida). Ambos procedimientos fueron implementados usando el paquete de programas Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

3.3.2. Estimación de los parámetros genéticos cuantitativos

Las estimaciones de los parámetros genéticos cuantitativos se obtuvieron para hembras y machos por separado. Bajo el modelo estadístico utilizado la contribución del componente de varianza entre líneas (σ^2_L) se consideró un estimador de la varianza genética (V_G) (Lynch & Walsh, 1998; Morgan & Mackay, 2006). La varianza ambiental (V_A) se estimó a partir del componente de varianza entre réplicas, que es el término de error en el ANOVA. Finalmente, la varianza fenotípica (V_F) se calculó como $V_G + V_A$ (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998).

Para facilitar las comparaciones entre sexos y poblaciones se calculó el coeficiente de variación genética usando la ecuación

$$CV_G = 100 (V_G)^{1/2} / \hat{\mu},$$

donde $\hat{\mu}$ representa el valor fenotípico medio poblacional del carácter estudiado. Este procedimiento se basa en la noción de que $\hat{\mu}$, en lugar de la V_F , es más apropiado para estandarizar la V_G cuando el fin es realizar comparaciones entre caracteres y/o entre poblaciones (Houle, 1992).

3.3.3. Análisis de Regresión Múltiple Lineal

Se realizaron análisis de regresión múltiple lineal con el fin de investigar si los patrones de variación interpoblacional en los caracteres bajo estudio pueden explicarse parcialmente por variaciones en la latitud y/o altitud. En estas regresiones la variable dependiente (o respuesta) fue el valor fenotípico medio del carácter por línea promediando el efecto del sexo, y las variables independientes (o predictoras) fueron la latitud (considerando sus valores en el sistema decimal) y la altitud de cada localidad. También, se efectuaron regresiones múltiples considerando como variables predictoras la temperatura media anual y la temperatura media anual máxima y mínima de las localidades donde se muestrearon las poblaciones estudiadas. Las regresiones múltiples se realizaron utilizando el paquete Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

3.3.4. Análisis de correlaciones entre caracteres

Los coeficientes de correlación genética entre caracteres se estimaron a partir del coeficiente de correlación de Pearson. El coeficiente de Pearson (r) mide la intensidad de la asociación entre dos variables registradas para una misma unidad experimental. Este coeficiente es un estimador del grado de (co)variación entre variables de interés. Los análisis de correlación se realizaron para cada par de caracteres en cada sexo por separado, utilizando como variables los valores fenotípicos medios de los caracteres por línea y sexo. El procedimiento implementado fue CORR del Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1

Variación genética natural en la resistencia a la inanición a diferentes escalas geográficas en *D. melanogaster*

4.1.1. Introducción

En la naturaleza, los organismos enfrentan el estrés ambiental desarrollando adaptaciones locales que aumentan su supervivencia y alteran su historia de vida para maximizar la reproducción (Hoffmann & Parsons, 1991; Randall *et al.*, 1997). El estudio de los cambios en caracteres relacionados con el fitness a través de diferentes hábitats naturales es esencial para comprender la adaptación climática de organismos expuestos a un ambiente continuamente cambiante. Así, explorar la variación fenotípica natural en caracteres adaptativos y sus arquitecturas genéticas es crucial para predecir el potencial cambio evolutivo que ocurre como consecuencia de la adaptación a condiciones ambientales locales.

Generalmente, las especies que habitan regiones templadas están expuestas a marcados cambios estacionales en la disponibilidad de los recursos alimenticios, de modo que la capacidad de sobrevivir a estos períodos es un carácter clave para la permanencia de la especie en su hábitat. Tal como se expuso en la Sección 1 en *Drosophila* la resistencia a la inanición (RI) es un componente del *fitness* del adulto que adquiere especial relevancia durante la temporada invernal en las regiones templadas cuando la disponibilidad de fuentes de alimento disminuye (Izquierdo, 1991; Mitrovski & Hoffmann, 2001; Boulétreau-Merle & Fouillet, 2002). La RI es un carácter cuantitativo gobernado por múltiples genes, es sensible a factores ambientales (Service & Rose, 1985; Da Lage *et al.*, 1990; Karan *et al.*, 1998; Harbison *et al.*, 2004, Hoffmann *et al.*, 2005a) y, además, muestra asociaciones robustas con otros caracteres de historia de vida, como la fecundidad (Service & Rose 1985; Leroi *et al.* 1994a, b), el tiempo de desarrollo (Chippindale *et al.*, 1996; Harshman *et al.*, 1999b) y longevidad (Magwire *et al.*, 2010). También, está correlacionado con caracteres de resistencia a otros tipos de estrés (Bubliy & Loeschke, 2005; Rion & Kawecki, 2007). Toda esta información sugiere una arquitectura genética compleja en la que la pleiotropía jugaría un importante papel. Además, el hecho de que la RI sea un carácter sexualmente dimórfico, agrega un nivel adicional de complejidad al mapa genotipo–fenotipo (Hansen, 2006; Rion & Kawecki, 2007). De hecho, muchos de los genes que constituyen la base genética de la RI tienen un efecto específico del sexo (Harbison *et al.*, 2004; 2005), lo cual indica el rol fundamental que la interacción entre el **Genotipo** y el **Sexo** podría estar jugando en la evolución de la variación genética natural de la RI.

En general, los estudios evolutivos de la RI en *Drosophila*, se han orientado a investigar los patrones geográficos de variación con el fin de detectar patrones clinales, que se consideran indicadores de la selección natural como mecanismo responsable de la diferenciación entre poblaciones (Karan *et al.* 1998; Robinson *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001, 2005a; Sisodia & Singh, 2010). Sin embargo, la mayoría de estos estudios no brindan estimaciones de la contribución relativa de la variación interpoblacional e intrapoblacional a la variación total natural en la RI (ver Hoffmann *et al.*, 2001).

En este sentido, uno de los principales objetivos de esta Sección es investigar la variación en la RI en un grupo de poblaciones naturales de *D. melanogaster* localizadas en el oeste argentino y, además, estudiar la distribución de la variación fenotípica total a dos escalas geográficas: interpoblacional e intrapoblacional, utilizando isolíneas derivadas de poblaciones naturales. La técnica basada en el estudio de isolíneas se ha utilizado ampliamente para explorar la variación genética en *Drosophila* (Hoffmann & Parsons 1988; Capy *et al.*, 1994; David *et al.*, 2005). Siguiendo estos lineamientos, nos proponemos responder las siguientes preguntas: ¿Las poblaciones de *D. melanogaster* difieren en sus valores medios de RI? ¿Las diferencias interpoblacionales en la RI exhiben un patrón de variación clinal? ¿Qué proporción de la variación fenotípica total está determinada por factores genéticos a nivel inter e intrapoblacional? ¿Los factores genético que subyacen la variación en la RI tienen efecto sexo-específico? Dentro de cada población natural ¿Las poblaciones estudiadas albergan similar cantidad de variación genética y/o variación genética sexo-específica?

4.1.2. Resultados

Las poblaciones de *D. melanogaster* analizadas provienen de capturas realizadas en las localidades de Güemes, Cachi, San Blas, Chilecito, Jáchal, San Juan, Barreal, Lavalle, y San Rafael (Figura 4.1; Tabla 3.1). Las determinaciones de la RI se realizaron implementando el **Diseño Experimental A** descrito en la Sección 3.2.



Figura 4.1. Mapa de Argentina en el que se muestran las localidades de muestreo. 1, Güemes (Salta); 2, Cachi (Salta); 3, San Blas (La Rioja); 4, Chilecito (La Rioja); 5, Jáchal (San Juan); 6, San Juan (San Juan); 7, Barreal (San Juan); 8, Lavalle (Mendoza); 9, San Rafael (Mendoza).

Los valores medios de RI (en horas) en hembras y machos de cada una de las poblaciones analizadas se representan en la Figura 4.2. En general, las moscas resistieron desde un máximo de 66 h a un mínimo de 41 h cuando se las sometió al tratamiento de inanición. La población que más resistió la falta de alimento fue Jáchal, mientras que las menos resistentes fueron las hembras de Lavalle y los machos de San Rafael (Figura 4.2).

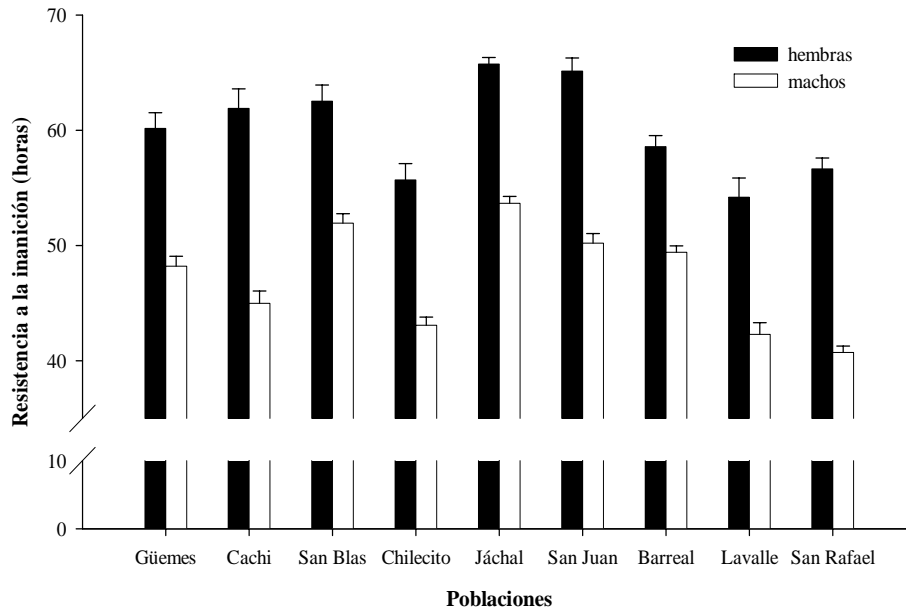


Figura 4.2. Valores medios y sus correspondientes errores estándar de la RI (horas) en hembras y en machos derivados de nueve poblaciones naturales de *D. melanogaster* ubicadas a lo largo de un gradiente latitudinal

Con el fin de cuantificar la contribución de las diferentes fuentes de variación examinadas a la variación fenotípica total de la RI, efectuamos un ANOVA de tres vías (Sección 3.3.1). El ANOVA reveló que los 3 factores principales Población, Sexo y Línea así como la interacción Línea x Sexo afectaron significativamente la RI (Tabla 4.1). El análisis de componentes de varianza mostró que las diferencias entre poblaciones dan cuenta del 7% de la variación fenotípica total, lo cual indica que los factores genético que gobiernan la variación de la RI se diferencian entre localidades.

El efecto significativo del factor Sexo indica que el carácter es sexualmente dimórfico (DS) ya que las hembras (60,4 h) resistieron cerca de 13 h más que los machos (47,5 h), resultado que concuerda con los obtenidos por otros autores (Harbison *et al.*, 2004, 2005; Ballard *et al.*, 2008; Sisodia & Singh, 2010; Gómez *et al.*, 2009). Asimismo, la magnitud y el sentido del DS no varió entre las poblaciones, tal como lo indica el resultado de la interacción Población x Sexo (Figura 4.2, Tabla 4.1).

Tabla 4.1. ANOVA general para la RI. Para cada fuente de variación se reporta los grados de libertad (*gl*), el valor de *F* y su significancia, el porcentaje de la varianza fenotípica que explica (σ^2).

Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Población	8	2,26	0,03	7
Sexo	1	209,60	< 0,0001	fijo
Población x Sexo	8	1,07	0,39	-
Línea (Población)	108	86,68	< 0,0001	52,2
Línea (Población) x Sexo	108	17,86	< 0,0001	27,8
Error	1702			13

Además de la variación genética interpoblacional detectada, el ANOVA detectó un efecto significativo del factor Línea y la interacción Línea x Sexo que, como se explicó en Materiales y Métodos, en conjunto, estiman la variación genética intrapoblacional. Estos factores explicaron el 80% de la varianza total para la RI (Tabla 4.1), e individualmente cada uno de ellos sugiere la presencia factores genéticos con efectos independientes del sexo (52,2%) y de factores genéticos con efectos sexo-específicos (27,8%). Es interesante agregar que, el resultado de la interacción Línea x Sexo se puede analizar también, desde el dimorfismo sexual. En este caso, la interacción indicaría que la magnitud del DS varía entre líneas (*genotipos*), hecho que sugiere la presencia de variación genética intrapoblacional para el DS.

Una forma de estimar el DS es mediante el cálculo del cociente entre los valores medios de RI estimados en hembras y machos en cada población. Los valores del DS variaron de 1,18 a 1,39, de modo que las hembras sobrevivieron, en promedio, 27% más que los machos. Los datos del DS se analizaron mediante un ANOVA de dos vías con Población y Línea (anidado en Población) como fuentes de variación. Los resultados de

este ANOVA indicaron que las diferencias entre poblaciones fueron no significativas; mientras que la variación entre líneas resultó altamente significativa ($F_{104, 831} = 18,7; p < 0,0001$) y explicó el 66% de la variación total, confirmando así, la presencia de variación genética intrapoblacional para el DS.

Las poblaciones claramente difirieron en sus valores medios para la RI (Figura 4.2), este resultado nos impulsó a investigar si estas diferencias ajustan a un patrón de variación clinal. Un patrón clinal es el cambio continuo en un carácter (cuantitativo o de las frecuencias alélicas de un locus) a lo largo un gradiente ambiental (geográfico y/o climático). Se realizaron dos análisis de regresión lineal múltiple usando a la RI como variable dependiente, uno en función de la latitud y altitud y, otro en función de las variables climáticas: temperatura media anual, temperatura media anual máxima y mínima, de las poblaciones estudiadas. Ninguno de los análisis de regresión fue significativo, de modo que las diferencias interpopulacionales no parecen seguir un patrón de variación latitudinal ni altitudinal (Figura 4.3), ni responden a las variaciones en las variables climáticas.

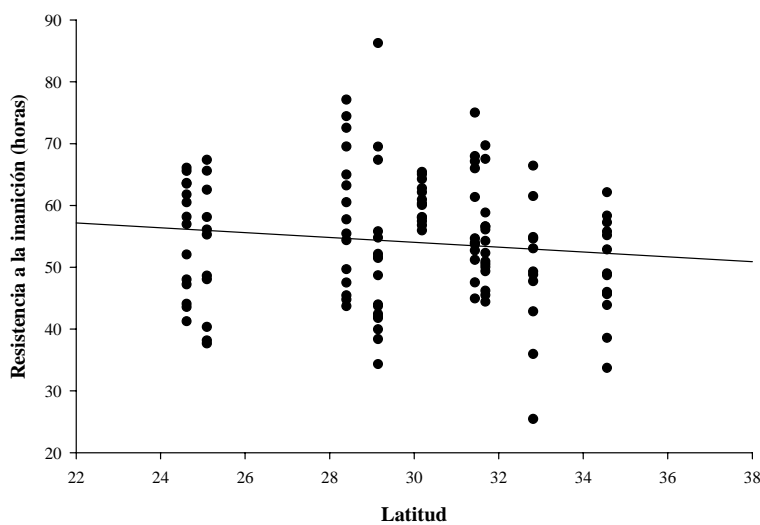


Figura 4.3. Regresión lineal no significativa de RI con la latitud que muestra una tendencia negativa. Cada punto representa el valor medio de la RI de una isolínea promediado el efecto del sexo.

También, se estudió la contribución relativa de las diferencias entre líneas (variación genética) y de la interacción Línea x Sexo (variación genética sexo-específica) a la variación fenotípica total en cada una de las poblaciones analizadas, con el fin de investigar si las tendencias detectadas con el ANOVA general se mantienen en todas las poblaciones. Con este objetivo, se analizaron los datos de cada población mediante un ANOVA de dos vías (Sección 3.3.1) para evaluar los efectos de los factores Línea, Sexo y la interacción Línea x Sexo sobre la RI. Los ANOVAs revelaron diferencias significativas entre sexos en todas las poblaciones, siendo siempre las hembras más resistentes que los machos (Tabla 4.2). Además, las diferencias en la RI entre líneas fueron altamente significativas, lo que indica que las poblaciones naturales de *D. melanogaster* albergan una cantidad substancial de variación genética para la RI.

La interacción Línea x Sexo fue significativa en de todas las poblaciones analizadas, sugiriendo que una fracción de la variación genética en la RI es específica del sexo. Esta interacción resulta significativa a causa de diferencias en la varianza entre líneas entre hembras y machos, lo cual indica que la magnitud de la variación genética difiere entre sexos (Tabla 4.3), y por desviación de la unidad de la correlación genética entre sexos ($r_{HM} < 1$, cambio de orden en el rango) (Sección 3.3.1; Anexo). Ambos componentes contribuyeron de manera similar a la V_{LxS} en la mayoría de las poblaciones, excepto en Jáchal y San Juan donde más del 80% de la V_{LxS} se atribuyó a cambios de orden en el rango (Tabla 4.2)

Tabla 4.2. Contribución relativa de cada fuente de variación a la variación fenotípica total de la RI en cada población natural analizada.

	Güemes	Cachi	San Blas	Chilecito	Jáchal	San Juan	Barreal	Lavalle	San Rafael
Sexo	***	***	**	***	***	***	**	*	***
Línea	33,4**	67,5**	54**	61,3**	6,2**	62,1**	45,2*	42**	58,3**
Línea x Sexo	44,6***	24***	30,5***	31,3***	36***	25,7***	40,8***	48,6***	25,1***
Error	22	8,5	15,5	7,4	57,8	12,2	14	9,4	16,6
r_{HM} †	0,48 (0,25)	0,78 (0,2)	0,70 (0,2)	0,78 (0,12)	-0,04 (0,29)	0,70 (0,21)	0,73 (0,22)	0,54 (0,26)	0,78 (0,16)
V_{LS} ‡	[51-49]	[59-41]	[48-52]	[40-60]	[97-3]	[82-18]	[63-37]	[62-38]	[57-43]

† Coeficiente de correlación genética entre sexos (error estándar)

‡ Proporción de la V_{LS} atribuible a la desviación de la unidad de la r_{HM} (primer término) y a las diferencias de la varianza entre líneas entre machos y hembras (segundo término).

Nivel de significación: $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***

El coeficiente de correlación entre sexos (r_{HM}), se estimó en cada población para determinar hasta qué punto los mismos genes controlan la expresión de la RI en hembras y machos. Un valor r_{HM} igual a 1 indica que los genes responsables de la variación de la RI son los mismos en ambos sexos, y por lo tanto el carácter no podrá evolucionar de manera independiente en hembras y en machos. Un valor r_{HM} igual a 0 sugiere que los genes que gobiernan la RI en hembras y machos son completamente diferentes, de modo que el carácter puede evolucionar independientemente entre sexos (Falconer, 1952).

Para establecer si los r_{HM} son significativamente diferentes de 0 y/o 1, recurrimos a los resultados de los ANOVAs por población. La r_{HM} es significativamente diferente de 1 si la interacción Línea x Sexo es significativa, en tanto que será significativamente diferente de 0 si el factor Línea es significativo¹ (Roff, 1997; Vieira *et al.*, 2000). r_{HM} varió entre poblaciones y en la mayoría de los casos difirió significativamente de 0 y de 1, lo que sugiere que las bases genéticas que regulan la expresión de la RI en ambos sexo se comparten parcialmente. En Jáchal el r_{HM} difirió significativamente de 1 pero no de 0, lo cual indica una independencia entre el conjunto de genes que controlan la RI en hembras y machos (Tabla 4.2). En conclusión, la evolución de la RI en hembras y en machos está parcialmente limitada por una arquitectura genética común, de forma tal que la evolución del DS estaría limitada genéticamente.

Las estimas de los parámetros genéticos cuantitativos proveen de material adicional para visualizar el patrón de variación en la RI y el dimorfismo sexual en cada población natural (Tabla 4.3). Tal como esperamos, las estimas de V_G fueron altas y, además, variaron entre las poblaciones analizadas; así Chilecito fue la población que mostró el mayor valor de V_G y Jáchal el valor más bajo. Además, las estimas de V_G y de V_F fueron mayores en hembras que en machos, confirmando el DS descrito a lo largo de esta Sección. Un patrón similar se detectó en el C_{VG} , el cual varió de 5,4% a 30,5% en hembras y de 8% a 19,2% en machos (Tabla 4.3). Las estimas de V_A fueron semejantes entre los sexos y menores que V_G . Este resultado, es seguramente, consecuencia del protocolo experimental utilizado dado que las mediciones de la RI se realizaron en moscas criadas bajo condiciones controladas de densidad, temperatura, humedad y fotoperíodo con el fin de minimizar la varianza ambiental. También, los bajos valores

¹ La F para testear si la r_{HM} es significativamente diferente de 0 es $F = MS_{Línea} / MS_{Línea \times Sexo}$. Esta F es diferente a la calculada para testear la hipótesis nula asociada al factor Línea, resultado reportado en la Tabla 4.2.

registrados en la V_A pueden explicarse por el hecho que la variable analizada en los ANOVAs es un promedio de 10 observaciones.

Tabla 4.3. Estimaciones de los parámetros genéticos cuantitativos de la RI para cada población en hembras y en machos, separadamente.

	Güemes	Cachi	San Blas	Chilecito	Jáchal	San Juan	Barreal	Lavalle	San Rafael	Promedio
Hembras										
V_F	210,94	234,47	250,37	307,94	37,69	159,38	131,69	283,82	128,59	193,86
V_G	188,55	222,48	224,51	288,96	12,59	142,63	119,89	269,17	110,37	175,45
V_A	22,39	11,99	25,86	18,98	25,10	16,75	11,80	14,65	18,22	18,41
CV_G	22,33	24,24	23,93	30,51	5,40	18,34	18,69	30,34	18,54	21,36
Machos										
V_F	68,59	76,37	76,75	77,62	34,78	77,41	41,79	89,33	43,32	65,10
V_G	28,31	61,77	53,39	68,99	18,68	65,33	29,15	66,64	32,96	47,24
V_A	40,28	14,60	23,36	8,63	16,10	12,08	12,64	22,69	10,36	17,86
CV_G	11,08	17,36	14,13	19,24	8,05	16,10	10,92	18,43	14,09	14,38

V_F : varianza fenotípica; V_G : varianza genética; V_A : varianza ambiental; CV_G : coeficiente de variación genética

4.1.3. Discusión

El estudio de la variación de la RI en nueve poblaciones naturales de *D. melanogaster* reveló que las poblaciones albergan una substancial cantidad de variación genética para la RI y, además, que las poblaciones difieren ligera y significativamente, en su capacidad de sobrevivir períodos de escasez de alimento.

La diferenciación en la RI entre poblaciones podría reflejar una respuesta adaptativa a la heterogeneidad ambiental y/o el resultado de procesos demográficos. Desafortunadamente, hasta el momento no contamos con evidencia directa para descartar los posibles efectos de factores demográficos. No obstante, cabe destacar que la mayoría de las poblaciones analizadas en esta Sección mostraron amplias diferencias en el tiempo de desarrollo (Folguera *et al.*, 2008) y el comportamiento olfativo en larvas, aunque no en el comportamiento olfativo en adultos (Lavagnino *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que los procesos no adaptativos (demográficos o históricos) deberían afectar por igual a todos los caracteres, los diferentes patrones de variación geográfica detectados para los caracteres estudiados sugieren que la influencia de los procesos no adaptativos no serían determinantes en la variación interpoblacional en la RI.

La variación interpoblacional no mostró una correlación con variables geográficas (latitud y altitud) ni con las variables climáticas analizadas. Estos resultados sugieren que la variación en la RI no estaría asociada con variables ecológicas relevantes que covaríen con la latitud. Una posible explicación para la ausencia de clina en la RI es que la disponibilidad de los recursos alimenticios no varíe con la latitud ni la altitud. Asimismo, debemos considerar la posibilidad de limitaciones en la estrategia de muestreo que podría dar cuenta de la falla en la detección de una clina. Sin embargo, el área cubierta por el muestreo fue amplia y abarco un rango de 12 grados de latitud y 1600 metros de altitud, cubriendo así diferentes hábitat. En este sentido, es destacable que hasta el momento se desconocen cuales son los factores causales de la variación natural en la RI. Otros trabajo tampoco detectaron un patrón de variación clinal para la RI en otras áreas de la amplia distribución de *D. melanogaster* (Robinson *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2005a). No obstante, estudios realizados con otras especies de *Drosophila* y con *D. melanogaster* procedentes de la India y de Australia han reportado la presencia de una clina latitudinal negativa (Karan *et al.*, 1998; Karan & Parkash, 1998; Arthur *et al.*, 2008; Sisodia & Singh, 2010). Nuestros resultados sugieren que la variación geográfica en la RI varía mucho entre continentes.

El estudio de la distribución de la variación genética a diferentes escalas geográficas permite comprender cómo está organizada la variación genética natural para los caracteres cuantitativos y qué procesos evolutivos están involucrados. Nuestros resultados muestran que la variación intrapoblacional explica un mayor porcentaje de la variación total en la RI que la variación interpoblacional, este mismo patrón también fue detectado en poblaciones *D. melanogaster* y de *D. simulans* y *D. birchii* originarias de Australia (Hoffmann *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2005; Arthur *et al.*, 2008). Estas evidencias sugieren que la gran cantidad de variación genética que segrega dentro de las poblaciones naturales es una característica común de este carácter de resistencia al estrés.

Otro de los resultados reportados fue el claro DS en la RI, que se mantuvo en todas las poblaciones. El DS se presume que es el resultado de la acción de la selección natural que favorecería óptimos diferentes para un carácter en hembras y machos (Fairbairn *et al.*, 2007). Asimismo, el DS en la RI se puede explicar por la expresión específica del sexo de caracteres reproductivos, que están bajo fuerte presiones selectivas, correlacionados con la RI. En *Drosophila*, se ha demostrado que la RI está correlacionada con la fecundidad, específicamente con la producción de huevos (Chippindale *et al.*, 1993; Salmon *et al.*, 2001) y el número de ovarias (Wayne *et al.*, 2006). Por el contrario, aspectos reproductivos del macho, como la producción de fluidos de las glándulas accesorias (*Acps*, por su denominación en inglés: *Accessory Gland Proteins*) y el esperma, no están correlacionados con la RI (Cordts & Partridge, 1996). No obstante, la expresión de algunas *Acps* se ve afectada por la ausencia de alimento, lo que conduce a una disminución del éxito reproductivo del macho (Harbison *et al.*, 2005; Fricke *et al.*, 2008). Alternativamente, el DS puede reflejar diferencias entre los sexos en los mecanismos fisiológicos básicos involucrados en la distribución de las limitadas reservas energéticas entre la supervivencia y la reproducción (Service *et al.*, 1985; van Noordwijk & de Jong, 1986; Chippindale *et al.*, 1993; Zwaan *et al.*, 1995; Magwere *et al.*, 2004; Harbison *et al.*, 2005). En este sentido, es importante aclarar que las determinaciones de la RI se realizaron en moscas no vírgenes, de modo que diferencias entre las hembras en por ejemplo el número de cópulas y la fecundidad podrían afectar y exagerar el DS detectado para la RI y en la magnitud de la varianza genética. En este punto cabe preguntarse ¿cuáles serían los patrones en el DS en moscas en las que el estado reproductivo estuviera controlado, es decir, en moscas vírgenes?

Finalmente, este estudio detectó un notable cambio en la magnitud del DS entre genotipos en todas las poblaciones. En este contexto, nuestros resultados coinciden con el estudio realizado con líneas artificiales portadoras de mutaciones puntuales inducidas por mutagénesis con elementos *P* (Harbison *et al.*, 2004) que logró identificar un gran número de genes responsables de la expresión de la RI, y además reveló que, muchos de estos genes exhibieron un efecto específico del sexo (Harbison *et al.*, 2004). Así, la interacción $G \times S$ detectada en esta Sección proporciona evidencia para suponer que el efecto sexo-específico reportado por Harbison *et al.* (2004) no es un artefacto de líneas mutantes artificiales, sino que también es detectable en poblaciones naturales. Por lo tanto, se podría argumentar que aunque la selección natural puede actuar sobre factores genéticos involucrados en la interacción $G \times S$, estos factores permiten explicar un alto porcentaje de la variación genética natural en la RI. De hecho, esta interacción podría ser clave en el mantenimiento de la variación genética natural para la RI.

Los caracteres homólogos en hembras y en machos generalmente covarían (Poissant *et al.*, 2009) debido a que suelen estar regulados por los mismos genes (Roff, 1997). Las hembras y machos mantienen diferentes óptimos fenotípicos en la mayoría de los caracteres, no obstante, la selección sexo específica puede evitar que cada sexo alcance su correspondiente óptimo (Lande, 1980). En este sentido, el coeficiente de correlación entre sexos, r_{HM} , es un parámetro genético cuantitativo que puede ser utilizado para predecir el potencial para la evolución independiente entre sexos (Bonduriansky & Chenoweth, 2009). Los valores de r_{HM} fueron positivos y diferentes de 1 y 0, lo cual indica la presencia de un cierto grado de independencia genética entre sexos que permitiría la evolución hacia un nuevo dimorfismo sexual en las poblaciones naturales.

En la siguiente Sección profundizaremos el estudio de la variación en la RI analizando la variación en moscas vírgenes, con el objeto de controlar el posible efecto del estado reproductivo sobre la RI. Además, investigaremos las posibles asociaciones genéticas con otros caracteres complejos como la longevidad y el contenido de lípidos.

4.2

Variación en la resistencia a la inanición y su relación con la longevidad y el contenido de lípidos en *isolíneas* derivadas de poblaciones naturales de *D. melanogaster*

4.2.1. Introducción

Las diferentes ramas de la biología estudian el funcionamiento parcial de los organismos a diferentes niveles, molecular, celular, neurológico, fisiológico y comportamental, y omiten el estudio de las interacciones entre estos componentes. La necesidad de comprender cómo funcionan las diferentes partes que componen a los organismos hace inevitable el análisis de cada una de ellas por separado. No obstante, es importante señalar que, ningún sistema debe ser estudiado únicamente de manera aislada. En particular, es deber considerar al organismo en su totalidad cuando el objetivo es entender cambios evolutivos ya que es todo el organismo (y no caracteres específicos) la unidad de la selección (Lewontin, 1970).

Los caracteres no se heredan como unidades independientes sino que la gran mayoría están indisolublemente asociados, directa o indirectamente, entre sí. Las asociaciones genéticas entre caracteres pueden deberse a pleiotropía (un grupo de genes controla la expresión de más de un carácter), o al desequilibrio de ligamiento que es la asociación no aleatoria entre alelos de loci diferentes. Este puede deberse a (1) ligamiento físico entre dos loci que regulan caracteres diferentes, (2) selección natural cuando algunas combinaciones de alelos de distintos loci que afectan caracteres diferentes tienen ventaja respecto de otras (selección correlacional) y 3) deriva génica (Lynch & Walsh, 1998). Las correlaciones genéticas causadas por desequilibrio de ligamiento suelen ser transitorias. Por el contrario, las asociaciones que se originan por selección natural suelen, al igual que las generadas por pleiotropía, ser más estables y mantienen asociados diferentes caracteres alterando la tasa y la dirección del cambio evolutivo.

Los resultados presentados en la Sección 4.1 sugieren que la variación genética que subyace la expresión de la RI es resultado de la selección natural y, muy probablemente, la intensidad con que la selección afecta la RI varía durante las diferentes épocas del año y entre los diferentes ambientes. Sin embargo, la variación genética en este carácter de resistencia al estrés puede surgir como un efecto indirecto de la selección natural actuando sobre otro(s) carácter(es) correlacionado(s) genéticamente con la RI. Por estas razones nos proponemos, en esta Sección, investigar las posibles asociaciones entre la RI y otros caracteres adaptativos.

En la Sección 4.1 se demostró que la RI es un carácter sexualmente dimórfico y, además, que la magnitud de la varianza genética difirió notablemente entre los sexos. En efecto, la varianza genética en las hembras fue 3,7 veces mayor que en los machos.

Una de las posibles explicaciones para esta marcada diferencia entre sexos es que en aquellos experimentos no se controló el estado reproductivo de las moscas. Es decir que una fracción de la varianza entre hembras podría ser consecuencia de diferencias en el número de veces que copularon, la cantidad de esperma en los órganos de almacenamiento y la fecundidad, dado que las moscas utilizadas no eran vírgenes (Markow & O'Grady, 2005). Por esta razón todos los experimentos que se presentan en esta Sección se realizaron con moscas vírgenes, tanto hembras como machos, con el fin de eliminar el posible efecto del estado reproductivo.

La RI es un carácter con altos niveles de variación genética natural (Sección 4.1) y que además está asociado con otros caracteres de historia de vida (Rion y Kawecki, 2007). Muchos trabajos han intentado establecer si existe alguna relación entre la RI y la longevidad (L). Sin embargo, la evidencia es controvertida, ya que algunos trabajos demostraron que la RI y la L están positivamente correlacionados (Service *et al.*, 1985; Rose *et al.*, 1992; Zwann *et al.*, 1995; Chippindale *et al.*, 1996; Archer *et al.*, 2003, Phelan *et al.*, 2003; Magwire *et al.*, 2010), en tanto que otros no lograron hallar tal asociación (Force *et al.*, 1995; Harshman *et al.*, 1999b; Baldal *et al.*, 2006). Una gran parte de los estudios que han analizado la correlación entre la RI y la L se basan en experimentos de selección artificial y son escasos los datos aportados por estudios basados en isóneas recientemente derivadas de poblaciones naturales.

