

Tesis Doctoral

¿Qué historias nos cuentan el ADN mitocondrial y los microsatélites sobre la estructura poblacional de *Drosophila koepferae* y su especie hermana *Drosophila buzzatii* en Argentina?

Lipko, Paula

2013-10-29

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. 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:

Lipko, Paula. (2013-10-29). ¿Qué historias nos cuentan el ADN mitocondrial y los microsatélites sobre la estructura poblacional de *Drosophila koepferae* y su especie hermana *Drosophila buzzatii* en Argentina?. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Lipko, Paula. "¿Qué historias nos cuentan el ADN mitocondrial y los microsatélites sobre la estructura poblacional de *Drosophila koepferae* y su especie hermana *Drosophila buzzatii* en Argentina?". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-10-29.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**¿Qué historias nos cuentan el ADN mitocondrial
y los microsatélites sobre la estructura poblacional
de *Drosophila koepferae* y su especie hermana
Drosophila buzzatii en Argentina?**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Autora: Lic. Paula Lipko

Director de tesis: Dr. Esteban Hasson

Consejero de Estudios: Dr. Esteban Hasson

Lugar de trabajo: Laboratorio de Evolución. Departamento de Ecología, Genética y Evolución.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Buenos Aires, 2013.

ÍNDICE

Resumen	Pág.	4
Abstract		5
		9
Capítulo 1		
1.1 Marco Teórico		9
1.2 Modelo de Estudio		20
1.3 Objetivos		30
		31
Capítulo 2		
2.1 Introducción		32
2.2 Materiales y métodos		34
2.2.1 Obtención de muestras		34
2.2.2 Extracción de ADN		38
2.2.3 Amplificación por PCR y secuenciación		39
2.2.4 Edición y alineamiento de secuencias		40
2.2.5 Estimación de la diversidad molecular		40
2.2.6 Relaciones genealógicas entre haplotipos		41
2.2.7 Análisis demográficos		41
2.2.8 Estructura poblacional		45
2.3 Resultados		48
2.3.1 Diversidad molecular		48
2.3.2 Relaciones genealógicas entre haplotipos		51
2.3.3 Análisis demográficos		59
2.3.4 Análisis de estructura poblacional		63
2.3.5 Correlación entre matrices		66
2.4 Discusión		70
2.5 Conclusiones		78
		79
Capítulo 3		
3.1 Introducción		80
3.2 Materiales y métodos		82
3.2.1 Construcción de una biblioteca enriquecida en microsatélites		83
3.2.2 Caracterización de los loci microsatélites		83
3.2.3 Análisis de datos		85
3.2.4 Recolección de muestras		86
3.2.5 Obtención de datos		86
3.2.6 Variación genética geográfica		87
3.2.7 Diferenciación interpoblacional		87
3.3 Resultados		91
3.3.1 Caracterización preliminar de los microsatélites		91
3.3.2 Variación genética de los loci y desequilibrio de ligamiento		92
3.3.3 Divergencia geográfica		103
3.4 Discusión		115
3.5 Conclusión		118
		119

Capítulo 4	
Discusión general	119
Conclusiones generales	129
	130
Bibliografía	
Anexo I	145
Anexo II	154
Anexo III	160

Resumen

Recientemente, el papel de los factores ecológicos en la especiación ha comenzado a evaluarse críticamente. En insectos mariposas y moscas de la fruta, la evidencia disponible indica que los cambios de hábitat/dieta están correlacionados con el aislamiento reproductivo apuntando a que la adquisición de nuevas plantas hospedadoras podría ser clave en la sorprendente diversidad de los insectos fitófagos. Las especies cactófilas del género *Drosophila* son modelos ideales para estudiar el papel de los cambios de planta hospedadora en la adaptación y la especiación. *D. buzzatii* y *D. koepferae* se crían en los tejidos necróticos de cactáceas de los géneros *Opuntia* (tunas) y *Trichocereus* (cardones) y exhiben un cierto grado de especificidad de nicho. Se ha propuesto que los cactus columnares y las tunas podrían representar dos tipos de recursos claramente diferenciados, ya que difieren en varios aspectos relevantes para el ciclo de vida de las moscas, como por ejemplo en su composición química. Los primeros presentan una mayor concentración de compuestos tóxicos, como alcaloides, y por lo tanto representan un ambiente estresante durante el desarrollo larval; en tanto que las tunas ofrecen un ambiente químico más benigno y rico desde el punto de vista nutricional. Asimismo, cardones y tunas se diferencian en su predecibilidad espacial y temporal y sus patrones de distribución geográfica. Una predicción basada en la relación entre el uso de plantas hospedadoras diferentes y la estructuración poblacional es que el grado de compartimentalización del recurso impondría diferentes grados de restricción al flujo génico. En este trabajo se estudió la variación molecular y la estructura poblacional de estas dos especies utilizando dos marcadores moleculares, COI y un grupo de microsatélites específicos para estas especies. Se encontró que no hay estructuración genético-poblacional en *D. buzzatii* como cabría esperar para una especie que utiliza un recurso con una distribución espacialmente homogénea (más que los cardones) y espacialmente predecible; en cambio en *D. koepferae*, asociada a un recurso con una distribución más compartimentalizada y menos predecible espacialmente, se encontró una estructuración poblacional.

Palabras clave: *Drosophila koepferae*, *Drosophila buzzatii*, estructura poblacional, variabilidad molecular, ADN mitocondrial, microsatélites

Abstract

What stories tell us mitochondrial DNA and microsatellites on population structure of *Drosophila koepferae* and *Drosophila buzzatii* in Argentina?

The role of ecological factors in speciation has recently began to be critically evaluated. In insects, the available evidence indicates that changes in habitat/diet are correlated with reproductive isolation, particularly, in butterflies and fruit flies, suggesting that the acquisition of new host plants could be a key factor in the amazing diversity of phytophagous insects. Cactophilic species of the genus *Drosophila* are ideal models for studying the role of changes in host plant adaptation and speciation. *D. buzzatii* and *D. koepferae* are two cactophilic species that inhabit the arid and semiarid lands of Argentina and Bolivia. These species exhibit a certain degree of niche specificity since the former breeds mainly in the necrotic tissues of cacti of the genus *Opuntia* (prickly pears) and the latter on the necroses of plants of the genera *Trichocereus* (cardón) and *Cereus*, however the available evidence points to a certain degree of niche overlap. Previous studies have proposed that columnar cacti and prickly pears represent two distinct types of resources since they differ in many aspects such as geographic distribution, chemical composition and spatial and temporal predictability that are relevant to the life cycle of flies. On one hand, columnar cacti represent stressful environments for larval development since they have a high concentration of toxic compounds such as alkaloids and triterpenes. On the other hand, unas offer a more benign chemical environment due to the absence of toxic compounds and greater nutritional richness. A prediction based on the relationship between the use of different host plants and population structure is that the degree of compartmentalization of the specific resource imposes varying constraints to gene flow. In this tesis, we studied molecular variation and population structure in *D. buzzatii* and *D. koepferae* using two types of molecular markers, the mitochondrial gene COI and a set of species-specific microsatellites. Our main findings are that natural populations of *D. buzzatii* are not genetically structured as expected for a species that uses a resource with a spatially homogeneous distribution, while significant population structure was detected in *D. koepferae*, a species associated with resources exhibiting more compartmentalized and spatially less predictable breeding sites.

Keywords: *Drosophila koepferae*, *Drosophila buzzatii*, population structure, molecular variability, mitochondrial DNA, microsatellites

Agradecimientos

Este tesis doctoral fue posible gracias a las becas otorgadas por diferentes organismos: ANPCyT (Beca al proyecto PICT 32146/05), beca de inicio de doctorado de la UBA, beca tipo II CONICET, así como el apoyo económico de CONICET (PIP 112-200801-01459), de la UBA (proyecto UBACyT 20020100100274) y de la ANPCyT (PICT 32146/05 y PICT 2795/2010) otorgados al Dr. Esteban Hasson.

Quisiera agradecer a aquellos que a lo largo de estos años, en diferentes etapas, me han ayudado dentro y fuera del laboratorio siendo parte de la condición de posibilidad para la realización de esta tesis. En principio quiero agradecer el apoyo institucional de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y en particular al Departamento de Genética, Ecología y Evolución del cual formo parte desde mis estudios de grado.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, en particular a Cristian Corio por haberme enseñado los primeros pasos en el laboratorio de molecular, y ayudarme cada vez que lo necesité. También a Paola Sassi y Marcos Imberti porque dentro del laboratorio no sólo me brindaron su amistad sino consejos académicos de gran importancia. No puedo olvidarme de Gabriela Russo con la cual compartimos muchísimas horas de mesada. Quiero agradecer a Eduardo Soto por siempre haber sido generoso en cuanto a su conocimiento y manejo de las moscas. En particular a Eduardo Soto y Valeria Carreira, puesto que el viaje de campaña que hicimos en el 2008 fue una instancia fundamental y de gran aprendizaje. Agradezco a Juan José Fanara, Valeria Carreira, Nicolás Lavagnino, por haber colectado ejemplares en la campaña 2007, a Juan Hurtado por haber colectado ejemplares en la campaña 2010, y a Esteban Hasson por haber colectado ejemplares en las 3 campañas. También quiero agradecer a los compañeros del cuarto piso que siempre han sido muy solidarios, en particular a Marcela Rodriguero. No quiero dejar de mencionar lo fundamentales que fueron las colaboraciones con diferentes personas que me han suministrado herramientas tanto intelectuales como afectivas para lograr consumir la tesis que hoy tiene entre sus manos. Agradezco a Romina Piccinali, por haber sido generosa en cuanto a su experiencia sobre el manejo de secuencias, y por haberme enseñado a usar los primeros programas de análisis de datos moleculares. Le agradezco a Santiago Ceballos por haberme ayudado con bibliografía y programas para analizar datos. También quiero agradecer a los colegas que me han leído diferentes capítulos de la tesis: Maria Inés Pigozi, Marcos Imberti, Nicolás Lavagnino, Gonzalo Corti Bielsa, Luis Suárez, Alicia Massarini y Mariana Córdoba; sus miradas críticas y sus consejos enriquecieron el manuscrito; en este sentido en especial le doy las gracias a Alicia López. Quiero agradecer a Mariana Álvarez por haberme ayudado con varias de las figuras de la tesis y con la elección de la tipografía. Esta tesis como supongo que son la mayoría, es el fruto de varios años de trabajo y esfuerzo, preponderan la búsqueda y la curiosidad, y por sobre todo el incansable objetivo de saber un poco más del objeto de estudio, con el cual he soñado, me he peleado, lo he adorado, me ha sufrido, lo he sufrido. Para realizar esta

tesis he sacrificado entre otras cosas, una gran cantidad de moscas cactófilas del noreste argentino, a las cuales esta tesis rinde pálido homenaje. A lo largo de estos años he conocido lugares, gente y aprehendido una enormidad de cosas que me llevo conmigo y que me han enriquecido, sin lugar a dudas no sólo como investigadora sino también como persona, que es en definitiva lo que hace que pueda investigar. Por eso, siguiendo con los agradecimientos no puedo olvidar al “Grupo de Historia de la Ciencia” de la FCEN, en particular a Alberto Onna. Quiero agradecer al Grupo “Ciencia entre Todxs” y a todos sus integrantes, porque resignifican la idea de ciencia y de investigar. Sin lugar a dudas en estos agradecimientos guardo un lugar especial para María Inés Pigozi, Marcos Imberti, Mariana Córdoba, Luis Suarez, Mariana Álvarez y Eugenia di Fiori por haberme acompañado más allá de las palabras y la academia. Estoy en deuda con María Marta Marquestó. Me queda lo esencial, incluso más allá de esta tesis: mi familia, mis padres Inés y Ernesto; mis hermanos Nicolás y Silvana; y mi Gonzalo, ellos constituyen el basamento afectivo sin nada de lo cual sería posible. No hay palabras entonces que puedan dar cuenta de su importancia.

A mis padres, Inés y Ernesto.

A mi maestro Alberto Onna.

En memoria de Guillermo Boido.

► Introducción

1.1 Marco Teórico

1.1.1 El pensamiento evolutivo

La presente tesis se inspira, en la pregunta que Charles Darwin formuló como el misterio de los misterios: ¿cómo surgen nuevas especies? (Darwin 1859) La Evolución tanto como hecho y teoría es el hilo conductor que integra toda la información de la vida sobre la tierra proveniente de todos los campos de la biología, y explica cómo ha surgido la biodiversidad (Gould 1983, Futuyma 1986, 1997). Es así que los seres humanos nos encontramos compartiendo el planeta junto con la enorme diversidad de organismos que se han originado a través de diversos procesos y mecanismos a lo largo de la historia de la vida sobre la tierra. Los procesos y mecanismos por los cuales se ha generado la biodiversidad y su distribución en el planeta, han sido y son el foco de interesantes e intensos debates.

El primer mecanismo para explicar el surgimiento de la biodiversidad y de las especies, la selección natural (SN), fue propuesto conjuntamente por Charles Darwin y Alfred Wallace en julio de 1858 en la Sociedad Linneana de Biología de Londres. A esta presentación le siguió la publicación de “El origen de las especies”, la obra cumbre de Darwin que reúne una vasta cantidad de información, donde el autor desarrolla, entre otros, el concepto de la selección natural. Desde la primera publicación de “El origen de las especies” (1859) la teoría de la evolución ha atravesado diferentes etapas. En los años siguientes a su aparición, las teorías darwinianas fueron primero leídas, para luego ser evitadas por la comunidad científica a causa de algunas dificultades. Entre éstas -desde un análisis historiográfico internalista, es decir sólo teniendo en cuenta la relación de los postulados con el conocimiento hegemónico consolidado en la segunda mitad del siglo XIX- se pueden enumerar las siguientes: la antigüedad de la Tierra (según los cálculos de

ese entonces no era suficiente como para que la selección natural hubiera producido los efectos pretendidos) y la falta de una explicación adecuada que diera cuenta del origen de las variaciones necesarias para que opere la selección natural. A esto debemos sumar que por aquellos tiempos se habían propuesto mecanismos alternativos que pretendían dar cuenta del cambio, tales como la ortogénesis (evolución dirigida en un sólo sentido por fuerzas que se originan dentro del organismo) o la herencia de caracteres adquiridos, ambos postulados por J. B. Lamarck (Bowler y Morus 2005, Folguera y Lipko 2007)

Luego de las investigaciones de Mendel y posteriormente, de la sistematización que se propugnó con la integración entre la genética de poblaciones, la sistemática y la paleontología, algunas de las teorías propuestas por Darwin fueron incorporadas en el seno del pensamiento biológico. Esta integración que le dio finalmente el protagonismo a estas ideas se conoce como Teoría Sintética de la Evolución (TSE) (Mayr 1982, Depew y Werber 1996, Gould 2004,). En 1908, Godfrey H. Hardy (1877-1947), un matemático inglés y Wilhelm Weinberg (1862-1937), un médico alemán, dedujeron las ecuaciones matemáticas que permitieron extender las predicciones de la genética mendeliana al nivel poblacional. En las dos décadas siguientes algunos genetistas como H. B. S. Haldane, R. A. Fisher y S. Wright aportaron las herramientas matemáticas que posibilitaron la integración entre la genética mendeliana y la teoría darwiniana en una síntesis que se conoció como la “Teoría Sintética de la Evolución” (TSE), Teoría Moderna de la Evolución o, simplemente, Neodarwinismo, que representó un hito en el pensamiento evolutivo contemporáneo (Mayr 1982, Depew y Werber 1996 Gould 2004). Algunos autores han entendido que la TSE se basa en cuatro hipótesis centrales: 1) se elimina cualquier teoría alternativa contradictoria con las hipótesis darwinianas seleccionadas, 2) la mutación, la deriva génica, la migración y la selección natural son reconocidas como los únicos procesos microevolutivos, 3) el azar participa del proceso evolutivo como fuente de variabilidad primaria y a través de la deriva génica y 4) la selección natural es la fuerza evolutiva predominante que explica la historia de los organismos vivos (Futuyma 1997, Folguera y Lipko 2007). Estas fueron propuestas con el fin de explicar la historia y dinámica de las poblaciones en el tiempo y la especiación (Folguera y Lipko 2007).