Otros estudios han propuesto que la RI podría estar relacionada con el almacenamiento de reservas energéticas (Chippindale *et al.*, 1996; Harshman *et al.*, 1999b; Hoffmann *et al.*, 2005b). Las reservas energéticas de los insectos se acopian en forma de glucógeno y triglicéridos en células especializadas para el almacenamiento de reservas, denominadas adipocitos. Los adipocitos pueden acumular grandes cantidades de lípidos en forma de vacuolas lipídicas (*lipid droplets*) en el citoplasma celular, donde los triglicéridos son el componente principal. El metabolismo de las reservas lipídicas en insectos aporta la energía utilizada durante los períodos de diapausa (Hahn & Denlinger, 2007), para el desarrollo embrionario (Ziegler & Van Antwerpen, 2006), es el combustible que usan las moscas durante el vuelo y es la fuente de energía que les permite sobrevivir durante los períodos de escasez el alimento (Arrese & Soulages, 2010). Por lo tanto, es lógico pensar en una asociación positiva y estable entre la RI y la cantidad de las reservas lipídicas del organismo. De hecho, hay estudios en *Drosophila*,

que han demostrado esta asociación (Baldal *et al.*, 2006; Aguila *et al.*, 2007; Ballard *et al.*, 2008).

Uno de los objetivos de la presente Sección es investigar las posibles asociaciones entre la RI, la L y el contenido de lípidos (CL) en isolíneas derivadas de cinco poblaciones naturales de *D. melanogaster*. Particularmente, nos proponemos dar respuesta a las siguientes preguntas ¿Las poblaciones de *D. melanogaster* varían en sus valores medios para la RI, L y CL? ¿El patrón de variación entre poblaciones en cada uno de los caracteres es clinal? ¿Qué aporte realizan a la variación fenotípica total para estos caracteres la variación interpoblacional e intrapoblacional? ¿Qué fracción de la variación total en la RI, la L y el CL se explica por factores genéticos y/o genéticos sexo-específicos? ¿Qué tipo de asociación existe entre los caracteres estudiados? ¿Depende ésta del sexo?

4.2.2. Resultados

Las isolíneas de *D. melanogaster* utilizadas en la esta Sección derivan de capturas realizadas en las localidades de Güemes, Cachi, Lavalle, Uspallata y Neuquén (Tabla 3.1). Las determinaciones de cada carácter se realizaron utilizando el **Diseño Experimental B** descrito en la Sección 3.2.

4.2.2.1. Resistencia a la inanición

Los valores medios de la RI en horas, en hembras y machos de las poblaciones naturales se muestran en la Figura 4.4A. Los individuos procedentes de Güemes fueron los más resistentes al hambre (50,2 h y 46 h para hembras y machos, respectivamente), en tanto que los menos tolerantes fueron las hembras de Neuquén (43,2 h) y los machos de Lavalle (41,3 h).

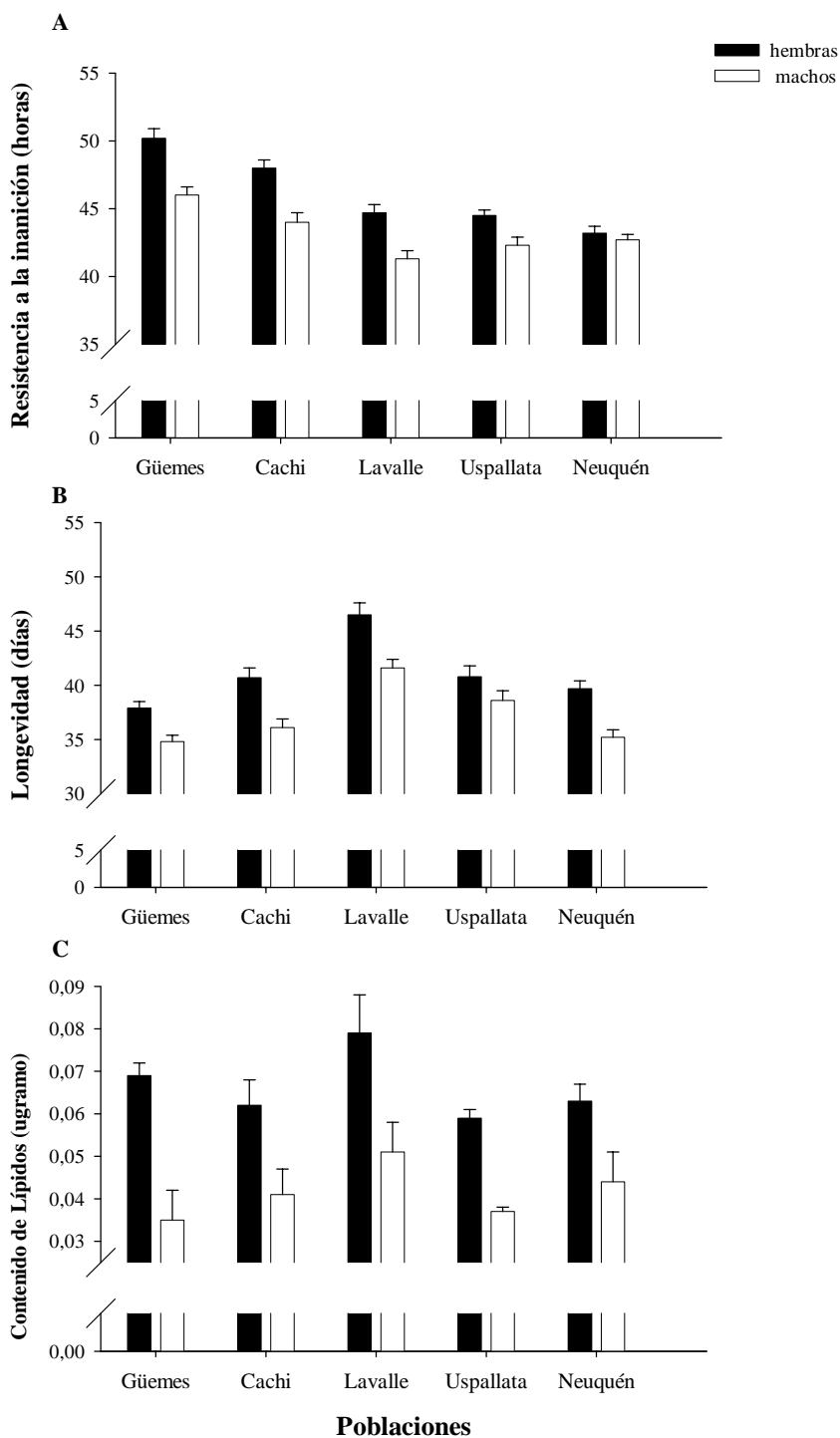


Figura 4.4. Valores medios y sus correspondientes errores estándar en (A) RI (horas), (B) L (días) y (C) CL por individuo (µgramos) en hembras y machos derivados de cinco poblaciones naturales de *D. melanogaster* ubicadas a lo largo de un gradiente latitudinal.

Para evaluar el efecto de las diferentes fuentes de variación sobre la RI efectuamos un ANOVA de tres vías (Sección 3.3.1). Este análisis que el efecto del factor Población sobre la RI fue significativo (Tabla 4.4), y explicó un 7,2% de la variación fenotípica total.

Asimismo, el ANOVA reveló un claro dimorfismo sexual (DS) (también detectado en la Sección 4.1). Las hembras (45,7 h) fueron significativamente más resistentes que los machos (43,05 h) (Tabla 4.4) en concordancia con los resultados de otros estudios (Harbison *et al.*, 2004, 2005; Ballard *et al.*, 2008). Más aún, la ausencia de un efecto significativo de la interacción Población x Sexo indicó que el sentido y la magnitud del DS no difirieron entre las poblaciones estudiadas (Figura 4.4A; Tabla 4.4).

Otro de los resultados que surge del análisis estadístico es que el factor Línea y la interacción Línea x Sexo afectaron significativamente la variación total del carácter (Tabla 4.4) explicando un 15,7% y un 37,7% de la variación, respectivamente. En conjunto ambos factores estiman la variación genética intrapoblacional, la cual explicó un 53,4% de la variación total. La variación entre líneas detectada dentro de las poblaciones indica que parte de la variación del carácter es genética; en tanto que la interacción Línea x Sexo apunta a que una fracción de la base genética del carácter tiene acción específica del sexo. En otras palabras, la magnitud del DS varió entre líneas, lo cual, bajo nuestro diseño experimental apunta a que la variación en el DS tiene base genética.

El análisis del DS para la RI usando como variable el cociente del valor medio de la RI entre hembras y machos para cada población (Figura 4.4A) mostró que las hembras sobrevivieron, en promedio, 6,4% más que los machos. De hecho el valor del DS varió entre 1,09 y 1,01. Los datos de DS se analizaron mediante un ANOVA de dos vías con población y línea (anidado en población) como fuentes de variación. El ANOVA reveló que las diferencias entre poblaciones no fueron significativas; mientras que la variación entre líneas resultó altamente significativa ($F_{56, 483} = 11,1; p < 0,00001$) y explicó un 53,4% de la variación total, confirmando la presencia de variación genética intrapoblacional para el DS (que también fue detectada en la Sección 4.1 con moscas no vírgenes).

Tabla 4.4. ANOVA general para la resistencia a la inanición, la longevidad y el contenido de lípidos. Para cada fuente de variación se dan los grados de libertad (*gl.*), los valores de *F*, su significancia y el porcentaje de la varianza fenotípica que explica cada fuente de variación (σ^2).

Fuentes de variación	Resistencia a la inanición				Longevidad				Contenido de Lípidos			
	<i>gl.</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2	<i>gl.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	σ^2	<i>gl.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	σ^2
Población	4	3,05	0,024	7,2	4	4,54	0,001	8	4	1,21	0,33	1,8
Sexo	1	11,06	0,001	fijo	1	16,42	0,0001	fijo	1	51,64	< 0,0001	fijo
Población x Sexo	4	0,57	0,57	-	4	0,53	0,7	-	4	0,76	0,56	-
Línea (Población)	56	17,20	< 0,0001	15,7	55	6,78	< 0,0001	11,7	23	2,94	< 0,0001	6,3
Línea (Población) x Sexo	56	9,83	< 0,0001	37,7	55	3,55	< 0,0001	19,3	23	1,9	0,008	11,7
Error	1020				930				319			
				39,4				61				80,2

Al evaluar las diferencias en la RI entre poblaciones se observó que: 1) una fracción significativa de la variación fenotípica para el carácter se debe a diferencias entre poblaciones (Tabla 4.4) y 2) las poblaciones del norte de la distribución geográfica fueron, en promedio, más tolerantes a la inanición que las del sur (Figura 4.4A). Esto nos condujo a investigar si las diferencias interpoblacionales siguen un patrón variación clinal. En general, las clinas pueden reflejar la acción de la selección natural sobre un carácter (Endler, 1986). En otras palabras, las clinas podrían ser indicadores de la respuesta adaptativa de las poblaciones a la variación ambiental. El análisis de regresión lineal múltiple de la RI en función de la latitud y la altitud fue significativo ($F_{2, 58} = 5,28$; $p = 0,007$) y sólo la latitud mostró una asociación significativa y negativa con la RI (Figura 4.5). Esta relación entre la latitud y la RI permite explicar hasta un 15% de la variación fenotípica total observada. Dado que con la latitud covarían diversas variables ambientales, se investigó el posible efecto de variables climáticas que covarían con la latitud. La principal variable climática que varía con la latitud es la temperatura, y ésta se sabe regula el ciclo biológico de todos los seres vivos. Para analizar el efecto de la temperatura sobre la variación entre poblaciones realizamos un análisis de regresión lineal múltiple utilizando como variables predictoras la temperatura media anual, la media anual máxima y la media anual mínima de cada localidad, y como variable respuesta la RI. El resultado no reveló una asociación significativa entre las variables climáticas y la RI.

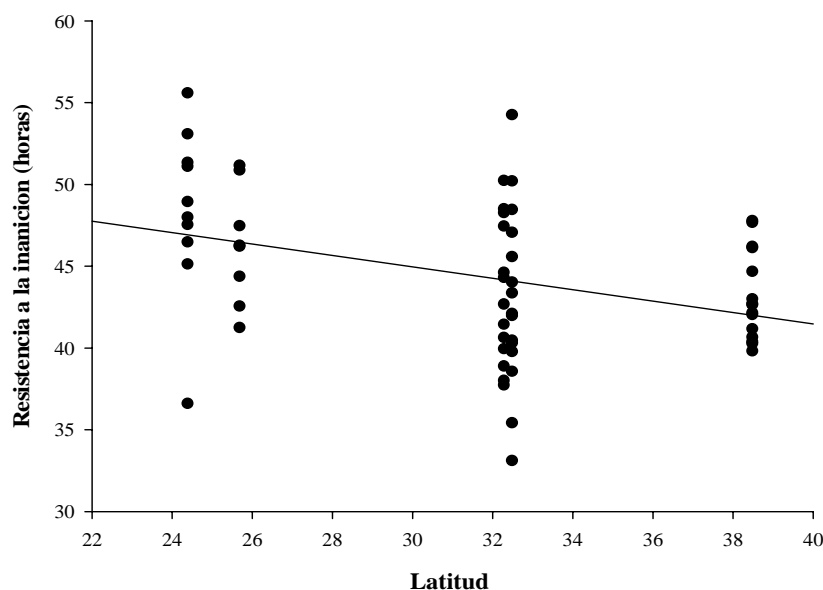


Figura 4.5. Regresión lineal de la RI con la latitud ($\beta = -0,44$ y $p = 0,002$). Cada punto representa el valor medio del carácter para cada una de las isóneas analizadas, promediando el efecto del sexo.

El ANOVA general reveló que una importante fracción de la variación genética para la RI ocurre dentro de las poblaciones naturales. No obstante, este ANOVA no permite detectar cuál (o cuáles) de las poblaciones analizadas exhiben variación genética y variación genética sexo-específica para el carácter. Con este propósito los datos provenientes de cada población se analizaron mediante ANOVAs de dos vías (Sección 3.3.1) con Línea y Sexo como principales fuentes de variación. Estos ANOVAs mostraron un efecto significativo del factor Sexo solamente en las poblaciones del norte argentino (Tabla 4.5). En efecto, en Güemes y Cachi las hembras fueron significativamente más resistentes que los machos, mientras que en las restantes (Uspallata, Lavalle y Neuquén) si bien la tendencia siempre se mantuvo a favor de las hembras las diferencias entre sexos no fueron significativas (Figura 4.4A). La variación entre líneas fue significativa en todas las poblaciones e indicó que la variación en la RI tiene base genética en todas las poblaciones, contribuyendo desde un 5% en Neuquén hasta un 40% en Güemes a la variación fenotípica total. Asimismo, la interacción Línea x Sexo fue altamente significativa en todas las

poblaciones, sugiriendo que éstas albergan variación genética sexo-específica para el carácter, o variación genética para el DS. La contribución de esta interacción a la varianza total varió desde poco más del 18-19% en Cachi y Güemes hasta un máximo de 62,4% en Lavalle (Tabla 4.5). La varianza de la interacción (V_{LxS}) estuvo conformada por la contribución de la diferencia en la varianza entre líneas entre sexos (indicaría diferencias en la magnitud del componente de variación genética entre sexos) y por la desviación de la unidad del r_{HM} (indicaría efectos sexo-específicos, ver Sección 3.3.1 y Anexo) en cada población. En la Figura 4.6, donde se muestra la variación en la RI entre líneas en ambos sexo, puede verse que ambos componentes contribuyeron a la V_{LxS} .

Tabla 4.5. ANOVAs efectuados para la RI en cada una de las poblaciones naturales estudiadas.

Güemes				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	9	22,01	< 0,00001	40,3
Sexo	1	7,64	0,021	Fijo
Línea x Sexo	9	5,27	< 0,00001	19,4
Error	160			40,3
Cachi				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	7	10,68	< 0,00001	23,6
Sexo	1	6,17	0,041	Fijo
Línea x Sexo	7	3,74	0,001	18,7
Error	124			57,7
Lavalle				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	14	27,64	< 0,00001	8,9
Sexo	1	2,22	0,16	Fijo
Línea x Sexo	14	20,44	< 0,00001	62,4
Error	254			28,7
Uspallata				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	12	19,28	< 0,00001	27,8
Sexo	1	2,19	0,16	Fijo
Línea x Sexo	12	8,19	< 0,00001	28,1
Error	222			44,1
Neuquén				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	14	6,17	< 0,00001	5
Sexo	1	0,56	0,49	Fijo
Línea x Sexo	14	6,58	< 0,00001	36,8
Error	260			58,2

gl. Grados de libertad. σ^2 : componente de varianza en porcentaje.

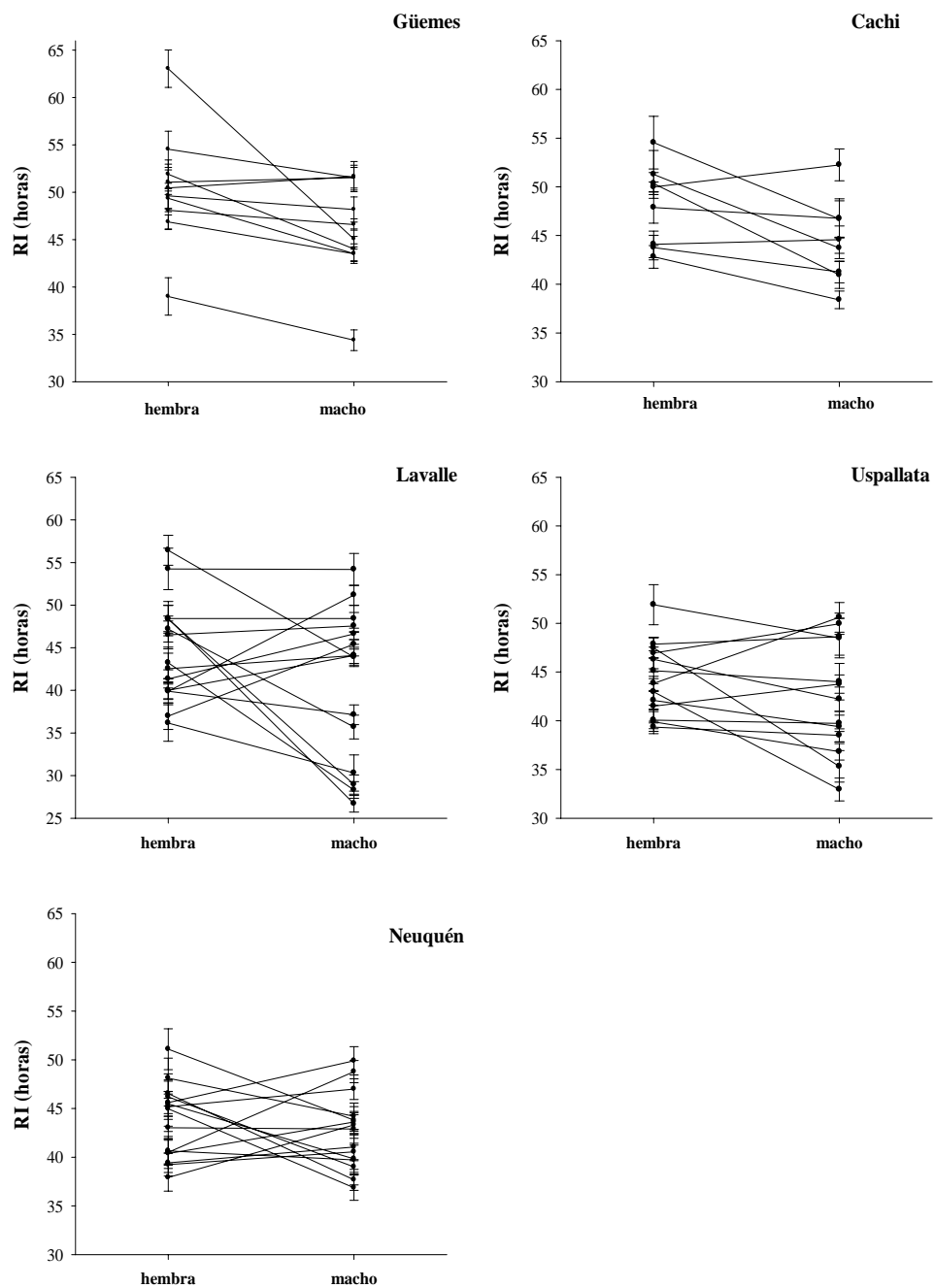


Figura 4.6. Variación en la RI entre líneas dependiendo del sexo en cada población de estudio. Cada línea representa una aislínea analizada.

Tal como se explicó en la Sección 4.1, los coeficientes de correlación genética entre sexos (r_{HM}) indican cuán limitada estaría genéticamente la divergencia de

caracteres homólogos en hembras y macho. Para establecer si los r_{HM} fueron significativamente diferentes de 0 y/o 1 recurrimos a los resultados de los ANOVAs por población. Los valores r_{HM} fueron significativamente diferentes de 0 y 1 en Güemes, en las restantes poblaciones sólo fueron significativamente diferentes de 1, lo cual sugiere independencia entre los genes que afectan la RI en hembras y en machos (Tabla 4.6). Esta independencia genética es el mínimo requerimiento para que el DS en la RI tenga la posibilidad de evolucionar, de manera que el carácter llegue a alcanzar óptimos cada vez más diferentes en cada sexo.

Tabla 4.6. Coeficientes de correlación entre sexos y sus correspondientes errores estándar entre paréntesis.

	Güemes	Cachi	Lavalle	Uspallata	Neuquén
r_{HM}	0,51 (0,3)	0,56 (0,3)	0,13 (0,2)	0,52 (0,3)	-0,01 (0,3)

4.2.2.2. Longevidad

Los valores medios de longevidad (L) por población y sexo se muestran en la Figura 4.4B. Las moscas sobrevivieron entre 35 y 45 días, Lavalle fue en promedio la población más longeva, mientras que los individuos de Neuquén resultaron ser los menos longevos. El ANOVA de tres factores efectuado para investigar la contribución de cada fuente de variación analizada a la variación total de la L, mostró un efecto significativo del factor Población que explicó un 8% de la variación fenotípica total (Tabla 4.4). También reveló un efecto significativo de los factores Línea y Línea x Sexo que explicaron en conjunto un 31% de la varianza total. Por un lado, las diferencias entre líneas sugieren la presencia de factores genéticos asociados a la L, en tanto que la interacción efectos sexo-específicos de los factores genéticos. En otras palabras, la interacción indica que la magnitud del DS varió entre líneas sugiriendo la presencia de variación genética para el DS en la L.

Además, el ANOVA detectó diferencias significativas entre sexos, las hembras fueron significativamente más longevas que los machos, con valores medios de 40,6

y 36,8 días, respectivamente. Este resultado es concordante con información disponible en la literatura (por ejemplo Vieira *et al.*, 2000; Magwire *et al.*, 2010). El DS no varió entre las poblaciones (Figura 4.4B) como lo indica la interacción Población x Sexo que no fue significativa (Tabla 4.4). Tal como explicamos en la Sección 4.2.2.1, el DS puede expresarse mediante un cociente entre los valores medios de L en hembras y en machos en cada población. Los valores del DS variaron entre 1,05 a 1,12 de modo que las hembras sobrevivieron, en promedio, un 10% más tiempo que los machos. El ANOVA empleado para analizar los datos de DS mostró que las diferencias entre poblaciones no fueron significativas, mientras que el factor línea contribuyó significativamente a la variación, dando cuenta de 19,5% de la variación total. Esto confirma que la variación en el DS tiene base genética.

El análisis de regresión lineal múltiple de la L en función de la latitud y la altitud, no fue significativo ($F_{2, 57} = 0,93$; $p = 0,39$).

Al igual que en el estudio de la RI, efectuamos ANOVAs de dos vías (Sección 3.3.1) para conocer la contribución de las distintas fuentes de variación genética en cada población. Estos ANOVAs mostraron que si bien el efecto del factor Sexo fue significativo en Güemes, Cachi y Neuquén (Tabla 4.7) el tiempo de vida medio de las hembras fue mayor que el de los machos en todas las poblaciones (Figura 4.4B). A su vez, el factor Línea fue significativo en casi todas las poblaciones (con la única excepción de Lavalle), lo cual indicó que las diferencias en L dentro de cada población tienen un componente genético. El componente de varianza entre líneas explicó desde 9,1% (Neuquén) hasta 29,9% (Uspallata) de la variación total.

Tabla 4.7. ANOVAs efectuados para la L en cada una de las poblaciones naturales.

Güemes				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	14	4,94	< 0,00001	13,9
Sexo	1	5,39	0,035	Fijo
Línea x Sexo	14	2,25	0,007	10,7
Error	228			75,4
Cachi				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	8	6,82	< 0,00001	18,2
Sexo	1	7,63	0,024	Fijo
Línea x Sexo	8	2,42	0,017	11,7
Error	139			70,1
Lavalle				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	7	0,94	0,45	-
Sexo	1	4,49	0,071	Fijo
Línea x Sexo	7	3,90	0,0006	24
Error	132			76
Uspallata				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	11	16,07	< 0,00001	29,9
Sexo	1	0,52	0,48	Fijo
Línea x Sexo	11	5,51	< 0,00001	24,9
Error	183			45,2
Neuquén				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	13	5,52	< 0,00001	9,1
Sexo	1	6,72	0,022	Fijo
Línea x Sexo	13	3,31	0,0001	19
Error	220			71,9

gl. Grados de libertad.

σ^2 : componente de varianza en porcentaje.

Finalmente, el efecto de la interacción Línea x Sexo fue significativo en todas las poblaciones, es decir el efecto del componente genético sobre la L es específico del sexo. El porcentaje de la variación fenotípica total explicada por esta interacción varió desde 10,7% en Güemes hasta 24,9% en Uspallata. La V_{LxS} se explicó tanto por diferencias en la varianza entre líneas entre machos y hembras (cambio de escala) y por, cambios en el orden del rango. En Cachi y Lavalle el 30% de V_{LxS} se atribuyó a cambios de escala, en las restantes poblaciones más del 95% de la V_{LxS} se explicó por cambios de orden en el rango (Figura 4.7)

El análisis de los r_{HM} (Tabla 4.8) mostró que en Güemes y Uspallata el coeficiente de correlación genética entre sexos fue significativamente diferente de 0 y 1 y en las restantes poblaciones el r_{HM} fue significativamente diferente de 1 y no de 0. Ambos resultados indican que la arquitectura genética de la L entre sexos se encuentra como máximo parcialmente compartida, lo cual implica que en las poblaciones existe materia prima para que el DS siga evolucionando, aunque en algunas este procesos parecería estar más restringido que en otras.

Tabla 4.8. Coeficientes de correlación entre sexos y sus correspondientes errores estándar para cada población.

	Güemes	Cachi	Lavalle	Uspallata	Neuquén
r_{HM}	0,37 (0,2)	0,39 (0,3)	-0,03 (0,4)	0,52 (0,2)	0,26 (0,2)

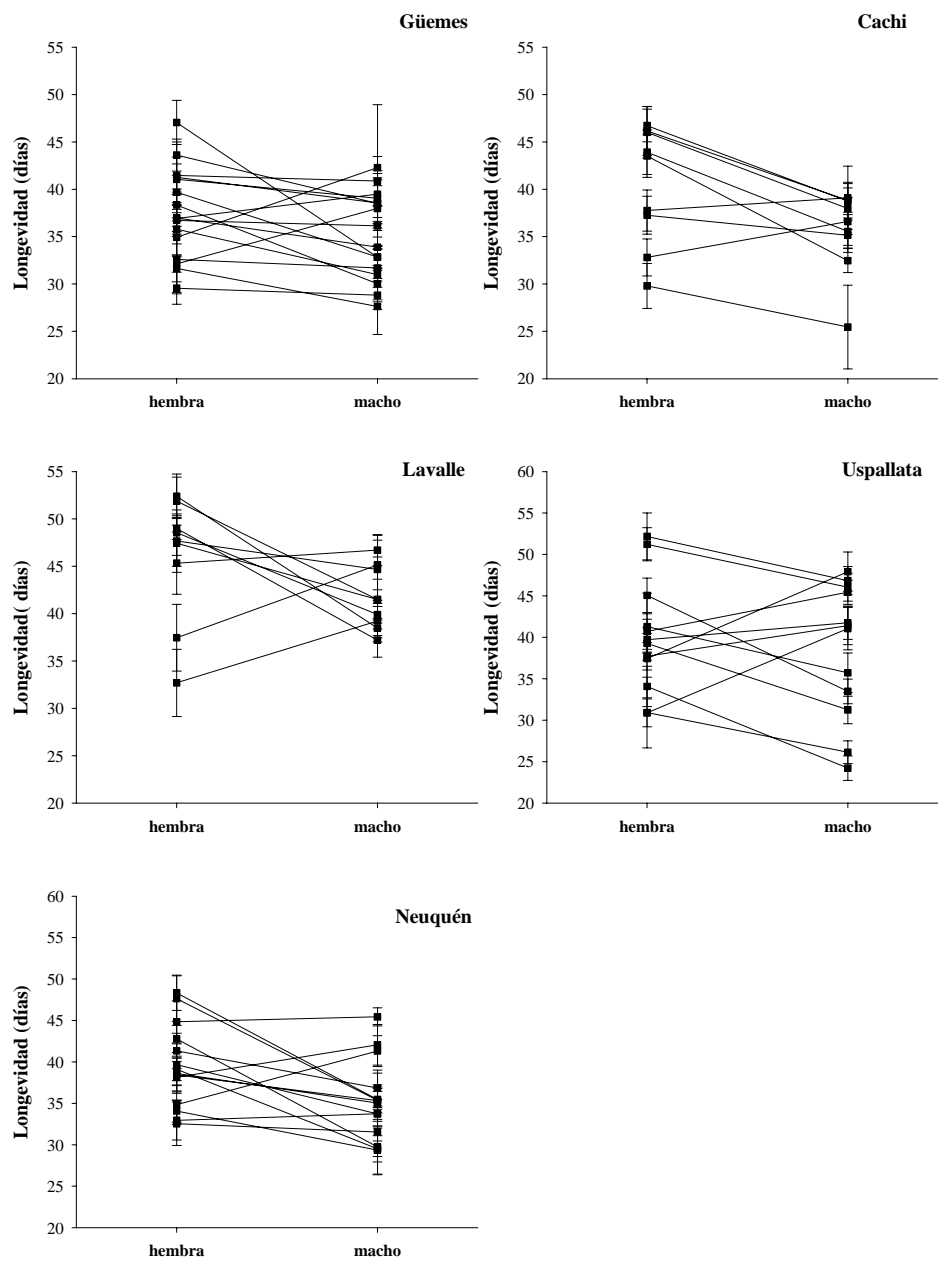


Figura 4.7. Variación en la L entre líneas dependiendo del sexo en cada población de estudio. Cada línea representa una isolínea analizada.

4.2.2.3. Contenido de lípidos

El valor medio del contenido de lípidos por individuo (CL) en μ gramos, en hembras y machos de cada población se muestran en la Figura 4.4C. En líneas generales, las moscas de Lavallo tuvieron un mayor CL, mientras que, las hembras de Uspallata y los machos de Güemes exhibieron los menores valores.

Los datos del CL se analizaron mediante un ANOVA de tres vías que evaluó el efecto de los factores Población, Línea y Sexo cuyos resultados se presentan en la Tabla 4.4. El ANOVA reveló que la variación entre poblaciones no fue significativa, indicando que este carácter no exhibe variabilidad genética interpoblacional. Por el contrario, el factor Línea fue significativo, dando cuenta de 6,3% de la variación fenotípica total detectada. Como se ha mencionado en Secciones previas, este factor permite estimar la contribución del componente genético a la variación fenotípica total del carácter. El efecto de la interacción Línea x Sexo también fue significativo lo cual implica la presencia de variación genética sexo-específica con una contribución relativa a la variación total fue del 11,7%. Conjuntamente, la interacción Línea x Sexo y el factor Línea dan cuenta del 18% de la variación fenotípica intrapoblacional para el CL. Aquí, es importante señalar que la variación entre réplicas estimada por el error del ANOVA fue alta y explicó un 80,2% de la variación total (Tabla 4.4). Esta elevada contribución relativa del error podría explicarse por el bajo número de réplicas ($N = 5$) analizadas, en combinación con la alta variación en las determinaciones del carácter que podría ser consecuencia de la metodología utilizada en la cuantificación.

El CL es también un carácter sexualmente dimórfico en concordancia con resultados obtenidos por otros autores (Robinson *et al.*, 2000; Ballard *et al.*, 2008). El ANOVA señaló que, en todas las poblaciones las hembras almacenan significativamente mayor cantidad de lípidos (0,066 μ g) que los machos (0,041 μ g) (Tabla 4.4; Figura 4.4C). El estimador del DS entre poblaciones varió entre 1,97 a 1,43 indicando que, las hembras almacenan 60% más lípidos que los machos.

El ANOVA de dos vías realizado con el DS como variable mostró que la variación entre poblaciones no fue significativa. En contraste, la variación entre líneas fue significativa dando cuenta del 12% de la variación total. Al igual que para la RI y la L, las diferencias entre líneas sugieren que hay variación genética para el DS dentro de las poblaciones.

Los ANOVAs individuales para cada población permitieron evaluar el aporte de las distintas fuentes de variación genética. Los resultados de estos ANOVAs se presentan en la Tabla 4.9. Es importante señalar que en los análisis estadísticos sólo se incluyeron los datos de 3 líneas de Lavalle, mientras que los valores medios de CL graficados en la Figura 4.4C se obtuvieron a partir de mediciones realizadas en 8 y 4 líneas en hembras y machos, respectivamente. Dado que el número de líneas analizadas en Lavalle fue muy bajo, los resultados del ANOVA deben interpretarse teniendo en cuenta esta limitación. El factor Sexo tuvo un efecto significativo en Cachi, Güemes, Uspallata y Neuquén donde las hembras mostraron un mayor CL que los machos (Tabla 4.9). En Lavalle, si bien el factor Sexo no fue significativo, esto no implica ausencia de DS para el CL. De hecho, como puede verse en la Figura 4.4C las hembras tuvieron un valor de CL mayor que los machos.

La variación entre líneas fue significativa en Cachi, Uspallata y Neuquén y explicó 12%, 4% y 30% de la variación total detectada, respectivamente, de modo que la variación fenotípica para el CL tiene base genética. Con relación a la interacción Línea x Sexo se detectó un efecto significativo únicamente en Güemes y Cachi, que reveló la existencia de variación genética sexo-específica. Esta interacción, cuando resultó significativa, permitió explicar entre 43% (Güemes) y 15% (Cachi) de la variación fenotípica total. Aparentemente la principal causa de la interacción significativa en estas poblaciones fue una mayor varianza entre líneas en hembras que en machos, aunque el componente de cambio de orden en el rango también aportó a la $V_{L \times S}$ en estas poblaciones (Figura 4.8). Los cálculos de r_{HM} no se realizaron para el CL debido al bajo número de líneas analizadas en cada población.

Tabla 4.9. ANOVAs efectuados para el CL en cada una de las poblaciones naturales.

Güemes				
Fuente de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	σ^2
Línea	5	2,41	0,05	-
Sexo	1	12,19	0,017	fijo
Línea x Sexo	5	5,32	0,0005	43,4
Error	50			56,6
Cachi				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	4	3,05	0,022	12,4
Sexo	1	11,43	0,029	fijo
Línea x Sexo	4	2,69	0,038	14,8
Error	68			72,8
Lavalle				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	2	2,54	0,095	4,7
Sexo	1	1,17	0,39	fijo
Línea x Sexo	2	2,04	0,15	20
Error	30			75,3
Uspallata				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	8	2,44	0,016	4,4
Sexo	1	37,83	0,0002	fijo
Línea x Sexo	8	1,58	0,13	5,9
Error	147			89,7
Neuquén				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	4	5,09	0,001	31,1
Sexo	1	44,16	0,0026	fijo
Línea x Sexo	4	0,36	0,83	-
Error	44			68,9

gl. Grado de libertad. σ^2 : componente de varianza en porcentaje

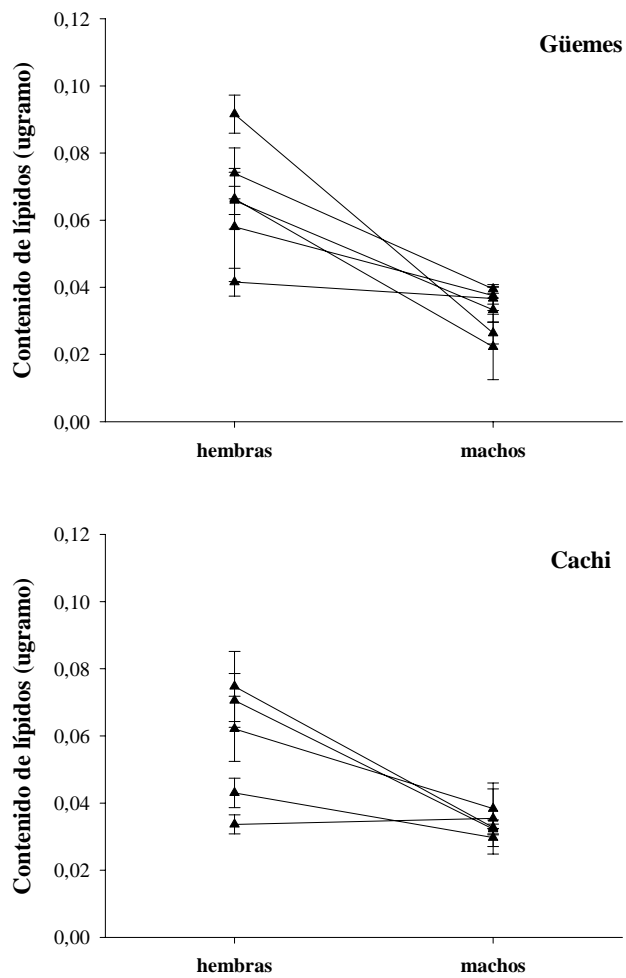


Figura 4.8. Variación en el CL entre líneas dependiendo del sexo en las poblaciones que la interacción Línea x Sexo resultó significativa. Cada línea representa una isolínea analizada.

4.2.2.4. Correlaciones genéticas entre caracteres

Uno de los objetivos de esta Sección fue investigar las posibles asociaciones entre la RI, la L y el CL. Para ello calculamos los coeficientes de correlación producto-momento de Pearson (r) para cada par de caracteres en cada sexo por separado. Además, calculamos la correlación entre sexos para cada carácter.

La correlación entre la RI y el CL fue significativa y positiva tanto en hembras como en machos (Figura 4.9B). Los coeficientes de determinación ($r^2 \times 100$) indicaron que poco más de 12% (en hembras) y 14% (en machos) de la variación total en la RI puede explicarse por su correlación con el CL. La asociación positiva entre estos caracteres sugiere que habría una superposición parcial entre las arquitecturas genéticas de ambos caracteres, de manera que un cambio en uno de ellos podría producir una respuesta correlacionada en el otro y viceversa. En cambio, las asociaciones entre RI y L (Figura 4.9A) y entre L y CL (Figura 4.9C) no fueron significativas en ningún sexo. Esto sugiere una aparente independencia entre las arquitecturas genética de estos caracteres.

El análisis de la correlación entre hembras y machos reveló una asociación positiva y significativa para la RI ($r = 0,33$; $p = 0,007$) y para la L ($r = 0,44$; $p = 0,0003$) pero no para el CL ($r = 0,3$; $p = 0,06$). Los valores de r^2 indican que aproximadamente 10% de la variación en la RI y 19% en la L se deben a factores genéticos compartidos entre hembras y machos. Estos resultados sugieren que ambos caracteres podrían evolucionar de manera parcialmente independiente en cada sexo. En otras palabras el DS podría tomar diferentes valores, dependiendo de algún factor relacionado con la calidad o la abundancia de los recursos alimenticios del ambiente.

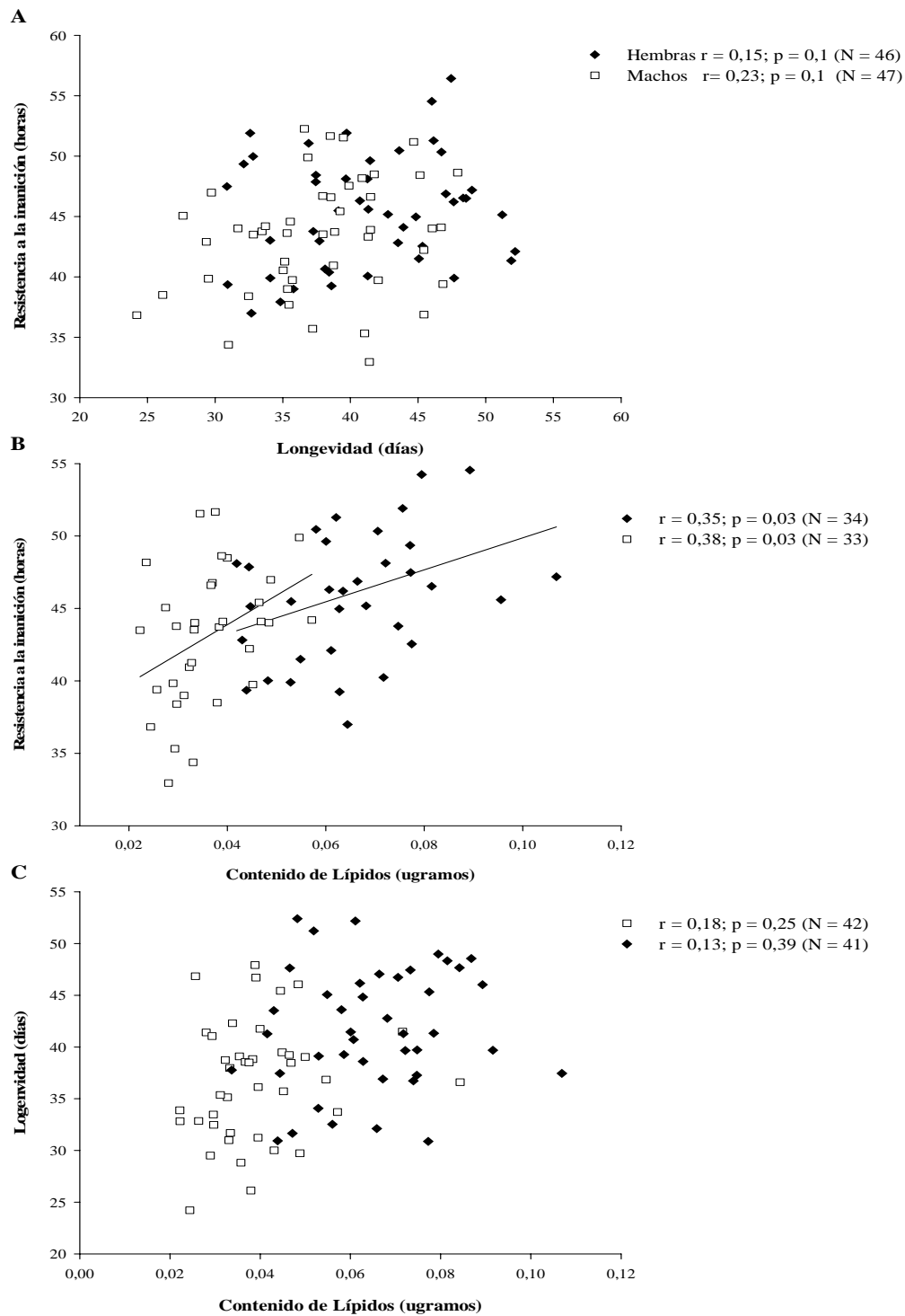


Figura 4.9. Correlaciones genéticas entre los tres caracteres estudiados en hembras y machos. En cada gráfico se presenta el valor del coeficiente de correlación de Pearson (r) y su significación (p) y entre paréntesis se da el número de aislóneas (N) que se utilizaron en cada cálculo. (A) L vs RI; (B) CL vs RI; (C) CL vs L.

4.2.3. Discusión

Los resultados que se presentaron en esta Sección indican que las poblaciones naturales de *D. melanogaster* varían en su RI, y albergan altos niveles de variación genética, y que una fracción de la variación sería el blanco de la selección natural, ya que se detectó un patrón de variación clinal a lo largo de un gradiente ambiental. En este sentido, el análisis de regresión con variables geográficas reveló que la latitud permite explicar una fracción significativa de las diferencias detectadas entre poblaciones. Las poblaciones del norte de la distribución geográfica, resistieron más a la inanición que las poblaciones del sur. No obstante, la clina latitudinal detectada podría no reflejar la acción directa de selección diferencial sobre la RI, sino que podría ser consecuencia indirecta de la selección natural actuando sobre otro(s) carácter(es) genéticamente correlacionado(s) con la RI.

Generalmente, se espera que el suministro local de alimentos sea el factor más importante en la determinación de la RI. Por lo tanto, si existen diferencias entre poblaciones en cuanto a la disponibilidad de los recursos alimentarios entonces cabrían esperar diferencias interpoblacionales. Los resultados aquí expuestos y los reportados en otros estudios indican que la variación interpoblacional es solamente una fracción de la variación total y que la variación intrapoblacional es el principal componente de la varianza para la RI (Griffiths *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2001; Van Der Linde & Sevenster, 2006; Arthur *et al.*, 2008). Si los factores ambientales que determinan la intensidad de los regímenes de selección sobre la RI varían poco entre las poblaciones analizadas entonces se esperaría escasa diferenciación o, alternativamente, si las poblaciones estuvieran conectadas por un intenso flujo génico se diluirían las diferencias interpoblacionales generadas por la adaptación local. Tal como discutimos en la Sección 4.1, en nuestro laboratorio se ha detectado una clara diferenciación entre poblaciones para otros caracteres (Folguera *et al.*, 2008; Lavagnino *et al.*, 2008) en las mismas poblaciones naturales estudiadas en esta Tesis que apoya la hipótesis de adaptación local en la RI.

Nuestra expectativa era que a mayores latitudes las poblaciones fueran más tolerantes a la inanición debido a la mayor estacionalidad en la disponibilidad de recursos alimenticios. Por el contrario, hemos detectado una asociación inversa entre la RI y la latitud, que también fue reportada en poblaciones de *D. ananassae*, *D. kikkawai* y *D. melanogaster* de India (Karan *et al.*, 1998; Karan & Parkash, 1998;

Parkash & Munjal, 2000; Sisodia & Singh, 2010) y *D. simulans* de Australia (Arthur *et al.*, 2008). Una explicación para este patrón de variación clinal en la RI sería que la estacionalidad de los recursos no aumenta con la latitud, y otra es que las poblaciones están adaptadas a la abundancia y distribución de los recursos alimenticios locales generándose un patrón de variación clinal inverso. En efecto, dado que estos insectos saprofitófagos se alimentan de los microorganismos responsables del proceso de descomposición de tejidos vegetales (también del tejido descompuesto) podría ocurrir que las poblaciones que viven a mayores latitudes explotan recursos más duraderos debido a que las fuentes alimenticias se descomponen más lentamente a causa de las bajas temperaturas, reduciendo así el tiempo de exposición de los individuos a períodos de escasez de alimento. Finalmente, otra explicación es que la clina en la RI sea una consecuencia de la selección actuando sobre otros caracteres asociados genéticamente con la RI, entre los que se encuentra la tolerancia al frío. En este marco, hay estudios que han reportado una asociación negativa entre la RI y la tolerancia al frío en líneas seleccionadas artificialmente para ambos caracteres y derivadas de poblaciones naturales (Chippindale *et al.*, 1996; Harshman *et al.*, 1999b; Hoffmann *et al.*, 2005b; Kenny *et al.*, 2008). Estos resultados podrían explicar la clina detectada para la RI como un efecto indirecto de la selección sobre la tolerancia al frío. En general, las clinas latitudinales en *Drosophila* se interpretan como una respuesta adaptativa a la variación de factores climáticos que covarían con la latitud, sin embargo, los mecanismos selectivos que generan este patrón siguen sin estar resueltos.

En la Sección 4.1 no se detectó un patrón de variación latitudinal significativo, aunque la asociación entre la RI y la latitud mostró una tendencia negativa como la detectada en esta Sección. La diferencia entre los resultados de ambos experimentos podría radicar en el estado reproductivo de las moscas el cual, evidentemente afecta diferencialmente la RI en machos y hembras. Asimismo, una explicación alternativa, no excluyente con la anterior es que aquí agregamos una nueva población (Neuquén) que se ubica cuatro grados más al sur que San Rafael (aproximadamente 550 Km.), que fue la población más austral incluida en el estudio anterior. Tanto la ampliación del rango latitudinal de las poblaciones estudiadas como el uso de moscas vírgenes podrían haber incrementado la potencia para detectar la clina.

En general, se observó que las poblaciones difirieron en sus valores fenotípicos medios para los tres caracteres analizados, presentando leves variaciones genéticas entre poblaciones y altos niveles de variación genética intrapoblacional, un patrón que, como se dijo anteriormente, es coincidente con estudios realizados en poblaciones naturales de Australia e India (Hoffmann *et al.*, 2001; Ballard *et al.*, 2008).

El dimorfismo sexual (DS) a favor de las hembras se detectó tanto para la RI, como para la L y el CL, y además, se mantuvo a través de todas las poblaciones naturales analizadas. En la RI y la L, los genotipos difirieron en la magnitud y/o el sentido del DS, lo cual sugiere la presencia de variación genética intrapoblacional para el DS. En el caso del CL sólo dos poblaciones mostraron variación genética para el DS, sin embargo, esto es posible que se deba al bajo número de líneas que se pudieron estudiar. Las correlaciones genéticas positivas entre sexos detectadas en la RI, la L y el CL sugieren que los sexos comparten, al menos parcialmente, la arquitectura genética de un mismo carácter, ya que los valores de los coeficientes de determinación no fueron elevados. Esto sugiere una cierta dependencia evolutiva entre hembras y machos para los caracteres estudiados que limitaría el potencial cambio en el dimorfismo sexual. Sin embargo, es importante destacar que la materia prima necesaria para la evolución del DS está presente.

El estudio de las correlaciones es fundamental para entender el grado de dependencia genética entre caracteres. De este modo, si dos caracteres están correlacionados genéticamente sus caminos evolutivos estarán ligados, y por lo tanto, si la selección afecta a un carácter el otro mostrará una respuesta correlacionada, tanto en sus valores fenotípicos medios como en los niveles de varianza genética, restringiendo la evolución independiente de cada carácter. En cambio, cuando dos caracteres no están correlacionados mostrarán respuestas independientes a diferentes procesos evolutivos. Los resultados expuestos en esta Sección mostraron que la RI y la L no están correlacionados. Es decir, que los patrones de variación genética detectados para la RI no serían un subproducto de la acción de fuerzas evolutivas actuando vía la L. Es importante destacar que los resultados del análisis de correlación entre RI y L difieren respecto de los reportados por otros autores. Por ejemplo, estudios efectuados con líneas seleccionadas artificialmente para mayor RI y para mayor L mostraron respuestas correlacionadas de L y RI, respectivamente (Service *et al.*, 1985; Rose *et al.*, 1992; Zwann *et al.*, 1995; Chippindale *et al.*, 1996;

Archer *et al.*, 2003, Phelan *et al.*, 2003). En cambio, nuestros resultados son coincidentes con los de otros experimentos de selección artificial que no detectaron asociación significativa entre la RI y la L (Froce *et al.*, 1995; Harshman *et al.*, 1999b; Baldal *et al.*, 2006). Aparentemente, las diferencias entre experimentos de selección artificial podrían deberse a diferencias genéticas entre las poblaciones base (poblaciones naturales que inicialmente fueron sometidas a los regímenes de selección), lo cual es muy frecuente en experimentos de selección artificial. Alternativamente, diferencias en las condiciones ambientales entre laboratorios en los que se realizaron los experimentos de selección y/o otros factores podrían ser determinantes en la respuesta a la selección (Harshman & Hoffmann, 2000). Además de estos inconvenientes, se sabe que la correlación entre RI y L puede cambiar a través de las generaciones. Hay trabajos que demuestran que una correlación inicialmente positiva puede desaparecer en líneas seleccionadas para mayor RI, a medida que las líneas se van haciendo más resistentes. Estos resultados sugieren que la correlación entre estos caracteres puede ser inestable, no puede generalizarse, y puede cambiar con las condiciones ambientales (Archer *et al.*, 2003, Phelan *et al.*, 2003; Chippindale *et al.*, 2003; Prasad & Shakarad, 2004).

No obstante, hay estudios que apoyan la hipótesis de una relación genética y fisiológica entre la RI y la L. En efecto experimentos de mapeo de QTLs en *D. melanogaster* han permitido detectar dos QTLs, uno en el cromosoma 2 y otro en el cromosoma 3 que tienen efectos sobre ambos caracteres, lo cual da apoyo a la hipótesis de una base genética compartida (Vieira *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004a). No obstante, cabe destacar que un QTL es una región del genoma que puede albergar centenas o miles de genes, dependiendo del número y la distribución de los marcadores moleculares utilizados en el mapeo. De modo que el compartir un QTL no implica necesariamente que sean los mismos genes los que afectan la RI y la L. Además, los restantes QTLs identificados en los trabajos referidos afectaron a uno de los dos caracteres, debilitando la hipótesis de una amplia base genética compartida. De hecho Vieira *et al.* (2000) sostienen la hipótesis de independencia genética entre RI y L.

La posibilidad de contar con mutantes permite centrar los estudios en la acción de determinados genes, de manera de profundizar nuestro conocimiento de las bases genéticas de las correlaciones. En este sentido, son interesantes los resultados de trabajos con mutantes del gen *methuselah* que incrementan la longevidad y la **RI**

respecto de moscas salvajes (Lin *et al.*, 1998). Asimismo, mutantes de un gen que codifica para el receptor de la ecdysona y de un gen involucrado en la biosíntesis de este esteroide afectan a ambos caracteres, ya que las moscas mutantes son más longevas y más resistentes a la inanición (Simon *et al.*, 2003).

No obstante, otras líneas de evidencia parecen sugerir que diferentes procesos afectan manera desacoplada a la RI y la L. Actualmente, hay un gran interés en la aplicación de terapias antienvjecimiento, las cuales podrían retrasar el desarrollo de enfermedades asociadas con la vejez, tales como neurodegeneración, diabetes y cáncer. El desarrollo de terapias antienvjecimiento ha estimulado el estudio de una vía fundamental denominada TOR (por su nombre en inglés, *Target of Rapamycin*), la cual está evolutivamente conservada desde las levaduras hasta los mamíferos, y cumple la función de regulación del crecimiento celular y el metabolismo, con efectos directos sobre la L (Wullschleger *et al.*, 2006). La inhibición de la vía TOR, por mutaciones en uno de sus componentes principales, TORC1, produce moscas más longevas, sin generar ningún efecto sobre la RI (Kapahi *et al.*, 2004). En cambio, la manipulación de otro componente de esta vía no afectó la L, y sí la RI (Bjedov *et al.*, 2010). Estos resultados abogan a favor de la idea del desacople entre estos caracteres. Por otra parte, la inhibición de un neuropéptido involucrado en la movilización de energía y el comportamiento alimentario denominado hormona adipocinética (AKH, del inglés, *Apokinetic Hormone*), produjo un incremento en la RI sin mostrar cambio alguno en la L (Lee & Park, 2004). Los resultados disponibles indican que si existe una relación entre RI y L la misma parece ser realmente compleja, y que factores genéticos y fisiológicos se combinan para determinar un fenotipo multidimensional (un fenotipo generado por la combinación de más de un carácter) moldeado por la heterogeneidad espacio-temporal del ambiente, y la acción de otros procesos evolutivos.

Los resultados de nuestros estudios indican que las poblaciones naturales de *D melanogaster* disponen de mucha variación genética para la RI y para la L y que la variación natural de estos caracteres no está correlacionada, apuntando a un desacople de sus arquitecturas genéticas y por lo tanto a una potencial independencia evolutiva.

Por otra parte, detectamos una correlación genética positiva entre la RI y el CL lo cual sugiere que la capacidad para sobrevivir períodos de escasez de alimento está asociadas a la energía almacenada en forma de lípidos. De este modo, una fracción

de la variación detectada para la RI podría explicarse, al menos parcialmente, en términos de la variación de un carácter fisiológico como las reservas de lípidos. Además, el hecho de detectar una correlación genética entre estos caracteres sustentaría la hipótesis que sus arquitecturas genéticas están parcialmente acopladas, determinando una mutua dependencia evolutiva.

La base de la correlación genética detectada entre RI y CL puede ser el resultado de la acción de genes con efectos pleiotrópicos sobre el CL y la RI; y, analizada desde un aspecto fisiológico, la correlación puede reflejar simplemente que una mayor cantidad de reservas metabólicas incrementan directamente la supervivencia en condiciones de ausencia de alimento. De hecho, el aumento en las reservas energéticas, en particular de lípidos, parece ser el responsable del cambio en la RI en *Drosophila*. La estrecha relación entre estos dos caracteres ha sido documentada mediante experimentos de selección artificial (Chippindale *et al.*, 1996; Harshman & Schmid, 1998; Harshman *et al.*, 1999a; Hoffmann *et al.*, 2005b; Baldal *et al.*, 2006) y del estudio de poblaciones naturales (Aguila *et al.*, 2007; Ballard *et al.*, 2008). Cabe destacar que se han postulado otros mecanismos fisiológicos para explicar la supervivencia bajo condiciones de inanición como la reducción de la tasa de consumo de reservas bajo condiciones de estrés y la disminución del nivel de energía mínima vital del organismo (para más detalles ver Rion & Kawecki, 2007). Estas respuestas fisiológicas, pueden dispararse frente a cambios ambientales (bajas temperaturas, cambios en el fotoperíodo, disminución de la calidad y las fuentes alimenticias) que anuncian la llegada de la temporada invernal, induciendo un aumento de las reservas energéticas a través de cambios en el comportamiento alimenticio y/o incrementando la biosíntesis de lípidos, y estimulando la diapausa reproductiva (Schmidt *et al.*, 2005a, b) cambios que están acompañados por un aumento en la RI.

En conclusión, podemos afirmar que las poblaciones naturales de *D melanogaster* estudiadas presentan variación genética para el CL. Asimismo, el CL y la RI muestran una correlación genética positiva en ambos sexos, indicando que sus arquitecturas genéticas estarían acopladas y/o que existe un mecanismo fisiológico que los liga. De este modo, parte de la variación genética detectada en la RI entre poblaciones puede explicarse por las variaciones detectadas en el CL.

En la siguiente Sección investigaremos los niveles de variación genética para la RI y la L en líneas isogénicas de sustitución para el cromosoma 2 derivadas de

poblaciones naturales de *D. melanogaster*. De este modo, nos proponemos evaluar cuál es el aporte de los factores genéticos localizados en el cromosoma 2 a la RI y la L.

4.3

Variación en la resistencia a la inanición y su relación con la longevidad en *líneas de sustitución para el cromosoma 2* derivadas de poblaciones naturales de *D. melanogaster*

4.3.1. Introducción

Uno de los principales focos de interés de la biología evolutiva es entender y predecir el cambio fenotípico de un carácter sometido a la selección natural. Para ello es necesario conocer qué fracción de la variabilidad fenotípica del carácter es atribuible a factores genéticos. El estudio de la arquitectura genética de un carácter cuantitativo implica la identificación de los factores genéticos involucrados en su expresión, su modo de acción, los factores ambientales que lo afectan, la variación natural y los factores evolutivos que gobiernan el cambio (Hansen, 2006). Parte del estudio de la arquitectura genética de un carácter cuantitativo es identificar las regiones del genoma (QTL) involucradas en la determinación fenotípica del carácter, y establecer qué proporción de la variación total explican (Mackay, 2001a, b). Actualmente, el mayor desafío está centrado en identificar las regiones genómicas responsables de la *variación natural* en caracteres adaptativos, con el objetivo final de mapear los polimorfismos moleculares responsables de tal variación (Carbone *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2008).

Uno de los objetivos de esta Tesis es caracterizar la arquitectura genética para la resistencia a la inanición. En las Secciones previas hemos investigado la variación genética natural para este carácter utilizando líneas portadoras de genomas completos de origen natural derivadas de diferentes poblaciones de *D. melanogaster* (Sección 4.1 y 4.2). Esta información fue fundamental porque permitió estimar el potencial evolutivo del carácter, el cual depende de la cantidad de variación genética disponible (Houle, 1992). En esta Sección se estudia el efecto de una región del genoma natural sobre la variación de este carácter adaptativo.

Una metodología comúnmente utilizada en estudios genéticos cuantitativos es la **sustitución cromosómica**. La misma consiste en poner en homocigosis un cromosoma proveniente de una población natural en un fondo genético homogéneo. Las líneas de sustitución cromosómica son de uso frecuente en *Drosophila* (Sección 3.1.3).

El objetivo central de la presente Sección es investigar el aporte del cromosoma 2 tanto a la variación natural en la RI y la L como también a los efectos sexo-específicos detectados en las Secciones previas, utilizando líneas isogénicas de sustitución derivadas de diferentes poblaciones naturales de *D. melanogaster*. Asimismo, estudiaremos cómo se estructura la variación genética asociada al

cromosoma 2 para ambos caracteres entre las poblaciones naturales y cuáles son los niveles de variación genética que alberga cada población. Finalmente, investigaremos qué tipo de asociación existe entre la RI y la L en ambos sexos.

4.3.2. Resultados

Los resultados de los análisis genéticos cuantitativos para la RI y la L se obtuvieron a partir del estudio de 60 líneas isogénicas de sustitución cromosómica derivadas de las siguientes poblaciones naturales: Güemes, San Blas, Chilecito, Barreal, Lavalle, Uspallata y Neuquén (Tabla 3.1). Las mediciones de la RI y la L se efectuaron utilizando el **Diseño Experimental B** (Sección 3.2).

4.3.2.1 Resistencia a la inanición

Los valores medios de la RI (en horas) en cada sexo y en cada una de las poblaciones naturales estudiadas se muestran en la Figura 4.10. En promedio, las hembras de Barreal y los machos de Uspallata exhibieron los mayores valores de RI, en tanto que las menos resistentes fueron las hembras de San Blas y los machos de Güemes. La diferencia en la RI entre la línea más resistente (Barreal 45) y la menos resistente (Güemes 251) fue de 35,3 h en hembras, mientras que en machos la diferencia entre Uspallata 8 (más resistente) y Güemes 251 (menos resistente) fue de 29,8 h (Figura 4.11). Las líneas que presentaron los fenotipos más y menos resistentes para cada sexo fueron seleccionadas para llevar a cabo los experimentos de complementación genética con el propósito de identificar variantes alélicas naturales para los genes responsables de las diferencias en la RI (Sección 4.4).

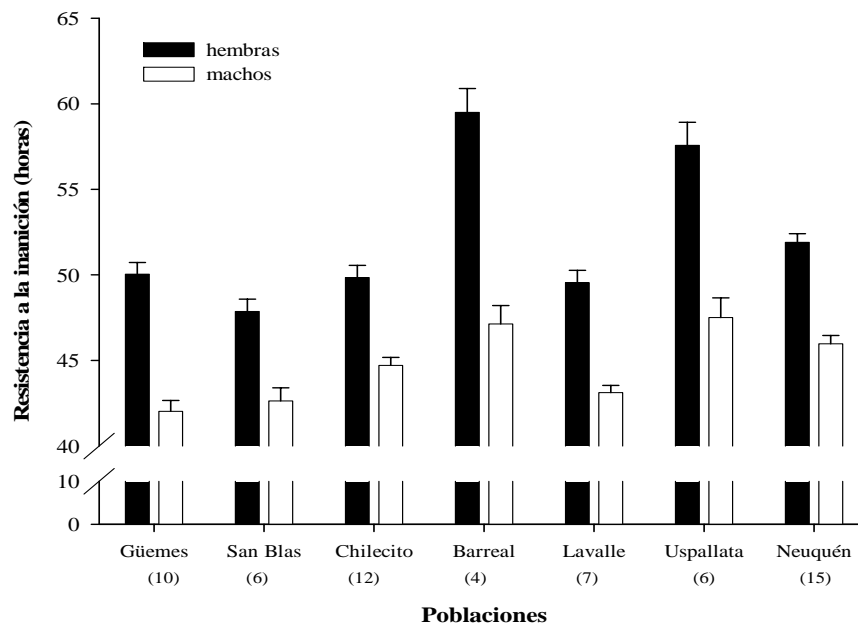


Figura 4.10. Valores medios \pm error estándar de la RI (horas) en machos y hembras de líneas isogénicas de sustitución para el cromosoma 2 derivadas de siete poblaciones naturales de *D. melanogaster* ubicadas a lo largo de un gradiente latitudinal. Entre paréntesis se indica la cantidad de líneas analizadas en cada población, en hembras y machos.