Hacia la década de 1950, el neodarwinismo se consolidó como un cuerpo teórico compacto, enriquecido por los conceptos más modernos de la biología. La anatomía comparada, la embriología, la sistemática y la paleontología sumaron evidencias que

permitieron consolidar los postulados darwinistas. Los principales representantes de la síntesis fueron el genetista T. Dobzhansky, el zoólogo E. Mayr, el paleontólogo G. Simpson y el botánico G. L. Stebbins, todos ellos de Estados Unidos y el zoólogo inglés J. Huxley. El núcleo central de la Teoría Sintética es la adaptación. Toda la variabilidad biológica fue interpretada a la luz de este concepto: las variantes genéticas que existen en la naturaleza están allí porque son ventajosas en términos adaptativos; surgieron al azar por mutaciones ocurridas en el material genético pero sobrevivieron y se hicieron frecuentes gracias a la selección natural (Futuyma 1997).

Durante la segunda mitad del siglo pasado, la TSE fue aceptada por la mayor parte de los biólogos y las controversias se limitaron a cuestiones de detalle. Sin embargo, en aquellos tiempos la visión predominante era diferente a la que asume la genética de poblaciones. En efecto, se consideraba que la unidad de los procesos evolutivos eran los organismos individuales pues eran los únicos que tenían existencia real, en tanto que las entidades supraindividuales, como las poblaciones o las especies, sólo serían construcciones conceptuales carentes de la misma. Sin embargo, los individuos no pueden ser las unidades de la evolución porque, además de ser efímeros, su genotipo no experimenta cambio evolutivo ya que permanece inalterado durante su vida. Las poblaciones en cambio constituyen un sistema que tiene continuidad biológica, espacial y temporal ya que el conjunto de sus genes o “reservorio genético” se trasmite de generación en generación. Así, la población como unidad evolutiva constituye un sistema con características propias. Por ejemplo: la tasa de crecimiento, la tasa de natalidad, la tasa de mortalidad, los niveles de variabilidad genética, la densidad, las relaciones ecológicas son algunos de los atributos de la población como entidad, que no resultan de la suma de las propiedades de los organismos individuales sino que son un atributo del sistema como un todo e influyen decisivamente en su destino evolutivo (Futuyma 1998).

1.1.2 La Especiación

Responder el interrogante de ¿Qué es una especie?, sería deseable antes de abocarnos a investigar el/los proceso/s de formación de las especies. Sin embargo, existen muchas definiciones de especie como lo revela un vistazo general a la literatura evolutiva, cada una de las cuales refleja las diversas problemáticas que abordan las diferentes disciplinas. En consecuencia, un concepto de especie sólo puede ser evaluado en términos de una meta o un propósito particular (Templeton 1989).

En esta tesis usaremos el concepto biológico de especie que Mayr (1942) definió como “grupos de poblaciones naturales actuales o potencialmente capaces de intercambio reproductivo que se encuentran aisladas reproductivamente de otros grupos similares”. De forma similar, Dobzhansky (1935) afirmó que “Las especies son sistemas de poblaciones: el intercambio genético entre estos sistemas se encuentra limitado o impedido por un mecanismo de aislamiento reproductivo o quizás por una combinación de varios de estos mecanismos”. Como White (1978) ha subrayado, bajo esta concepción aislacionista la especie “es al mismo tiempo una comunidad reproductiva, un pool de genes, y un sistema genético” (Templeton 1982, 1989).

Como hemos mencionado la teoría de la evolución da cuenta de la historia de la biodiversidad en nuestro planeta y según esta teoría todos los seres vivos descendemos de una forma ancestral común, y la explicación de cómo esto ha sucedido implica mecanismos como la selección natural, la mutación, la deriva y la migración, (Futuyma 1998, Mayr 1982). En este sentido, la evolución es frecuentemente dividida en anagénesis, (evolución dentro de una línea filética), y cladogénesis (división de una línea filética en dos o más líneas). El rasgo más importante de la evolución anagénica es la adaptación: esto es, el proceso por el cual una población adquiere rasgos peculiares que tienden a potenciar la supervivencia, el éxito reproductivo y/o la fertilidad con respecto a un ambiente en particular (Templeton 1982, 2006). A su vez para que ocurra cladogénesis o especiación es necesario, en el caso de los organismos de reproducción sexual, el desarrollo de algún tipo de mecanismo de aislamiento reproductivo. Tradicionalmente, se han postulado tres contextos geográficos en los que puede tener lugar la especiación. Primero, cuando la nueva especie evoluciona en un rango geográfico contiguo a la especie ancestral, la especiación se denomina parapátrica (Fig. 1.1.a); bajo este modelo las nuevas especies mantienen una distribución continua separada por una zona ecotonal que implica un abrupto cambio ambiental y la adaptación a las condiciones ambientales en un lado o el otro del ambiente propiciaría la divergencia de los linajes. Segundo, cuando una nueva especie evoluciona dentro del rango geográfico de su ancestro el proceso se denomina especiación simpátrica (Fig. 1.1.b). Este tipo de especiación está asociada a un modo particular de selección natural denominada disruptiva o diversificadora. Tercero, cuando las nuevas especies evolucionan en áreas disyuntas, aisladas geográficamente se dice que la especiación es alopátrica (Fig. 1.1.c). Esta está relacionada con la interrupción del flujo génico propiciada por una barrera física lo cual permitirá la divergencia gradual entre las

poblaciones y la posible aparición de barreras al flujo génico como una consecuencia de la divergencia debida a mutación, deriva génica y/o selección natural que conduce a la adaptación a las condiciones ambientales locales. Si, posteriormente, la barrera geográfica desaparece, las poblaciones diferenciadas podrían expandirse hasta generar una zona de contacto secundario o incluso una amplia zona de superposición. Si el aislamiento reproductivo fuera completo, la selección natural podría incrementar la diferenciación en el uso del hábitat para evitar la competencia. Si, alternativamente, el aislamiento reproductivo alcanzado es incompleto, y si además la adecuación biológica de los híbridos es menor a la de los progenitores, la selección natural podría favorecer el desarrollo de mecanismos de aislamiento reproductivo completando el proceso de especiación (Templeton 2006).

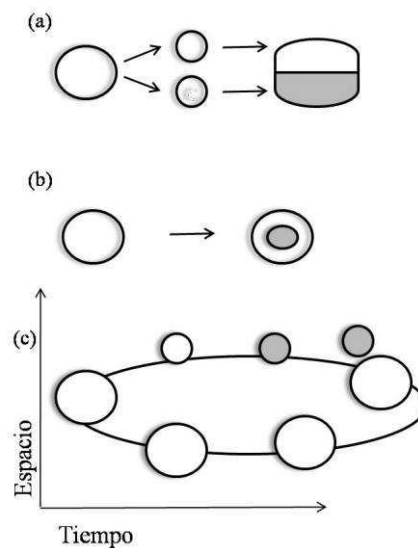


Figura 1.1: Esquema de tipos de especiación geográfica. (a) Especiación parapátrida, (b) Especiación simpátrida y (c) Especiación alopátrida.

1.1.3 La Estructura genético poblacional

La estructura genético poblacional de una especie es el resultado de los procesos microevolutivos y demográficos que actúan entre y dentro de las poblaciones, así como de la biogeografía histórica de los linajes genéticos (Wenink et al. 1996, Templeton 2006). Por tanto, examinar las variaciones entre las poblaciones puede revelar sus asociaciones históricas y los procesos de reestructuración genética que pueden conducir a la especiación (Kirchman et al. 2000, Templeton 2006). Se han realizado numerosos estudios en toda clase de organismos sobre la variación geográfica que han podido revelar los mecanismos históricos y ecológicos de la distribución de muchas especies (e.g.

Kirchman et al. 2000, Templeton 2006), por lo que comprender los patrones de variación geográfica es el primer paso para inferir los procesos evolutivos de poblaciones naturales (Zink y Remsen, 1986)

1.1.4 La Filogeografía

La filogeografía como disciplina surgió a raíz de los estudios de variación genética realizados con enzimas, RAPDs, RFLPs, y el ADNmitocondrial como molécula informática por excelencia para el análisis filogenético y la genética de poblaciones. La filogeografía es una disciplina integradora que utiliza los marcos teóricos de la genética de poblaciones, de la genética molecular, la filogenia, la demografía y la geografía histórica (Avice 1987, 2000). Por tanto, es el campo de estudio que se ocupa de los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos, a nivel intraespecífico, o entre especies cercanamente relacionadas (Avice 1987, 2000, 2009). Los patrones actuales de distribución geográfica y de la variación genética poblacional son el resultado de eventos históricos (la vicarianza o migración), o de eventos recurrentes (flujo génico y la variación del ambiente como recurso) (Avice et al. 1987, Slatkin 1994). Entonces dado que cada evento responsable de la diferenciación habría generado una huella genética (patrones filogeográficos particulares) (Templeton 1997, Avice 2000, Templeton 2006), el estudio de los patrones de variación geográfica en poblaciones naturales de especies cercanamente emparentadas permite comprender los procesos que han operado durante la cladogénesis, inferir la distribución ancestral de una especie, establecer el grado de estructuración y explicar la co-ocurrencia espacial de distintos morfotipos de una misma especie.

La filogeografía desarrolla tres hipótesis básicas (Crisci et al. 2000), las cuales se describen a continuación:

Hipótesis 1: La mayoría de las especies incluyen poblaciones geográficas, que ocupan distintas ramas de un árbol genealógico intraespecífico.

Hipótesis 2: Las especies que no exhiben una estructura genealógica correlacionada con su distribución geográfica han ocupado áreas libres de barreras al flujo génico y han experimentado un intenso flujo génico producto de la dispersión entre poblaciones.

Hipótesis 3: Los grupos monofiléticos intraespecíficos que se distinguen por grandes separaciones filogenéticas, se originan debido a la presencia de barreras extrínsecas (biogeográficas) al flujo génico de largo plazo.

De las anteriores hipótesis se desprenden los siguientes corolarios:

Corolario 1: Si un mismo gen se analiza desde dos perspectivas distintas (sitios de restricción y secuenciación por ejemplo) debe existir concordancia entre las genealogías intraespecíficas obtenidas.

Corolario 2: Si se analizan distintos genes de una misma especie independientemente se debe hallar concordancia entre las genealogías intraespecíficas obtenidas a partir de cada marcador.

Corolario 3: Debe existir concordancia en cuanto a las relaciones entre las áreas y las filogenias intraespecíficas de especies que exhiben el mismo rango de distribución geográfica.

Corolario 4: Debe existir concordancia entre las distribuciones geográficas de los linajes de las filogenias intraespecíficas y las provincias biogeográficas tradicionalmente reconocidas o que se han definido en función de información independiente.

La filogeografía como disciplina integradora adopta metodologías, por un lado, de la filogenética y la cladística y por otro de la biogeografía. Estas disciplinas adoptan los métodos de reconstrucción y el lenguaje para describir la topología de los árboles filogenéticos y las relaciones entre organismos; mientras que de la biogeografía toma escenarios hipotéticos como la dispersión y la vicariancia, sobre los que se construyen modelos nulos. Para la filogeografía ha sido fundamental el desarrollo de teorías matemáticas y estadísticas que se refieran a los procesos de bifurcación (o coalescencia, en sentido cronológico opuesto) y del arreglo de linajes (lineage sorting) que suceden en las genealogías génicas de marcadores neutrales dentro de y entre especies cercanamente emparentadas, teoría conocida como “el coalescente” o “coalescencia de linajes (Kigman 1982, Hudson 1986).

Avise (1987) ha diseñado 5 categorías filogeográficas en base a datos empíricos, a saber (Fig. 1.2)

Categoría de tipo I: refiere a aquellos árboles en los que hay bifurcaciones profundas resultado de grandes distancias mutacionales que se han originado en alopatria. Esta

categoría se asocia frecuentemente con la existencia de barreras extrínsecas de largo término (Fig. 1.2).

Categoría de tipo II: se caracteriza por un árbol génico con bifurcaciones profundas en algunas de sus ramas cuyos linajes principales son simpátricos a lo largo de una amplia área geográfica. Hay diferentes escenarios hipotéticos que podrían dar lugar a este patrón filogeográfico; sin embargo, en la mayoría de los casos documentados, la evidencia apunta hacia una zona de contacto secundario y mezcla de linajes que divergieron históricamente en alopatría (Fig. 1.2).

Categoría de tipo III: se manifiesta en un árbol con pequeñas divergencias entre linajes que históricamente experimentaron procesos de divergencia en alopatría. Se refiere a poblaciones que han mantenido un contacto reciente entre grupos inicialmente alopátricos que sufrieron los efectos de la divergencia genética por el efecto de la deriva génica al azar y el arreglo de linajes, o bien por selección natural. Esto implica que las poblaciones deben de haber mantenido un bajo flujo genético relativo a su tamaño efectivo poblacional para permitir la divergencia entre poblaciones (Fig. 1.2).

Categoría de tipo IV: se caracteriza por una genealogía con linajes simpátricos. Este patrón corresponde a especies con altos niveles de flujo genético y tamaños efectivos poblacionales moderados o pequeños, cuyas poblaciones no han sido divididas por barreras filogeográficas de largo plazo (Fig. 1.2).