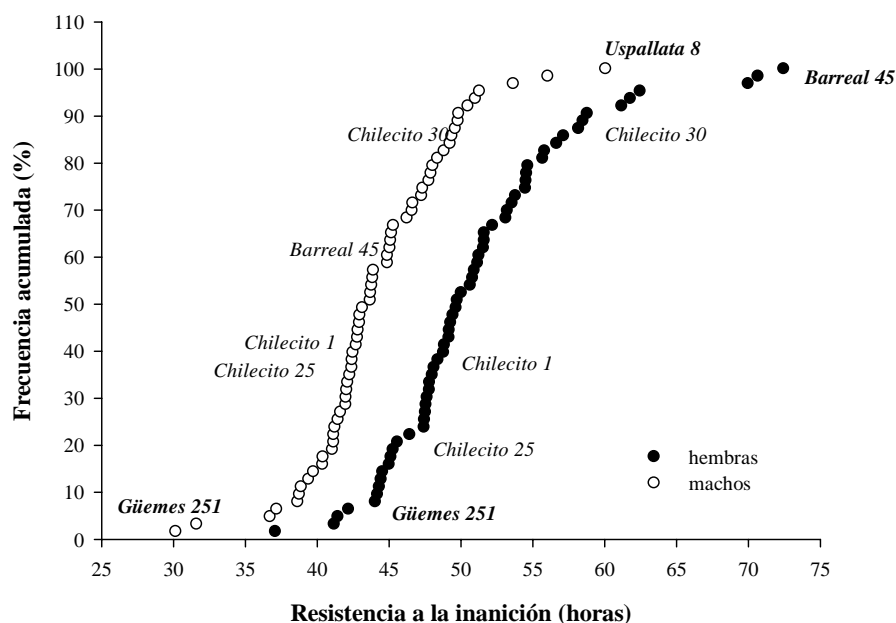


Figura 4.11. Frecuencia acumulada de los valores de la RI para las 60 líneas isogénicas de sustitución en sexos separados. Barreal 45, Uspallata 8 y Güemes 251 mostraron los valores de RI más extremos en hembras y en machos. Estas líneas junto con las derivadas de Chilecito se utilizaron en los análisis de complementación genética descriptos en la Sección 4.4.

Con el objeto de conocer el aporte a la variación en la RI y la significación estadística de cada fuente de variación en las líneas de sustitución se realizó un ANOVA de tres vías. El resultado del mismo reveló un efecto significativo del factor Población sobre la RI (Tabla 4.10) que explicó un 7,3% de la variación fenotípica total, indicando la presencia de variación genética interpoblacional asociada al cromosoma 2. Asimismo, el factor Línea y la interacción Línea x Sexo tuvieron un efecto significativo sobre la RI y sus aportes a la variación fenotípica total fueron de 22,3% y 38,3%, respectivamente (Tabla 4.10). Conjuntamente, ambos factores brindan una estimación de la variación genética intrapoblacional asociada al cromosoma 2. Como se ha mencionado previamente, las diferencias entre líneas sugieren que una porción importante de la variación en la RI puede explicarse por variación en factores genéticos localizados en el cromosoma 2, en tanto que la interacción Línea x Sexo sugiere la presencia de factores genéticos específicos del

sexo. El análisis de la interacción desde el dimorfismo sexual (DS) apunta a que la magnitud y del DS varía entre líneas de sustitución, es decir hay variación genética natural asociada sólo al cromosoma 2 para el DS.

Tabla 4.10. ANOVA general para la RI. Para cada fuente de variación se reportan los grados de libertad (*gl.*), los valores de *F* y su significancia, y el porcentaje de la varianza fenotípica que explica cada fuente de variación (σ^2).

Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Población	6	2,36	0,04	7,3
Sexo	1	63,25	< 0,0001	fijo
Población x Sexo	6	1,01	0,42	-
Línea (Población)	53	24,30	< 0,0001	22,3
Línea (Población) x Sexo	53	12,45	< 0,0001	38,3
Error	1023			32,1

Las hembras (51,5 h.) fueron significativamente más resistentes que los machos (44,6 h.) y la magnitud del DS no varió entre poblaciones, como lo indica la interacción Población x Sexo que no fue estadísticamente significativa (Figura 4.10). Tal como especificamos en las Secciones 4.1 y 4.2 el DS se puede calcular por el cociente del valor medio de RI entre hembras y machos para cada población. Los valores del DS variaron entre 1,11 a 1,26, de modo que las hembras resistieron, en promedio, hasta un 16% más que los machos. El análisis del DS mediante un ANOVA de dos factores (población y línea anidado en población) reveló, que la variación entre poblaciones no fue significativa ($F_{6, 53} = 0,93$; $p = 0,47$); mientras que, la variación entre líneas (anidado en población) fue altamente significativa ($F_{53, 497} = 10,3$; $p < 0,0001$). Este factor permitió explicar poco más del 50% de la variación total, confirmando la presencia de variación genética intrapoblacional para el DS.

El ANOVA mostró que una fracción significativa, aunque pequeña (en comparación con la variación intrapoblacional), de la variación para la RI se debió a diferencias interpoblacionales. Para determinar si la variación interpoblacional seguía algún patrón clinal se realizó un análisis de regresión múltiple lineal en función de la latitud y la altitud, el cual reveló una asociación positiva y significativa ($F_{2, 57} = 5,05$;

$p = 0,009$) entre la RI y ambas variables independientes, de modo que las poblaciones localizadas a menores latitudes y altitudes fueron menos tolerantes que las más australes y situadas a mayores alturas (Figura 4.12). La regresión permitió explicar un 13% de la variación fenotípica total observada. El análisis del efecto de variables climáticas sobre la variación en la RI mostró que ninguna de las variables predictoras testeadas afectaba la variación en la RI.

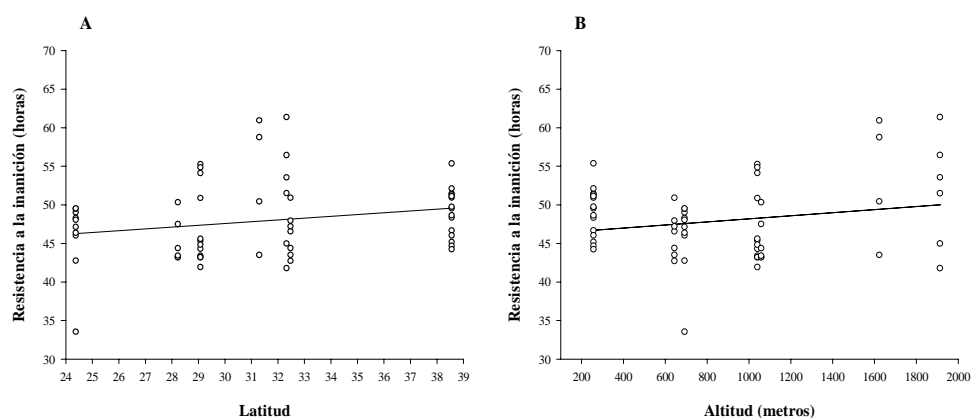


Figura 4.12. Regresión lineal significativa de la RI con la latitud (A, $\beta = 0,35$ y $p = 0,008$) y la altitud (B, $\beta = 0,34$ y $p = 0,01$). Cada punto representa el valor medio de la RI para cada línea isogénica de sustitución analizada, promediando los sexos debido a que Población x Sexo fue no significativo en el ANOVA general.

En segunda instancia realizamos ANOVAs para evaluar la contribución relativa de la variación genética y la variación genética sexo-específica en cada población por separado. Los resultados de los ANOVAs bifactoriales con Línea y Sexo como fuentes de variación principales revelaron un efecto significativo del Sexo en 4 poblaciones (Güemes, Chilecito, Lavalle y Neuquén) (Tabla 4.11), donde las hembras fueron significativamente más resistentes que los machos. Si bien en las restantes poblaciones (San Blas, Barreal y Uspallata) se detectó la misma tendencia (Figura 4.10), el factor sexo no fue significativo.

Los ANOVAs también revelaron un efecto significativo del factor Línea, lo cual sugiere la presencia de variación genética para la RI asociada al cromosoma 2 en cada una de las poblaciones (Tabla 4.11), aunque el nivel de variación, estimado a partir del componente de varianza entre líneas (σ^2_L), difirió ampliamente entre

poblaciones. El componente de varianza entre líneas (σ^2_L) explicó hasta un máximo del 47% de la variación fenotípica total en Chilecito, y un mínimo de 4,6% en San Blas. También, la interacción Línea x Sexo fue altamente significativa en todas las poblaciones, lo cual indica la presencia de variación genética sexo-específica asociada al cromosoma 2. La contribución de esta interacción a la varianza total varió desde un máximo de 70% en Barreal hasta un mínimo de 22,3% en Chilecito; es importante destacar que en Barreal sólo pudieron analizarse 4 líneas de sustitución. Sin embargo, a pesar del bajo número de líneas, hemos mantenido a esta población en los análisis debido a que la línea Barreal 45 fue la que mostró una mayor RI en hembras y se utilizó en los experimentos de complementación genética que presentaremos en la Sección 4.4. Seguida a Barreal se encuentra San Blas donde la interacción explicó un 48% de la varianza total (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. ANOVAs efectuados para la RI en cada una de las poblaciones naturales

Güemes				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	9	44,39	< 0,0001	30,8
Sexo	1	18,21	0,021	Fijo
Línea x Sexo	9	14,74	< 0,0001	39,6
Error	173			29,6
San Blas				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	5	9,19	< 0,0001	4,6
Sexo	1	3,88	0,1	Fijo
Línea x Sexo	5	11,15	0,001	48
Error	108			47,4
Chilecito				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	11	37,28	< 0,0001	47
Sexo	1	13,68	0,003	Fijo
Línea x Sexo	11	7,75	< 0,0001	22,3
Error	205			30,7
Barreal				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	3	75,25	< 0,0001	15,7
Sexo	1	3,42	0,16	Fijo
Línea x Sexo	3	52,34	< 0,0001	70,5
Error	72			13,7
Lavalle				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	6	9,33	< 0,0001	13,3
Sexo	1	14,69	0,008	Fijo
Línea x Sexo	6	5,73	< 0,0001	34,6
Error	111			52,1
Uspallata				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	5	35,08	< 0,0001	31,6
Sexo	1	5,55	0,064	Fijo
Línea x Sexo	5	18,89	< 0,0001	44,2
Error	97			24,3
Neuquén				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	14	9,27	< 0,0001	7,3
Sexo	1	17,69	0,0008	Fijo
Línea x Sexo	14	6,82	< 0,0001	34,6
Error	265			58,2

El análisis de la interacción Línea x Sexo reveló que la misma puede explicarse tanto por diferencias en la magnitud de la varianza entre líneas entre sexos (*cambio de escala*) y por desviaciones de la unidad del coeficiente de correlación entre sexos (*cambio de orden en el rango*). En casi todas las poblaciones, a excepción de Barreal y Lavalle, más de 70% de $V_{L \times S}$ se atribuyó a cambios de orden en el rango (Figura 4.13).

Los valores de los coeficientes de correlación genética entre sexos (r_{HM}) se reportan en la Tabla 4.12. Los valores r_{HM} no fueron significativamente diferentes de 0 (excepto en Chilecito) y sí diferentes de 1 en todas las poblaciones. Este resultado, semejante al descrito en la Sección 4.2, sugiere que la constelación de genes localizados en el cromosoma 2 que afectan la RI en cada sexo sería diferente. Este resultado podría indicar que la fracción de la arquitectura genética de la RI compartida entre los sexos no incluiría genes que mapean en el cromosoma 2. Así, en cada una de las poblaciones naturales el DS para la RI mantiene la capacidad de evolucionar.

Tabla 4.12. Coeficiente de correlación genética entre sexos \pm error estándar por población.

	Güemes	San Blas	Chilecito	Barreal	Lavalle	Uspallata	Neuquén
r_{HM}	0,18 \pm 0,3	-0,01 \pm 0,5	0,61 \pm 0,3	0,28 \pm 0,6	0,37 \pm 0,4	0,17 \pm 0,4	0,14 \pm 0,2

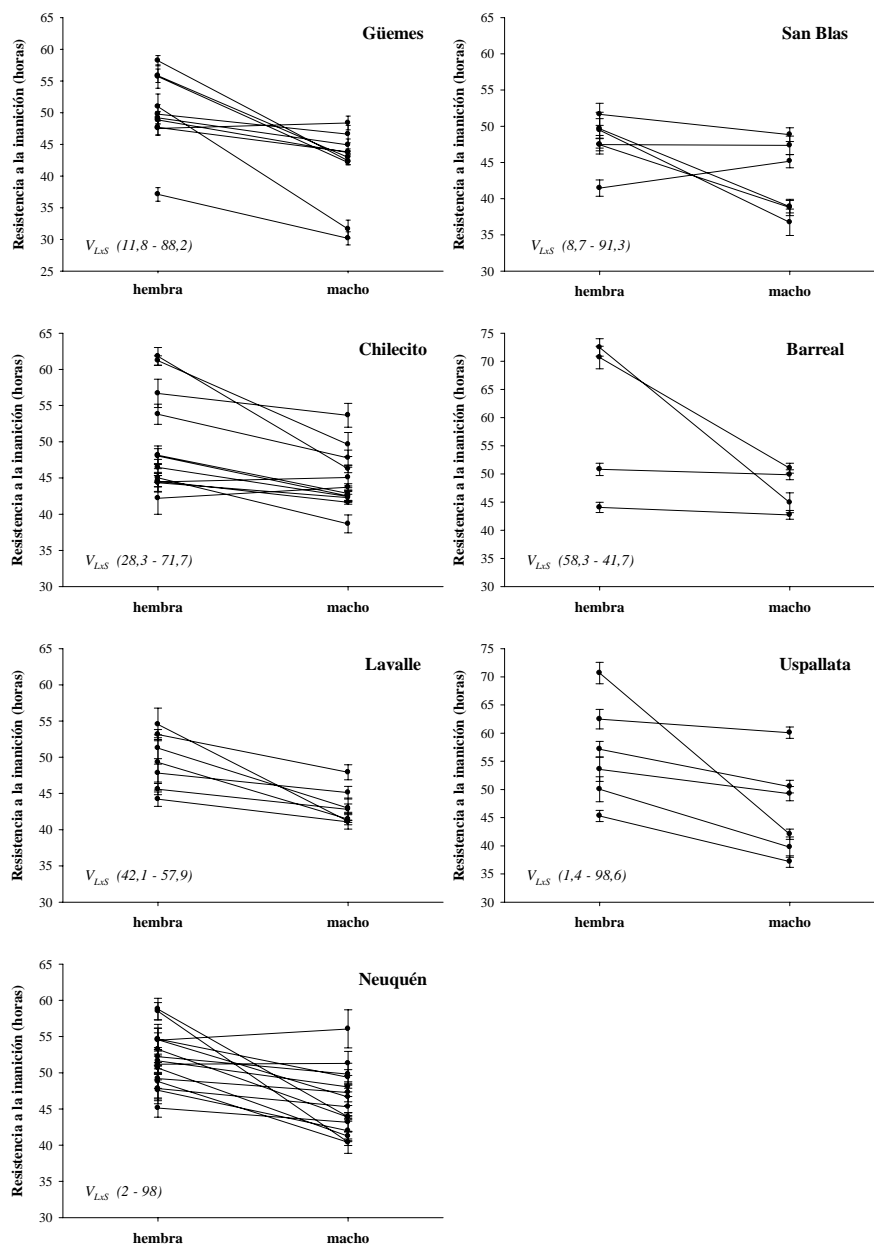


Figura 4.13. Variación en la RI entre líneas de sustitución dependiendo del sexo en cada población de estudio. Cada línea representa una línea isogénica analizada. V_{LXS} es la varianza de la interacción Línea x Sexo, el primer componente del paréntesis indica el porcentaje de la V_{LXS} que explica el cambio de escala, es segundo componente del paréntesis indica el porcentaje de la V_{LXS} que explica el cambio en el orden del rango.

4.3.2.2. Longevidad

Los valores medios de la L (en días) en hembras y machos de cada una de las poblaciones naturales analizadas se muestran en la Figura 4.14. En esta puede verse, en general, que las moscas vivieron de 29 a 42 días. Los individuos derivados de Lavalle fueron los más longevos, en tanto que los de Güemes sobrevivieron menos tiempo. Uno de los resultados que más llamó nuestra atención fue el hecho que en todas las poblaciones (excepto San Blas), los machos fueran más longevos que las hembras, que es lo opuesto a lo que se ha descripto, tradicionalmente en *Drosophila* y para los otros caracteres estudiados en esta Tesis.

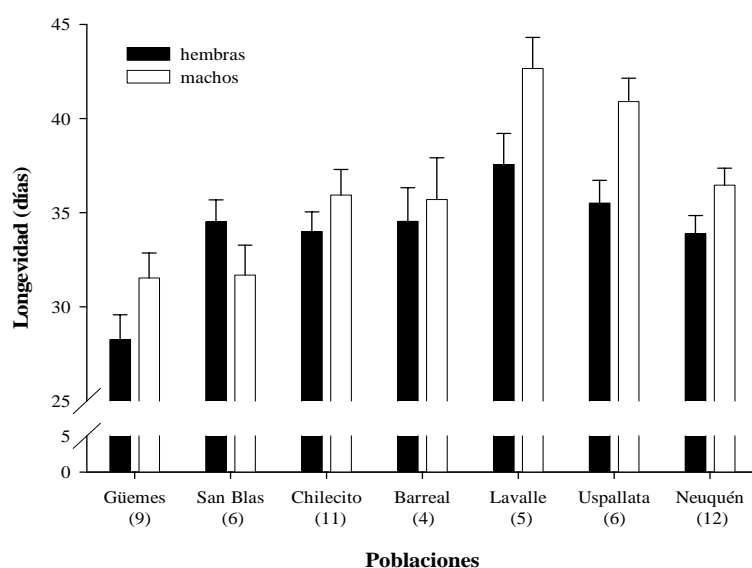


Figura 4.14. Valores medios \pm error estándar de la L (en días) en machos y hembras de las líneas isogénicas de sustitución para el cromosoma 2 derivadas de siete poblaciones naturales de *D. melanogaster* ubicadas a lo largo de un gradiente latitudinal. El número entre paréntesis indica la cantidad de líneas analizadas por población.

El conjunto de datos de L de las líneas de sustitución se analizó mediante un ANOVA de tres vías. Este análisis reveló un efecto no significativo del factor Población ($F_{6, 860} = 1,3, p < 0,25$), sugiriendo que la variación entre poblaciones no contribuye significativamente a la variación total detectada para la L. Este resultado, que contrasta con las observaciones realizadas en aisladas sugiere la ausencia de

variación genética interpoblacional asociada al cromosoma 2 para este carácter. En cambio, la variación entre líneas fue significativa y explicó el 32% a la variación total en la L ($F_{46, 860} = 15,56, p < 0,0001$), lo cual indica la presencia de factores genéticos asociados al cromosoma 2 responsables de la variación intrapoblacional en la L. También, la interacción Línea x Sexo tuvo un efecto significativo ($F_{46, 860} = 4,07, p < 0,0001$), dando cuenta de un 17% de la variación fenotípica total, poniendo de manifiesto la presencia de variación genética sexo-específica. La interpretación desde el DS sugiere que la magnitud del DS varío entre líneas, apuntando a que en el cromosoma 2 hay genes que exhiben variación alélica que afecta el DS de la L. Conjuntamente, el factor Línea y la interacción Línea x Sexo brindan una estimación de la variación genética intrapoblacional asociada al cromosoma 2, la cual explicó el 49 % de la variación total detectada en la L.

Como ya se ha demostrado en anteriores Secciones, la variación genética intrapoblacional dio siempre cuenta de un mayor porcentaje de la variación total en la L que la variación genética interpoblacional, tanto en el caso de los estudios de isolíneas en los que las diferencias genéticas entre líneas pueden encontrarse en cualquier parte del genoma, como en las líneas de sustitución en las que las diferencias genéticas sólo pueden encontrarse en el cromosoma 2.

Las hembras, en promedio, vivieron 2,4 días menos que los machos pero esta diferencia no fue significativa ($F_{1, 46} = 2,82, p < 0,1$). Es interesante resaltar el cambio de sentido que sufrió el DS en las líneas de sustitución del cromosoma 2 que fue común a casi todas las poblaciones (Figura 4.14). El cálculo del DS por población tomó valores que variaron entre 0,86 y 0,96 de modo que los machos sobrevivieron, en promedio, cerca de un 9% más que las hembras. La única excepción fue San Blas en la que el DS fue 1,08. El análisis estadístico del DS indicó que la variación entre poblaciones no aportó significativamente a la variación total del DS ($F_{6, 45} = 0,9, p = 0,5$), en tanto que la variación entre líneas fue altamente significativa ($F_{53, 397} = 3,8, p < 0,0001$) y explicó un 24,6% de la variación total, apuntando a que la variación en la magnitud del DS tiene base genética.

Los análisis por población permitieron determinar la magnitud relativa de la variación genética y la variación genética sexo-específica en cada población. Los resultados de los ANOVAs se muestran en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13. ANOVAs efectuados para la L en cada población naturales analizada.

Güemes				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	8	37,8	< 0,0001	59,8
Sexo	1	0,94	0,36	Fijo
Línea x Sexo	8	3,62	0,0007	9,2
Error	145			31
San Blas				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	5	14,3	< 0,0001	44,2
Sexo	1	2,3	0,2	Fijo
Línea x Sexo	5	1,1	0,34	0,8
Error	99			55
Chilecito				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	10	20,9	< 0,0001	37
Sexo	1	0,03	0,86	Fijo
Línea x Sexo	10	5,6	< 0,0001	22,5
Error	170			40,5
Barreal				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	3	11,5	< 0,0001	13,2
Sexo	1	0,04	0,8	Fijo
Línea x Sexo	3	6,8	0,004	32,7
Error	69			54,1
Lavalle				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	4	14	< 0,0001	36,8
Sexo	1	2,1	0,2	Fijo
Línea x Sexo	4	2,7	0,05	9,4
Error	75			53,8
Uspallata				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	5	2,8	< 0,0001	11,7
Sexo	1	27,6	0,003	Fijo
Línea x Sexo	5	0,5	0,74	-
Error	93			88,3
Neuquén				
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	σ^2
Línea	11	9	< 0,0001	12,7
Sexo	1	1,2	0,29	Fijo
Línea x Sexo	11	5,1	< 0,0001	26,6
Error	201			60,6

El factor Sexo tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la L únicamente en Uspallata, donde los machos vivieron 5,4 días más que las hembras. En las otras poblaciones las diferencias en la L entre hembras y machos no fueron significativas, aunque la tendencia se mantuvo a favor de los machos (excepto San Blas, Figura 4.14). Al mismo tiempo, el factor Línea mostró un efecto significativo en todas las poblaciones analizadas, indicando que todas albergan variación genética (estimada por σ^2_L) para la L asociada al cromosoma 2 (Tabla 4.13). Así, Güemes fue la población que presentó la mayor σ^2_L , dando cuenta de casi 60% de la variación, en tanto que en Uspallata el porcentaje de la variación total explicado por la variación entre líneas ($\sigma^2_L = 11,7\%$) fue el menor.

El análisis de la interacción Línea x Sexo mostró un efecto significativo sobre el carácter en Güemes, Chilecito, Barreal y Neuquén, apuntando a la presencia de variación genética sexo-específica para la L asociada al cromosoma 2. La contribución de esta interacción a la varianza total varió entre 32,7% en Barreal hasta 9,2% en Güemes. En las poblaciones en las que la interacción Línea x Sexo resultó ser significativamente diferente de cero, más del 74% de la V_{LxS} fue atribuible al cambio de orden en el rango de la L entre hembras y machos (Figura 4.15).

El cómputo de r_{HM} en cada población dio como resultado que en Güemes, San Blas y Chilecito el coeficiente fue significativamente diferente de 0 y de 1, sugiriendo que una fracción de los genes involucrados en la variación de la L es común a ambos sexos, y otra es diferente (Tabla 4.14). En las poblaciones de Barreal y Neuquén el r_{HM} no fue significativamente diferente de 0 y sí significativamente diferentes de 1, indicando que distintos genes afectan la L tanto en hembras como en machos. Finalmente Lavalle es un caso extraño porque el r_{HM} no fue significativamente diferente de 0 ni de 1. Estos resultados en comparación con los de la Sección 4.2 indican que la fracción de la arquitectura genética para la L que comparten los sexos incluye genes localizados en el cromosoma 2, dado que la parcial dependencia genética del carácter entre los sexos (descubierta en la Sección 4.2) se mantiene (y podríamos decir que aumenta) cuando investigamos líneas que sólo difieren en el cromosoma 2. El aumento de la dependencia genética descubierto en líneas de sustitución para el cromosoma 2 sugiere la importancia de este cromosoma en la determinación del DS para la L.

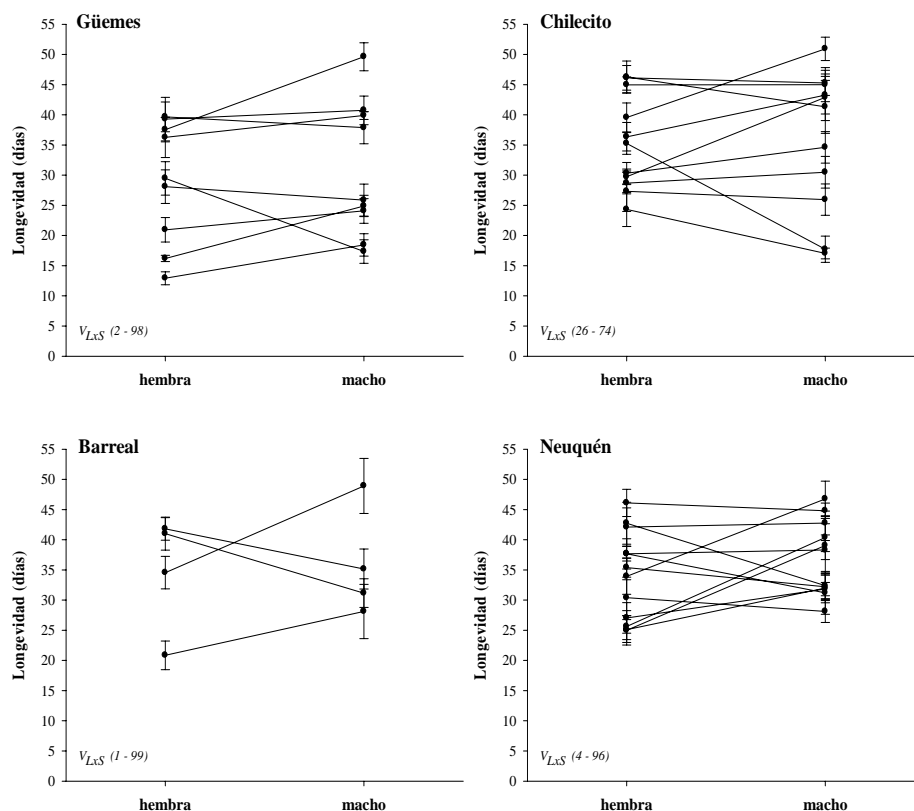


Figura 4.15. Variación en la L entre líneas de sustitución cromosómica en machos y hembras en cada población donde la interacción Línea x Sexo fue significativa. Cada línea representa una línea isogénica analizada. V_{LxS} es la varianza de la interacción Línea x Sexo, el primer componente dentro del paréntesis indica el porcentaje de la V_{LxS} que explica el cambio de escala, es segundo componente indica el porcentaje de la V_{LxS} que explica el cambio en el orden del rango.

Tabla 4.14. Coeficiente de correlación genética entre sexos \pm error estándar por población.

	Güemes	San Blas	Chilecito	Barreal	Lavalle	Uspallata	Neuquén
r_{HM}	$0,75 \pm 0,2$	$0,72 \pm 0,3$	$0,68 \pm 0,2$	$0,22 \pm 0,6$	$0,78 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,4$ (error)	$0,32 \pm 0,3$

4.3.2.3. Correlaciones genéticas entre caracteres

Para evaluar el grado de asociación entre la RI y la L calculamos el coeficiente de correlación de Pearson (r) y, además, calculamos la correlación entre sexos para cada carácter. Los resultados de estos análisis mostraron que los coeficientes de correlación entre la RI y la L no fueron significativamente diferentes de cero en hembras ($r = 0,1$, $p = 0,47$) ni en machos ($r = 0,2$, $p = 0,1$). Este resultado sugiere que los factores genéticos localizados en el cromosoma 2, que afectan la expresión de ambos caracteres serían diferentes. El mismo resultado se obtuvo en la Sección 4.2 con el estudio de isolíneas (líneas con los tres cromosomas de origen natural). **La ausencia de asociación genética entre la RI y la L tanto en isolíneas como en líneas de sustitución dan claros indicios que la arquitectura genética de la RI y de la L no está compartida en las poblaciones naturales estudiadas, y por lo tanto sus caminos evolutivos serían completamente independientes.**

Asimismo, investigamos la asociación entre la RI y la L utilizando un método alternativo que consistió en evaluar estadísticamente la diferencia entre el coeficiente de variación ($CV = \text{desviación estándar} / \text{media poblacional}$) de la RI (CV_{RI}) y de la L (CV_L) para cada combinación sexo-población. Las diferencias entre CV_{RI} y CV_L se evaluaron mediante la prueba no-paramétrica de Mann-Whitney, que resultó significativa en casi todos los casos excepto en Barreal (Tabla 4.15). Estos resultados indican diferencias substanciales en las arquitecturas genéticas de la RI y la L en ambos sexos, y confirman su independencia. Además, este análisis no-paramétrico permitió evaluar la asociación entre la RI y la L en cada población natural por separado.

Tabla 4.15. Análisis de Mann-Whitney no paramétrico entre los coeficientes de variación de la RI y la L medidos por sexos separados y para cada población. Se reporta el estadístico U y su nivel de significancia ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$)

	Hembras	Machos
Güemes	70**	76**
San Blas	32*	35
Chilecito	111***	117***
Barreal	16	16
Lavalle	24*	25**
Uspallata	36**	36**
Neuquén	141***	134***

Además, se calcularon los coeficientes de correlación entre sexos para RI y L teniendo en cuenta todas las líneas de sustitución sin discriminar por población. Los resultados mostraron que los valores de RI en hembras y en machos están correlacionados positiva y significativamente ($r = 0,42$; $p = 0,0009$). En este caso el valor del coeficiente de determinación ($r^2 = 0,17$) indica que el 17% de los factores genéticos que afectan la RI son comunes en ambos sexos. También la correlación fue positiva y altamente significativa ($r = 0,62$; $p < 0,0001$) para la L. En este caso el coeficiente de determinación fue mayor ($r^2 = 0,38$) e indicó que machos y hembras comparten cerca del 40% de los genes que afectan la longevidad. Los resultados de estos análisis de correlación son coincidentes con los descriptos en las Secciones 4.3.2.1 y 4.3.2.2. Si bien todo parece indicar la existencia de un cierto grado de independencia en la evolución de ambos caracteres en ambos sexos, también existen evidencias de limitaciones genéticas para la evolución del DS en la RI y principalmente en la L.

4.3.3. Discusión

Los resultados de esta Sección revelaron que una importante fracción de la variación natural detectada para la RI y la L está gobernada por factores genéticos localizados en el cromosoma 2 con efectos específicos del sexo. Asimismo, la diferenciación genética interpoblacional fue menor que la intrapoblacional en ambos caracteres. En líneas generales, los resultados del análisis genético cuantitativo con líneas isogénicas de sustitución para el cromosoma 2 mostraron las mismas tendencias reportadas en las Secciones 4.1 y 4.2. La detección de variación genética asociada a la RI y a la L es el primer paso hacia la identificación de regiones más estrechas responsables de la variación natural de estos dos caracteres.

El uso de líneas de sustitución cromosómicas para evaluar la asociación entre genotipo-fenotipo aumenta considerablemente nuestra capacidad para detectar regiones responsables de la variación natural. Esto es debido a que se restringe la variación genética que afecta a un determinado carácter a los genes localizados en un único elemento cromosómico.

El cromosoma 2 representa el 40% total del genoma, de modo que su aporte a la variación fenotípica de caracteres complejos es esperable. La influencia del cromosoma 2 sobre la variación en la RI se ha investigado mediante estudios de mapeo de QTLs. Estos han detectado un gran número de QTLs para la RI localizados en el cromosoma 2 (Vieira *et al.*, 2000; Harbison *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004a; Nuzhdin *et al.*, 2007), en coincidencia con los resultados expuesto en esta Sección. Asimismo, las líneas de sustitución mostraron un marcado efecto específico del sexo sobre la RI, el cual también se ha visto en dichos estudios de QTLs. Igualmente, un análisis previo con líneas de sustitución para el cromosoma 2 derivadas de una única población natural procedente de América del Norte reportó que factores genéticos localizados en este cromosoma explicaban un 50% de la variación total para la RI (Carbone *et al.*, 2006). Todos estos resultados junto con los presentados en esta Sección ponen de manifiesto la importancia del cromosoma 2 en la determinación de la variación natural para la RI.

En cuanto a la L, se han realizado grandes avances en el conocimiento de la arquitectura genética de este carácter. Estudios previos de QTLs detectaron regiones involucradas en la variación natural del carácter en el cromosoma 2 y 3, muchos de los cuales mostraron un efecto específico del sexo (Nuzhdin *et al.*, 1997; Pasyukova

et al., 2000; Vieira *et al.*, 2000; Leips & Mackay 2000; Wang *et al.*, 2004a; Nuzhdin *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006). En los últimos años también se han identificado varios genes que tienen variantes alélicas responsables de la variación en la L entre dos líneas con una larga historia de cría en el laboratorio derivadas de poblaciones naturales, Oregon y 2b (De Luca *et al.*, 2003; Pasyukova *et al.*, 2004; Paaby & Schmidt, 2009). Los resultados de esta Sección muestran una importante contribución del cromosoma 2 a la variación genética natural para la L. Un estudio similar en el que se utilizaron líneas de sustitución para el cromosoma 2 derivadas de una población natural reportó que un 23% de la variación total para la L podía explicarse por factores genéticos localizados en esta región (Carbone *et al.*, 2006). En conjunto, todos estos resultados revelan que, al igual que en el caso de la RI, el cromosoma 2 contribuye a la variación genética natural para la L.

La variación genética natural para la RI mostró bajos niveles interpoblacionales y altos niveles intrapoblacionales, que resulta ser el mismo patrón de distribución geográfico que se detectó en los experimentos con isolíneas (Secciones 4.1 y 4.2) y en otros estudios llevados a cabo con poblaciones australianas de *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. birchii* (Hoffmann *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2005; Arthur *et al.*, 2008). La diferenciación entre poblaciones en la RI mostró una asociación positiva con la latitud y la altitud, lo cual puede interpretarse como consecuencia de adaptación diferencial a lo largo de gradientes ambientales. Los agentes selectivos que podrían estar moldeando las diferencias interpoblacionales en la RI se desconocen. Hasta lo que nosotros sabemos, las clinas latitudinales positivas para la RI sólo fueron reportadas en *D. melanogaster* de América del Norte (Schmidt *et al.*, 2005a), y en *D. birchii* originaria de Australia (Griffiths *et al.*, 2005). La asociación positiva entre la RI y la latitud detectada en América del Norte se postula que surge en respuesta a la acción de la selección natural sobre la diapausa reproductiva, que es un carácter asociado genéticamente con la RI y que mostró un patrón de variación clinal (Tatar & Yin, 2001; Schmidt *et al.*, 2005a). Así, la clina latitudinal detectada en esta Sección podría surgir como un subproducto de la selección sobre la diapausa reproductiva, que parece ser un carácter clave en la adaptación a climas templados. En cuanto a la asociación positiva entre la RI y la altitud, Sorensen *et al.* (2005) detectaron la misma tendencia en *D. buzzatii* de Argentina. Como expresamos en la Sección 4.2, los mecanismos selectivos que explican las clinas en este carácter de

resistencia al estrés se desconocen, siendo éstas interpretadas como una respuesta adaptativa a la variación climática.

En la Sección 4.2 detectamos una asociación negativa entre la RI y la latitud. Sin embargo, en la presente Sección registramos una correlación positiva de la RI con la latitud. Este inesperado resultado sugiere 1) la participación de genes localizados fuera del cromosoma 2 que contrarrestan los efectos sobre la RI de este cromosoma, generando así una asociación negativa entre la RI y la latitud (lo que implicaría ubicarse bajo un modelo aditivo) y/o 2) la existencia de interacciones genéticas entre el cromosoma 2 y el resto del fondo genético responsables de la variación natural de la RI entre poblaciones. Estos resultados indican que la arquitectura genética natural de la RI es compleja, de manera que posibles efectos epistáticos podrían estar gobernando la variación genética natural para la RI. De hecho, en el cromosoma 3 se localizan los genes que codifican para los péptidos similares a la insulina (*dilps*, por su denominación en inglés *insulin-like peptides*), para las proteínas de respuesta al choque térmico (*hsp*, por su nombre en inglés *heat shock protein*) y genes responsables de la variación natural en la diapausa reproductiva. Estos grupos de genes que están involucrados, directa o indirectamente, en la regulación de la RI (Wang *et al.*, 2004b; Tatar *et al.*, 2003; Broughton *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2007; Toivonen & Partridge, 2009) podrían interactuar con otros genes localizados en el cromosoma 2, y que también están afectando a la RI (por ejemplo, *Rya-44F*, *crol*) (Harbison *et al.*, 2004).

Al igual que en las Secciones anteriores, en la presente también se detectó un fuerte dimorfismo sexual (DS) en la RI a favor de las hembras en casi todas las poblaciones naturales. Asimismo, el DS varió en magnitud entre los diferentes genotipos, lo cual indica la existencia de variación genética para el DS asociada únicamente a factores genéticos localizados en el cromosoma 2. En el caso de la L los resultados indicaron que el efecto del cromosoma 2 únicamente cambia el sentido del DS detectado en la Sección 4.2. Este resultado sugiere que los genes con efectos específicos del sexo sobre la L estarían localizados fuera del cromosoma 2. De hecho, estudios previos detectaron que los QTLs con efectos sobre la L en machos se localizan en el cromosoma 3 (Leips & Mackay, 2000; Wilson *et al.*, 2006)

El estudio de las correlaciones entre la RI y la L en ambos sexos reveló que los factores genéticos localizados en el cromosoma 2 que afectan la RI y la L no se solapan, confirmando la independencia de las arquitecturas genéticas de la RI y la L,

en este caso cuando restringimos la región de genoma que varía entre líneas para buscar factores genéticos que gobiernen la variación natural en la RI y la L.

De nuestro trabajo concluimos que la variación genética natural detectada en la RI y en la L se puede atribuir a factores genéticos localizados en el cromosoma 2. Además, una fracción de la variación genética restringida al cromosoma 2 para la RI y la L es sexo-específica. La arquitectura genética de la RI y la L están desacopladas, de modo estos caracteres podrían evolucionar de manera independiente.

En la siguiente Sección nos proponemos detectar variantes alélicas de genes localizados en el cromosoma 2 responsables de la variación natural detectada en la RI.

4.4

Variación alélica natural en genes asociados a la expresión de la resistencia a la inanición en poblaciones de *D. melanogaster*

4.4.1. Introducción

Las poblaciones naturales albergan una cantidad substancial de variación genética para características morfológicas, fisiológicas, comportamentales y de historia de vida. El interés en el estudio de la arquitectura genética de estos caracteres cuantitativos se centra, entre otros aspectos, en el descubrimiento de los genes responsables de la variación natural de los caracteres. Avances en la medicina, agricultura y en el estudio de la evolución adaptativa dependen de la identificación de los genes que regulan la expresión de los caracteres complejos, y de la determinación de las propiedades genéticas y moleculares de alelos responsables de la variación genética en las poblaciones naturales. Este creciente interés fue conduciendo las investigaciones hacia el estudio de los genes responsables de la variación natural de estos caracteres. En efecto, preguntas tales como ¿son los mismos genes los que determinan la variación genética en diferentes poblaciones naturales?, frente a un cambio ambiental ¿hay un cambio en los genes involucrados en la variación del carácter? o, ¿los genes responsables de la variación fenotípica de un carácter tienen efectos específicos del sexo? Respuestas a estas preguntas, entre otras que puedan formularse, son de suma utilidad para comprender la arquitectura genética de un carácter complejo.

Una aproximación para descifrar la base genética de la variación de un carácter complejo es el mapeo de regiones cromosómicas con efectos significativos sobre la variación del carácter cuantitativo (QTL). Sin embargo, la identificación de QTLs no es una tarea sencilla por diversas razones (Mackay, 2001a, b). Los QTLs pueden tener pequeños efectos sobre la variación del carácter y, además ser sensibles al ambiente externo y al ambiente sexual. Así, se requerirá tanto de tamaños de muestrales elevados y de condiciones experimentales específicas para resolver estos inconvenientes. Por otra parte, un QTL puede contener muchos genes, de los cuales sólo una fracción podría ser responsable de la variación del carácter cuantitativo, estos genes se denominan QTG (por su denominación en inglés: *Quantitative Trait Gene*). Por esta razón, generalmente, es necesario un gran número de líneas recombinantes para realizar un mapeo de alta densidad con marcadores moleculares a fin de reducir el QTL a la mínima longitud posible y llegar eventualmente a identificar el QTG.

En *D. melanogaster* una metodología empleada para la identificación de genes involucrados en la expresión de caracteres complejos es la técnica denominada mutagénesis por inserción del elemento-*P* móvil, que se empleó para detectar genes que regulan la longevidad (Pasyukova *et al.*, 2000; Flatt, 2004; Paaby & Schmidt, 2008; Magwire *et al.*, 2010), la actividad locomotora (Jordan *et al.*, 2006), el comportamiento olfativo (Sambandan *et al.*, 2006), el tiempo de desarrollo (Mensch *et al.*, 2008), el tamaño corporal (Carreira *et al.*, 2009) y la resistencia a la inanición (Harbison *et al.*, 2004). Mediante esta técnica se ha generado una colección de líneas mutantes co-isogénicas que difieren únicamente en la posición en la que se ha insertado el elemento-*P* que interrumpe la secuencia de un único gen (Venken & Bellen, 2005). Los genes interrumpidos por la inserción del elemento-*P* móvil en las líneas mutantes que presentaron valores fenotípicos, para un carácter en particular, significativamente diferentes del valor registrado en una línea control (libre de elemento-*P* móvil y co-isogénica con las demás), se los denominan **genes candidatos** a integrar la base genética del carácter bajo estudio. Si bien esta técnica nos indica que los genes identificados participan en la expresión del carácter no nos demuestra que los genes identificados son responsables de la variación fenotípica del carácter en la naturaleza (Anholt & Mackay, 2004; Mackay, 2001a, b; 2009).

La identificación del subgrupo de **genes candidatos** responsables de la variación fenotípica natural de un carácter requiere de la utilización de un ensayo experimental denominado prueba de complementación genética (Mackay, 2001a, 2004, 2009; Anholt & Mackay, 2004). Este protocolo se ha utilizado, con resultados satisfactorios en la identificación de genes con variación natural en otros caracteres complejos como el comportamiento olfativo (Fanara *et al.*, 2002); el tiempo de desarrollo (Mensch *et al.*, 2010); el comportamiento locomotor (Jordan *et al.*, 2006), la longevidad (De Luca *et al.*, 2003; Pasyukova *et al.*, 2004; Carbone *et al.*, 2006; Paaby & Schmidt, 2008) y diapausa reproductiva (Schmidt *et al.*, 2008). El protocolo experimental se basa en el uso de líneas derivadas de poblaciones naturales y líneas con deficiencias cromosómicas y/o mutaciones puntuales para un **gen candidato**. Cabe destacar que la lógica de las pruebas de complementación genética para las deficiencias y las mutaciones es la misma y ambas requieren de cruzamientos entre líneas deficientes (*df*) o mutantes puntuales (*m*) que afectan la normal expresión del gen candidato y una línea control (C), con al menos dos líneas derivadas de poblaciones naturales (+₁ y +₂) que exhiban diferencias fenotípicas para el carácter

bajo estudio. A los descendientes de estos cruzamientos, todos heterocigotas, (para el caso de la mutación puntual $m/+_1$, $m/+_2$, $C/+_1$, $C/+_2$), se los somete al ensayo biológico para medir el valor fenotípico de cada genotipo. Si la diferencia del valor fenotípico medio del carácter entre $m/+_1$ y $m/+_2$ es mayor que la diferencia entre $C/+_1$ y $C/+_2$ inferimos que esta diferencia se debe a una falla en la complementación genética. La falla en la complementación puede deberse a que a) la deficiencia o la mutación dejan al descubierto los alelos naturales con diferentes efectos en el carácter de interés (alelismo), b) interacciones entre el gen candidato y otros QTLs localizados en las líneas naturales que también afectan al carácter (Mackay, 2001a, 2004, 2009; Anholt & Mackay, 2004). Es fundamental resaltar que en ambos casos el/los gen(es) identificados, denominados QTGs, están involucrados en la variación natural del carácter y actúan de forma directa por alelismo o indirecta por epístasis. Nuestro interés se centrara en fallas en la complementación por alelismo.

Finalmente, la búsqueda de factores genéticos responsable de la variación fenotípica se puede profundizar identificando los polimorfismos nucleotídicos en la secuencia del QTG responsables de la variación del carácter en poblaciones naturales. A las variantes nucleotídicas con efecto fenotípico se los denomina QTNs (por su nombre en inglés, *Quantitative Trait Nucleotides*) (Long *et al.*, 1998; De Luca *et al.*, 2003; Carbone *et al.*, 2006).

Los estudios de QTLs que afectan la resistencia a la inanición han revelado que las regiones con mayores efectos sobre este carácter están localizadas en el cromosoma 2 (Wang *et al.*, 2004a; Nuzhdin *et al.*, 2007). Además, Harbison *et al.* (2004) han identificado 13 QTLs responsables de las diferencias en la resistencia a la inanición entre dos líneas de laboratorio altamente endocriadas: Oregon y 2b. De los 13 QTLs registrados, 11 se localizaron en el cromosoma 2 y 5 de ellos exhibieron efectos específicos del sexo. Los ensayos de complementación cuantitativa detectaron 12 genes candidatos involucrados en la variación del carácter entre Oregon y 2b (Harbison *et al.*, 2004). Estas líneas derivan de distintas poblaciones naturales aisladas geográficamente y se han mantenido en condiciones de laboratorio por más de 20 años, hecho que podría debilitar la conclusión de que los genes identificados son los responsables de la variación natural en la resistencia a la inanición.

A lo largo de este trabajo, hemos demostrado que las poblaciones naturales de *D. melanogaster* albergan una considerable cantidad de variación genética para la

tolerancia a la inanición. Asimismo, hemos detectado que una fracción importante de los factores genéticos que modulan la variación del carácter se localiza en el cromosoma 2. Precisamente, la identificación de genes responsables de la variación detectada para la resistencia a la inanición es el punto final de esta Tesis.

En esta Sección se presentan los resultados de los ensayos de complementación genética cuantitativa que permitieron identificar variantes alélicas de genes candidatos responsables de la variación observada para la resistencia a la inanición en las poblaciones naturales de *D. melanogaster* estudiadas. Para esto seleccionamos, líneas isogénicas de sustitución para el cromosoma 2 (derivadas de diferentes poblaciones naturales) que exhibieron los valores más extremos para este carácter, y líneas mutantes para un grupo de genes candidatos (localizados en el cromosoma 2) identificados como responsables de las diferencias en la resistencia a la inanición entre las líneas Oregon y 2b (Harbison *et al.*, 2004). Estos experimentos nos permitirán, entonces, avanzar sobre el conocimiento de las bases genéticas que gobiernan la expresión de este carácter en la naturaleza.

4.4.2. Materiales y Métodos

Los ensayos de complementación genética cuantitativa se realizaron pararon el fin de identificar genes con variantes alélicas responsables de la variación en la resistencia a la inanición (RI) en las poblaciones naturales de *D. melanogaster* estudiadas. La metodología consistió en cuantificar la RI en individuos descendientes de los cruzamientos entre líneas portadoras de alelos mutantes (*m*) y líneas portadoras de alelos naturales (+) para el gen candidato de interés. Las líneas portadoras de alelos mutantes presentan un elemento-*P* transponible interrumpiendo la secuencia del gen candidato que se localiza en el cromosoma 2 y el alelo homólogo (de expresión normal) se localiza en un cromosoma balanceador (*Bal*²). Las líneas portadoras de los alelos naturales provienen de las líneas de sustitución para el cromosoma 2 analizadas en la Sección 4.3 que exhibieron los fenotipos más extremos para la RI. Dado que el cromosoma balanceador contiene un marcador fenotípico dominante (Curly), en la descendencia de cada cruzamiento se

² Los cromosomas balanceadores albergan múltiples inversiones en el orden de los genes que suprimen la recombinación con el cromosomas homólogos; marcadores morfológicos dominantes y al menos una mutación letal recesiva, o sea, solo son viables la descendencia heterocigota para el cromosoma balanceador (Fox & Wolf 2006). El marcador morfológico dominante produce alas curvas en los portadores y se denomina *Curly*.

reconocerán 2 fenotipos: salvaje correspondiente al genotipo $+/m$ para el cromosoma 2 (donde el locus del gen candidato está en hemigiosis) y Curly que corresponde al genotipo $+/Bal$ para el cromosoma 2 (donde el locus del gen candidato está en heterocigosis con el alelo de la línea balanceadora) (Figura 4.16).

Con el fin de identificar QTG para la RI se eligieron 6 genes candidatos: *crooked legs (crol)*, *l(2)k-17002*, *Ryanodine receptor 44F (Rya-r44F)*, *l(2)rG270*, *l(2)k-0061* y *Numb* que según un estudio previo (Harbison *et al.*, 2004) mostraron variantes alélica con efectos sobre la RI en Oregon y 2b (Fry *et al.*, 1998). Las líneas mutantes para estos genes candidatos fueron provistas por el Drosophila Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). Las líneas de sustitución para el cromosoma 2 elegidas para este estudio fueron Barreal 45, Chilecito 30 y Chilecito 1 que mostraron los mayores valores de RI y Chilecito 25 y Güemes 251 que presentaron los fenotipos menos resistentes (Tabla 4.16).

En la Figura 4.16 se muestra el esquema de cruzamientos y la interpretación de los resultados de las pruebas de complementación.

Los cruzamientos se efectuaron entre hembras vírgenes de las líneas de sustitución y machos de las líneas mutantes, y también los recíprocos. Para cada uno de los 30 cruzamientos (5 líneas derivadas de la isogenización del cromosoma 2 y 6 líneas con alelos mutantes para los diferentes genes candidatos) se obtuvieron larvas de primer estadio (en cajas de recolección de huevos siguiendo el mismo protocolo descrito en la Sección 3.2.1) que en conjuntos de 30 se sembraron en tubos con medio de cultivo estándar. En total se sembraron 20 tubos por cruzamiento para garantizar el número de moscas necesario para realizar los ensayos de RI. Los descendientes de cada uno de los cruzamientos se separaron por sexo y fenotipo (salvaje, que corresponde al genotipo $+/m$ y Curly que corresponde al genotipo $+/Bal$). Estas moscas fueron las que se utilizaron en los ensayos de RI siguiendo el **Diseño experimental B** descrito en la Sección 3.2.2.

Cabe señalar que no todos los cruzamientos generaron descendencia, y por esta razón, en cada uno de los ensayos de complementación no se analizaron todas las líneas de sustitución para el cromosoma 2 mencionadas más arriba.

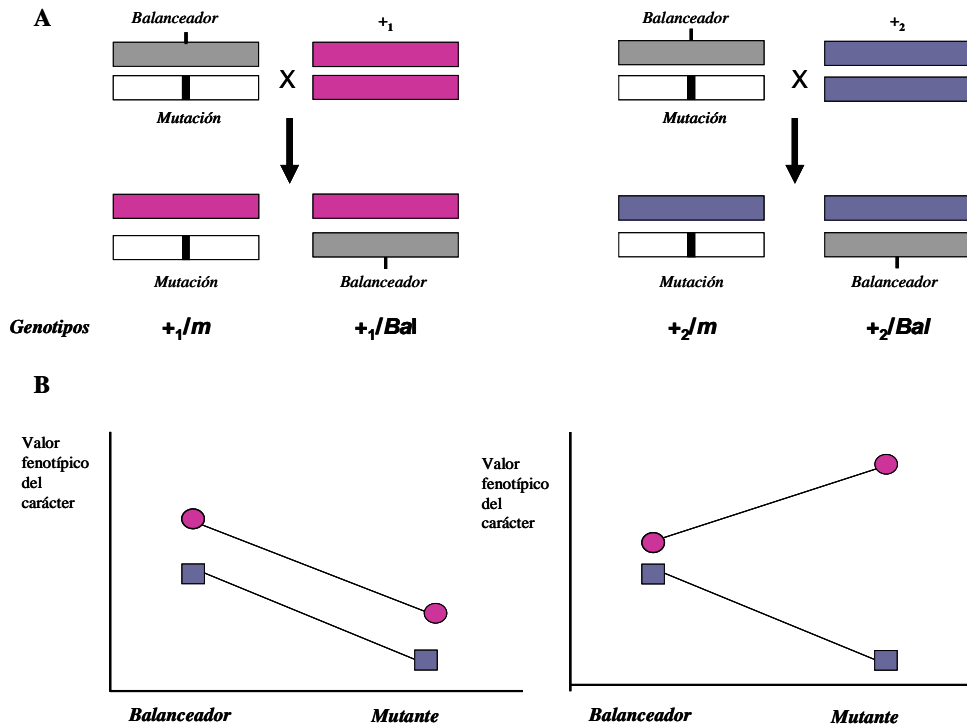


Figura 4.16. A. Esquema de cruzamientos utilizados en las pruebas de complementación. Se muestra los genotipos para el cromosoma 2 de las líneas parentales y de los descendientes. +₁ (rosa) y +₂ (violeta) son dos cromosomas naturales que provienen de líneas de sustitución cromosómica que mostraron valores extremos de RI. Estas líneas se cruzaron con una línea portadora de un alelo mutante para el gen candidato originado por la inserción de un elemento-P (alelo *mutante*) y el alelo homólogo se localiza en un cromosoma balanceador que contiene un marcador fenotípico dominante y un letal recesivo (*balanceador*). B. Esquemas de los resultados de las pruebas de complementación. **Panel izquierdo**, complementación genética: los alelos naturales complementan el efecto del alelo mutante de modo que +₁ y +₂ no difieren en la RI en el genotipo *balanceador* y tampoco difiere en la RI en el genotipo *mutante*. **Panel derecho**, falla en la complementación por alelismo, +₁ y +₂ no difieren en su RI en el genotipo *balanceador* pero sí difieren en el genotipo *mutante*.

Análisis estadístico

El análisis de los datos de las pruebas de complementación para cada uno de los genes candidatos se realizó mediante ANOVAs siguiendo el modelo:

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

donde μ es la media de la RI, G es el factor genotipo (fijo) con dos niveles (mutante y balanceador), L es el factor línea (fijo) con tantos niveles como líneas isogénicas se analizaron, S es el factor sexo (fijo) con dos niveles, y E es el error y corresponde a la variación entre réplicas. En cuanto a las interacciones, una interacción $G \times L$ significativa indica la presencia de una falla en la complementación (variación potencial del gen candidato en la muestra de alelos naturales analizada). Mientras que una interacción triple ($G \times L \times S$) significativa indica la presencia de una falla sexo-específica en la complementación, de modo que los efectos de las variantes alélicas del gen candidato sobre la RI serían sexo-dependientes.

El análisis de las interacciones del ANOVA es el **primer criterio** para identificar una falla en la complementación genética, si la causa de la falla es alelismo debe cumplirse un **criterio adicional**, la diferencia en el valor medio de la RI entre los genotipos $+_1/m$ y $+_2/m$ debe ser significativamente mayor que la diferencia entre $+_1/Bal$ y $+_2/Bal$ (Figura 4.16B) (Pasyukova *et al.*, 2000; Mackay, 2004; Edwards & Mackay, 2009) en las comparaciones pareadas entre líneas. Este efecto se detecta estadísticamente mediante el análisis de la interacción $G \times L$ en el ANOVA, e indica que los distintos alelos naturales del gen candidato ($+_1$ y $+_2$) que se expresan en un fondo m , difieren en sus efectos sobre la RI. Sin embargo, cuando se analiza, al mismo tiempo, más de un par de líneas con alelos naturales el análogo de este **criterio adicional** es que la varianza entre los genotipos $+_i/m$ debe ser significativamente mayor que entre los genotipos $+_i/Bal$ (Geiger-Thornsberry & Mackay, 2004). Para esto se calculan los componentes de varianza entre líneas (σ^2_L) separadamente para cada genotipo (m y Bal) y se determina el cociente $\sigma^2_{L +/Bal} : \sigma^2_{L +/m}$. Esta relación entre los dos componentes de varianza sigue una distribución F de Fischer con $(n - 1)$ grados de libertad ($n =$ número de líneas analizadas). Si el cociente $\sigma^2_{L +/Bal} : \sigma^2_{L +/m}$ es mayor que el valor de $F_{(n-1); (n-1); 0,05}$ entonces la variación entre líneas en un fondo Bal es significativamente mayor que la variación entre líneas en un fondo m , y por lo tanto la falla en la complementación será atribuible a interacciones epistáticas. Una mayor variación entre líneas en un fondo

Bal indica que la falla en la complementación genética podría atribuirse a interacciones epistáticas entre el cromosoma natural y genes ubicados en el cromosoma *balanceador*. El cumplimiento de ambos criterios excluye los casos en los cuales la falla en la complementación ocurre por epístasis, y detecta solamente alelismo. Es importante recordar que los fondos genéticos de los genotipos mutantes y balanceadores no son co-isogénicos. Las líneas con alelos mutantes se mantienen sobre un cromosoma balanceador y no siempre estos están disponibles en un fondo genético isogénico. Por esta razón es necesario que se cumplan criterios adicionales para ser más cautos en la interpretación de los resultados.

Los datos de RI se sometieron a una transformación logarítmica natural [$\ln(RI)$] previo a los análisis estadísticos. Los componentes de la varianza se obtuvieron utilizando el procedimiento VARCOMP, mientras que los ANOVAs se realizaron a través del procedimiento GLM, ambos implementados por el paquete Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

4.4.3. Resultados

A continuación se presentan los resultados de los ensayos de complementación genética cuantitativa efectuados para los genes candidatos. No todos los cruzamientos dieron descendencia, por esta razón no se pudieron analizar todas las líneas naturales para todos los genes. Los valores de RI de las líneas isogénicas utilizadas en los ensayos de complementación se reportan en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16. Valores medios de RI (horas) en hembras y en machos las líneas isogénicas utilizadas en los ensayos de complementación.

	Hembras	Machos	Media
CHI 1	48,1	42,8	45,5
CHI 25	46,5	47,6	48
CHI 30	61,2	49,6	55,4
BAR 45	72,4	44,9	58,6
GÜE 251	37,1	30,1	33,6

Variación genética natural en el gen *crooked legs*

El ensayo de complementación genética para *crooked legs* se realizó con las líneas de sustitución: CHI 25, CHI 30 y BAR 45. Los valores medios de la RI de los genotipos descendientes se muestran en la Tabla 4.17. El ANOVA del análisis de complementación genética reveló un efecto significativo de la interacción $L \times G$ sobre la RI (Tabla 4.18), sugiriendo una falla en la complementación. El término $L \times G \times S$ no fue significativo, de modo que la falla en la complementación no fue sexo-dependiente. Los contrastes “*a posteriori*” de Tukey demostraron que los valores medios de RI de los individuos portadores de los genotipos CHI 30/*Bal* y BAR 45/*Bal* no difirieron significativamente entre sí ($p = 0,99$), y que las diferencias entre CHI 30/*m* y BAR 45/*m* fueron significativas ($p < 0,0001$). Asimismo, el genotipo CHI 25/*m* presentó una RI significativamente menor ($p < 0,0001$) que el genotipo BAR 45/*m*, mientras que CHI 25/*Bal* y BAR 45/*Bal* no difirieron significativamente en la RI (Figura 4.17). Finalmente, el análisis de componentes de varianza entre

líneas dentro de cada genotipo mostró que la varianza entre alelos naturales en el fondo *m* fue significativamente mayor que en el fondo *Bal*. En efecto, el valor de la razón de varianzas F fue de 0,05, menor al valor de tabla $F_{3, 3, 0,05} = 9,28$, por tanto la falla en la complementación puede atribuirse a alelismo.

De este modo, concluimos que el gen *crooked legs* presenta variantes alélica asociadas a las diferencias fenotípicas de la RI en poblaciones naturales.

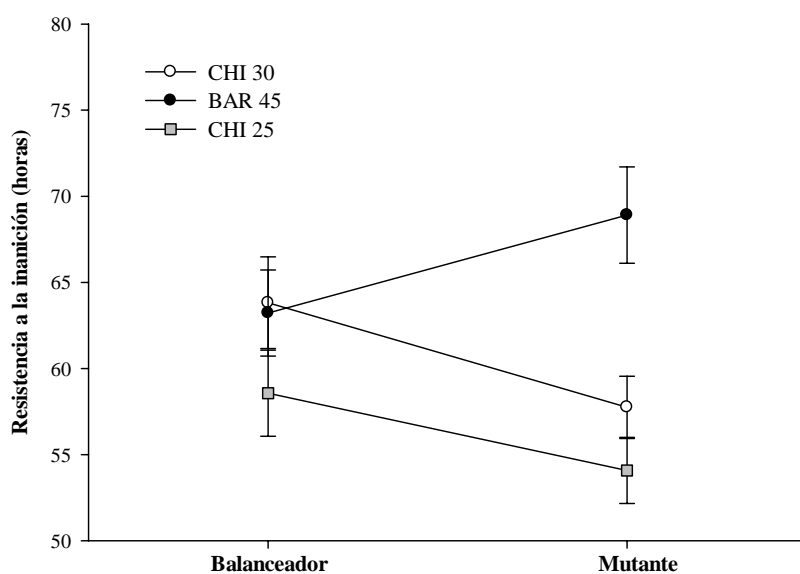


Figura 4.17. Resultados de las pruebas de complementación cuantitativa para el gen *crooked legs*. Se grafica la media y el error estándar de la RI para los genotipos resultantes de los cruzamientos entre líneas de sustitución para el cromosoma 2 provenientes de las poblaciones naturales Chilecito (CHI 30, CHI 25) y Barreal (BAR 45) y la línea portadora del alelo mutante. Se grafican únicamente las líneas que cumplieron con los criterios compatibles con la falla en la complementación causada por alelismo.

Variación genética natural en el gen *l(2)k17002*

El ensayo de complementación genética para *l(2)k17002* se realizó con las líneas de sustitución: CHI 1, CHI 25, CHI 30, GÜE 251 y BAR 45. Los valores medios de la RI de los genotipos descendientes se muestran en la Tabla 4.17. El ANOVA para este ensayo reveló un efecto significativo de la interacción $L \times G$ (Tabla 4.18), lo cual indica una falla en la complementación genética. Nuevamente, la interacción triple no fue significativa, de manera que el efecto es semejante en ambos sexos. Los contrastes “*a posteriori*” de Tukey mostraron que las diferencias en la RI entre los individuos portadores de los genotipos CHI 1/*Bal*, CHI 25/*Bal*, GÜE 251/*Bal* y CHI 30/*Bal* no fueron significativas. En cambio, los portadores del alelo natural para *l(2)k17002* del cromosoma CHI 1 en un fondo genético mutante difirieron significativamente en su RI respecto de los cromosomas CHI 25 ($p = 0,00001$), GÜE 251 ($p = 0,0001$) y CHI 30 ($p = 0,00001$) también en un fondo mutante. Estos resultados revelan la presencia de variación alélica natural para el gen candidato. En promedio, el genotipo CHI 1/*m* resistió 21 h más que CHI 25/*m*, casi 17 h más que CHI 30/*m*, y 13 h más que GÜE 251/*m* (Figura 4.18). Asimismo, la comparación entre CHI 25/*m* y GÜE 251/*m* fue significativa ($p = 0,001$), aunque en este caso la diferencia fue de sólo 8 h.

El análisis conjunto de todas las líneas de sustitución utilizando la prueba de razón de varianzas reveló que el alelismo es la principal causa de la falla en la complementación genética para *l(2)k17002* ya que la variación entre líneas fue mayor en el fondo *m* mutante que en el fondo *Bal* ($F = 0,01 < F_{4, 4, 0,05} = 6,38$ de tabla).

Por lo tanto, podemos concluir que la variación alélica natural en el gen *l(2)k17002* está asociada a las diferencias fenotípicas en la expresión de la RI observada en las poblaciones naturales.

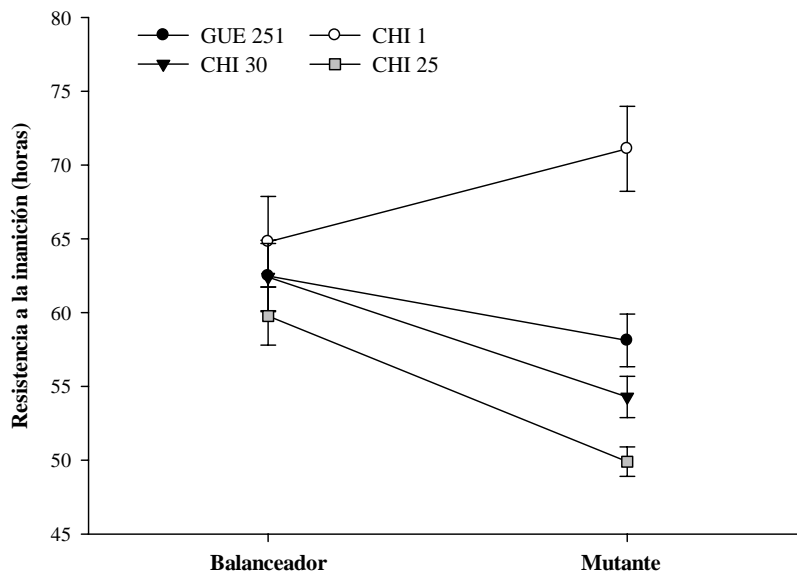


Figura 4.18. Resultados de las pruebas de complementación cuantitativa para el gen *l(2)k17002*. Se grafica la media y el error estándar de la RI para los genotipos resultantes de los cruzamientos entre las líneas de sustitución CHI 1, CHI 25, CHI 30 y GÜE 251 con la línea portadora del alelo mutante. Se grafican únicamente las líneas que cumplieron con los criterios para detectar una falla en la complementación causada por alelismo.