Categoría de tipo V: intermedia entre la de tipo III y la de tipo IV, se caracteriza por genealogías en las que existen linajes comunes ampliamente distribuidos junto con linajes cercanamente relacionados que son exclusivos (“privados”) de localidades cercanas. Este patrón se asocia a niveles modestos de flujo genético actual entre poblaciones que han estado históricamente conectadas. Aquí, los haplotipos comunes suelen ser los ancestrales mientras que los exclusivos (privados) se suponen derivados y apomórficos (Fig. 1.2).

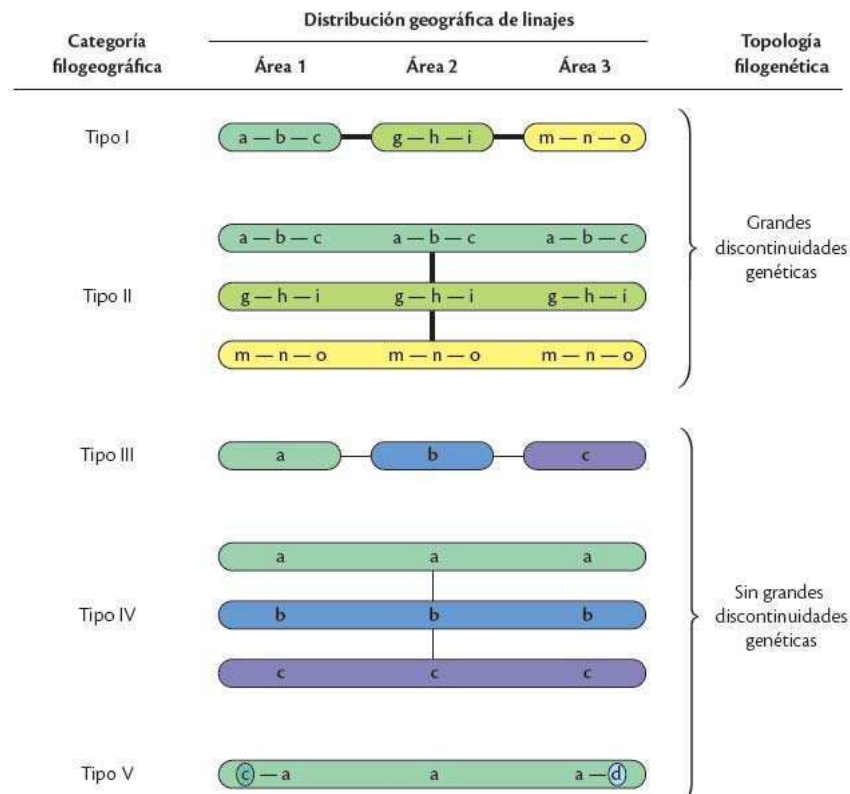


Figura 1.2: Categorías filogeográficas basadas en la distribución geográfica de linajes filogenéticos y sus niveles de divergencia genética. Las grandes discontinuidades están representadas por líneas gruesas. El nivel de similitud genética entre linajes está codificado por la similitud en colores (Modificado de Avise 2000).

Un abordaje filogeográfico presenta un enfoque de la historia en la especie basada principalmente en la biogeografía (Crisci 2000). En cada generación t cada individuo tiene un número aleatorio de descendientes (mayor o igual a 0) en la generación $t+1$. La inferencia filogeográfica se fundamenta en la Teoría de la Coalescencia que, a su vez, provee el marco matemático para estudiar las genealogías de genes o árboles de genes. En este marco la estructura de la variación hereditaria de una población se puede pensar como la superposición de dos procesos aleatorios: el coalescente y la mutación. El modelo poblacional subyacente a esta teoría es el de Wright-Fisher (1930) que modela la evolución de un locus en el cual la variación es neutra (los alelos afectan el fitness de los portadores de manera casi idéntica) en una población de tamaño constante con generaciones discretas en la que el apareamiento es al azar. Además, en cada generación cada individuo tiene un número aleatorio de descendientes (≥ 0) los cuales tienen una probabilidad $1-\mu$ de ser idénticos al padre y una probabilidad μ de ser portadores de una mutación. En la medida que recorremos la genealogía en forma retrospectiva (desde el presente hacia el pasado) los eventos de coalescencia conducen a la reducción de ramas

del árbol, es decir de ancestros (Fig. 3). Eventualmente, quedará un solo ancestro que se denomina Ancestro Común Más Reciente de la población (ACMR o Most Recent Common Ancestor). Es decir que a medida que recorremos las ramas del árbol hacia el pasado, tarde o temprano, encontraremos el ancestro común más reciente entre dos alelos cualesquiera. Asimismo, si en cada linaje ocurren mutaciones a una tasa μ por generación, entonces para dos alelos que compartieron un ancestro común t_{CA} generaciones en el pasado se habrán acumulado $\mu \times t_{CA}$ mutaciones en cada linaje. Esto implica que el número de diferencias entre dos alelos cualesquiera a nivel de la secuencia de nucleótidos es función del tiempo que ha transcurrido desde que los mismos compartieron el último ancestro común siempre y cuando sean válidos los supuestos del modelo de Wright-Fisher acerca de la neutralidad de las mutaciones y de la constancia del tamaño efectivo de la población. El tiempo de coalescencia es el período, medido en el número de generaciones que transcurre desde la generación actual hasta llegar al ACMR y se aproxima a $4 N_e$ a medida que el tamaño muestral se acerca al N_e (Fig. 1.3). Este proceso es genealógico y en su versión más sencilla supone ausencia de recombinación, selección, cambios en el tamaño efectivo y estructuración poblacional. El proceso de coalescencia genera un árbol que, con el agregado de las mutaciones, permite relacionar los patrones de ancestralidad con los de variabilidad genética (Kingman 1982, Hudson 1990). Si hay alelos que no son neutros los diferentes tipos de selección dejan huellas particulares en los árboles de genes. Por ejemplo, la Selección Natural (SN) positiva que conduce a la fijación de la variación neutra ligada tiene como efecto neto una disminución del N_e (tamaño efectivo histórico poblacional) y por lo tanto acorta la longitud del árbol relativo a un árbol producido con un gen cuya variación es neutra. Sin embargo, la huella que deja una fijación selectiva es muy similar a la que deja un incremento reciente del tamaño poblacional. A su vez la selección equilibradora tiende a preservar alelos por un tiempo mayor al tiempo promedio en que se mantienen alelos neutros, de modo que la huella que deja un polimorfismo protegido por la selección natural sobre la variación neutra es un incremento de la variación. Nuevamente debemos señalar que eventos demográficos pueden mimetizar los efectos de la selección, que en el caso de la selección equilibradora es el contacto secundario de poblaciones divergentes.

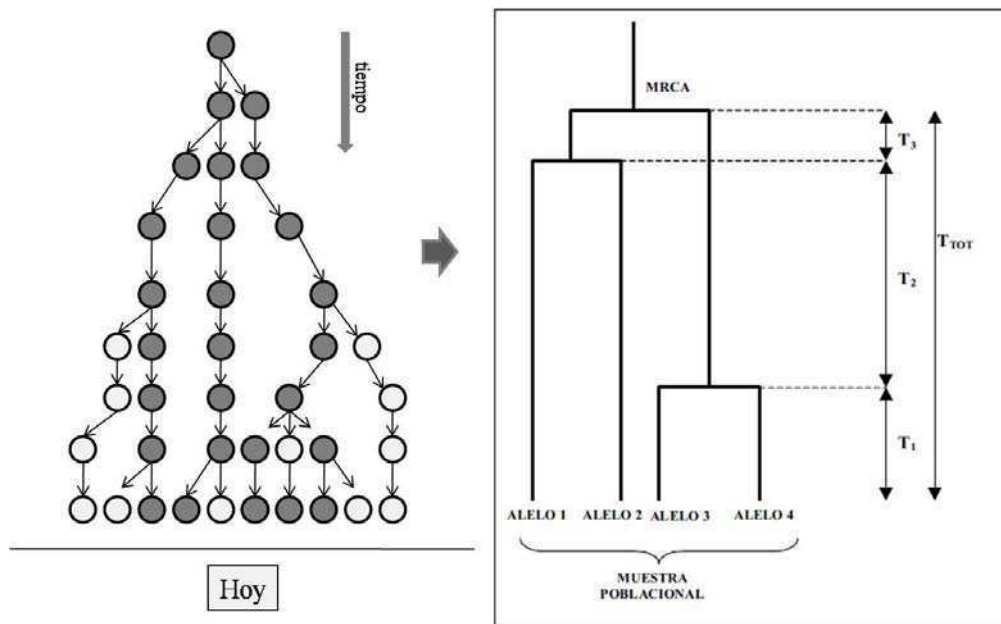


Figura 1.3: Representación gráfica de un proceso de coalescencia. Izquierda: MRCA y todos sus descendientes. Los círculos negros representan 4 alelos de una población. Derecha: Linaje de la muestra de alelos. T_n son las generaciones hacia atrás en el tiempo que hay que recorrer hasta que dos linajes confluyan. T_{TOT} es el tiempo total de coalescencia, el cual se aproxima al valor $4N_e$.

El vínculo entre la teoría neutralista y la coalescencia es que en principio se asume que las mutaciones son neutras, aunque existen diferentes modelos mutacionales que se pueden simular en los procesos de coalescencia. El modelo más utilizado se denomina modelo de sitios infinitos, que implica que las mutaciones ocurren en sitios donde no ocurrieron mutaciones previas. Bajo este modelo la distribución de las mutaciones en el árbol durante t generaciones es aleatoria y sigue una distribución de Poisson. En el proceso de coalescencia existen dos fuentes de aleatoriedad: 1- la varianza en el tiempo de coalescencia y 2- la varianza en el proceso mutacional (Hudson 1990, Kingman 1982). Con el proceso de coalescencia se pueden hacer predicciones respecto a la variabilidad esperada en una muestra de secuencias. El número de diferencias que se espera encontrar entre dos alelos tomados al azar de una población es igual a dos veces el número de mutaciones que ocurrieron en una rama durante el tiempo de coalescencia de esos dos alelos, y esto equivale a $4N_e\mu$ (Kingman 1982, Hudson 1990).

Los modelos de coalescencia son útiles para el análisis de datos moleculares, puesto aportan herramientas matemáticas para estimar parámetros poblaciones (como ser tasas de migración y de mutación), para desarrollar pruebas estadísticas relacionadas con los modelos de evolución de las secuencias de ADN, para analizar el ajuste de los datos a escenarios evolutivos particulares, y para investigar simultáneamente los efectos de

diferentes fuerzas evolutivas actuando sobre la variabilidad (Aris-Brosou y Excoffier 1996, Nordborg y Innan 2003).

1.2 Modelo de Estudio

1.2.1 Historia evolutiva y taxonomía de los drosofilidos cactofílicos de América del sur

El Orden Diptera (insectos con dos un par de alas membranosas y un par de alas modificado) es uno de los grupos más diversos dentro del Dominio Eucaria. Hasta el momento se han descrito más de 150.000 mil especies de dípteros. Estos a su vez, son parte de un linaje antiguo que, según la evidencia fósil y molecular, se remonta al Paleozoico tardío (Krzaeminki y Krzamisnska 2003, Bertone y Wiegmann 2009). El orden atravesó al menos 3 radiaciones adaptativas, la última de ellas, en la que se supone dio origen a los linajes actuales, fue a principios del Eoceno (Patterson y Stone 1952, Markow y O'Grady 2006 y Oliveira et al. 2012). Estas radiaciones se relacionan con el establecimiento de nuevas asociaciones ecológicas entre los distintos grupos de dípteros y sus plantas hospedadoras.

Género *Drosophila*, grupo *repleta*

El género *Drosophila* cuenta con más de 2000 especies descritas cuyas distribuciones van desde especies endémicas a cosmopolitas (Markow y O'Grady 2006). Actualmente el género está subdividido en 10 subgéneros (Heed y Mangan 1989) de los cuales los subgéneros *Drosophila* y *Sophophora* incluyen el 90% de la diversidad total. Dentro del subgénero *Drosophila*, el grupo de *repleta* es de los más grandes incluyendo cerca de 100 especies (Baechli 2005). Las especies de este grupo han servido como modelos de estudios ecológicos y evolutivos por décadas (East et al. 1982; Barker et al. 1985, Knibb y Barker 1988, Barker et al. 2002, 2011 y Pfeiler y Markow 2011).

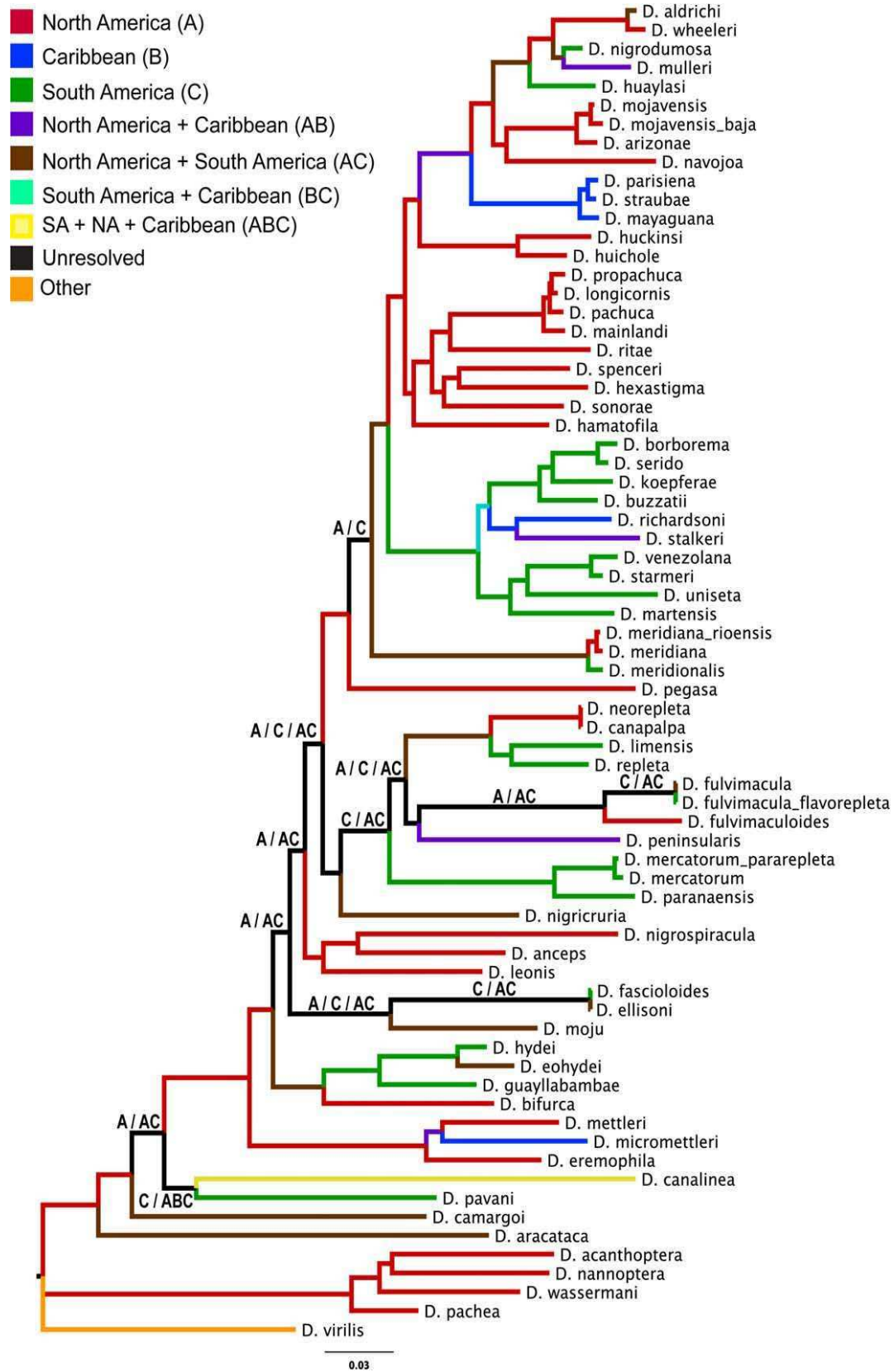
Grupo *repleta*, complejo *buzzatii*

Las relaciones filogenéticas en el grupo *repleta* se han estudiado analizando los patrones de bandas que se observan en los cromosomas gigantes de las glándulas salivales, conocidos como cromosomas politénicos (Ruiz et al. 1982, O'Grady et al. 2001, Markow et al. 2006). La filogenia del grupo incluye los principales subgrupos del grupo *repleta* y

la utilización de información molecular de tres loci génicos permitió definir las relaciones entre los taxa derivados (Durando et al. 2000, Oliveira et al. 2012). En esta filogenia los complejos mulleri y buzzatii aparecen como grupos monofiléticos hermanos. Otros complejos y subgrupos como hydei, mercatorum y meridiana también son monofiléticos, aunque las relaciones dentro de ellos, por el momento, no pueden definirse inequívocamente (Fig. 1.4 4). El complejo buzzatii está formado por los clusters: stalker, martensis y buzzatii. Las relaciones entre ellos se establecieron mediante la comparación del patrón de bandas de los cromosomas politénicos. En particular, las especies del complejo buzzatii se diferencian citológicamente por inversiones cromosómicas fijadas respecto del ordenamiento de bandas de una forma hipotética ancestral denominada PRIMITIVO I (Ruiz y Wasserman 1993).

Las drosófilas cactófilas de América se han estudiado exhaustivamente particularmente en 3 regiones: 1- en Norteamérica, donde el sistema moscas-cactus habita el desierto de Sonora (Heed y Mangan 1986), 2- en las tierras áridas del norte de Venezuela y Colombia donde habitan las especies del cluster martensis y las islas del Caribe donde se encuentran las especies del cluster stalker (Benado y Montero 1988, Ruiz y Wasserman 1993) y 3- las áreas desérticas de Argentina y Brasil donde habitan las especies del cluster buzzatii (Hasson et al. 1992, Manfrin y Sene 2006 Hasson et al. 2009).

Figura 1.4. Relaciones filogenéticas entre las especies del grupo repleta (Oliveira 2012).



Cluster buzzatii

Drosophila buzzatii (Patterson y Wheeler 1942, Sturtevant et al. 1942), *D. serido* (Vilela y Sene 1977), y *D. borborema* eran, hasta 1988, las únicas especies reconocidas del cluster *buzzatii* (Vilela y Sene, 1977, Wasserman 1982). Estudios posteriores utilizando cromosomas politénicos (Ruiz et al. 1982, Tosi y Sene 1989), el cariotipo metafásico (Baimai et al. 1983), la morfología de la genitalia masculina (Fontdevila et al. 1988, Silva y Sene 1991) y el aislamiento reproductivo (Bizzo 1983, Hasson 1988), dieron evidencias de que *D. serido* era, en realidad, una especie politípica o superespecie (Sene et al. 1988). Posteriormente, los diferentes morfotipos de *D. serido* fueron elevados a la categoría de especie como *D. koepferae* (Fontdevila et al. 1988), *D. seriema* (Tidon-Sklorz y Sene 1995), *D. gouveai* (Tidon-Sklorz y Sene 2001) y *D. antonietae* (Tidon-Sklorz y Sene, 2001). Estas junto a *D. serido* y *D. borborema* (Vilela y Sene, 1977) conforman el “*D. serido* sibling set” (Manfrin y Sene 2006, Tidon-Sklorz y Sene 2001).

Las especies que forman el cluster *buzzatii* son morfológicamente muy similares entre sí, pero se pueden diferenciar inequívocamente mediante el análisis de la genitalia del macho (específicamente el aedeagus que es el órgano intromitente) puesto que tienen formas y tamaños característicos (Vilela y Sene 1977). A su vez, las evidencias que aportan los datos moleculares, cromosómicos y morfológicos hasta la fecha son contradictorias, por lo cual las relaciones filogenéticas dentro del cluster *buzzatii* aún no han sido completamente dilucidadas Fig. 1.5 (Manfrin y Sene 2006). El consenso general supone la posición basal de *D. buzzatii* y se discute si *D. koepferae* debe ser considerada la especie hermana de ésta o, por el contrario, como la especie más basal del *serido* sibling set. La morfología externa y los estudios de ADN mitocondrial apoyan la primer hipótesis (Fontdevila et al. 1988, Manfrin et al. 2001), en tanto que el análisis de la morfología del aedeago apoya la segunda (Silva y Sene 1991)

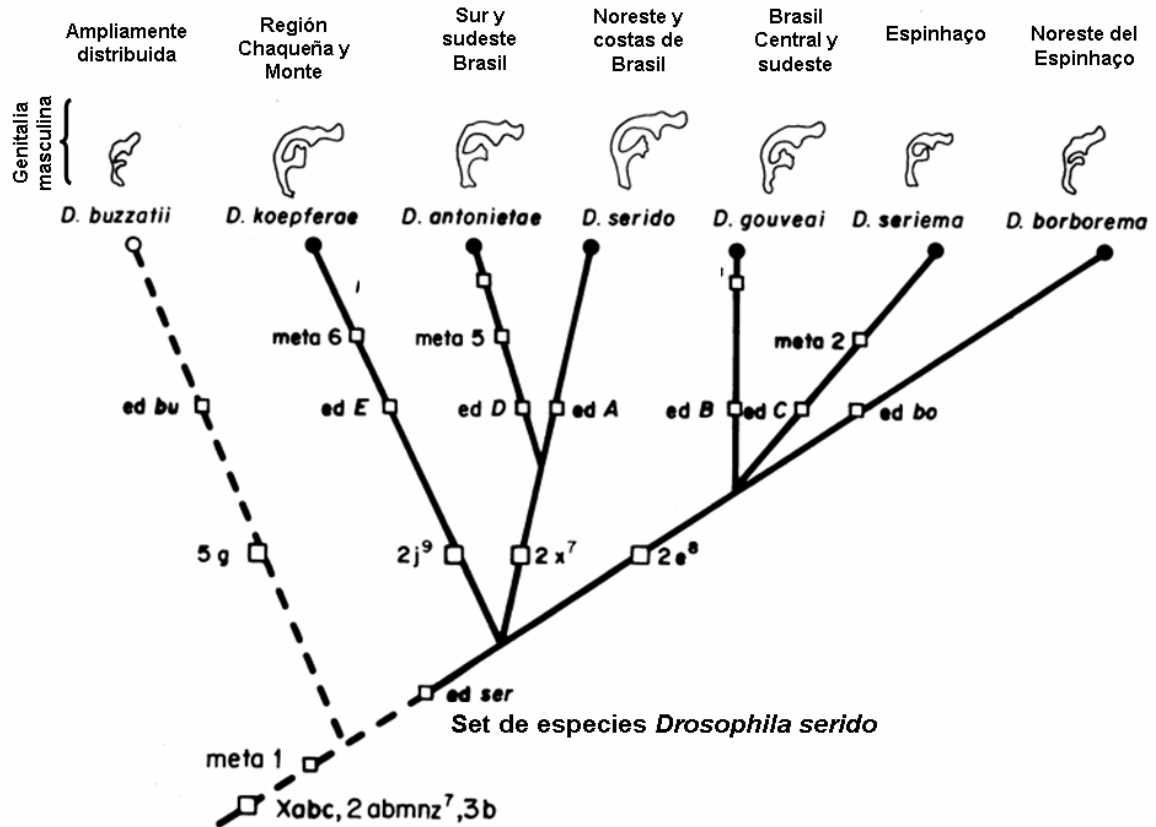


Figura 1.4: Árbol filogenético del cluster buzzatii basado principalmente en inversiones cromosómicas. **ed A–E:** morfotipos de aedeagos (genitalia masculina) según Silva y Sene (1991). **bu:** *D. buzzatii*; **bo:** *D. borborema*; **meta:** tipos de cromosomas metafásicos según (Baimai et al., 1983). La línea llena indica las relaciones de las especies incluidas dentro del grupo denominado “sibling set de *D. serido*” (Tidon-Sklorz y Sene 1995). Sobre los nombres de las especies se ilustran los contornos de los aedeagos y se indica la distribución geográfica en Sudamérica. (Figura modificada de Manfrin y Sene 2006).

Todas las especies del cluster buzzatii (Ruiz y Wasserman, 1993), son endémicas de América del Sur (Fig. 1.6), con excepción de *Drosophila buzzatii* que tiene un rango de distribución más amplio, en el siglo XIX y durante la primera mitad del siglo pasado ha extendido su distribución al Viejo Mundo y Australia siguiendo pasivamente a sus hospedadores naturales: las tunas o peras espinosas, del género *Opuntia* (Fontdevila et al. 1989, Hasson et al. 1992, Fanara et al. 1999, Hasson et al. 2009) (Fig. 1.5, Manfrin y Sene 2006). La asociación que muestran las especies del cluster buzzatii con las cactáceas tiene al menos dos consecuencias: la primera es que la actual distribución de las poblaciones está determinada por la presencia de cactáceas y la segunda, es que la divergencia dentro del cluster podría estar relacionada con la expansión y retracción de

la vegetación xerofítica de las comunidades abiertas en Sudamérica durante el cambio climático promovido por los períodos glaciares (Manfrin y Sene 2006).

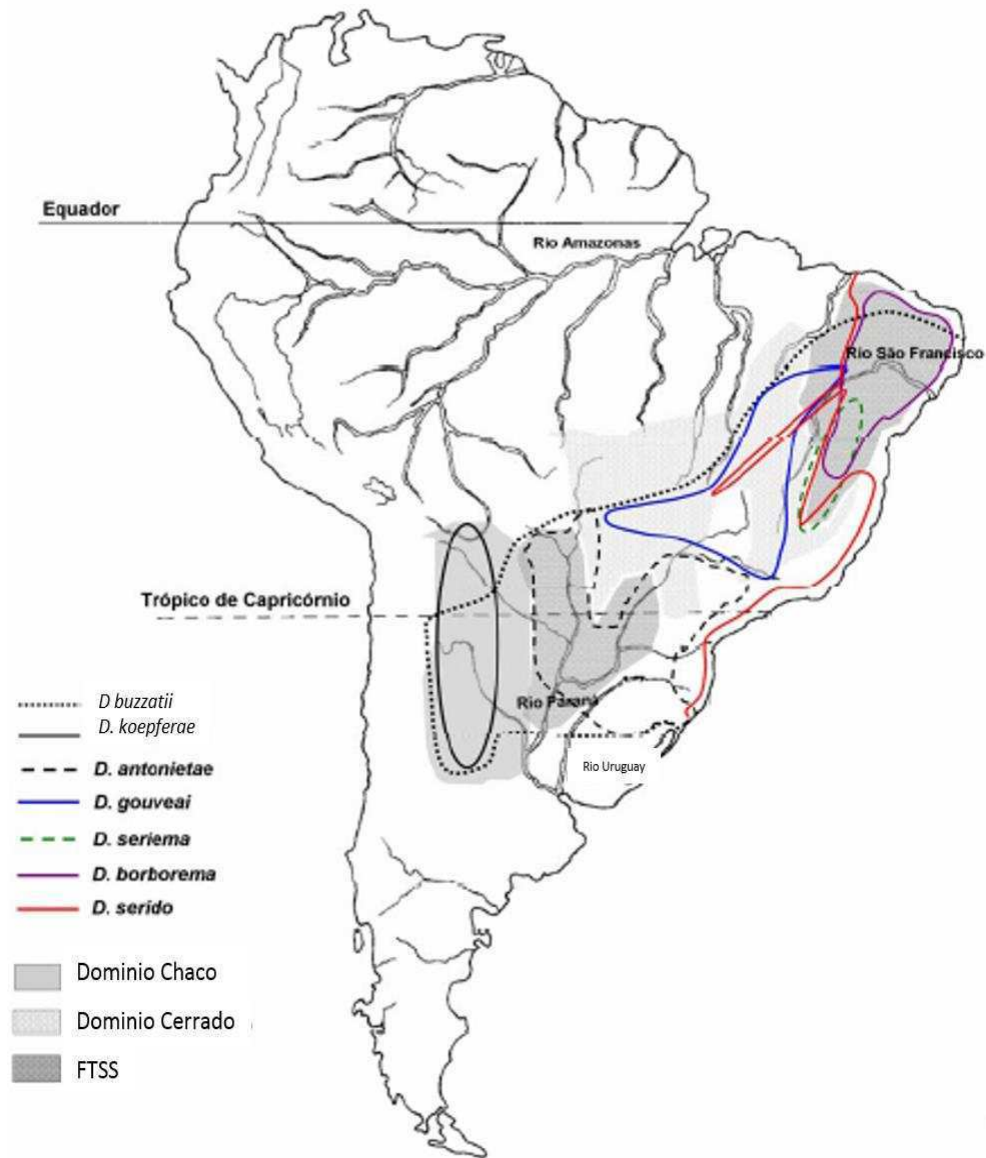


Figura 1.5: Distribución geográfica del “cluster” *Drosophila buzzatii* en America del Sur y los dominios de Chaco, Cerrado y la Selva Tropical estacionalmente seca (FTSS) (Franco 2009).