Variación alélica natural para el gen *Ryanodine receptor 44F*

El ensayo de complementación genética para *Rya-44F* se realizó con las líneas de sustitución: CHI 25, CHI 30, GÜE 251 y BAR 45. Los valores medios de la RI para todos los genotipos descendientes se presentan en la Tabla 4.17. El ANOVA mostró que la interacción $L \times G$ fue significativa (Tabla 4.18), al igual que en los casos anteriores, se detectó una falla en la complementación. El patrón no fue dependiente del sexo, tal como lo indica el resultado de la interacción $L \times G \times S$. Los contrastes de Tukey mostraron que las diferencias entre los genotipos CHI 25/*Bal* y CHI 30/*Bal* no fueron significativas ($p = 0,65$), en tanto que los genotipos CHI 25/*m* y CHI 30/*m* difirieron significativamente en su RI ($p = 0,01$). Los individuos CHI 30/*m* resistieron casi 6 h más a la falta de alimento que los portadores del cromosoma CHI 1 sobre el fondo mutante (Figura 4.19). El análisis conjunto de todas las líneas reveló que la falla en la complementación se debió a alelismo ($F = 1,18 < F_{3, 3, 0,05} = 9,28$ de tabla).

Finalmente, podemos concluir que el gen *Rya-44F* presenta variantes alélicas responsables de las diferencias detectadas en la RI en poblaciones naturales argentinas.

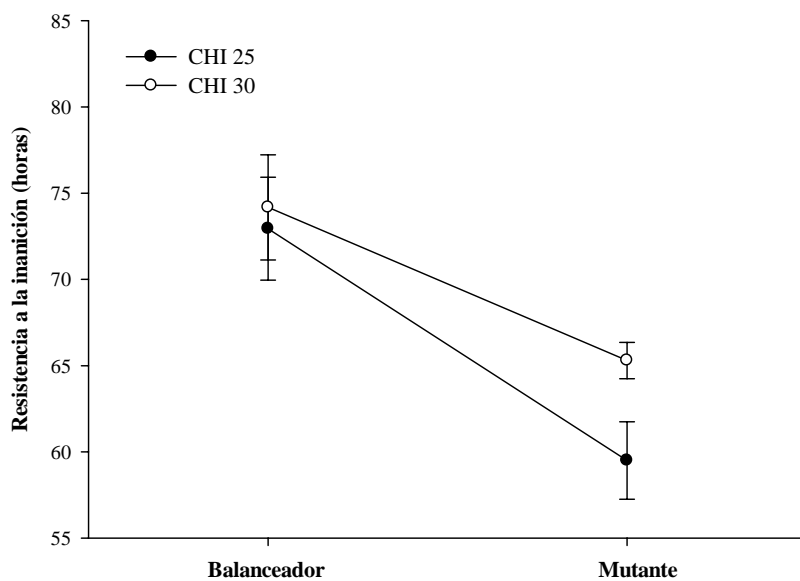


Figura 4.19. Resultados de las pruebas de complementación cuantitativa para el gen *Rya-44F*. Se grafica la media y el error estándar de la RI para los genotipos resultante de los cruzamientos entre las líneas de sustitución provenientes de la población natural Chilecito (CHI 25, CHI 30) y la línea portadora del alelo mutante para el gen candidato *Rya-44F*. Se grafican únicamente las líneas que cumplieron con los criterios para detectar una falla en la complementación causada por alelismo.

Variación alélica natural para el gen *l(2)rG270*

El ensayo de complementación genética para *l(2)rG270* se realizó con las líneas de sustitución: CHI 1, CHI 25, CHI 30, GÜE 251 y BAR 45. Los valores medios de la RI para los genotipos descendientes se muestran en la Tabla 4.17. El ANOVA reveló un efecto significativo de la interacción $L \times G$ y de la interacción triple $L \times G \times S$. En este caso, se detectó una falla en la complementación genética dependiente del sexo (Tabla 4.18). El análisis de la interacción triple apunta a que la falla en la complementación genética ocurrió sólo en **hembras**, ya que las portadoras del genotipo CHI 1/*m* resistieron 17 h más que las portadoras del genotipo BAR 45/*m* ($p = 0,0001$) (Figura 4.20), mientras que las diferencias entre CHI 1/*Bal* y BAR 45/*Bal* no resultaron significativas ($p = 0,99$). En los machos no se detectó ninguna falla en la complementación genética. El análisis del *criterio adicional* indicó que la falla en la complementación genética en hembras se puede atribuir principalmente a alelismo ($F = 1,64 < F_{4, 4, 0,05} = 6,38$ de tabla)

Finalmente, podemos deducir que *l(2)rG270* presenta diferentes variantes alélicas responsables directas de las diferencias en la RI en hembras.

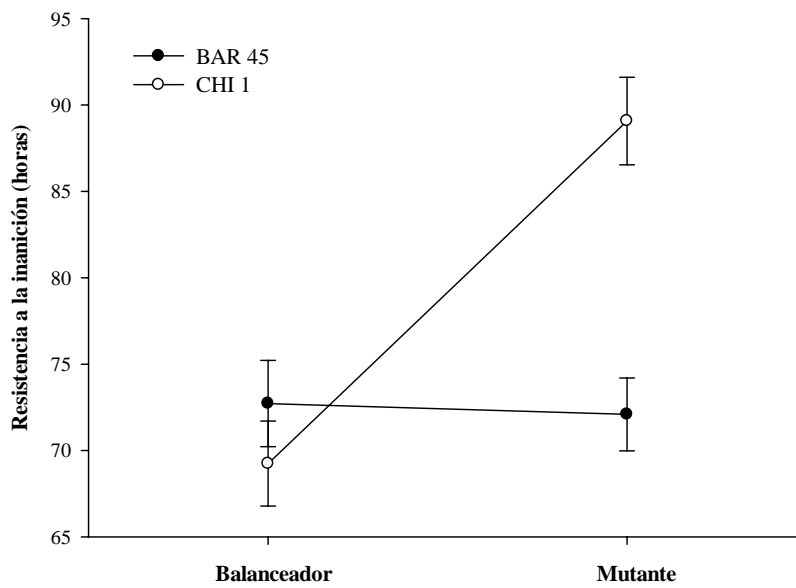


Figura 4.20. Resultados de las pruebas de complementación cuantitativa para el gen *l(2)rG270* en **hembras**. Se grafica la media y el error estándar de la RI para los genotipos resultantes de los cruzamientos entre las líneas de sustitución CHI 1 y BAR 45 con la línea portadora del alelo mutante para el gen candidato *l(2)rG270*. Se grafican únicamente las líneas que cumplieron con los criterios para detectar una falla en la complementación causada por alelismo.

Variación alélica natural para el gen *l(2)k00611*

El análisis de complementación genética para *l(2)k00611* se realizó con las líneas de sustitución CHI 1, CHI 25 y CHI 30. Los valores medios de la RI para todos los genotipos descendientes se muestran en la Tabla 4.17. El ANOVA del ensayo de complementación reveló un efecto significativo de las interacciones $L \times G$ y $L \times G \times S$. Como en el caso anterior, estos resultados indican la presencia de una falla en la complementación genética dependiente del sexo (Tabla 4.18). El análisis de la interacción triple reveló que la falla en la complementación fue significativa sólo en **hembras**. Las diferencias entre las portadoras de los genotipos CHI 1/*Bal* y CHI 30/*Bal* no fueron significativas, en tanto que las portadoras del genotipo CHI 1/*m* resistieron casi 34 h más que CHI 30/*m* ($p = 0,0001$) (Figura 4.21). En el análisis hemos incluido la línea GÜE 289, que no se incluyó en el ANOVA general debido a que no pudimos obtener datos de la RI en machos. Las hembras portadoras del genotipo GÜE 289/*Bal* (RI = 85,3 h), no difirieron significativamente en su RI respecto de las hembras con genotipo CHI 1/*Bal*. No obstante, las portadoras del genotipo GÜE 289/*m* (RI = 50,9 h) resistieron significativamente 44 h menos bajo inanición que las portadoras del genotipo CHI 1/*m* ($p = 0,00003$). El análisis del **criterio adicional** nos permite afirmar que la falla en la complementación genética puede atribuirse a alelismo ($F = 0,13 < F_{3,3,0,05} = 9,28$ de tabla).

Finalmente concluimos que el gen *l(2)k00611* contribuye a la variación natural en la RI en hembras aportando variantes alélicas con efecto directos sobre el carácter de estudio.

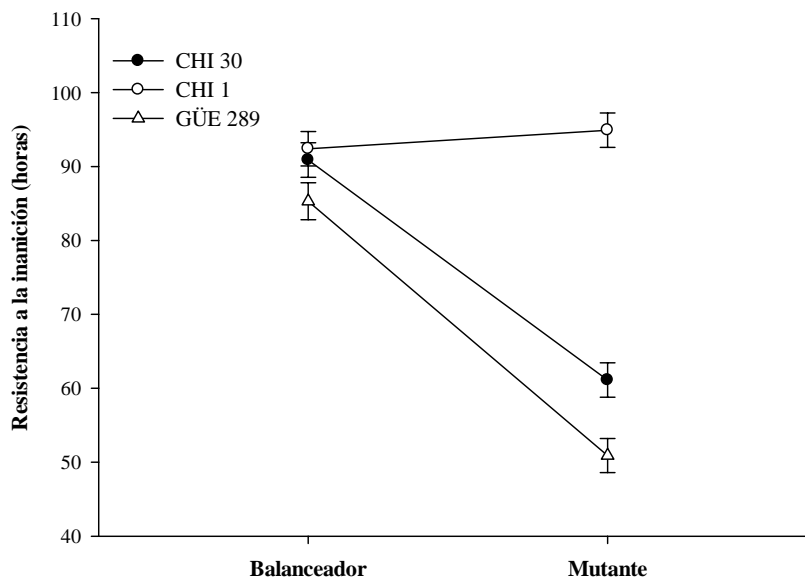


Figura 4.21. Resultado de las pruebas de complementación cuantitativa para el gen *l(2)k00611* solo en **hembras**. Se grafica la media y el error estándar de la RI para los genotipos resultante de los cruzamientos entre las líneas de sustitución CHI 1, CHI 30 y Güemes (GÜE 289) y la línea con el alelo mutante para el gen candidato *l(2)k00611*. Se grafican únicamente las líneas que cumplieron con los criterios para detectar una falla en la complementación causada por alelismo.

Variación genética natural en el gen *Numb*

El ensayo de complementación genética para *Numb* se realizó con las líneas de sustitución CHI 1, GÜE 251 y BAR 45. Los valores medios de la RI de todos los genotipos descendientes se muestran en la Tabla 4.17. El ANOVA para el ensayo reveló que las interacciones $L \times G$ y $L \times G \times S$ no fueron significativas (Tabla 4.18). De hecho el análisis exploratorio de los contrastes de Tukey mostró que ni las diferencias entre los genotipos CHI 1/*Bal*, GÜE 251/*Bal* y BAR 45/*Bal* ni entre los genotipos CHI 1/*m*, GÜE 251/*m* y BAR 45/*m* CHI 1 fueron significativas.

De este modo, podemos concluir que si bien el gen *Numb* está involucrado en la determinación de la variación de la RI entre Oregon y 2b (Harbison *et al.*, 2004), no exhibe variantes alélicas asociadas a la variación de la RI entre las líneas estudiadas en esta Tesis.

Resultados y Discusión

	<i>Crooked legs</i>						<i>gen l(2)k17002</i>					
	Ambos sexos		Hembras		machos		Ambos sexos		Hembras		machos	
Alelos naturales	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>
CHI 1	57,2	58,3	65,1	70,6	49,3	46	71,1	64,8	79	76,2	61,1	53,5
CHI 25	54	58,5	61,6	73,3	46,5	43,7	49,9	59,7	52,5	69,4	46,6	49,6
CHI 30	57,7	63,8	59,6	71,1	55,3	54,6	54,2	62,4	58,4	76,9	50,1	55,1
BAR 45	68,9	63,2	77,7	75	59	49,7	66,2	70,1	74,4	85,3	57,5	54,1
GÜE 251	ND	ND	ND	ND	ND	ND	58,1	62,4	57,2	72,8	59	52,1
	<i>Ryanodine receptor 44F</i>						<i>l(2)rG270</i>					
	Ambos sexos		Hembras		machos		Ambos sexos		Hembras		Machos	
Alelos naturales	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>
CHI 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	68	55,8	89	69,2	47	42,8
CHI 25	59,5	72,9	68,3	84,4	50,6	61,4	65,4	69	76,9	80	53,9	58,1
CHI 30	65,3	73,9	66,4	75,2	64	72,7	65,3	69	73	75,6	50,4	48,4
BAR 45	63,4	65,4	67,1	75,2	59,7	55,7	60,8	57,7	72	72,7	49,5	42,8
GÜE 251	60	61,1	69,2	73,2	50	49	61,4	52,1	74,3	59,5	48,5	44,8
	<i>l(2)k00611</i>						<i>Numb</i>					
	Ambos sexos		Hembras		machos		Ambos sexos		Hembras		machos	
Alelos naturales	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>	<i>m</i>	<i>Bal</i>
CHI 1	73,2	78,2	94,9	92,4	47	59,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHI 25	55,4	60,5	64,9	76,1	46	45	51,7	47,8	57,6	54,3	45,7	41,4
CHI 30	54	75,4	61,1	90	51,5	64	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BAR 45	ND	ND	ND	ND	ND	ND	57,3	47,6	70,2	56,7	44,5	38,5
GÜE 251	ND	ND	ND	ND	ND	ND	56,3	41,7	62,7	40,4	46,7	43,5

Tabla 4.17. Valores medios de la RI (en horas) para cada genotipo promediando los sexos, y además para hembras y machos separados.

m: fondo genético mutado. *Bal*: fondo genético balanceador. ND: no hay datos debido a que los cruzamientos no generaron descendientes

Tabla 4.18. Resultados de los ANOVAs para los ensayos de complementación genética cuantitativa de los genes candidatos analizados.

<i>Crooked legs</i>				<i>l(2)k17002</i>			
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Línea	3	18,1	p < 0,0001	Línea	4	29,1	p < 0,0001
Sexo	1	413,9	p < 0,0001	Sexo	1	269,5	p < 0,0001
Genotipo	1	0,5	0,47	Genotipo	1	25,7	p < 0,0001
Línea x Sexo	1	10,2	p < 0,0001	Línea x Sexo	4	6,1	p < 0,0001
Línea x Genotipo	3	6,4	0,0004	Línea x Genotipo	4	7,4	p < 0,0001
Sexo x Genotipo	3	33,2	p < 0,0001	Sexo x Genotipo	1	46,5	p < 0,0001
Línea x Genotipo x Sexo	3	0,5	0,67	Línea x Genotipo x Sexo	4	1,6	0,18
Error	132			Error	258		
<i>Rya-44F</i>				<i>l(2)rG270</i>			
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Línea	3	10,1	p < 0,0001	Línea	4	19,5	p < 0,0001
Sexo	1	117,3	p < 0,0001	Sexo	1	1012,7	p < 0,0001
Genotipo	1	16,7	p < 0,0001	Genotipo	1	27,4	p < 0,0001
Línea x Sexo	3	11,0	p < 0,0001	Línea x Sexo	3	9,6	p < 0,0001
Línea x Genotipo	3	4,8	0,003	Línea x Genotipo	4	11,0	p < 0,0001
Sexo x Genotipo	1	3,2	0,07	Sexo x Genotipo	1	0,9	0,35
Línea x Genotipo x Sexo	3	0,7	0,56	Línea x Genotipo x Sexo	4	4,8	0,001
Error	138			Error	179		
<i>l(2)k00611</i>				<i>Numb</i>			
Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Línea	2	56,5	p < 0,0001	Línea	3	24,2	0,06
Sexo	1	444,8	p < 0,0001	Sexo	1	145,6	p < 0,0001
Genotipo	1	66,7	p < 0,0001	Genotipo	1	29,9	p < 0,0001
Línea x Sexo	2	4,9	0,009	Línea x Sexo	3	8,2	0,0002
Línea x Genotipo	2	16,2	p < 0,0001	Línea x Genotipo	3	4,7	0,05
Sexo x Genotipo	1	0,5	0,47	Sexo x Genotipo	1	4,1	0,04
Línea x Genotipo x Sexo	2	11,8	p < 0,0001	Línea x Genotipo x Sexo	3	2,1	0,1
Error	103			Error	116		

4.4.4. Discusión

En la presente Sección hemos identificado 5 genes responsables de la variación natural en la resistencia a la inanición en poblaciones argentinas de *D. melanogaster*. Mediante el uso de ensayos de complementación genética cuantitativa logramos identificar alelos naturales que contribuyen a la variación fenotípica natural para este carácter. Así, parte de la variación genética detectada para la RI entre las líneas de sustitución para el cromosoma 2 podría atribuirse a la variación alélica de 5 de los 6 genes candidatos estudiados en la presente Sección. De este modo, confirmamos que *crooked legs (crol)*, *Ryanodine receptor 44F (Rya-r44F)*, *l(2)rG270*, *l(2)k-17002*, *l(2)k-0061* son genes que no sólo están involucrados en la expresión de la RI, sino que también exhiben variantes alélicas asociadas a su variación natural. Los alelos identificados provinieron de tres poblaciones: Güemes (24° 41' S), Chilecito (29° 10' S) y Barreal (31° 35' S). Los individuos portadores de los alelos procedentes de Güemes presentaron los valores más bajos para la RI, este resultado era esperable debido a que las líneas de sustitución provenientes de esta población exhibieron también valores bajos de resistencia (Tabla 4.16). Sin embargo, los resultados obtenidos de los ensayos con los alelos naturales de Chilecito y Barreal fueron, en algún aspecto sorprendentes, ya que para algunos de los genes candidatos los individuos portadores de alelos naturales procedentes de líneas de sustitución que habían mostrado altos valores de RI (BAR 45 y CHI 30) fueron menos resistentes que los individuos que albergaron alelos originarios de líneas de sustitución que mostraron bajos valores de RI (GÜE 251 y CHI 25) (Tablas 4.16 y 4.17). Como ejemplos de este comportamiento se encuentran los ensayos de complementación realizados con los genes *l(2)rG270*, *l(2)k00611l(2)* y *l(2)k17002*, en este último además se observa que el alelo de Güemes presenta una resistencia mayor que dos alelos de Chilecito, cuando en las líneas de sustitución el patrón fue opuesto. Asimismo, es interesante mencionar que los valores fenotípicos de las líneas de sustitución (Tabla 4.16) fueron, por lo general, menores que los valores de la RI en las correspondientes líneas $+i/m$ (Tabla 4.17). Estos resultados indican que el valor fenotípico de un carácter complejo, como la RI, no se reduce a los efectos de sus genes individuales, de modo que las interacciones genéticas (dominancia y epístasis) también ejercen sus efectos sobre el fenotipo (Fox & Wolf, 2006; Hansen, 2006). Todo esto sugiere que la arquitectura genética de la RI es compleja y que las interacciones epistáticas desempeñan un papel fundamental en la regulación de la RI.

Los genes candidatos responsables de la variación natural de la RI se sabe que están involucrados en la regulación de funciones biológicas diferentes como la reproducción, el metabolismo y el comportamiento alimenticio. Esto sugiere redes de genes con efectos pleitrópicos que relacionan a la RI con otros caracteres complejos. Finalmente, cabe destacar que en todos los ensayos de complementación realizados las hembras mostraron siempre los fenotipos más resistentes, lo que indica que el dimorfismo sexual del carácter se mantiene a través de los diferentes alelos naturales (Tabla 4.17).

La población de Chilecito aportó líneas de sustitución con fenotipos en ambos extremos de la distribución, y mostró variantes alélicas para determinados genes candidatos con altos valores de resistencia, y variantes para otros genes con bajos valores de resistencia, lo cual sugiere dos cuestiones: 1) confirma que las diferencias en la RI entre las líneas de sustitución extremas se pueden explicar, en parte, por diferentes alelos en algunos genes candidatos con efectos directos sobre el fenotipo y 2) la presencia de variación alélica natural dentro de la población, donde 3 genes candidatos estudiados mostraron al menos dos alelos diferentes con efectos significativos sobre el carácter. Lamentablemente no contamos, al momento de hacer el estudio, con más líneas de sustitución de Barreal y de Güemes para comparar niveles de variación intrapoblacional de los genes candidatos.

En lo que refiere a las funciones biológicas de los genes que tienen efectos significativos sobre la variabilidad fenotípica de la RI sabemos que *crooked legs (crol)* codifica para un factor de transcripción dedos de zinc que está regulado positivamente por la hormona esteroidea ecdysona durante el estadio del desarrollo larva tardía / prepupa (D'Avino & Thummel, 1998). *Crol* está íntimamente relacionado con la metamorfosis por su rol clave en la regulación de la transcripción de numerosos genes de respuesta a la ecdysona, entre los que se encuentra el receptor de la ecdysona *EcR*. (Koelle *et al.*, 1991). Asimismo, su expresión se detecta en tejidos diana de la ecdysona como los discos imaginales y las glándulas salivales, y además en el sistema nervioso central (D'Avino & Thummel, 2000). Por su parte, en *Drosophila* la ecdysona (20-hydroxy ecdysone) está involucrada en la remodelación de los tejidos larvales, y es necesaria en la determinación de las estructuras adultas (Thummel, 1996; Klowden, 2002). En este sentido, es fundamental para la adecuada diferenciación que sufren los discos imaginales. Desde nuestro punto de vista, es interesante destacar que las células epiteliales asociadas a los discos imaginales darán lugar a las células grasas de los adultos de *Drosophila* (Hoshizaki *et al.*, 1995). La diferenciación de células reservorios

de grasas en adultos de *Drosophila* podría estar íntimamente relacionada con la capacidad de los adultos de resistir a la escasez de alimento. Una posible implicación de nuestros resultados es que la variación alélica de *crol*, que se expresa en los discos imaginales y que sabemos afecta la RI, podría afectar la diferenciación de la cantidad de células grasas, y de este modo los reservorios lípidicos de la mosca adulta, fundamentales para la sobrevivir períodos de escasez de alimento. En este contexto, los resultados expuestos en la Sección 4.3 junto con otros trabajos ilustran la estrecha relación que existe entre el contenido de lípidos y la RI en *Drosophila* (Chippindale *et al.*, 1996; Djawdan *et al.*, 1998; Harshman & Schmid, 1998; Arrese & Soulages, 2010).

Otro de los genes para los cuales detectamos variación alélica asociada a la variación en la RI es *Ryanodine receptor 44F* (*Rya-44F*). Este gen codifica para un canal de Ca^{2+} el cual media la liberación de Ca^{2+} intracelular desde el retículo endoplásmico/sarcoplásmico, un proceso fundamental en la homeostasis del Ca^{2+} . En *Drosophila*, su expresión se detectó en los músculos de los embriones tardíos, mientras que en adultos su transcripción se registró en el músculo tubular y el cerebro (Hasan & Rosbash, 1992). La principal función de *Rya-44F* es regular importantes procesos celulares como la dupla excitación-contracción del músculo, la secreción endo/exocrina y la excitabilidad neuronal (Hasan & Rosbash, 1992; Takeshima *et al.*, 1994; Shimuta *et al.*, 2001; Yamazaki, *et al.*, 2009). Asimismo, este receptor tiene fuertes efectos sobre la ingesta de alimento y el paso de los mismos a través del intestino. Larvas mutantes de *Rya-44F* presentaron serios defectos en la ingesta y en la excreción, donde el principal responsables de tal anomalía es una contracción muscular anormal (Sullivan *et al.* 2000). Los distintos alelos de *Rya-44F* detectados en esta Tesis podrían afectar de manera diferencial la absorción de los alimentos en adultos de *Drosophila* por su efecto sobre los músculos tubulares adultos. Esto podría disminuir los niveles de reservas alimenticias y consecuentemente afectar la supervivencia de los adultos bajo condiciones de escasez de alimento.

Otro de los genes para los que detectamos una falla en la complementación genética fue *l(2)rG270*. Este gen ejerce sus efectos sobre la fecundidad y más específicamente en el desarrollo de huevos. Mutantes de *l(2)rG270* produjeron huevos anormales debido a un fallo en la oogenesis (Perrimon *et al.*, 1996). Hasta el momento se desconoce el producto de la transcripción de *l(2)rG270* y, por lo tanto, su función específica en la regulación de la oogenesis, proceso que incluye múltiples y diversos mecanismos moleculares y celulares que ocurren tanto en el ovario, como fuera de él. La existencia

de variantes alélicas naturales para este gen que afectan la variación de la RI sólo en hembras pone claramente de manifiesto la estrecha relación entre la RI y la fecundidad (Service & Rose, 1985; Leroi *et al.*, 1994 a, b; Prasad & Joshi, 2003).

En relación a los restantes genes en los que se detectaron fallas en la complementación genética: *l(2) k17002* y *l(2)k00611*, hasta el momento no se han identificado los procesos biológicos en los que están involucrados. En este sentido, la presente Tesis es un aporte al conocimiento de las funciones de estos genes ya que nuestros resultados muestran que están implicados en la resistencia al stress alimenticio.

Finalmente, el único gen para el que el fenotipo de los portadores del alelo mutado fue complementado por los diferentes alelos naturales fue *Numb*. Se ha demostrado que *Numb* regula la RI y que además presenta variantes alélicas responsables de las diferencias entre las líneas Oregon y 2b (Harbison *et al.*, 2004). Sin embargo, nuestros resultados muestran que no está involucrado en la variación natural del carácter en las poblaciones analizadas en este trabajo. *Numb* codifica para una proteína asociada a la membrana involucrada en la diferenciación celular durante el desarrollo del sistema nervioso en *Drosophila* (Posakony, 1994; Jan & Jan, 1998). Así, una división celular asimétrica del gen *Numb* en el órgano precursor sensorial (*SOP*, por su denominación en inglés, *Sensorial Organ Precursor*) componente del sistema nervioso periférico, genera células hijas con diferentes destinos celulares, creando la diversidad propia del sistema nervioso maduro (Rhyus *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2005). Además, *Numb* modula el camino de señalización de *Notch* también involucrado en la proliferación y diferenciación celular a través del mismo mecanismo (Guo *et al.*, 1996; Spana & Doe, 1996; Tang *et al.*, 2005). La ausencia de variantes alélicas para este gen que afecten diferencialmente la RI es posible que sea consecuencia de una fuerte presión de selección purificadora. Alternativamente, estas variantes alélicas podrían ser raras y no encontrarse así, dentro de la muestra de alelos naturales que analizamos en esta Sección.

Los genes que se analizaron ya habían sido identificados por Harbison *et al.* (2004) como genes que presentaban variabilidad genética asociada a variación fenotípica. En aquel estudio se emplearon solo dos líneas: Oregon y 2b, que derivan de poblaciones diferentes, Oregon proviene de Estados Unidos y 2b de Rusia y que tienen una historia de más de 20 años de endocría en el laboratorio. Nuestros resultados demostraron que *crooked legs (crol)*, *Ryanodine receptor 44F (Rya-r44F)*, *l(2)rG270*, *l(2)k-17002*, *l(2)k-0061* también exhiben variación genética en poblaciones naturales localizadas en Argentina. Es interesante señalar que estos genes exhibieron esta misma característica

para regiones geográficamente distantes como Estados Unidos, Rusia y Argentina con lo cual la variación determinada por estos QTG no se circunscribe a una región geográfica particular. Por otra parte, en el estudio de Harbison *et al.* (2004) no pudo establecer si la variación detectada es politípica o polimórfica. En cambio, nuestros estudios permiten afirmar que los genes *Ryanodine receptor 44F*, *l(2)k17002* y *l(2)k00611* presentan variación polimórfica, ya que se detectaron variantes alélicas asociadas a la RI en una misma población (Chilecito) mientras que para los restantes genes no fue posible confirmar si se trataba de variación polimórfica o politípica

El hecho de haber detectado fallas en la complementación genética únicamente en hembras para los genes *l(2)rG270* y *l(2)k00611l(2)* concuerda con el patrón sexo-específico de la arquitectura genética del carácter que describimos a lo largo esta Tesis.

Para el futuro queda pendiente la identificación de los polimorfismos moleculares o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) en los genes candidatos responsables de la variación natural de la resistencia a la inanición.

CONCLUSIONES

En relación a los patrones de variación en la RI

En líneas generales los resultados de los experimentos realizados en esta Tesis indican que las poblaciones naturales de *D. melanogaster* muestran claras diferencias en su capacidad para sobrevivir bajo condiciones de falta de alimento. Estas diferencias están genéticamente determinadas y parecen ser consecuencia de la acción de la selección natural, que actúa directa sobre el carácter o indirectamente vía un carácter correlacionado genéticamente y conduce a la adaptación a las condiciones ambientales imperantes en cada localidad de muestreo. Los factores selectivos que afectarían la evolución del carácter podrían ser el tipo de recurso alimenticio y su disponibilidad espacio-temporal.

Además de las diferencias genéticas interpopulacionales, dentro de cada población natural existe una substancial cantidad de variación genética para este carácter de resistencia al estrés que confirma su alto potencial evolutivo en la naturaleza.

Entre los mecanismos implicados en el mantenimiento de los altos niveles de variación genética intrapoblacional en la RI la interacción Genotipo x Sexo detectada en todos los experimentos tendría un papel central. Particularmente, los genotipos que mostraron efectos sexualmente antagónicos sobre el carácter ofrecen una vía para explicar el mantenimiento de la variación genética debido al hecho que los coeficientes de selección tendrían signo opuesto en hembras y machos.

Además, nuestros resultados permiten proponer que la variación genética intrapoblacional en la RI podría mantenerse como consecuencia de la variación genética en el CL, un carácter correlacionado genéticamente con la RI. El hecho que la RI y el CL exhiban una significativa correlación genética sugiere una base mecánica de la variación en la RI y la posibilidad que el carácter blanco de la selección sea, efectivamente, el CL, y que las observaciones acerca de la RI sean consecuencia de selección correlacional o indirecta.

Una importante fracción de la variación genética natural en la RI se atribuye a factores genéticos localizados en el cromosoma 2.

En la presente Tesis se ha detectado variación genética intra e interpopulacional para la RI en todos los experimentos, tanto en los efectuados con isóneas, controlando y no controlando el estado reproductivo de las moscas, y en los realizados con líneas de sustitución cromosómica. La comparación entre los estudios de variación geográfica con isóneas y líneas de sustitución reveló algunas discrepancias que permiten hacer

algunas inferencias acerca del modo de acción de los genes implicados en la arquitectura genética de la RI. Con las isolíneas se detectaron clinas latitudinales negativas (a mayor latitud menor RI), por el contrario, con las líneas de sustitución se detectó una clina positiva (a mayor latitud mayor RI). Estos resultados sugieren una compleja arquitectura genética de la RI en la que los efectos de los genes implicados no serían estrictamente aditivos sino que sus efectos parecen depender del fondo genético, sugiriendo interacciones entre los factores genéticos localizados en el cromosoma 2 y el resto del genoma.

Inferencias acerca de la Arquitectura genética de la RI

Hemos demostrado que el cromosoma 2 contribuye a la variación genética natural de la RI. En este contexto, los resultados mostraron que la contribución relativa de la diferenciación interpoblacional y la variación intrapoblacional a la varianza fenotípica en la RI fue semejante (alrededor del 7% y 50 %, respectivamente) en los estudios con isolíneas y con líneas isogénicas de sustitución cromosómica. Entonces, con el fin de comparar la contribución relativa del componente genético en ambos grupos de líneas estimamos los parámetros genéticos cuantitativos (Tabla 5.1). Cabe recordar que las líneas de sustitución cromosómica son completamente homocigóticas para todo el genoma (isogénicas) y que difieren entre sí únicamente en el cromosoma 2 ya que los cromosomas X y 3 son los mismos que los de la línea utilizada como control denominada IsoB. Asimismo, es importante destacar que los protocolos experimentales utilizados en los ensayos con isolíneas y con líneas isogénicas fueron exactamente iguales y que sólo difirieron en la fracción del genoma que variaba (**Diseño Experimental B**, Sección 3.3.1). Las comparaciones de los parámetros genéticos cuantitativos mostraron algunos resultados sorprendentes. **Nuestra expectativa era una mayor varianza genética (V_G) en las isolíneas que en las líneas isogénicas, debido a la mayor homogeneidad genética entre estas últimas. El patrón observado varió entre sexos ya que sólo los machos se ajustaron a la predicción.** En las *hembras* las estimaciones de V_G fueron mayores en la muestra de líneas isogénicas de sustitución que en las isolíneas (Tabla 5.1), indicando que aquellas exhiben una mayor variación asociada al carácter.

Tabla 5.1. Parámetros genéticos cuantitativos para la RI en líneas con genoma completo natural y líneas con sólo el cromosoma 2 natural, en sexos por separado.

	HEMBRAS		MACHOS	
	Genoma natural	Cromosoma 2 natural	Genoma natural	Cromosoma 2 natural
V_F	50,3	61,4	60,2	45,3
V_G	26,5	36,8	43,1	32,7
CV_G	11	12	15	13

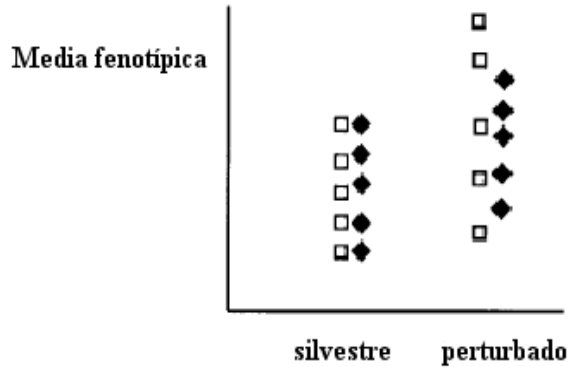
V_F : varianza fenotípica; V_G : varianza genética; CV_G coeficiente de variación genética

¿Es posible que la variación genética entre líneas de sustitución que sólo difieren entre sí en un elemento del genoma (cromosoma 2) y que son altamente homocigóticas sea mayor que la variación genética entre líneas que difieren en genomas completos de origen natural? ¿Como pueden explicarse estas observaciones?

Se sabe que los efectos de la variabilidad³ genética natural sobre el fenotipo pueden ser amortiguados (traducido del término inglés *buffering*) o liberados como resultado de complejas interacciones genéticas (Le Rouzic & Carlborg, 2007) y/o como resultado de perturbaciones ambientales. La variación genética de un carácter está compuesta por todos los elementos genéticos que contribuyen a su expresión fenotípica presente y futura. De todos estos componentes solamente una fracción denominada **variación genética visible** afecta al fenotipo, mientras que otra fracción se traduce en variación fenotípica solamente bajo ciertas condiciones genéticas o ambientales específicas. Esta situación se ilustra en la Figura 5.1 en la que se muestra la variación fenotípica de dos caracteres bajo dos condiciones ambientales: silvestre y perturbada. La varianza de uno de los caracteres, el indicado por el marcador negro, es independiente de las condiciones ambientales y se dice, en este caso, que la expresión del fenotipo está canalizada. En cambio, la varianza fenotípica del segundo carácter sí depende del ambiente, expresándose en condiciones de un ambiente perturbado mucha más variación fenotípica, ilustrando en este caso una situación de descanalización del fenotipo.

³ Variabilidad: potencial o disposición de un sistema genético a variar (Wagner & Altenberg, 1996)

Figura 5.1. Cambios en la varianza fenotípica entre líneas cuando se perturba el ambiente ya sea por una alteración en el ambiente o en el genotipo (modificado de Gibson y Wagner 2000).



Este componente de la variabilidad genética que confiere potencial para producir un cambio fenotípico, pero que no se expresa en genotipos naturales (genotipos que comúnmente encontramos en la naturaleza) o ambientes naturales, se denomina *variación genética críptica* y se traduce a diferencias fenotípicas cuando el fondo genético cambia o es perturbado, o bajo condiciones de estrés ambiental (Hermisson & Wagner, 2004; Gibson & Dworkin, 2004). Los mecanismos subyacentes a esta variabilidad “oculta” son las interacciones epistáticas y las interacciones genotipo-ambiente (Carlborg & Haley, 2004; Le Rouzic & Carlborg, 2007). De hecho, es muy factible que la epístasis sea un componente esencial en la regulación de la expresión de caracteres complejos (Carlborg & Haley, 2004).

En resumen podemos afirmar que 1) las interacciones entre factores genéticos ubicados en el cromosoma 2 y el resto del genoma amortiguan (disminuyendo) la variación fenotípica natural en la resistencia a la inanición entre los genotipos naturales, 2) existe variación genética críptica para la resistencia a la inanición en la naturaleza, y, muy relevante, 3) que los efectos de las interacciones genéticas son dependientes del sexo. Justamente, en nuestro estudio la descanalización, es decir la liberación de la variación fenotípica se observó únicamente en hembras.

Al analizar los patrones de distribución de frecuencias acumuladas para la RI en los dos grupos de líneas (isolíneas e isogénicas) en ambos sexos, es posible visualizar gráficamente lo que indican los parámetros genético-cuantitativos (Figura 5.2). En las *hembras*, se puede observar que el rango de variación en líneas isogénicas fue mayor que en isolíneas. Además, las isogénicas mostraron un valor fenotípico medio para el carácter mayor que las isolíneas. Esto último podría deberse a que el fondo genético IsoB incrementa ‘*per se*’ la RI respecto de las isolíneas. No obstante, el valor de RI de individuos IsoB fue menor que los de las isolíneas en ambos sexos. Por lo tanto, la menor variación genética observada en los genotipos naturales (isolíneas) es muy probablemente consecuencia de un proceso de amortiguación genética o *buffering* donde el fondo genético natural en isolíneas actúa amortiguando los efectos de los cromosomas 2 sobre el fenotipo, y permitiendo la visualización de una fracción de la variabilidad genética natural en la RI. Cuando el fondo genético en el cual se encuentran los cromosomas 2 naturales se reemplaza por el de IsoB (perturbación genética), se produce una liberación de variación fenotípica, debido a la expresión de variación genética que estaba “oculta” en los genotipos naturales, traduciendo la variación genética críptica en diferencias fenotípicas. Así, proponemos que el mecanismo subyacente a nuestras observaciones es que el cambio de ambiente genético produciría una alteración de las interacciones epistáticas entre los genes del cromosoma 2 y el resto del genoma. No obstante, es importante recordar que este efecto se observó únicamente en *hembras*, de modo que la interacción genotipo por sexo también podría ayudar a explicar la canalización de la RI en las líneas silvestres.

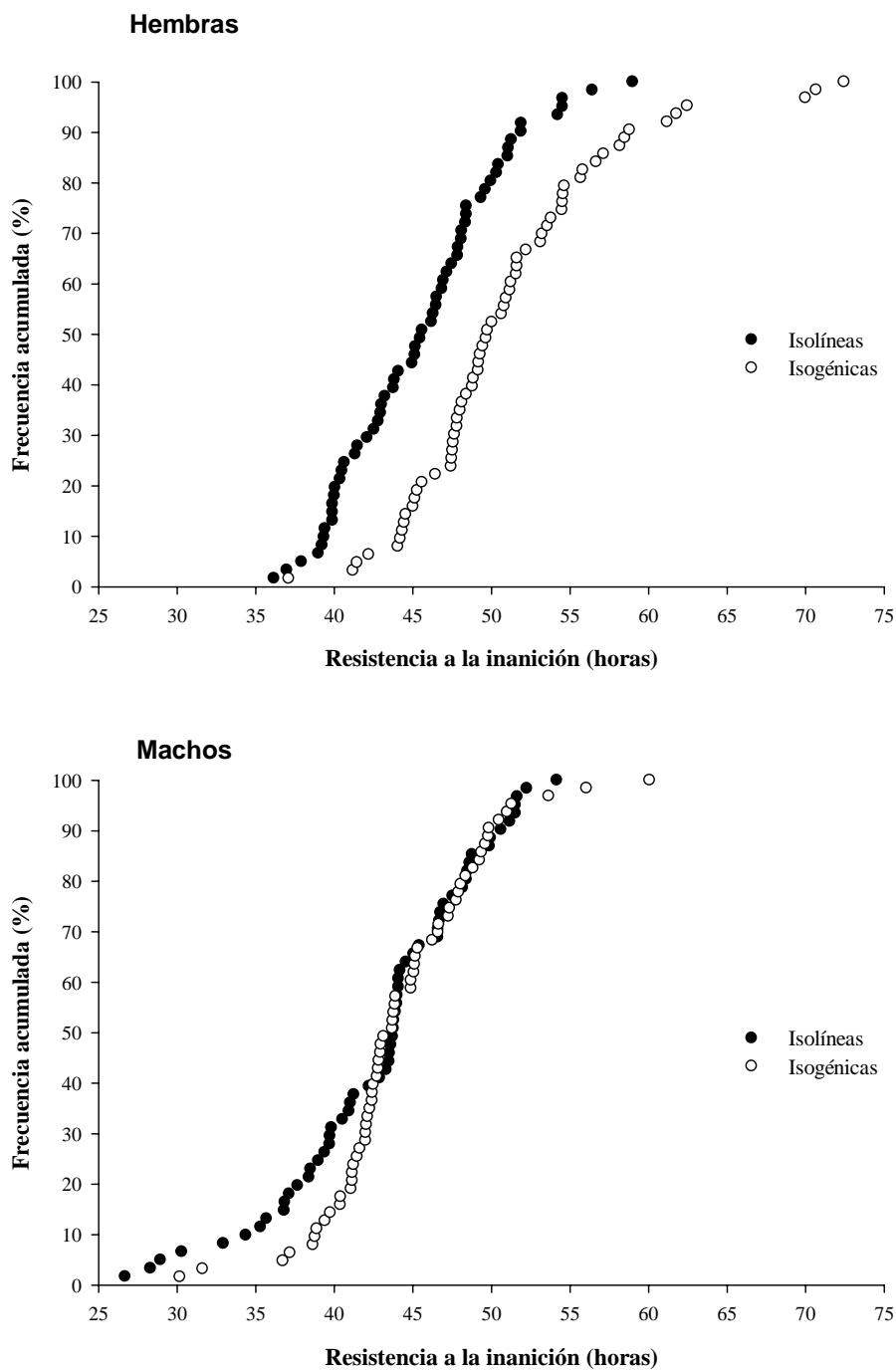


Figura 5.2. Distribución de frecuencias acumuladas (%) para la resistencia a la inanición en solíneas y en líneas isogénicas en hembras y machos.

En la misma dirección parecen apuntar los resultados de las pruebas de complementación presentados en la Sección 4.4. Precisamente, allí mostramos que los valores fenotípicos de los descendientes de genotipo heterocigótico (+/m) de los cruzamientos entre líneas de sustitución y líneas portadoras de alelos mutantes para genes candidatos (QTG) de la RI, fueron mayores que o invirtieron el valor fenotípico de la línea de sustitución con el cromosoma 2 de origen natural (ver Tablas 4.16 y 4.17). Es más, algunos QTGs mostraron un efecto dependiente del sexo sobre la RI que afectó la expresión del carácter únicamente en hembras. Los resultados informados en la Sección 4.4, por lo tanto, apoyan la hipótesis de la amortiguación o *buffering* genético sustentado en interacciones genéticas que regulan la expresión de la variación natural en la RI.

A modo de control estudiamos el patrón de distribución de frecuencias acumuladas para la longevidad en isolíneas y en líneas isogénicas con el fin de detectar posibles interacciones genéticas que regulan la expresión de la variación natural en la longevidad (Figura 5.3). En este caso observamos que 1) en ambos sexos, las líneas isogénicas presentan un rango de variación fenotípica mayor que las isolíneas, 2) el valor medio de longevidad es menor en isogénicas que en isolíneas en **hembras** y 3) en las líneas isogénicas se detectaron valores de longevidad bajos (menores a 20 días), en ambos sexos, que sugieren la expresión de alelos recesivos cuyos efecto promedio sería deletéreo sobre este componente de la aptitud biológica (Dobzhansky, 1970). Finalmente, la observación de un mayor rango de variación en las líneas isogénicas podría explicarse por la aparición de genotipos con bajos valores de longevidad, consecuencia de la manifestación de los efectos de alelos recesivos cuyo efecto está enmascarado en los genotipos naturales.

De esta forma, y tomando en consideración todos los resultados obtenidos en la presente Tesis, podemos concluir que la arquitectura genética de la longevidad y la resistencia a la inanición son diferentes, lo que, además, apunta a que ambos caracteres evolucionarían de manera independiente.

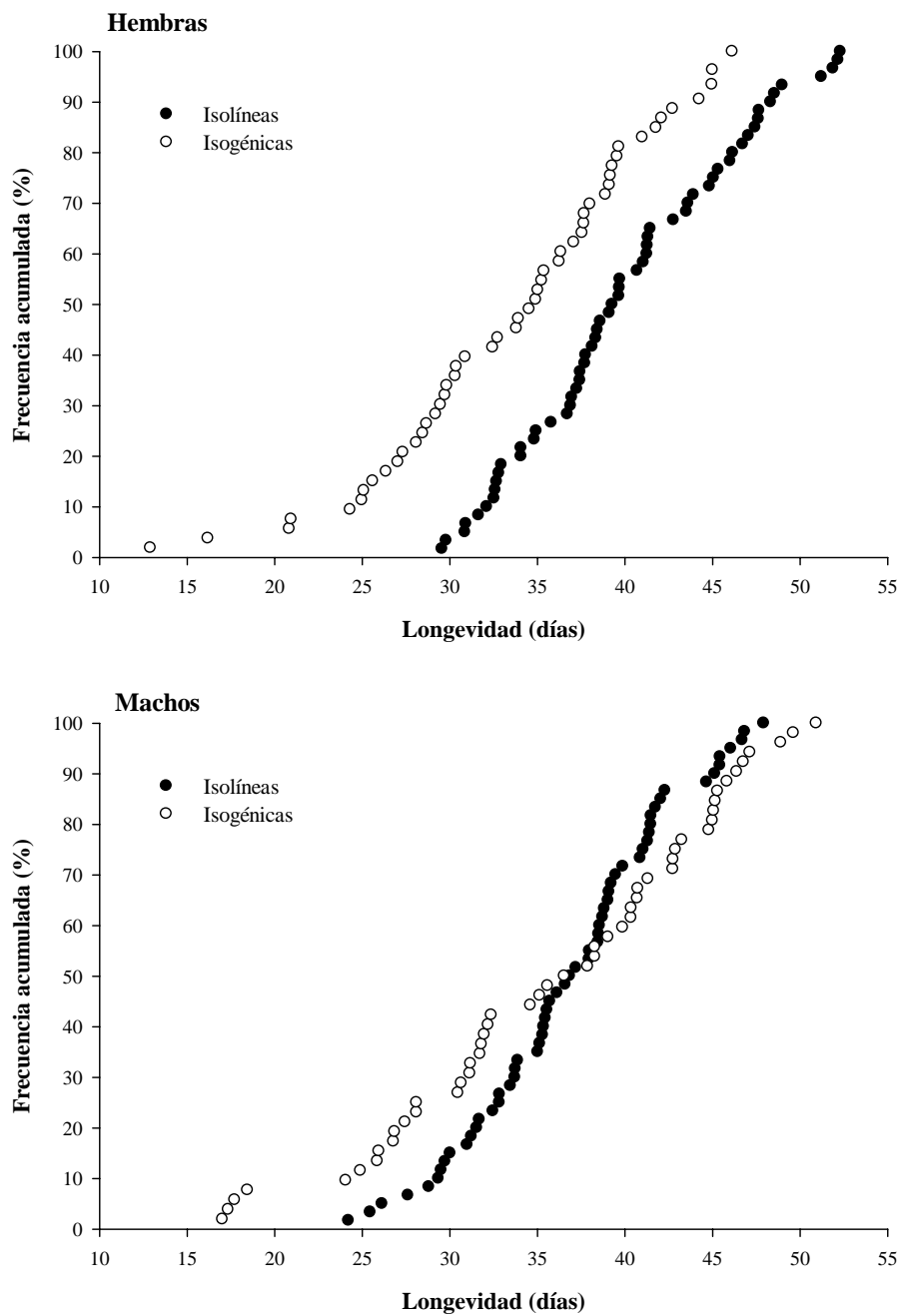


Figura 5.3. Distribución de frecuencias acumuladas (%) para la longevidad en isolíneas y en líneas isogénicas en hembras y machos.

El apareamiento y la resistencia a la inanición en hembras

La comparación de los patrones de variación en la RI descritos en las Secciones 4.1 y 4.2 revela llamativas diferencias. En primer lugar, las moscas analizadas en la Sección 4.1 fueron más resistentes a la inanición que las analizadas en la Sección 4.2. En segundo lugar, detectamos importantes diferencias en la magnitud de la varianza entre líneas entre machos y hembras en las moscas analizadas en la Sección 4.1 que no lo observamos en las moscas estudiadas en la Sección 4.2. La única diferencia entre ambas Secciones radicó en el estado reproductivo de las moscas, en la primera no se controló el estado reproductivo (no vírgenes), en tanto que en la segunda sí, ya que sólo se analizaron moscas vírgenes.

En organismos de reproducción sexual el apareamiento implica diferentes costos y beneficios para hembras y machos, lo cual puede generar un conflicto sexual (Partridge & Hurst 1998). Se sabe que el apareamiento acarrea elevados costos para las hembras. En efecto, las proteínas seminales transferidas por los machos durante la cópula inducen profundos cambios fisiológicos y comportamentales en las hembras que conducen a aumentar el éxito reproductivo de los machos. Por ejemplo, ciertas proteínas seminales reducen tanto el tiempo de vida de las hembras como su éxito reproductivo, ya que disminuyen la frecuencia de re apareamiento (Chapman *et al.*, 1995; Civetta & Clark, 2000; Markow, 2002; Liu & Kubli, 2003; Wigby & Chapman, 2005). Además, se han investigado otros costos asociados a la cópula como un aumento en la tasa de predación, riesgo de daño físico y aumento de la susceptibilidad a infecciones por patógenos (Partridge & Hurst, 1998; Arnqvist & Nilsson 2000; Johnstone & Keller, 2000). En general, se puede plantear la hipótesis que los costos que conlleva el apareamiento son mayores para las hembras que para los machos. No obstante, este escenario puede no ser siempre así, por ejemplo, en especies de *Drosophila* que viven en hábitats desérticos, las hembras ven aumentada su resistencia a la desecación después del apareamiento (Knowles *et al.*, 2004, 2005). Así, la interacción macho-hembra afecta a caracteres de estrés, ecológicamente relevantes, y en un escenario natural el apareamiento parece no ser tan perjudicial (Candolin & Heuschele, 2008).

En este contexto, nuestros resultados revelaron que las hembras no vírgenes muestran una mayor tolerancia a la inanición que las hembras vírgenes (Figura 5.4). En contraposición, el apareamiento no pareció afectar la RI de los machos, en ninguna de las poblaciones naturales analizadas. De este modo, el apareamiento pareció traer

aparejada una ventaja adaptativa para las hembras, con efectos positivos sobre este relevante carácter de estrés.

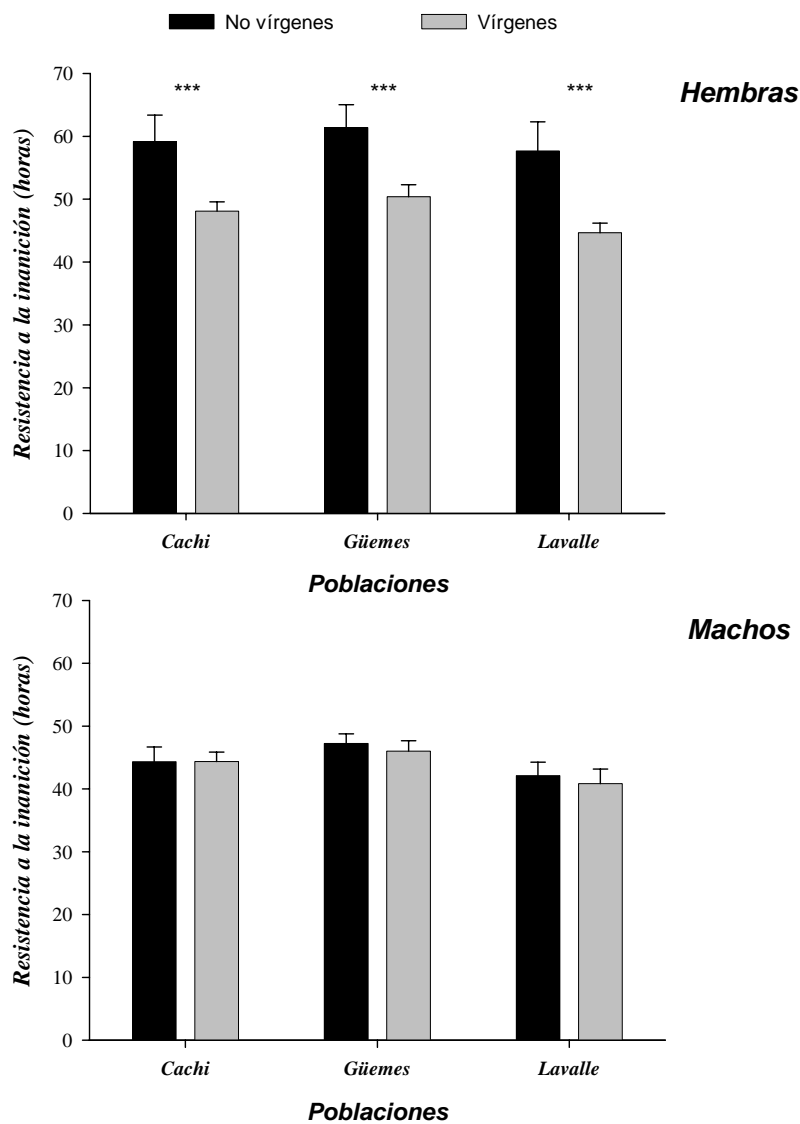


Figura 5.4. Resistencia a la inanición en moscas vírgenes y no vírgenes provenientes de diferentes poblaciones naturales. *** indica $p < 0,0001$.

El/los mecanismo/s que explica/n la mayor RI en hembras todavía no está resuelto por completo, pero seguramente está mediado por la acción de las proteínas secretadas por las glándulas accesorias de los machos (*Acps* en inglés) que inducen cambios fisiológicos y comportamentales en las hembras (Wolfner 2002; Kubli 2003; Chapman & Davies 2004). Por ejemplo, las proteínas seminales pueden actuar directamente sobre los centros que controlan el apetito (Lee *et al.*, 2004; Wynne *et al.*, 2005) y producir un incremento en la tasa de ingesta de alimento en hembras recién apareadas (Carvalho *et al.* 2006). Por el contrario en machos el comportamiento de alimentación no estuvo afectado por su estado reproductivo.

Asimismo, un pequeño péptido seminal denominado péptido sexual (SP en inglés), estimula la liberación de hormona juvenil (JH en inglés), la cual a su vez regula la maduración sexual y la oogénesis en hembras adultas de *Drosophila* (Bownes, 1989; Riddiford, 1993; Soller, *et al.*, 1999; Gruntenko & Rauschenbach, 2008). La inducción de la oogénesis podría provocar un aumento en la ingesta de alimento lo cual finalmente resulta en un aumento de las reservas lipídicas (Rush *et al.*, 2007), que como demostramos está íntimamente relacionado con la resistencia a la inanición.

Por lo tanto, la capacidad de las hembras apareadas a sobrevivir más que los machos en condiciones de escasez de alimento puede explicarse por un aumento de reservas lipídicas como consecuencia de un aumento en la tasa de ingesta de alimento inducida por la liberación de JH estimulada por la transferencia de proteínas seminales durante el apareamiento.

Similares resultados se han informado para otro importante carácter de estrés como la resistencia a la desecación, en dos especies de desierto: *D. mojavensis* y *D. arizonae* (Knowles *et al.*, 2004). El aumento de la resistencia a la desecación luego del apareamiento se ha explicado por la transferencia de sustancias nutritivas en los fluidos seminales que son activamente absorbidas en el tracto femenino (Pitnick *et al.*, 1997). No obstante, en *D. melanogaster* las hembras no parecen recibir ningún regalo nupcial que permita explicar el beneficio del apareamiento.

Las principales conclusiones de la presente Tesis son las siguientes:

1. Las poblaciones naturales mantienen altas cantidades de variación genética para la resistencia a la inanición, la longevidad y el contenido de lípidos. Estos caracteres muestran un alto potencial evolutivo.
2. La selección natural es la fuerza evolutiva que en parte está moldeando la variación genética natural en la resistencia a la inanición, ya sea actuando directamente sobre el carácter, o indirectamente vía el contenido de lípidos.
3. La expresión fenotípica de la variación genética natural es específica del sexo. Los genotipos que muestran efectos sexualmente antagónicos podrían estar involucrados en el mantenimiento de la variación genética intrapoblacional.
4. El cromosoma 2 es responsable de una importante fracción de la variación genética natural para la resistencia a la inanición y la longevidad.
5. Genes que regulan diferentes funciones biológicas y que se localizan en el cromosoma 2 albergan variantes alélicas que son responsables de la variación natural de la resistencia a la inanición detectada.
6. Las interacciones genéticas constituyen una parte importante de la arquitectura genética de la resistencia a la inanición en la naturaleza.
7. Tales interacciones son dependientes del sexo y particularmente, en *hembras*, las interacciones epistáticas entre genes del cromosoma 2 y el resto del genoma son un componente importante de la variación natural para la resistencia a la inanición.
8. En *hembras*, el estado reproductivo es un componente esencial en la regulación de la resistencia a la inanición.

BIBLIOGRAFÍA

- A -

- Adams, M.D., *et al.*, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287, 2185–2195.
- Aguila, J.R., Suszko, J., Gibbs, A.G. & Hoshizaki, D.K. 2007. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* 210: 956-963.
- Anholt, R.R. & Mackay, T.F.C. 2004. Quantitative genetic analyses of complex behaviors in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics* 5: 838-849.
- Archer, M.A., Phelan, J.P., Beckman, K.A. & Rose, M.R. 2003. Breakdown in correlations during laboratory evolution. II. Selection on stress resistance in *Drosophila* populations. *Evolution* 57: 536–543.
- Arnqvist, G. & Nilsson, T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insect. *Animal Behavior* 60:145-164.
- Arrese, E.L. & Soulages, J.L. 2010. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*. 55: 207–25.
- Arthur, A. L., Weeks, A. R. & Sgrò, C. M. 2008. Investigating latitudinal clines for life history and stress resistance traits in *Drosophila simulans* from eastern Australia. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1470-1479.

- B -

- Baker, K.D. & Thummel, C.S. 2007. Diabetic Larvae and Obese Flies-Emerging Studies of Metabolism in *Drosophila*. *Cell Metabolism Review* 6: 257-266.
- Baldal, E.G., Brakefield, P.M. & Zwaan, B.J. 2006. Multitrait evolution in lines of *Drosophila melanogaster* selected for increased starvation resistance: the role of metabolic rate and implications for the evolution of longevity. *Evolution*, 60: 1435–1444.
- Ballard, W.O., Melvin, R.G. & Simpson, S.J. 2008. Starvation resistance is positively correlated with body lipid proportion in five wild caught *Drosophila simulans* populations. *Journal of insect Physiology* 54: 1371-1376
- Barton, N.H. & Keightley, P.D. 2002. Understanding Quantitative Genetic Variation. *Nature Reviews Genetics* 3: 11-21.
- Bjedov, I., Toivonen, J.M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A. & Partridge, L. 2010. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metabolism* 11: 35–46.
- Bonduriansky, R. & Chenoweth, S.F. 2009. Intralocus sexual conflict. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 280-288.

- Borash, D.J. & Ho, G.T. 2001. Patterns of selection: stress resistance and energy storage in density-dependent populations of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 47: 1349–1356.
- Boulétreau-Merle, J. & Fouillet, P. 2002. How to overwinter and be a founder: egg-retention phenotypes and mating status in *Drosophila melanogaster*. *Evolutionary Ecology* 16: 309-332.
- Bownes, M. 1989. The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. *Journal of Insect Physiology* 35: 409–414.
- Broughton, S.J., Piper, M.D., Ikeya, T., Bass, T.M., Jacobson, J., Drieger, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D.J., Leivers, S.J. & Partridge, L. 2005. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *PNAS USA* 102: 3105–3110.
- Bubliy, O.A. & Loeschcke, V. 2005. Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanogaster*. *Journal Evolutionary Biology* 18: 789-803.

- C -

- Candolin, U. & Heuschele, J. 2008. Is sexual selection beneficial during adaptation to environmental change? *Trends in Ecology and Evolution* 23: 446–452.
- Capy, P., Pla, E. & David, J.R. 1994. Phenotypic and genetic variability of morphometrical traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. II. Within population variability. *Genetics Selection Evolution* 26: 15-28.
- Carbone, M.A., Jordan, K. W., Lyman, R. F., Harbison, S.T., Leips, J., Morgan, T.J., De Luca, M., Awadalla, P. & Mackay, T.F.C. 2006. Phenotypic variation and natural selection at *Catsup*, a pleiotropic quantitative trait gene in *Drosophila*. *Current Biology* 16: 912–919.
- Carlborg, Ö. & Haley, C. 2004. Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nature Review Genetics* 5:618-625.
- Carreira, V.P., Mensch, J. & Fanara, J.J. 2009. Body size in *Drosophila*: genetic architecture, allometries and sexual dimorphism. *Heredity* 102: 246-256.
- Carvalho, G.B., Kapahi, P., Anderson, D.J. & Benzer, S. 2006. Allocrine modulation of feeding behavior by the sex peptide of *Drosophila*. *Current Biology* 16: 692–696.
- Chapman, T., Liddle, L.F., Kalb, J.M., Wolfner, M.F. & Partridge, L. 1995. Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature* 373:241–44
- Chapman, T., & Davies, S.J. 2004. Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. *Peptides* 25, 1477–1490.

- Chippindale, A.K., Leroi, A.M., Kim, S.B. & Rose, M.R. 1993. Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution .1. Nutrition and the cost of reproduction. *Journal of Evolutionary Biology* 6: 171-193.
- Chippindale, A.K., Chu, T.J.F. & Rose, M.R. 1996. Complex trade-offs and the evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 50: 753-766.
- Chippindale, A.K., Ngo, A.L. & Rose, M.R. 2003. The devil in the details of life-history evolution: instability and reversal of genetic correlations during selection on *Drosophila* development. *Journal of Genetics*, 82: 133-145.
- Civetta, A. & Clark, A.G. 2000. Correlated effects of sperm competition and postmating female mortality. *PNAS USA* 97:13162–13165.
- Clark, A.G., Eisen, M.B., Smith, D.R., Bergman, C.M., Oliver, B., Markow, T.A. *et al.* 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450: 203–218.
- Cordts, R. & Partridge, L. 1996. Courtship reduces longevity of male *Drosophila*. *Animal Behaviour* 52, 269–278.

- D -

- D'Avino, P.P. & Thummel, C.S. 1998. *Crooked legs* encodes a family of zinc finger proteins required for leg morphogenesis and ecdysone-regulated gene expression during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 125: 1733–1745.
- D'Avino, P.P. & Thummel, C.S. 2000. The ecdysone regulatory pathway controls wing morphogenesis and integrin expression during *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology* 220, 211-224.
- Da Lage, J.L., Capy, P., & David, J.D. 1990. Starvation and desiccation tolerance in *Drosophila melanogaster*: differences between European, North African and Afrotropical populations. *Genetics Selection Evolution* 22: 381-391.
- David, J.R., Gibert, P., Legout, H., Petavy, G., Capy, P. & Moreteau, B. 2005. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity* 94: 3-12.
- De Luca, M., Roshina, N.V., Geiger-Thornsberry, G.L., Lyman, R.F., Pasyukova, E.G. & Mackay, T.F.C. 2003. Dopa decarboxylase (*Ddc*) affects variation in *Drosophila* longevity. *Nature Genetics* 34: 429-433.
- Djawdan, M., Chippindale, A.K., Rose, M.R. & Bradley, T.J. 1998 Metabolic reserves and evolved stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Physiological Zoology* 71: 584–559.

Dobzhansky, T. 1970. *Genética del Proceso Evolutivo*. Columbia University Press, Nueva Cork.

Drosophila 12 Genomes Consortium. 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450: 203-218.

- E -

Edwards, A.C. & Mackay, T.F.C. 2009. Quantitative Trait Loci for Aggressive Behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 182: 889-897.

Endler, J. A. 1986. *Natural selection in the wild*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.

- F -

Fairbairn, D.J., Blanckenhorn, W.U. & Székely, T. 2007. *Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual dimorphism*. Oxford: Oxford University Press.

Falconer, D.S. 1952. The problem of environment and selection. *Am. Nat.* 86: 293-298.

Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Addison, Wesley, Longman, Essex, U.K.

Fanara, J.J., Robinson, K.O., Rollmann, S.M., Anholt, R.R. & Mackay, T.F.C. 2002. Vanaso is a candidate quantitative trait gene for *Drosophila* olfactory behavior. *Genetics* 162: 1321-1328.

Flatt T. 2004. Assessing natural variation in genes affecting *Drosophila* lifespan. *Mechanisms of Ageing and Development* 125:155-159.

Folguera, G., Ceballos, S., Spezzi, L., Fanara, J.J & 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.

Force, A.G., Staples, T., Soliman, S. & Arking, R. 1995. Comparative biochemical and stress analysis of genetically selected *Drosophila* strains with different longevities. *Dev. Genet.* 17: 340-351.

Fox, C.W. & Wolf, J.B. 2006. *Evolutionary Genetics Concepts and Case Studies*. Oxford University Press, Inc.

Fricke, C., Bretman, A. & Chapman, T. 2008. Adults male nutrition and reproductive success in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 62: 3170-3177.

Fry, J.D., Nuzhdin, S.V., Pasyukova, E.G. & Mackay, T.F.C. 1998. QTL mapping of genotype-environment interaction for fitness in *Drosophila melanogaster*. *Genetics Research* 71: 133-141.