El cluster *buzzatii* tiene algunas características que lo hacen ideal como modelo biológico para estudios evolutivos. Es un grupo monofilético, lo cual es fundamental para estudios comparativos que aborden la evolución de caracteres (Oliveira et al. 2012). Se conoce acerca de su genética, su ecología y su biogeografía (Manfrin y Sene 2006, Hasson et al. 2009). Si bien es un grupo diverso, la cantidad de especies que lo componen no es grande, lo cual permite exhaustivos estudios intra- e interespecíficos. El modelo ofrece

además la posibilidad de investigar las bases genéticas de la divergencia tanto a nivel morfológico, por ejemplo de caracteres relacionados con el tamaño corporal (Carreira et al. 2006, Soto I. et al. 2008) como a nivel de caracteres de importancia adaptativa como el tiempo de desarrollo (Soto I. et al. 2008) e incluso cambios a nivel de estructuras que podrían implicar barreras al flujo génico como la morfología de la genitalia masculina (aedeagus, Soto I. et al. 2007). Este grupo constituye un modelo ideal para estudios de evolución de caracteres de historia de la vida, puesto que las especies están adaptadas a diferentes tipos de plantas hospedadoras que representan ambientes contrastantes (Hasson et al. 1995, Fanara et al. 1999). Su nicho trófico y reproductivo está limitado a los tejidos de cactáceas en descomposición, lo cual permite localizar y delimitar las poblaciones en los ambientes naturales. Además, está constituido por especies que se encuentran en diferentes etapas de divergencia, y por tanto, permiten investigar los eventos más tempranos y tardíos de la especiación (Manfrin y Sene 2006).

Drosophila koepferae* y *Drosophila buzzatii

Drosophila koepferae y *D. buzzatii* son especies crípticas ya que no es posible distinguirlas en base a un análisis de su morfología externa. El análisis morfológico del aedeagus es criterio suficiente y único para su reconocimiento (Vilela 1983), en tanto que las hembras no pueden distinguirse entre sí. Una primera instancia de aislamiento ecológico entre estas dos especies de drosófilidos está dada por la utilización diferencial de los recursos de cría y alimentación (Fanara et al. 1999). Estudios en localidades donde coexisten ambas especies y se encuentran presentes dos tipos diferentes de hospedadores han mostrado que *D. buzzatii* mayormente utiliza tunas mientras que *D. koepferae* se cría y alimenta en mayor medida en cactáceas columnares (Hasson et al. 1992). Otros estudios indican que el comportamiento de oviposición diferencial podría ser otro de los factores que contribuirían al aislamiento ecológico (Fanara et al. 1999, Fanara y Hasson 2001, Soto I. et al. 2012). Además, ambas especies se encuentran reproductivamente aisladas por la inviabilidad parcial de las cigotas híbridas (mortalidad de huevo), la esterilidad de los machos híbridos (Naveira y Fontdevila 1986, Hasson 1988, Marin et al. 1993, Marin y Fontdevila 1993, Fanara et al. 1999) y la inviabilidad parcial de los híbridos (Soto I. et al. 2008). Según estudios recientes, *D. buzzatii* y *D. koepferae* divergieron hace aproximadamente 3 a 4 millones de años (Oliveira et al. 2012). Ambas especies parecen haberse originado en las zonas semiáridas o áridas del sur de América

del Sur y forman parte de un grupo de especies adaptadas a vivir en condiciones hostiles para otras especies del género. Actualmente *D. buzzatii* y *D. koepferae* presentan una distribución parcialmente superpuesta en las zonas áridas de Argentina (Fontdevila 1989, Hasson et al. 1992, Fanara et al. 1999) (Fig. 1.5). Además, es de destacar que son el par de especies del cluster para las cuales se cuenta con mayor conocimiento acerca de su ecología, particularmente de las cactáceas que sirven como sitios de cría y alimentación (Hasson et al. 1992, Fanara et al. 1999, Fanara et al. 2006, Hasson et al. 2009).

En cuanto a las características genéticas de *Drosophila buzzatii*, se ha encontrado el mismo cariotipo metafásico para las poblaciones de Argentina y Brasil (Baiman, 1983 en Manfrin y Sene 2006). Además, estudios alozímicos muestran que genéticamente las mayorías de las poblaciones de ambos países son similares, sin embargo hay dos excepciones a estos patrones de similitud. La primera corresponde a una población del noreste de Brasil que resultó monomórfica para un locus, siendo el resto de las poblaciones polimórficas para el mismo. La segunda excepción se encontró en una población en la costa sureste de Brasil, la cual es polimórfica para 3 loci que son monomórficos en el resto de las poblaciones estudiadas (Barker 1985 en Manfrin 2006). A su vez, las poblaciones del Dominio Chaqueño son citológicamente altamente polimórficas, 16 inversiones cromosómicas se encuentran segregando en esta área (Ruiz, 1984 en Manfrin, 2006), de las cuales sólo dos están presentes en las poblaciones brasileras (Barker 1985). Esta información apoya la hipótesis de que *D. buzzatii* se habría originado en lo que hoy es el Chaco Argentino y que posteriormente se habría expandido hacia el noroeste y el noreste (Carson 1965 en Manfrin 2006). Sin embargo, esta hipótesis ha sido revisada recientemente por Santos (2011) quien postula que el genocentro de *D. buzzatii* sería lo que hoy es el Dominio de Caatinga en Brasil.

Con respecto a las características genéticas de *Drosophila koepferae* no es mucha la información con la que se cuenta; entre otros motivos porque es más difícil de mantener en condiciones de laboratorio que su especie gemela *D. buzzatii*. Sin embargo, se sabe que esta especie presenta la inversión cromosómica $2j^9$ fijada (Wasserman 1987 en Manfrin 2006) y el morfo-citológico denominado cariotipo VI (Baimai et al. 1983). Los estudios de estructura poblacional en *D. koepferae* se han realizado en base al análisis de las inversiones cromosómicas y de la variación aloenzimática: los valores de distancia genética sugieren una incipiente diferenciación entre las poblaciones de Bolivia y Argentina (Fontdevila et al. 1988, Hasson 1988).

Asociación con los sustratos de cría

Las moscas del género *Drosophila* son insectos saprofitófagos que se crían y alimentan de la comunidad microbiana (bacterias, hongos y levaduras) asociada a una gran variedad de recursos (Markow y O'Grady 2008), como flores (Brncic 1983), hongos (Jaenike 1983), frutas (Atkinson y Shorrocks 1977), hojas (Carson 1971), savia (Throckmorton 1975), cactus (Heed 1978), tierra embebida del exudado de necrosis de tejidos de cactus (Heed 1978) y en algunos casos raros hasta cangrejos de tierra (Carson 1974) o huevos de arañas (Hardy 1965).

Las bacterias cumplen un importante papel en la descomposición de los tejidos de algunas plantas, mientras que en la descomposición de tejidos de cactus y frutas las levaduras parecen jugar el rol principal (Atkinson y Shorrocks 1977). El modelo biológico que ofrece el cluster *Drosophila buzzatii* se conoce como el sistema “drosófila-levadura-cactus”. Este modelo involucra diversas variables vinculadas a los cactus, las levaduras y su interacción. Por ejemplo, la composición química del cactus es un determinante fundamental ya que influye sobre el espectro de levaduras y hongos que se desarrollan durante el proceso de descomposición de los tejidos (Manfrin y Sene 2006).

Los recursos tróficos de ambas especies son los tejidos necróticos de varias cactáceas, tanto del género *Opuntia* (tunas) como del tipo columnar de los géneros *Echinopsis* y *Cereus* (Hasson et al. 1992). Los cactus columnares y las tunas parecen representar dos tipos de recursos diferenciados, ya que difieren en varios aspectos relevantes del ciclo de vida de las moscas (Hasson et al. 1992), por ejemplo en su predictibilidad temporal y espacial. Por un lado las necrosis de las tunas son espacialmente más abundantes y, por lo tanto, más predecibles en términos de la probabilidad de encuentro, pero se descomponen con mayor rapidez, constituyendo un recurso efímero para las moscas, lo que las hace temporalmente menos predecibles. Por otro lado, las necrosis de cardones son espacialmente más raras, pero cuando comienzan a descomponerse la biomasa disponible para las moscas suele ser abundante, lo cual los hace espacialmente menos predecibles y temporalmente más predecibles que las tunas (Hasson et al. 1992; Fanara et al. 1999).

En relación a la composición química de cardones y tunas, los primeros presentan una mayor concentración de compuestos potencialmente tóxicos para las moscas (alcaloides y otros compuestos secundarios) que generan un ambiente relativamente estresante durante el desarrollo larval (Hasson et al. 2009, Corio et al. 2010). Por su parte,

las tunas son cactáceas químicamente menos agresivas y no parecen imponer un desafío adaptativo para las moscas que las utilizan, a diferencia de las que se crían en cactáceas químicamente más complejas como los columnares (Ruiz y Heed 1988, Corio et al. 2010).

Estudios previos se han basado principalmente en *Drosophila buzzatii* para intentar discernir su estructura geográfica. Se ha trabajado con alozimas, y genes nucleares (Gomez y Hasson 2000, Piccinali et al. 2004 y 2007) estos trabajos indican que la especie no está estructurada genéticamente. A su vez hay un área de vacancia en cuanto a la estructuración de *D. keopferae*. Por tanto este trabajo de tesis propone comparar la variabilidad de las dos especies, utilizando nuevas poblaciones y estudiar la estructura genética poblacional de ambas especies, un rasgo importante que permite dilucidar la historia evolutiva de estas especies en particular y de las especies en general (Awise 1987, 2000).

1.3 Objetivos

Objetivo general

Investigar los patrones de estructuración genético-poblacional en *Drosophila koepferae* y *Drosophila buzzatii* mediante el uso de marcadores genéticos con el fin de comprender e inferir los mecanismos adaptativos y no adaptativos (demográficos e históricos) que actuaron en las historias evolutivas de estas especies

Objetivos particulares

- Estudiar y caracterizar la variación nucleotídica del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (mtCOI) en poblaciones naturales de *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*.
- Analizar la relación entre la variabilidad genética y la distribución geográfica en un marco filogeográfico.
- Realizar un estudio de la estructura poblacional mediante uso de marcadores microsatélites.
- Realizar un estudio comparativo de la estructura poblacional entre *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*.

CAPÍTULO 2

► La estructura poblacional de *Drosophila koepferae* y *D. buzzatii* en la Argentina según los datos que aporta el marcador Mitocondrial Citocromo Oxidasa I.

Resumen del capítulo

Introducción: Se estudió la estructura genético poblacional en poblaciones naturales de *Drosophila koepferae* y *D. buzzatii* en el norte argentino. Al ser especies que han divergido recientemente (3-4 millones de años) pueden dar indicios de los mecanismos que moldearon su historia evolutiva. Se pusieron a prueba hipótesis de ausencia de estructuración poblacional en *D. buzzatii* y lo contrario en su especie hermana, de acuerdo a lo observado en estudios previos.

Materiales y Métodos: Se amplificaron secuencias de 552pb del gen mtCOI para 14 poblaciones de *Drosophila buzzatii* y para 5 poblaciones de *D. koepferae*. Se analizó de forma comparativa la variabilidad de las secuencias, la distribución de haplotipos, la estructuración poblacional, mediante análisis de varianza, test de correlación, dendogramas y el ajuste a lo esperado bajo modelos de neutralidad.

Resultados: La variabilidad del fragmento analizado es mayor en *Drosophila koepferae* que en *D. buzzatii*. No se encontraron signos significativos de estructuración en *D. buzzatii*, y si leves indicios de estructuración genético poblacional en *D. koepferae*. No se encontró una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica.

Conclusiones: Los niveles de variación observados son consistentes con diferencias en el tamaño efectivo histórico entre ambas especies, y por tanto, diferentes historias evolutivas. Por un lado, *Drosophila buzzatii* exhibió signos de expansión poblacional reciente, mientras que *D. koepferae* no. Estos resultados son consistentes con los informados previamente en la bibliografía y podrían estar mostrando diferencias en la capacidad dispersiva entre especies tal vez vinculada a las particularidades de sus plantas hospedadoras.

2.1 Introducción

Los marcadores moleculares son una herramienta útil y necesaria en diversos campos de la biología como la evolución, la ecología, la bio-medicina, las ciencias forenses y también para realizar estudios de diversidad. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad para detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y pueden ser de tipo dominante o co-dominante (Awise 2000, 2009). Actualmente, algunos marcadores genéticos como microsatélites y secuencias de ADN mitocondrial son ampliamente utilizados para estimar parámetros como la tasa de migración, el flujo génico, el tamaño efectivo poblacional, el parentesco e inferir cuellos de botella, eventos de hibridación interespecífica y la estructura poblacional. Un marcador molecular ideal para estudios filogeográficos debe: 1) poder distinguirse unívocamente y estar ampliamente distribuido en una gran variedad de organismos, para fines comparativos; 2) ser fácil de aislar y de reproducir; 3) tener una estructura genética simple, para facilitar su amplificación, excluyendo pseudogenes o transposones; 4) tener un modo de herencia directo, sin recombinación u otros rearrreglos genéticos. En virtud de estas características, los marcadores moleculares mitocondriales son generalmente utilizados como una primera aproximación al estudio de la estructura poblacional y la filogeografía de las especies (Awise 2000, 2009). El ADN mitocondrial (ADNmt) es especialmente útil para trazar historias filogeográficas y de estructura poblacional estrechamente relacionada al linaje dado que son de herencia uniparental (materna), no recombinan, poseen una alta tasa de evolución que es entre 1 y 10 veces mayor que cualquier gen nuclear de copia simple (Brown y Wright 1975) y, además, existe en copias múltiples dentro de cada célula eucariota lo que facilita su extracción y posterior amplificación por PCR. El hecho de que sus tasas de mutación sean varias veces mayores que las de genes nucleares hace de los marcadores mitocondriales herramientas muy informativas, en particular para estudios intraespecíficos en los que los linajes genéticos han divergido recientemente. La mayoría de las variantes del ADNmt son sustituciones nucleotídicas y son pocos los casos en los que se observan cambios en la longitud de la molécula (por deleciones o inserciones) u otro tipo de reordenamiento. La mayoría de los individuos son homoplásmicos para un ADNmt prevalente (Hey y Machado 2003, Awise 2009). Todas estas particularidades hacen del ADNmt un marcador adecuado que permite inferir cambios demográficos y dispersión (Awise 2000). Si bien existen numerosos estudios genético poblacionales en

especies del género *Drosophila* (Powell 1997, Pritchard et al 2000, Pfeiler y Markow 2011), pocos estudios han tenido en cuenta la relación entre la estructura poblacional, la especiación y aspectos relevantes de la ecología de las moscas de la fruta, como por ejemplo el tipo de recurso en que se crían en la naturaleza. La escasez de este tipo de estudios puede deberse a que la ecología y varios aspectos de la biología poblacional de la mayoría de las especies de *Drosophila*, al menos las que son modelos tradicionales (e.g. *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura* y *D. subobscura*), son aún poco conocidos (Markow y O'Grady 2008, Pfeiler y Markow 2011). En este estudio se eligió el gen que codifica para la subunidad I de la Citocromo Oxidasa I (mtCOI), por ser éste uno de los genes mitocondriales más utilizados en estudios filogeográficos en insectos. El gran número de trabajos publicados aplicando esta metodología permite realizar comparaciones con otras especies (Oliveira et al. 2011, Pfeiler y Markow 2011). Los trabajos previos con mtCOI en *D. buzzatii* indican que es una especie con una alta capacidad dispersiva, sin embargo, no se han realizado estudios exhaustivos al respecto (Rossi et al. 1996, Santos 2011). A su vez poco se sabe de la estructuración poblacional de su especie hermana *D. koepferae* que se ha visto relegada en los trabajos de investigación. Los datos previos indican que estas especies de gran vagilidad poseen a su vez diferencias en diversos caracteres relacionados con sus de historia de vida (tal como se ha enumerado en el capítulo precedente), y en sus preferencias en la oviposición (Soto I et al 2011).

En esta sección, el objetivo fue estimar la variabilidad genética y la estructura poblacional en el par de especies cactófilas *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae* a lo largo de su distribución en la Argentina mediante el análisis de la variación de un fragmento de COI. Los estudios previos con otros marcadores moleculares indican que las poblaciones de *D. buzzatii* no están estructuradas (Rossi et al. 1996, Piccinali et al. 2004, 2007) en tanto que las poblaciones de *D. koepferae* presentaron un cierto grado de estructuración (Piccinali et al. 2004, 2007). Dada las características particulares de estas especies (ver Capítulo 1) y en base a los resultados de trabajos previos, es que nos propusimos poner a prueba las siguientes hipótesis de trabajo:

- 1- Las secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (mtCOI) no evidencian patrones de estructuración poblacional en *Drosophila buzzatii*.
- 2- Las secuencias del gen citocromo oxidasa I (mtCOI) evidencian patrones de estructuración poblacional en *Drosophila koepferae*.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1- Obtención de muestras

Se realizaron muestreos en 18 localidades del noreste y noroeste Argentino entre los años 2007 y 2010. En 14 localidades se colectaron ejemplares de *Drosophila buzzatii* y en 5 de *D. koepferae*. Los períodos de muestreo fueron entre fines de verano (fines de febrero) a otoño temprano (Marzo), que es la época en que es factible colectar muestras más abundantes. Se considera a ambas especies parcialmente simpátricas, dado que la distribución de *D. buzzatii* incluye a la de *D. koepferae*, de manera que lo esperado era encontrar ejemplares de ambas especies en algunas localidades. Si bien el esfuerzo de muestreo y la metodología fue la misma en cada localidad y campaña, sólo se colectaron ambas especies en San Agustín de Valle Fértil (provincia de San Juan) donde *D. buzzatii* y *D. koepferae* se encuentran en proporciones similares (Fanara et al. 2006). De las moscas colectadas en el campo, una muestra aleatoria de las mismas se utilizó para realizar este estudio.

Las capturas de adultos se realizaron utilizando redes entomológicas y trampas con banana fermentada como cebo. En cada localidad las trampas se distribuyeron entre los cactus (Fig. 2.1). Las moscas capturadas se llevaron al laboratorio en tubos adecuadamente rotulados, luego de lo cual los machos se identificaron mediante la inspección de la morfología de la genitalia (aedeagus) que es un carácter diagnóstico. Posteriormente se colocó a los machos en alcohol absoluto en tubos debidamente rotulados, donde se guardaron a -20 °C hasta el momento de la extracción del ADN.



Figura 2.1: Fotos ilustrativas de la Campaña 2008, Localidad de Valle Fértil, San Juan. Izquierda: Preparación de las trampas de banana fermentada al pie de una tuna y los baldes con el fermento que se dispondrán por espacio de algunas horas al pie de los cactus hospedadores de estas especies. Derecha: Captura de ejemplares al pie de un cardón, utilizando una red entomológica diseñada para este fin.

En la Tabla 2.1 se listan las localidades muestreadas, el año de colecta, las coordenadas geográficas y la provincia fitogeográfica en que se encuentra cada una de ellas dentro del Dominio de Chaco, región que a su vez se subdivide en Chaco Distrito Oriental, Chaco Distrito Occidental y Chaco Serrano. Se ha muestreado a su vez en las regiones de la Prepuna, del Espinal, de la Selva Misionera y del Monte el cual se divide en Monte Norte y Monte Sur (Cabrera 1976). Esta clasificación se basa en la predominancia de ciertas familias y el endemismo de ciertos géneros de plantas. Así es como el Dominio Chaco se puede subdividir en distritos, en cada uno de los cuales existe una predominancia de un cierto conjunto de especies. En la Tabla 1 se presenta un listado de las especies de cactáceas más conspicuas en cada una de las localidades muestreadas. Cada localidad de captura se identifica con un acrónimo de tres letras, que es la denominación que se usará a largo de esta tesis. En el caso de Valle Fértil donde coexisten ambas especies las muestras de *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae* se identificaron con el acrónimo VFB o VFK, respectivamente. En el mapa de la Fig. 2.2 puede observarse la ubicación geográfica de las localidades muestreadas y en la Fig. 2.2 se presentan las fitogeografía de la República Argentina con el fin de ilustrar en qué región se encuentra cada localidad de muestreo. Principalmente se colectaron individuos en localidades del Dominio de Chaco, el cual según sus características fitogeográficas se subdivide en Chaco serrano, donde se encuentran las localidades de Güemes, Vipos, Cadillal, Villa de Soto, Cruz del Eje y Valle Fértil, Chaco distrito oriental donde se encuentran las localidades de Lomitas y Palo Santo, y Chaco distrito occidental donde se encuentra la localidad de Ing.

Juárez. En el Monte Sur, se muestreó en las localidades de Lavalle y Villa Mazán. En el Espinal se muestreó en Ensenada y en la Selva misionera, en la localidad de Montecarlo. En estas localidades se capturaron ejemplares de *D. buzzatii*. Ejemplares de *D. koepferae* se colectaron en la región denominada Monte norte en las localidades de Ruinas de Quilmes y Brealito, en tanto que en Monte sur las colectas se realizaron Miranda y Suyuque (Monte sur) y en Valle Fértil.



Figura 2.2: Localidades muestreadas durante los veranos de 2007 a 2011: 1-Las Lomas, 2-Palo Santo, 3-Montecarlo, 4-Ensenada, 5-Tilcara, 6-General Güemes, 7-Villa Mazán, 8-Valle Fértil, 9-Villa de Soto, 10-Cruz del Eje, 11-Ruinas de los Quilmes, 12-Vipos, 13-Cadillal, 14- Ingeniero Juárez, 15-Lavalle, 16-Brealito, 17-Miranda, 18-Suyuque. En blanco se subrayan los nombres de las localidades en las cuales se capturaron individuos de *Drosophila koepferae*. En rojo se subraya la única localidad en la cual se encontraron ejemplares de las dos especies. En las demás localidades sólo se recolectaron ejemplares de *D. buzzatii*. Ver texto para más detalles.

Tabla 2.1: Localidades donde se colectaron las muestras de moscas analizadas en esta tesis. Se indica en cada caso la especie que se colectó, el nombre de la localidad, el acrónimo, las coordenadas geográficas, el año de colecta, la altitud, la provincia fitogeográfica según Cabrera (1976) y la especie de cactus que se encuentran en cada región, *Opuntia sulphurea* (Os), *O. quimilo* (Oq), *O. vulgaris* (Ov), *O. ficus indica* (Ofi), *Trichocereus pasacana* (Tp), *Trichocereus terscheskii* (Tt), *T. Candicans* (Tc), *Cereus validus* (Cv), *Pereskia sacharosa* (Ps).

Especie	Provincia	Localidad (Acrónimo)	Coordenadas	Año	Altitud (en metros)	Provincia fitogeográfica	Especie de cactus
<i>Drosophila buzzatii</i>	Tucumán	1-Vipos (VIP)	26°28'57.14"S 65°21'57.32"O	2010	786	Chaco serrano	<i>Oq, Cv, Tt</i>
	La Rioja	2-Villa Mazán(MAZ)	28°34'0.68"S 66°15'39.18"O	2010	651	Monte sur	<i>Os, Tt</i>
	Jujuy	3-Tilcara (TIL)	23°34'37.07"S 65°23'36.12"O	2008	2479	Prepuna	<i>Os, Tp</i>
	Tucumán	4-Cadillal (CAD)	26°40'59.99"S 65°16'0.01"O	2010	690	Chaco serrano	<i>Oq, Cv, Tt</i>
	Córdoba	5-Villa de Soto(VS)	30°51'6.91"S 65° 0'17.94"O	2008	536	Chaco serrano	<i>Oq, Tt, Cv</i>
	Formosa	6-Ingeniero Juárez(JUA)	23°53'60.00"S 61°51'0.00"O	2007	184	Chaco distrito occidental	<i>Oq, Ps, Cv, Tt, Op, Os, Tc</i>
	Entre Ríos	7-Ensenada (ENS)	32° 4'10.96"S 60°38'16.34"O	2007	81	Espinal	<i>Ov</i>
	Córdoba	8-Cruz del Eje(CRUZ)	65°20'0.07"O 64°48'35.63"O	2007	466	Chaco serrano	<i>Oq, Tt, Cv</i>
	Misiones	9-Montecarlo (MON)	26°34'0.35"S 54°45'57.77"O	2007	195	Selva Misionera	<i>Ofi</i>
	Formosa	10-Lomitas (LOM)	24°42'16.20"S 60°36'2.08"O	2007	131	Chaco distrito oriental	<i>Oq, Ps, Cv, Tt, Op, Os, Tc</i>
	Formosa	11-Palo Santo(PS)	25° 33' 47.49" S 59° 20' 10.25" O	2007	91	Chaco distrito oriental	<i>Op</i>
	Mendoza	12-Lavalle (LAV)	26°56'37.92"S 65°18'11.58"O	2011	392	Monte sur	<i>Ofi</i>
	Salta	13-General Güemes (GUE)	24.7 °S 65.1 °W	2010	734	Chaco serrano	<i>Oq, Tt, Cv</i>
<i>Drosophila buzzatii</i> y <i>Drosophila koepferae</i>	San Juan	14-Valle Fértil(VF)	30°54'44.56"S 67°17'5.24"O	2008	1560	Chaco serrano	<i>Os, Tt, Osp</i>
<i>Drosophila koepferae</i>	Salta	15-Brealito (BRE)	25°16'0.01"S 66°20'59.99"O	2010	2419	Monte norte	<i>Tt, Os</i>
	Tucumán	16-Ruinas de Quilmes(RUI)	26°41'35.34"S 66° 4'5.86"O	2008	1850	Monte norte	<i>Tt, Os</i>
	La Rioja	17-Miranda (MIR)	29°19'59.99"S 67°41'0.03"O	2010	1663	Monte sur	<i>Tt, Tc, Os</i>
	San Luis	18-Suyuque (SUY)	33°13'14.04"S 66°17'51.64"O	2010	819	Chaco serrano	<i>Os Tt, Tc</i>

2.2.2- Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de machos adultos colectados en la naturaleza utilizando el kit de extracción: PUREGENE® DNA Purification Kit y siguiendo el protocolo provisto por el proveedor con modificaciones menores. Las moscas se homogeneizaron utilizando un disgregador de tejidos. El homogenato se incubó durante 15 minutos a 65°C en un baño térmico (Dry Bath Incubator, Major Science). Luego se añadieron 0,55 µl de una solución 4 mg/ml de RNAsa A (Genbiotech), se mezcló realizando aproximadamente 25 inversiones suaves y se incubó a 37°C durante 60 minutos. Finalizada la incubación, se dejó la muestra a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Luego se agregaron 50 µl de Protein Precipitation Solution (QIAGEN) y se mezcló nuevamente por inversión. La muestra se colocó en hielo durante 5 minutos, luego de lo cual se centrifugó a 16000 rcf durante 6 minutos en una microcentrífuga de mesa (Centrifuge 5415D, Eppendorf). El sobrenadante fue vertido a un nuevo tubo de 1,5 ml conteniendo 150 µl de isopropanol 100% frío. Se mezcló invirtiendo cada tubo unas 50 veces y se centrifugó nuevamente a 16000 rcf en una microcentrífuga refrigerada (Centrifuge 5415R, Eppendorf) a 4°C. Se descartó el sobrenadante, cuidando que el pellet no se perdiera, y se colocó el tubo abierto sobre un papel absorbente limpio durante unos segundos de forma de drenar el excedente de alcohol. Se añadieron 150 µl de etanol 70% frío, se mezcló invirtiendo varias veces el tubo y se centrifugó durante 5 minutos a 16000 rcf a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante cuidadosamente, procurando que el precipitado de ADN no se perdiera y nuevamente se drenó el remanente de alcohol sobre un papel absorbente. A fin de evaporar el etanol, el tubo se colocó en una cámara conectada a una bomba de vacío durante 40 minutos, o hasta que no se registrara presencia de vapores alcohólicos. Finalmente, se añadieron 30 µl de agua Milli-Q estéril y se permitió la rehidratación del ADN por incubación a 4°C en heladera durante toda una noche. Una vez finalizada la extracción, la muestra fue almacenada a -20°C hasta su posterior utilización.

La calidad de la extracción fue verificada por electroforesis. A tal fin se sembraron 2 µl de cada ADN genómico en un gel de agarosa al 1%. Además, se determinó la cantidad de ADN mediante una técnica fluorométrica (Qubit™ fluorometer [Invitrogen]). Para esto se utilizó 1 µl de cada muestra siguiendo el protocolo descrito por el fabricante para ADN genómico (Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit).