- G -

- Geiger-Thornsberry, G.L. & Mackay, T.F.C. 2004. Quantitative trait loci affecting natural variation in *Drosophila* longevity. *Mechanisms of Ageing and Development* 125:179-189.
- Gibbs, A.G. & Matzkin, L.M. 2001 Evolution of water balance in the genus *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology* 204: 2331–2338.
- Gibert, P., Moreteau, B., Moreteau, J.C. & David, J. R. 1998. Genetic variability of quantitative traits in *Drosophila melanogaster* (fruit fly) natural populations: analysis of wild-living flies and of several laboratory generations. *Heredity*, 80: 326-335.
- Gibert, P., Moreteau, B., Petavy, G., Karan, D. & David, J.R. 2001. Chill-coma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species. *Evolution* 55: 1063-1068.
- Gibson, G., & Wagner, G. P. 2000. Canalization in evolutionary genetics: A stabilizing theory? *BioEssays* 22: 372–380.
- Gibson, G., & Dworkin, I. 2004. Uncovering cryptic genetic variation. *Nature Review Genetics* 5: 681–90
- Gómez, F.H., Defays, R., Sambucetti, P., Scannapieco, A., Loeschcke, V. & Norry, F.M. 2009. Quantitative trait locus for starvation resistance in an intercontinental set of mapping populations of *Drosophila melanogaster*. *FLY* 3:247-52.
- Griffiths, J.A., Schiffer, M. & Hoffmann, A.A. 2005. Clinal variation and laboratory adaptation in the rainforest species *Drosophila birchii* for stress resistance, wing size, wing shape and development time. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 213–222.
- Gruntenko, N.E. & Rauschenbach, I.Y. 2008. Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *Journal of Insect Physiology* 54: 902– 908
- Guo, M.L., Jan, Y. & Jan, Y.N. 1996. Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of *Numb* and *Notch*. *Neuron* 17:27–41.

- H -

- Hahn, D.A. & Denlinger, D.L. 2007. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *Journal of Insect Physiology* 53:760–73.
- Hallas, R., Schiffer, M. & Hoffmann, A.A. 2002. Clinal variation in *Drosophila serrata* for stress resistance and body size. *Genetics Research* 79: 141–148.
- Hansen, T.F. 2006. The evolution of genetic architecture. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 123-157.

- Hao, X., Zhang, S., Timakov, B. & Zhang, P. 2007. The *Hsp27* gene is not required for *Drosophila* development but its activity is associated with starvation resistance. *Cell Stress & Chaperones* 4: 364–372
- Harbison, S.T., Yamamoto, A.H., Fanara, J.J., Norga, K.K. & Mackay, T.F.C. 2004. Quantitative trait loci affecting starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 166: 1807-1823.
- Harbison, S.T., Chang, S., Kamdar, K.P. & Mackay, T.F.C. 2005. Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila*. *Genome Biology* 6, R36.
- Harshman, L.G. & Schmid, J.L. 1998. Evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*: aspects of metabolism and counter-impact selection. *Evolution* 52:1679-1685.
- Harshman, L.G., Hoffmann, A.A. & Clark, A.G. 1999a. Selection for starvation resistance in *Drosophila melanogaster*: physiological correlates, enzyme activities and multiple stress responses. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 370-379.
- Harshman, L.G., Moore, K.M., Sty, M.A. & Magwire, M.M. 1999b. Stress resistance and longevity in selected lines of *Drosophila melanogaster*. *Neurobiology Aging* 20: 521–529.
- Harshman, L.G. & Hoffmann, A.A. 2000. Laboratory selection experiments on life history and stress-related traits in *Drosophila*: what do they really tell us? *Trends in Ecology and Evolution* 15, 32–36.
- Hasan, G., & Rosbash, M. 1992. *Drosophila* homologs of two mammalian intracellular Ca^{2+} -release channels: identification and ex-pression patterns of the inositol 1,4,5-triphosphate and the ryanodine receptor genes. *Development* 116: 967–975.
- Hermisson, J. & Wagner, G.P. 2004. The population genetic theory of hidden variation and genetic robustness. *Genetics* 168:2271–84
- Hoffmann, A.A. & Parsons, P.A. 1988. The analysis of quantitative variation in natural-populations with isofemale strains. *Genetics Selection Evolution* 20: 87-98.
- Hoffman, A.A. & Parsons, P.A. 1991. *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, Oxford.
- Hoffmann, A.A., Hallas, R., Sinclair, C. & Mitrovski, P. 2001. Levels of variation in stress resistance in *Drosophila* among strains, local populations, and geographic regions: patterns for desiccation, starvation, cold resistance, and associated traits. *Evolution* 55: 1621-1630.
- Hoffmann, A.A., Anderson, A. & Hallas, R. 2002. Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*. *Ecol. Lett.* 5: 614-618.
- Hoffmann, A.A., Shirriffs, J. & Scott, M. 2005a. Relative importance of plastic vs genetic factors in adaptive differentiation: geographical variation for stress resistance in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *Functional Ecology* 19: 222-227.

Hoffmann, A.A., Hallas, R., Anderson, A.R. & Telonis-Scott, M. 2005b. Evidence for a robust sex-specific trade-off between cold resistance and starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 804-810.

Hoshizaki, D.K., Lunz, R., Ghosh, M. & Johnson, W. 1995. Identification of fat-cell enhancer activity in *Drosophila melanogaster* using P-element enhancer traps. *Genome* 38, 497-506.

Houle, D. 1992. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics* 130: 195-204.

- I -

Izquierdo, J.I. 1991. How does *Drosophila melanogaster* overwinter? *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 59: 51-58.

- J -

Jan, Y.N., & Jan, L.Y. 1998. Asymmetric cell division. *Nature* 392: 775–778.

Johnstone, R.A. & Keller, L. 2000. How males gain by harming their mates: sexual conflict, seminal toxins, and the cost of mating. *American Naturalist* 156: 368–377.

Joshi, D.S. 1999. Latitudinal variation in locomotor activity rhythm in adult *Drosophila ananassae*. *Canadian Journal of Zoology* 77: 865-870.

Jordan, K.W., Morgan, T.J. & Mackay, T.F.C. 2006. Quantitative trait loci for locomotor behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 174:271-84.

- K -

Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V. & Benzer, S. 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current Biology* 14: 885–890.

Karan, D., Dahiya, N., Munjal, A.K., Gibert, P., Moreteau, B., Parkash, R. & David, J.R. 1998. Desiccation and starvation tolerance of adult *Drosophila*: Opposite latitudinal clines in natural populations of three different species. *Evolution* 52: 825-831.

Karan, D., & Parkash, R. 1998. Desiccation tolerance and starvation resistance exhibit opposite latitudinal clines in Indian geographical populations of *Drosophila kikkawai*. *Ecological Entomology* 23, 391–396.

- Kelty, J.D. & Lee, R.E. 1999. Induction of rapid cold hardening by cooling at ecologically relevant rates in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 45: 719–726.
- Kellermann, V., van Heerwaarden, B., Sgrò, C.M. & Hoffmann, A.A. 2009. Fundamental Evolutionary Limits in Ecological Traits Drive *Drosophila* Species Distributions. *Science* 325: 1244-1246.
- Kenny, M., Wilton, A. & Ballard, W.O. 2008. Seasonal trade-off between starvation resistance and cold resistance in temperate wild-caught *Drosophila simulans*. *Australian Journal of Entomology* 47: 20–23
- Klaesfeld, A., Leloup, J.C. & Rouyer, F. 2003. Circadian rhythms of locomotor activity in *Drosophila*. *Behavioural Processes* 64: 161-173.
- Klowden, M., 2002. *Physiological Systems in Insects*. Academic Press, Amsterdam
- Knowles, L.L., Hernandez, B.B. & Markow, T.A. 2004. Exploring the consequences of postmating-prezygotic interactions between the sexes. *Proc. Royal. Soc. Lond. B* (Suppl).
- Knowles, L.L., Hernandez, B.B. & Markow, T.A. 2005. Nonantagonistic interactions between the sexes revealed by the ecological consequences of reproductive traits. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 156–161.
- Koehn, R.K. & Bayne, B.L. 1989. Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biol. J. Linn. Soc.* 37:157-171.
- Koelle, M.R., Talbot, W.S., Segraves, W.A., Bender, M.T., Cherbas, P. & Hogness, D. S. 1991. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysona receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67, 59-77.
- Kubli, E. 2003. Sex-peptides: seminal peptides of the *Drosophila* male. *Cell Molecular Life Science* 60: 1689-1704.

- L -

- Lande, R. 1980. The genetic covariance between characters maintained by pleiotropic mutations. *Genetics* 94: 203-215.
- Lavagnino, N.J., Anholt, R.R. & Fanara, J.J. 2008. Variation in genetic architecture of olfactory behaviour among wild-derived populations of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 988-996.
- Lee, G.H. & Park, J.H. 2004. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167: 311–323.

- Lee, K.S., You, K.H., Choo, J.K., Han, Y.M., & Yu, K. 2004. *Drosophila* short neuropeptide *F* regulates food intake and body size. *Journal of Biological Chemistry* 279, 50781–50789.
- Leips, J. & Mackay, T.F.C. 2000. Quantitative trait loci for life span in *Drosophila melanogaster*: interactions with genetic background and larval density. *Genetics* 155: 1773–1788.
- Leroi, A.M., Chen, W.R. & Rose, M.R. 1994a. Long-Term Laboratory Evolution of A Genetic Life-History Trade-Off in *Drosophila-Melanogaster* .2. Stability of Genetic Correlations. *Evolution* 48: 1258-1268.
- Leroi, A.M., Chippindale, A.K. & Rose, M. R. 1994b. Long-Term Laboratory Evolution of A Genetic Life-History Trade-Off in *Drosophila-Melanogaster* .1. The Role of Genotype-By-Environment Interaction. *Evolution* 48: 1244-1257.
- Le Rouzic, A & Carlborg, Ö. 2007. Evolutionary potential of hidden genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution* 23:33-37.
- Lewontin 1970. Unit of selection. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 1-18.
- Lin, Y.J., Seroude, L. & Benzer, S. 1998. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. *Science* 282: 943–946.
- Lindquist, S. 1986. The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry* 55: 1151-1191.
- Liu H. & Kubli, E. 2003. Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. *PNAS U S A* 100: 9929–9933.
- Long, A.D.; Lyman, R.F., Langley, C.H. & Mackay, T.F.C. 1998. Two sites in the delta gene region contribute to naturally occurring variation in bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 149: 999–1017.
- Lynch, M. 1988. The rate of polygenic mutation. *Genet. Res.* 51: 137-148.
- Lynch, M. & Walsh, B. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer, Sunderland.

- M -

- Mackay, T.F.C. 2001a. Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics* 2: 11-20.
- Mackay, T.F.C. 2001b. The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Review of Genetics* 35: 303-339.
- Mackay, T.F.C. 2004. Complementing complexity. *Nature Genetics* 36: 1145-1147.

- Mackay, T.F.C., Lyman, R.F. & Lawrence, F. 2005. Polygenic mutation in *Drosophila melanogaster*: Mapping spontaneous mutations affecting sensory bristle number. *Genetics* 170: 1723-1735.
- Mackay, T.F.C. & Anholt, R.R. 2006. Of Flies and Man: *Drosophila* as a Model for Human Complex Traits. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7:339–67.
- Mackay, T.F.C. & Anholt, R.R. 2007. Ain't misbehavin'? Genotype-environment interactions and the genetics of behavior. *Trends in Genetics* 23: 311-314.
- Mackay, T.F.C. 2009. The genetic architecture of complex behaviors: lessons from *Drosophila*. *Genetica* DOI 10.1007/s10709-008-9310-6.
- Magwere, T., Chapman, T. & Partridge, L. 2004. Sex differences in the effect of dietary restriction on life span and mortality rates in female and male *Drosophila melanogaster*. *Journal of Gerontology* 59A, 3–9.
- Magwire, M.M., Yamamoto, A., Carbone, M.A., Roshina, N.V., Symonenko, A.V, Pasyukova, E.G., Morozova, T.V. & Mackay, T.F.C. 2010. Quantitative and Molecular Genetic Analyses of Mutations Increasing *Drosophila* Life Span. *PLoS Genetics* 6(7): e1001037. doi:10.1371/journal.pgen.1001037.
- Markow, T.A. 2002. Female remating, operational sex ratio, and the arena of sexual selection in *Drosophila*. *Evolution* 59:1725–34.
- Markow, T.A. & O'Grady, P.M. 2005. Evolutionary Genetics of Reproductive Behavior in *Drosophila*: Connecting the Dots. *The Annual Review of Genetics* 39:263–91.
- Markow, T.A. & O'Grady, P. 2006. *Drosophila: a Guide to Species Identification and Use*. Academic Press (Elsevier), London.
- Markow, T.A. & O'Grady, P.M. 2007. *Drosophila* biology in the genomic age. *Genetics* 177: 1269–1276.
- Markow, T.A. & O'Grady, P.M. 2008. Reproductive ecology of *Drosophila*. *Functional Ecology*, 22: 747–759.
- Matthews, K.A., Kaufman, T.C. & Gelbart, W.M. 2005. Research resources for *Drosophila*: the expanding universe. *Nature Reviews Genetics* 6: 179-193.
- Matzkin, L.M., Mutsaka, K., Johnson, S. & Markow, T.A. 2009a. Metabolic pools differ among ecologically diverse *Drosophila* species. *Journal of Insect Physiology* 55: 1145-1150.
- Matzkin, L.M., Watts, T.D. & Markow, T.A. 2009b. Evolution of stress resistance in *Drosophila* interspecific variation in tolerance to desiccation and starvation. *Functional Ecology* 23: 521–527.
- Members of the Complex Trait Consortium, 2003. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nature Genetics*, 4: 911- 916.

- Mensch, J., Lavagnino, N., Carreira, V.P., Massaldi, A., Hasson, E., & Fanara, J.J. 2008. Identifying candidate genes affecting developmental time in *Drosophila melanogaster*: pervasive pleiotropy and gene-by-environment interaction. *BMC Developmental Biology* 8: 78.
- Mensch, J., Carreira, V., Lavagnino, N., Goenaga, J., Folguera, G., Hasson, E. & Fanara, J.J. 2010. Stage-specific Effects of Candidate Heterochronic Genes on Variation in Developmental Time along an Altitudinal Cline of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 5(6): e11229. doi:10.1371/journal.pone.0011229.
- Mitrovski, P. & Hoffmann, A.A. 2001. Postponed reproduction as an adaptation to winter conditions in *Drosophila melanogaster*: evidence for clinal variation under semi-natural conditions. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 2163-2168.
- Morgan, E. 2004. Ecological significance of biological clocks. *Biological Rhythm Research* 35: 3-12.
- Morgan, T.J. & Mackay, T.F.C. 2006. Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 96: 232-242.
- Morimoto, R. 1993. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409-1410.
- Muir, W.M., Nyquist, Y. & Xu, S. 1992. Alternative partitioning of the genotype by environment interaction. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 193-200.

- N -

- Nuzhdin, S.V., Pasyukova, E.G., Dilda, C.L., Zeng, Z.B. & Mackay, T.F.C. 1997. Sex-specific quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster*. *PNAS USA* 94: 9734-9739.
- Nuzhdin, S.V., Khazaeli, A.A. & Curtsinger, J.W. 2005. Survival analysis of life span quantitative trait loci in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 170: 719-31.
- Nuzhdin, S.V., Harshman, L.G., Zhou, M. & Harmon, F. 2007. Genome-enabled hitchhiking mapping identifies QTLs for stress resistance in natural *Drosophila*. *Heredity* 99: 313-321.

- P -

- Paaby, A.B. & Schmidt, P.S. 2008. Functional significance of allelic variation at *methuselah*, an aging gene in *Drosophila*. *PLoS ONE*. 3:e1987.
- Paaby, A.B. & Schmidt, P.S. 2009. Dissecting the genetics of longevity in *Drosophila melanogaster*. *FLY* 3: 1-10.

- Parkash, R. & Munjal, A.K. 2000. Evidence of independent climatic selection for desiccation and starvation tolerance in Indian tropical populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolutionary Ecology Research*. 2: 685–699.
- Partridge, L. & Hurst, L.D. 1998. Sex and conflict. *Science* 281: 2003–2008.
- Pasyukova, E.G., Vieira, C. & Mackay, T.F.C. 2000. Deficiency mapping of quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 156: 1129-1146.
- Pasyukova, E.G., Roshina, N.V. & Mackay, T.F.C. 2004. Shuttle craft: A candidate quantitative trait gene for *Drosophila* life span. *The Ageing Cell* 3:297-307.
- Perrimon, N., Lanjuin, A., Arnold, C. & Noll, E. 1996. Zygotic Lethal Mutations With Maternal Effect Phenotypes in *Drosophila melanogaster*. II. Loci on the Second and Third Chromosomes Identified by P-Element-Induced Mutations. *Genetics* 144: 1681-1692.
- Phelan, J.P., Archer, M.A., Beckman, K.A, Chippindale, A.K, Nusbaum, T.J. & Rose, M.R. 2003. Breakdown in correlations during laboratory evolution. I. Comparative analyses of *Drosophila* populations. *Evolution* 57:527–535.
- Phillips, P.C. 2005. Testing hypotheses regarding the genetics of adaptation. *Genetica* 123: 15–24.
- Pitnick, S., Spicer, G.S. & Markow, T. A. 1997. Phylogenetic examination of female incorporation of ejaculate in *Drosophila*. *Evolution* 51:833–845.
- Poissant, J., Wilson, A.J. & Coltman, D.W. 2009. Sex-specific genetic variance and the evolution of sexual dimorphism: a systematic review of cross-sex genetic correlations. *Evolution* 64: 97-107.
- Posakony, J.W. 1994. Nature versus nurture: asymmetric cell divisions in *Drosophila* bristle development. *Cell* 76, 415–418.
- Prasad, N.G. & Joshi, A. 2003. What have two decades of laboratory life-history evolution studies on *Drosophila melanogaster* taught us? *Journal of Genetics* 82: 45-76.
- Prasad, M.G. & Shakarad, M.N. 2004. Genetic correlations: transient truths of adaptive evolution. *Journal of Genetics*, 83: 3-5.

- Q -

- Quinn, G. P. & Keough, M.J. 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists Gerry Quinn & Mick Keough*. Published by Cambridge University Press.

- R -

- Randall, D., Burggren, W. & French, K. 1997. *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*, 4th edn. W.H. Freeman & Company, New York.
- Rhyus, M.S., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. 1994. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76:477-491.
- Riddiford, L.M. 1993. Hormones and *Drosophila* development. In *The Development of Drosophila melanogaster*, Volume 2, M. Bate and A. Martinez Arias, eds. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 899–939.
- Rion, S. & Kawecki, T.J. 2007. Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1655-1664.
- Roberts, D.B. 1998. *Drosophila*, a practical approach. Second edition. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Robertson, A. 1959. The sampling variance of the genetic correlation coefficient. *Biometric* 15: 469-485.
- Robinson, S.J.W., Zwaan, B. & Partridge, L. 2000. Starvation resistance and adult body composition in a latitudinal cline of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54: 1819-1824.
- Roff, D. A. (1997). *Evolutionary quantitative genetics*. Chapman & Hall, New York.
- Rose, M.R., Vu, L.N., Park, S.U. & Graves, J.L. 1992. Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* 27: 241-250.
- Rush, B., Sandver, S., Bruer, J., Roche, R., Wells, M. & Giebultowicz, J. 2007. Mating increases starvation resistance and decreases oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster* females. *Aging Cell*, 6: 723-726.
- Rusten, T.E., Lindmo, K., Juhasz, G., Sass, M., Seglen, P.O., Brech, A. & Stenmark, H. 2004. Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Developmental Cell* 7: 179–192.

- S -

- Salmon, A.B., Marx, D.B. & Harshman, L.G. 2001. A cost of reproduction in *Drosophila melanogaster*: stress susceptibility. *Evolution* 55: 1600-1608.
- Sambandan, D., Yamamoto, A., Fanara, J.J., Mackay, T.F., & Anholt, R.R. 2006. Dynamic genetic interactions determine odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 174: 1349–1363.

- Saunders, D.S., Henrich, V.C. & Gilbert, L.I. 1989. Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement. PNAS USA 86:3748–3752.
- Schmidt, P.S., Matzkin, L., Ippolito, M. & Eanes, W.F. 2005a. Geographic variation in diapause incidence, life-history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. Evolution 59: 1721-1732.
- Schmidt, P.S., Paaby, A.B. & Heschel, M.S. 2005b. Genetic variance for diapause expression and associated life histories in *Drosophila melanogaster*. Evolution 59: 2616-2625.
- Schmidt, P.S. & Paaby, A.B. 2008. Reproductive diapause and life-history clines in north american populations of *Drosophila melanogaster*. Evolution 62: 1204-1215.
- Schmidt, P.S., Zhu, C-T., Das, J., Batavia, M., Yang, L. & Eanes, W.F. 2008. An amino acid polymorphism in the couch potato gene forms the basis for climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. PNAS USA 105:16207-11.
- Scott, R.C., Schuldiner, O. & Neufeld, T.P. 2004. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. Developmental Cell 7: 167-178.
- Service, P.M., Hutchinson, E.W., Mackinley, M.D. & Rose, M.R. 1985. Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. Physiological Zoology 58: 380-389.
- Service, P.M. & Rose, M.R. 1985. Genetic covariation among life history components: the effect of novel environments. Evolution 39: 943-945.
- Shimuta, M., Yoshikawa, M., Fukaya, M., Watanabe, M., Takeshima, H., & Manabe, T. 2001. Postsynaptic modulation of AMPA receptor-mediated synaptic responses and LTP by the type 3 ryanodine receptor. Molecular and Cellular Neuroscience 17: 921–930.
- Simon, A.F., Shih, C., Mack, A. & Benzer, S. 2003. Steroid Control of Longevity in *Drosophila melanogaster*. Science 299: 1407-1410.
- Sisodia, S. & Singh, B.N. 2010. Resistance to environmental stress in *Drosophila ananassae*: latitudinal variation and adaptation among populations. Journal of Evolutionary Biology 23: 1979-1988.
- Soller, M., Bownes, M., & Kubli, E. 1999. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. Developmental Biology 208: 337-351.
- Sorensen, J.G., Noory, F.M., Scannapieco, A.C. & Loeschcke, V. 2005. Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the new world. Journal of Evolutionary Biology 18: 829-837.
- Spana, E.P., & Doe, C.Q. 1996. Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. Neuron 17: 21-26.

Sullivan, K.M.C.; Scott, K.; Zuker, C. & Rubin, G.M. 2000. The ryanodine receptor is essential for larval development in *Drosophila melanogaster*. PNAS. USA 97: 5942-5947.

- T -

Takeshima, H.; Nishi, M.; Iwabe, N.; Miyata, T.; Hosoya, T. *et al.*, 1994. Isolation and characterization of a gene for a ryanodine receptor/calcium release channel in *Drosophila melanogaster*. FEBS Letters 337: 81-87.

Tang, H., Rompani, S.B., Atkins, J.B., Zhou, Y., Osterwalder, T. & Zhong, W. 2005. Numb Proteins Specify Asymmetric Cell Fates via an Endocytosis- and Proteasome-Independent Pathway. Molecular and Cellular Biology 25: 2899-2909

Tatar, M., Chien, S. & Priest, N.K. 2001. Negligible senescence during reproductive dormancy in *Drosophila melanogaster*. American Naturalist 158: 248-258.

Tatar, M. & Yin, M.C. 2001. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. Experimental Gerontology 36: 723-738.

Tatar, M., Bartke, A. & Antebi, A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulinlike signals. Science 299: 1346-1351

Tauber, M. J., Tauber, C.A. & Masaki, S. 1986. Seasonal adaptations of insects. Oxford Univ. Press, New York.

Thummel, C.S. 1996. Flies on steroids – *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. Trends Genetics 12: 306-310.

Toivonen, J.M. & Partridge, L. 2009. Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*. Molecular and Cellular Endocrinology 299: 39-50.

- U -

Ungerer, M.C., Halldorsdottir, S.S; Purugganan, M.D. & Mackay, T.F.C. 2003. Genotype-Environment Interactions at Quantitative Trait Loci Affecting Inflorescence Development in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 165: 353-365.

- V -

Van Der Linde, K. & Sevenster, J.G. 2006. Local adaptation of developmental time and starvation resistance in eight *Drosophila* species of the Philippines. Biological Journal of the Linnean Society 87: 115-125.

- Van Herrewege, J. & David, J.R. 1997. Starvation and desiccation tolerances in *Drosophila*: Comparison of species from different climatic origins. *Ecoscience* 4: 151-157.
- Van Noordwijk, A.J. & de Jong, G. 1986. Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life-history tactics. *The American Naturalist* 128: 137-142.
- Venken, K.J. & Bellen, H.J. 2005. Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics* 6: 167-178.
- Vieira, C., Pasyukova, E.G., Zeng, A., Hackett, J.B., Lyman, R.F. & Mackay, T.F.C. 2000. Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 154: 213-227.

- W -

- Wagner, G.P. & Altenberg, L. 1996. Complex adaptations and evolution of evolvability. *Evolution* 50: 967-976.
- Wang, M.H., Lazebny, O., Harshman, L.G. & Nuzhdin, S.V. 2004a. Environment-dependent survival of *Drosophila melanogaster*: a quantitative genetic analysis. *Aging Cell* 3: 133-140.
- Wang, H.D., Kazemi-Esfarjani, P. & Benzer, S. 2004b. Multiple-stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes. *PNAS* 101: 12610-12615.
- Wayne, M., Soundararajan, U. & Harshman, L. 2006. Environmental stress and reproduction in *Drosophila melanogaster*: starvation resistance, ovariole numbers and early age egg production. *BMC Evolutionary Biology* 6: 57.
- Wigby, S. & Chapman, T. 2005 Sex peptide causes mating costs in female *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* 15: 316-321.
- Wilson, R.H., Morgan, T.J. & Mackay, T.F.C. 2006. High-resolution mapping of quantitative trait loci affecting increased life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 173: 1455-1463.
- Wolf, J.B., Brodie E.D. & Wade, M.J. 2000. *Epistasis and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, Oxford.
- Wolfner, M.F. 2002. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity*, 88: 85-93.
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M.N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.
- Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B. & Bloom, S. 2005. Appetite control. *Journal of Endocrinology* 184: 291-318.

- Y -

Yamazaki, D., Yamazaki, T. & Takeshima, H. 2009. New molecular components supporting ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release: Roles of junctophilin and TRIC channel in embryonic cardiomyocytes. *Pharmacology & Therapeutics* 121: 265-272.

- Z -

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Fourth Edition.

Ziegler, R. & Van Antwerpen, R. 2006. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 264-272

Zwaan, B., Bijlsma, R. & Hoekstra, R.F. 1995 Direct selection on life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 49: 649-659.

7

ANEXO

Interacción Genotipo x Sexo ($G \times S$)

El análisis de la varianza es una herramienta ampliamente utilizada para determinar la significación de los diferentes factores involucrados en un estudio genético cuantitativo. Los ANOVAs realizados para cada población y carácter sirvieron para analizar los factores principales Línea y Sexo y la interacción Línea x Sexo. En este contexto, es necesario resaltar que cada línea (familia) podría considerarse como un genotipo, de modo que la variación entre líneas sería una estimación del componente genético de la variación fenotípica. Consecuentemente, la interacción Línea x Sexo sería un estimador de la interacción Genotipo x Sexo. Esta interacción resulta significativa a causa de: 1) cambios en la magnitud de la varianza entre genotipos en hembras y machos (denominado *cambio de escala*) y/o cambios en el orden de los valores fenotípicos de los genotipos entre los sexos (denominado *cambio de orden en el rango*). Gráficamente resulta fácil visualizar una interacción significativa si trazamos las normas de reacción de cada genotipo a través de los sexos. La Figura A muestra los diferentes patrones de variación en las normas de reacción para diferentes genotipos y, el resultado asociado del análisis de la varianza. La descripción de cada patrón de variación se detalla a continuación:

a) Hay diferencias significativas entre genotipos, o sea, hay variación genética para el carácter, pero los efectos son idénticos en los dos sexos y no hay dimorfismo sexual. Las normas de reacción son paralelas, por lo tanto no existe interacción $G \times S$ y no hay variación genética para el dimorfismo sexual.

b) Hay diferencias significativas entre genotipos y entre sexos. Los diferentes genotipos reaccionan de la misma manera en ambos sexos. Este caso representa la situación donde además de variación genética para el carácter existe un claro dimorfismo sexual, pero las normas de reacción son paralelas por lo tanto no hay una interacción $G \times S$, de modo que no hay variación genética para el dimorfismo sexual.

c) Hay diferencias significativas entre genotipos, pero no existen diferencias entre sexos. No obstante, en hembras la magnitud de la varianza entre genotipos es menor que en machos. Aquí, las normas de reacción no son paralelas lo cual indica que existe interacción $G \times S$, es decir, hay variación genética para el dimorfismo sexual. Esta situación se denomina *cambio de escala*.

d) Hay diferencias significativas entre genotipos, pero no entre sexos. En este caso no existen diferencias en la magnitud de la varianza entre genotipos entre sexos, pero el orden de los valores fenotípicos de los genotipos cambia con el sexo. En este caso, las normas de reacción tampoco son paralelas, se cruzan, entonces existe interacción $G \times S$, lo cual implica que hay variación genética para el dimorfismo sexual. Esta situación se denomina *cambio de orden en el rango*.

e) Hay diferencias significativas entre los genotipos y entre sexos. Asimismo, los genotipos tienen valores fenotípicos diferentes entre sexos y, además, la magnitud de la varianza entre genotipos difiere entre hembras y machos. En este caso la significativa interacción $G \times S$ se manifiesta a causa de *cambios de escala* y *cambios de orden en el rango*. En este gráfico se observa variación genética para el carácter, dimorfismo sexual y variación genética para el dimorfismo sexual.

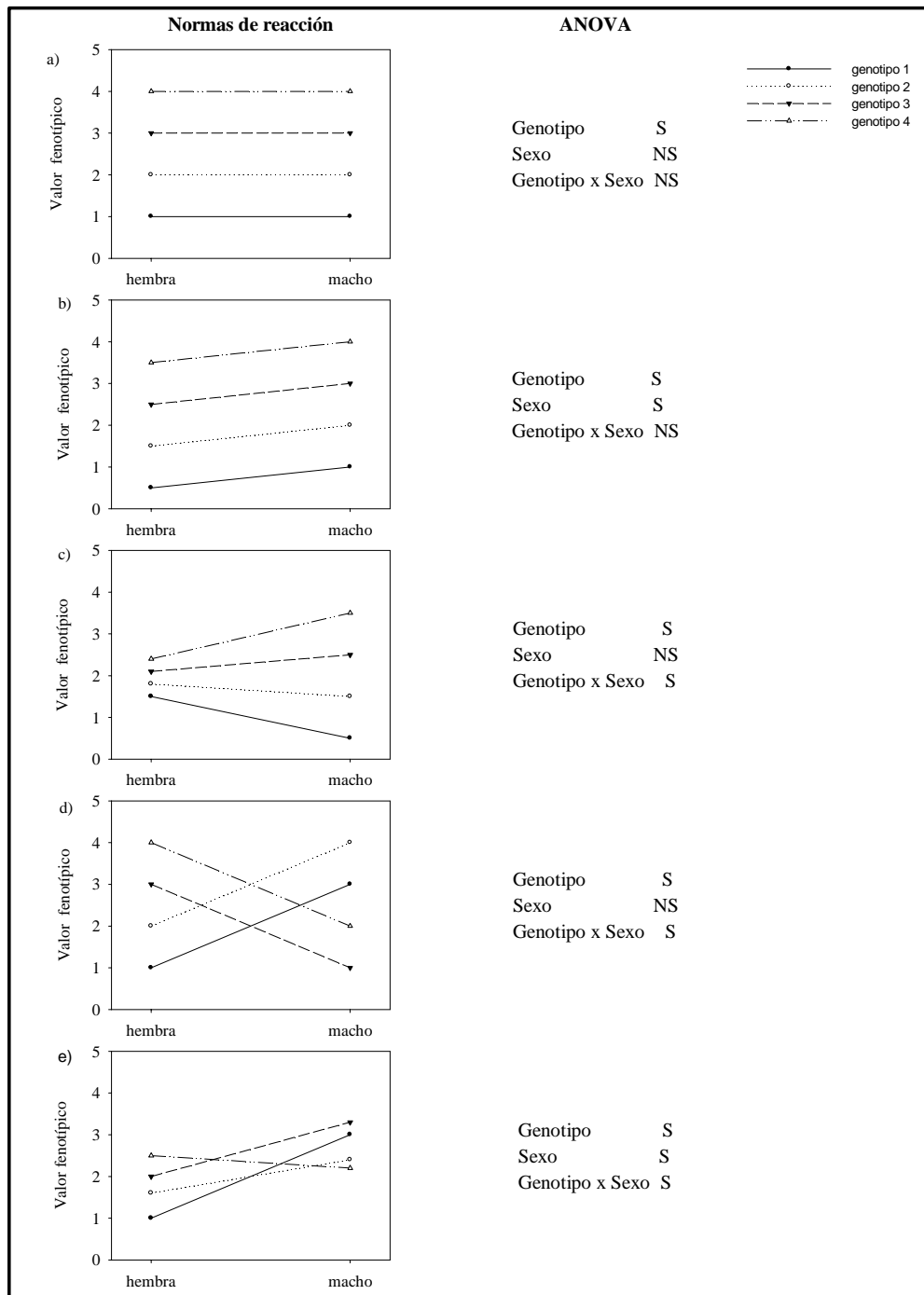


Figura A. Patrones de variación en las normas de reacción para diferentes genotipos a través de los sexos y el resultado asociado del ANOVA analizando el nivel de significación los factores, Genotipo, Sexo y Genotipo x Sexo.