2.2.3- Amplificación por PCR y secuenciación

El gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) tiene un tamaño aproximado de 1535 pb y se encuentra entre las posiciones 1533 y 2274 del genoma mitocondrial de *Drosophila melanogaster* (número de acceso el NCBI GenBank es FBgn0013674). Se analizó un fragmento de la secuencia del gen mitocondrial COI de 572 pb. Todas las muestras fueron amplificadas por PCR en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) en un volumen final de 50 µl, conteniendo: 5 µl de Buffer (10X) Invitrogen, 8µl dNTPs (1,25 mM), 5 µl Cl₂Mg (25 mM), 1 µl de cada primer en una concentración de 100 ng/µl, 0,4 µl Taq (Invitrogen), 2 µl de de una dilución 1:10 del ADN genómico. Para la amplificación del fragmento de COI se utilizaron los primers 1406f (5'CAATTTATCGCCTAACTTCAGCC3')(descriptos por primera vez por Simon et al. (1994) y posteriormente modificado por De Brito et al. (2002) y 2191r (5'CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC3') (De Brito et al. 2002). Las condiciones de ciclado fueron: 1 ciclo de 60 segundos a 94 °C, 35 ciclos de 40 segundos a 94° C, 40 segundos a 48°C y 120 segundos a 72° C.

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1%, teñidos con 2,5 µl de *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) por cada 50 ml de gel. Se sembraron 4 µl de cada producto de reacción junto con 1 µl de buffer de siembra (0,09% de Bromophenol Blue, 0,09% de Xylene Cyanol [SIGMA] y 60% de glicerol en agua bidestilada). La corrida electroforética se llevó a cabo a un voltaje constante de 80 V en buffer TAE 1X durante 50 minutos aproximadamente. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador UV DyNA Light Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet) y su tamaño se estimó por comparación con un marcador de peso molecular 100-1000 pbs (Invitrogen), sembrando 1 µl de marcador junto con 1 µl de buffer de siembra.

La purificación de los productos de amplificación se realizó utilizando el kit “Accuprep PCR Purification Kit” (BIONEER corporation), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Algunas muestras se purificaron mediante la técnica de purificación por gel de agarosa antes de utilizar un kit de purificación debido a la presencia de bandas inespecíficas de mayor peso molecular que podrían interferir en la secuenciación. La electroforesis se llevó a cabo en un gel al 1% en buffer TAE 1X a 80 V durante 60 minutos. La banda de interés se cortó del gel con un bisturí y se purificó utilizando el kit “AccuprepGel Purification Kit” (BIONEER). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un secuenciador automático ABI 3130XL con

BigDye™ terminator sequencing kit (Applied Biosystems), contratando el servicio de la Unidad de Secuenciación y Genotipado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (<http://seq.ege.fcen.uba.ar/>) o en un secuenciador automático 3730XL con *BigDye™ terminator cycling conditions* (Applied Biosystems) contratando el servicio de la empresa MacroGen Inc. (<http://macrogen.com>). La concentración requerida de los productos de amplificación fue de 50 ng/μl. En algunos casos fue necesario realizar varias reacciones de PCR por cada individuo para alcanzar la cantidad de producto requerido para su secuenciación.

En una primera instancia, las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en forma bidireccional con los mismos primers (cebadores) que se utilizaron en la reacción de amplificación, pero luego del análisis de las primeras secuencias se decidió secuenciar solamente la hebra sense del amplicón, dado que la dirección antisense no pudo secuenciarse exitosamente.

2.2.4- Edición y alineamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas utilizando el programa BIOEDIT (Sequence Alignment Editor Hall 1999). La alineación se llevó a cabo con el programa CLUSTALW (Thompson et al. 1994). Luego de eliminar las secuencias con baja calidad de secuenciación (que incluían los primers) de los extremos se obtuvieron secuencias de 552pb que fueron utilizadas para los análisis subsiguientes. La confirmación de que se trataba de COI se realizó comparando las secuencias obtenidas con la información disponible en el banco de datos de secuencias Genbank del NCBI utilizando el programa BLAST (Altschul et al. 1990). También se tradujeron las secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos con el fin de corroborar que no hubiera codones de stop prematuros en la sección del gen amplificada.

2.2.5- Estimación de la diversidad molecular

Como estimador de la diversidad molecular se calculó la diversidad nucleotídica (π), que corresponde al número medio de diferencias de nucleótidos por sitio entre pares de secuencias, mediante la fórmula:

$$\pi = \frac{k}{m}$$

donde k es:

$$k = \frac{2}{n(n-1)} \sum_{i < j} d_{ij}$$

m es la longitud del fragmento secuenciado, n es el número de secuencias en la muestra y d_{ij} es el número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias.

También se calculó la diversidad de haplotipos (Hd) definida como:

$$Hd = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^h p_i^2 \right)$$

Donde n es el número de secuencias, h es el número de haplotipos, p_i es la frecuencia relativa del haplotipo i.

Tanto π y como Hd proporcionan información acerca de la variación molecular de la muestra. Asimismo, se obtuvieron estimaciones de la diversidad molecular como el número de haplotipos (h), el número de sitios segregantes (S), la diversidad haplotípica y el número de mutaciones(η). Todos los índices se calcularon utilizando el programa DnaSP v5 (Rozas y Rozas 1995, 1997; Librado y Rozas 2009).

2.2.6- Relaciones genealógicas entre haplotipos

Para evaluar las relaciones entre haplotipos se obtuvieron redes (minimum spanning network) basadas en el número de diferencias entre haplotipos. Las redes se generaron usando el método Media Joining (Bandelt et al. 1999), implementado en el programa NETWORK 4.6 (www.fluxus-engineering.com).

2.2.7- Análisis demográficos

Se utilizaron pruebas específicas para poner a prueba la hipótesis de constancia en el tamaño poblacional. Las mismas permiten detectar huellas de posibles eventos demográficos en la diversidad genética observada.

Con el fin de investigar si los patrones de variación del gen COI se ajustan a los valores esperados bajo la teoría Neutralista se utilizaron las pruebas de neutralidad F_s (Fu 1997), Tajima D_T (Tajima 1989) y Pairwise Mismatch Distribution (Rogers y Harpending

1992, Ramos-Onsins y Rozas 2002b,) implementadas en el programa Arlequín ver. 3.5 (Excoffier y Heckel 2006, Excoffier 2009).

La **prueba Fs de Fu** (1997) se basa en la probabilidad de observar no menos de k haplotipos en una muestra de n secuencias dado un cierto valor de θ estimado a través de π . F_s se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$F_s = \ln \left(\frac{S'}{1-S'} \right), \text{ donde } S' = p(k_0 \leq k | \theta = \widehat{\theta}_\pi) = \sum_{k \geq k_0} \frac{|S_k| \widehat{\theta}_\pi^k}{S_n \widehat{\theta}_\pi}$$

Dado que F_s tiende a ser negativo cuando hay un exceso de mutaciones recientes que generan alelos raros, un valor negativo y significativo de este estadístico puede tomarse como evidencia contra el modelo neutral. Tal exceso de variantes raras puede ser consecuencia de una expansión reciente. La prueba supone que la recombinación es igual a cero lo cual es válido en el caso del mtADN. Sin embargo, cuando hay recombinación un valor de F_s significativo puede simplemente estar demostrando un exceso de haplotipos por el efecto de recombinación. Además, es de destacar que la prueba F_s es una de las más potentes para detectar expansiones poblacionales y “hitchhicking” genético (Fu 1997, Ramos-Onsins y Rozas 2002).

El **test D_T de Tajima** (1989) se basa en la comparación de dos estimadores del parámetro neutralista (Θ): θ_w que se basa en el número de sitios segregantes (S) (Watterson, 1975) y π que se basa en el número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias:

$$D_T = \frac{\pi - \theta_w}{\sqrt{\text{var}(\pi - \theta_w)}}$$

Bajo el modelo neutro el valor esperado de D_T es 0, ya que al ser θ_w y π estimadores del parámetro neutralista Θ se espera que bajo la hipótesis nula sean iguales. Sin embargo, cuando hay alelos bajo selección o cuando el tamaño efectivo no se mantiene constante, es decir cuando no se cumple alguno de los supuestos del modelo de Wright-Fisher, que subyace a la teoría neutralista, el comportamiento de ambos estimadores puede ser diferente. En efecto, el estimador basado en el número de sitios segregantes no toma en cuenta las frecuencias en que se encuentran las variantes que segregan en cada sitio, de modo que se ve igualmente afectado por sitios en los que segregan variantes raras como por sitios en los que segregan variantes en alta frecuencia. En cambio π es equivalente a la heterocigosis esperada bajo Hardy-Weinberg ($2pq$, donde p y q son las frecuencias de cada una de las variantes que segregan en cada sitio) promedio por sitio, de modo que se

ve más afectado por aquellos sitios en los que las variantes nucleotídicas que segregan se encuentran en alta frecuencia y menos por sitios en los que segregan variantes raras. Por lo tanto, cuando por alguna razón hay un exceso de variantes raras, respecto a las esperadas bajo la teoría neutralista, θ_w será mayor que π , de modo que D_T será negativo. A su vez, cuando el desvío respecto de la neutralidad ocurre en la dirección de un exceso de variantes en frecuencias intermedias, el valor de D_T es positivo.

El D_T (Tajima 1989) es un estadístico muy general que se basa en el análisis del espectro de frecuencias alélicas. Si las poblaciones han atravesado una expansión poblacional luego de un cuello de botella o la región génica presenta huellas de barridos selectivos el valor de D_T será menor que 0. Los valores de D_T positivos, en cambio, son consistentes con selección equilibradora o estructuración poblacional. Estudios con simulaciones demuestran que es más potente que otros test similares cuando la hipótesis alternativa es un barrido selectivo (selective sweeps) y cuello de botella (Tajima 1989, Simonsen 1995). Finalmente, cabe destacar que las desviaciones respecto del modelo neutro en un locus específico podrían ser consecuencia tanto de la selección como de cambios en la demografía. Sin embargo, es posible diferenciar entre ambos escenarios, los procesos demográficos tienen un efecto amplio en el genoma ya que afectan de manera similar a todos los loci, mientras que los efectos de la selección a nivel genómico son más locales, es decir se espera que se encuentren restringidos a loci específicos y eventualmente a sus vecindades dependiendo de la tasa de recombinación de la región bajo estudio.

Las pruebas de neutralidad D_T (Tajima 1989) y F_s (Fu 1997) fueron llevadas a cabo utilizando el programa DnaSP v5 (Rozas y Rozas 1995, 1997, Librado y Rozas 2009)

Los datos genético-moleculares ofrecen información no sólo para estudiar las relaciones entre poblaciones sino que además pueden mostrar la huella de los cambios de tamaño poblacional que han ocurrido en el pasado. Por lo tanto, la diversidad de las secuencias aporta un instrumento para examinar la demografía histórica. Las pruebas basadas en la evaluación de la distribución de diferencias pareadas o Mismatch Distribution (Rogers y Harpending 1992) se utilizan para investigar cambios en el tamaño efectivo histórico. Mediante el estudio de regiones de ADN que no han experimentado recombinación. Las poblaciones que han mantenido un tamaño efectivo constante presentan una distribución de diferencias entre pares de secuencias que se diferencia de la de poblaciones que han experimentado un crecimiento poblacional. El método

desarrollado por Rogers y Harpending (1992) evalúa la probabilidad, bajo neutralidad, de que dos secuencias tomadas al azar difieran en i sitios nucleotídicos en la generación t . En aquellos casos en los que no hay cambios en el tamaño poblacional se espera una distribución multimodal de las diferencias pareadas, pero en el caso que haya ocurrido una rápida expansión demográfica se espera una distribución unimodal. El estadístico se denomina rg y se calcula mediante la fórmula:

$$rg = \sum_{i=1}^{d+1} (x_i - x_{i-1})^2$$

donde x_i es la frecuencia de haplotipos que difieren en i posiciones y d es el número máximo de diferencias observadas. El estadístico rg permite estimar la “suavidad” (“*raggedness*”) de la distribución de diferencias pareadas observada, permitiendo distinguir entre poblaciones estacionarias de aquellas bajo expansión (Harpending et al. 1993).

Para realizar esta prueba se utilizó el programa DnaSP v5 que, además, permite visualizar de manera gráfica la distribución observada de las diferencias pareadas junto con las distribución esperada para una población en equilibrio (Slatkin y Hudson 1991) y para una población que ha experimentado un incremento en el tamaño poblacional (Rogers y Harpending 1992). Este mismo programa provee los intervalos de confianza del estadístico rg mediante simulaciones utilizando el algoritmo coalescente. La significación de los estadísticos se evaluó mediante simulaciones de coalescencia (10000 réplicas) basadas en un proceso de Monte Carlo (Hudson 1990) asumiendo la opción de no recombinación que es la más conservativa. Estudios con simulaciones demuestran que es más potente cuando la hipótesis alternativa es barrido selectivo (selective sweep) y cuello de botella, que otros test similares y es más potente para casos de expansión poblacional y “hitchhicking” genético (Fu 1997, Ramos-Onsins y Rozas 2002). La distribución de diferencias pareadas observada y la esperada bajo un modelo de crecimiento poblacional exponencial se calcularon usando el programa DNAsp V5.1 (Librado y Rozas 2009). Finalmente, la prueba R_2 (Ramos-Onsins y Rozas, 2002) usa la información de la frecuencia de los sitios segregantes. De modo similar que la Prueba de Tajima (D_T) el estadístico R_2 es apropiado para distinguir cambios en el tamaño poblacional. Las poblaciones que han sufrido una expansión reciente presentan un exceso de mutaciones en las ramas externas de la genealogía y un exceso de mutaciones únicas (singletons) (Tajima 1989, Slatkin y Hudson 1991). R_2 se define como:

$$R_2 = \frac{(\sum_{i=1}^n (U_i - \frac{k}{2})^2)^{1/2}}{S}$$

Donde n es el tamaño de la muestra, S es el número total de sitios segregantes, k es el número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias, U_i es el número de mutaciones únicas. En esta prueba la razón $k/2$ es el número esperado de mutaciones únicas en una de las ramas de la genealogía luego de un evento reciente de crecimiento poblacional, por lo tanto, se esperan valores bajos de R_2 en este tipo de escenario demográfico. R_2 de Ramos-Onsins y Rozas es un test más potente para muestras de tamaño pequeño y F_s se comporta mejor para muestras de tamaño mayor. La prueba mismatch distribution y el índice de Harpending (rg) si bien son usadas comúnmente son menos potentes (Ramos-Onsins y Rozas 2002).

2.2.8 -Estructura poblacional

Análisis de varianza molecular

La estructura poblacional fue inferida mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA, Excoffier, 1992). Este se basa en el análisis de la distribución de la variación entre haplotipos, entre y dentro de las poblaciones y a distintos niveles de una estructura jerárquica previamente establecida (Rousset 2000, Excoffier 2003). En nuestro caso se aplicaron 3 niveles: entre regiones, considerando las regiones fitogeográficas reconocidas por Cabrera (1976), entre poblaciones (dentro de regiones) y entre individuos (dentro de poblaciones). Los componentes de covarianza usados se calculan como los índices de fijación definidos originalmente por Wright (Wright 1965), en términos del coeficiente de endogamia y luego en términos de tiempos de coalescencia por Slatkin (Slatkin y Hudson 1991). Formalmente en el caso de haplotipos, se asume el siguiente modelo:

$$x_{ijk} = x + a_k + b_{jk} + c_{ijk}$$

Donde a son los efectos de grupo, b los efectos de poblaciones y c los efectos de haplotipos entre poblaciones dentro de grupos. Se asume que estos efectos son aditivos, aleatorios, independientes y están asociados con los componentes de covarianza φ_a^2 , φ_b^2 y φ_c^2 respectivamente. La varianza molecular total (φ^2) es la suma de los componentes de la covarianza entre los diferentes haplotipos dentro de la población (φ_c^2),

el componente de covarianza entre los diferentes haplotipos en las diferentes poblaciones entre los grupos (φ_b^2) y el componente de covarianza entre las G poblaciones (φ_a^2). Para un diseño de estructura jerárquica simple como el que utilizamos en la presente tesis donde el tipo de datos es de naturaleza haploide (las secuencias del fragmento del gen de mtCOI amplificado), el índice de fijación F_{ST} es idéntico al estadístico F entre loci $\widehat{\theta}_w$ (Michalakis y Excoffier 1996).

En el AMOVA realizado para analizar la estructuración de la variación en *Drosophila buzzatii* se consideraron 7 grupos según las regiones fitogeográficas descritas por Cabrera (Tabla 1). A continuación se describen los agrupamientos y las localidades que comprende cada uno:

- Chaco Distrito Oriental: Lomitas y Palo Santo.
- Chaco Distrito Occidental: Ing. Juárez.
- Chaco Serrano: Güemes, Vipos, Cadillal, Villa de Soto, Cruz del Eje y Valle Fértil.
- Pre-Puna: Tilcara.
- Monte Sur: Lavalle y Villa Mazan.
- Espinal: Ensenada.
- Selva Misionera: Montecarlo.

En el caso de *Drosophila koepferae* el AMOVA quedó estructurado en tres grupos:

- Monte Norte: Ruinas de Quilmes y Brealito.
- Monte Sur: Miranda y Suyuque
- Chaco Serrano: Valle Fértil

Los Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) se realizaron mediante el programa Arlequín 3.5 (Excoffier 2009). Para este análisis se consideraron 2 niveles de estructuración jerárquicos: las regiones fitogeográficas y las poblaciones. Otro modo de analizar la estructura de las poblaciones es mediante los estadísticos F diseñados por Wright (1931) que permiten describir la estructura de poblaciones de organismos diploides en términos de tres estadísticos F o de correlación alélica. En particular utilizamos F_{CT} (índice de diferenciación entre regiones), F_{SC} (índice de diferenciación entre poblaciones) y F_{ST} (índice de diferenciación global entre las regiones muestreadas). Sus valores pueden interpretarse como la desviación de las frecuencias genotípicas respecto de las esperadas bajo el modelo de HW dentro de las poblaciones locales y la

población total (Avice 2000). Los estadísticos F (Wright 1931, 1965) utilizan las frecuencias alélicas obtenidas en las diferentes regiones geográficas para determinar el flujo génico o para cuantificar la subdivisión de poblacional, ya que muestran una relación no lineal entre la cantidad de flujo génico y el grado de diferenciación genética entre subpoblaciones. F_{ST} se utiliza como índice de diferenciación global entre todas las poblaciones muestreadas y se interpreta como la varianza alélica entre poblaciones estandarizada con el valor máximo posible dada la media observada de las frecuencias alélicas. F_{ST} según Slatkin (Slatkin y Hudson 1991) se puede expresar del siguiente modo:

$$F_{ST} = \frac{f_0 - f_1}{1 - f_1} = \frac{t_0 - t_1}{t_1},$$

Donde f_0 es la probabilidad de identidad por descendencia de dos alelos muestreados de la misma población, f_1 es la probabilidad de identificar dos alelos que provienen de dos poblaciones distintas, t_1 es la media del tiempo de coalescencia entre dos alelos que provienen de dos poblaciones distintas, y t_0 es la media del tiempo de coalescencia entre alelos que provienen de la misma población. Los índices de fijación se calcularon mediante el programa Arlequín 3.5 (Excoffier 2009).

Test de Mantel

Para analizar la correlación entre la distancia genética, entre pares de poblaciones (medida con el estadístico F_{ST}) y la distancia geográfica entre poblaciones (medida en km lineales) se utilizó el Test de Mantel utilizando el programa Mantel for Windows (Excoffier et al. 2009). Éste se llevó a cabo utilizando las matrices de distancia geográfica (logaritmo en base 10 [\log_{10}] de la distancia geográfica) entre pares de localidades y la matriz de valores de F_{ST} entre pares de poblaciones obtenida con el programa Arlequín 3.15. El test de Mantel se basa en la correlación entre dos matrices. Cuando una de las matrices es la de distancias geográficas entre poblaciones y la otra de distancias genéticas como las dadas por la matriz de F_{ST} , el test permite establecer si hay una correlación entre la diferenciación genética y el grado de separación geográfica.

Análisis de Clusters jerárquico

El objeto del análisis de clusters es agrupar las observaciones de forma que los datos sean homogéneos dentro de los grupos (mínima varianza) y que estos grupos sean lo más heterogéneos posibles entre sí (máxima varianza). El análisis de clusters, entre muchas

de sus utilidades, se puede utilizar para agrupar poblaciones. Se realizó el análisis de cluster jerárquico con la función `hclust` del paquete `stat` de R 2.1.3 (<http://www.r-project.org/>), y luego se graficó el dendograma correspondiente con la función `plot.hclust`. Los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones se utilizaron como estimadores de la distancia genética.

2.3 Resultados

2.3.1- Diversidad molecular

Drosophila koepferae

Se analizaron 72 secuencias de 552 pb de longitud provenientes de 5 localidades. En el alineamiento se identificaron un total de 19 haplotipos (Anexo I) definidos por 64 sitios variables, incluyendo 36 singletons (mutaciones encontradas sólo una vez en la muestra) y 28 sitios informativos (Anexo I). La diversidad nucleotípica global (π) y la diversidad haplotípica (Hd) fueron 0.0224 y 0.90, respectivamente, variando localmente entre 0.0311 y 0.0159 la primera y la segunda entre 0.911 y 0.754 (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Estimadores de diversidad genética en cada población muestreada. Se indican el tamaño muestral (N); el número de sitios variables (S); el número de haplotipos (h); la diversidad haplotípica (Hd); la diversidad nucleotípica por sitio (π) y la heterocigosidad nucleotípica en base al número promedio de diferencias entre pares de secuencias (k) y el número medio de sitios variables (θ_w). La sigla dst representa la desviación estándar.

	Drosophila koepferae						
	N	S	h	Hd (dst)	π (dst)	k	θ_w
1-Brealito	11	42	7	0,911 (0,077)	0,0311 (0,0068)	16,622	15,19989
2-Ruinas de Quilmes	15	26	5	0,752 (0,092)	0,01594 (0,00541)	8,800	7,99616
3-Suyuque	7	25	6	0,952 (0,096)	0,02502 (0,00463)	13,809	9,64187
4-Valle Fertil	25	33	8	0,725 (0,073)	0,00759 (0,00239)	4,188	9,10481
5-Miranda	14	30	6	0.838 (0,061)	0,0223 (0,00263)	12,323	9,43357
Total	72	64	19	0,8979 (0,002)	0,02457 (0,02457)	13,562	26,2020

Drosophila buzzatii

Se analizaron 176 secuencias de 552 pb de longitud provenientes de las 14 localidades muestreadas. En el alineamiento se identificaron un total de 26 haplotipos (Anexo D) definidos por 63 sitios variables, incluyendo 9 singletons y 54 sitios informativos (Anexo D). La diversidad nucleotídica global (π) y la diversidad haplotípica (Hd) fueron 0,011 y 0,537 respectivamente, variando localmente la primera entre 0,004 y 0,111 y la segunda entre 0,200 y 0,864 (Tabla 2.3).

Tabla 2.3: Estimadores de diversidad genética para *Drosophila buzzatii* en cada población muestreada. Se indican el Tamaño muestral (N); el número de sitios variables (S); el número de haplotipos (h); la diversidad haplotípica (Hd); la diversidad nucleotídica por sitio (π) y la heterocigosidad nucleotídica en base al número promedio de diferencias entre pares de secuencias (k) y el número medio de sitios variables (θ_w). La sigla dst representa la desviación estándar

	<i>Drosophila buzzatii</i>						
	N	S	h	Hd (dst)	π (dst)	k	θ_w
1-Tilcara	18	54	5	0,484 (0,138)	0,0266 (0,007)	11,405	15,7
2-Vipos	10	29	7	0,864 (0,107)	0,111 (0,0066)	6,133	10,251
3-Villa Mazán	13	25	4	0,744 (0,045)	0,0133 (0,006)	7,339	8,056
4-Valle Fértil	24	25	5	0,736 (0,057)	0,0197 (0,0228)	10,902	6,695
5-Cadillal	16	16	4	0,350 (0,148)	0,0036 (0,0020)	6,686	9,226
6-Villa Soto	15	30	6	0,648 (0,134)	0,2 (0,1200)	0,786	0,771
7-Juárez	10	1	2	0,2 (0,154)	0,0114 (0,0121)	0,2	0,353
8-Ensenada	8	2	3	0,679 (0,122)	0,1142 (0,1210)	0,786	0,771
9-Cruz del Eje	11	24	3	0,564 (0,134)	0,0215 (0,0042)	11,891	8,194
10-Montecarlo	11	1	2	0,182 (0,144)	0,0003 (0,0002)	0,182	0,341
11-Lomitas	14	1	2	0,143 (0,119)	0,0003 (0,00002)	0,143	0,314
12-Palo Santo	8	0	1	0	0	0	0
13-Güemes	14	2	3	0,385(0,149)	0,0007(0,0003)	0,407	0,629
14-Lavalle	4	22	3	0,833(0,222)	0,0202(0,0107)	11,167	12,00
Total	176	66	26	0,537(0,046)	0,0109(0,046)	6,042	11,489

2.3.2- Relaciones genealógicas entre haplotipos

Drosophila koepferae

De los 19 haplotipos encontrados en *Drosophila koepferae*, 5 son compartidos entre poblaciones, y 14 son exclusivos de una población. De los haplotipos compartidos el mayoritario es H3DK que incluye el 20,8% (15) de las secuencias, luego le siguen H5DK que incluye el 15,3 % de las secuencias (11), y finalmente, con un 13,8% (10) el haplotipo H6DK (Fig. 2.3). Las poblaciones muestreadas comparten los 5 haplotipos mayoritarios (H1DK, H3DK, H5DK, H6DK y H8DK (Tabla 2.4). Sólo en el caso de H6DK, detectado en Brealito, que está definido por una única mutación, los demás haplotipos presentan entre 3 (H15DK encontrado en Valle Fértil, y H17DK encontrado en Miranda) y 23 mutaciones (H10DK encontrado en Suyuque). En la Fig. 2.4 se puede observar la distribución geográfica de los haplotipos. Valle Fértil es la localidad más diversa con 8 haplotipos, luego le siguen Brealito con 7, Miranda con 6, y Suyuque y Ruinas de Quilmes con 5 haplotipos cada una.

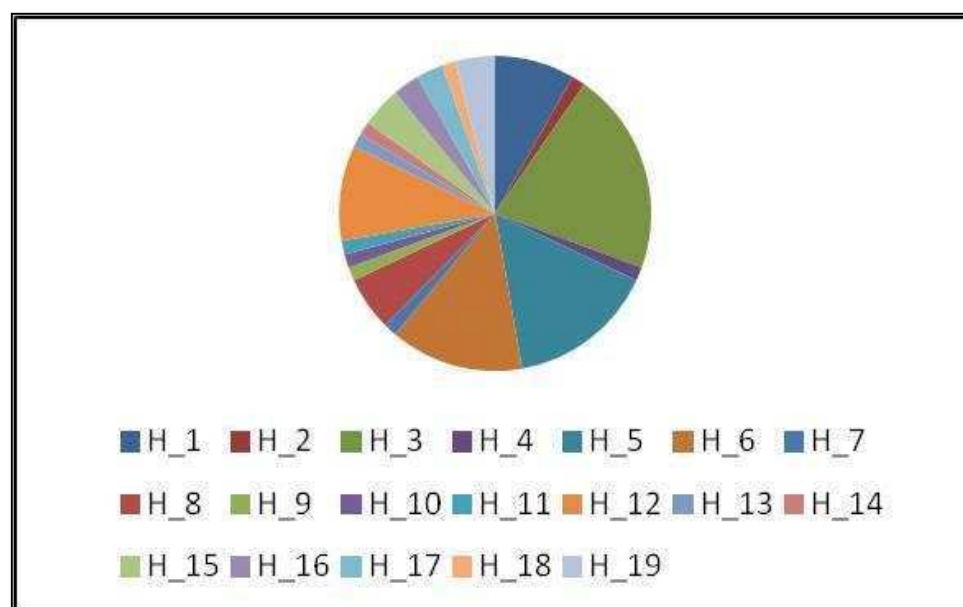


Figura 2.3: Abundancia relativa de cada uno de los haplotipos encontrados en *Drosophila koepferae*. Los números identifican los haplotipos, siendo por ejemplo el H_1 el haplotipo H_1DK. Por ejemplo el haplotipo H_1DK se encontró en 6 individuos. Para el detalle del número exacto de haplotipos por población ver Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Haplotipos detectados en la muestra de *Drosophila koepferae*. Haplotipo (identificación de cada haplotipo), n (cantidad de secuencias en las que aparece cada haplotipo), Población en la que se detectaron los haplotipos y número de individuos de cada población que portaban cada uno de los haplotipos (entre corchetes). En color gris se resaltan los haplotipos que son compartidos por más de una población.

<i>Drosophila koepferae</i>		
Haplotipo	n	Población [#individuo]
H_1DK	6	Brealito [3] Ruinas de Quilmes [2] Valle Fértil [1]
H_2DK	1	Brealito [1]
H_3DK	15	Brealito [2] Ruinas de Quilmes [1] Suyuque [1] Valle Fértil [11]
H_4DK	1	Brealito [1]
H_5DK	11	Brealito [1] Ruinas de Quilmes [3] Suyuque [3] Miranda[4]
H_6DK	10	Brealito [3] Ruinas de Quilmes [6] Valle Fértil [1]
H_7DK	1	Brealito [1]
H_8DK	4	Ruinas de Quilmes [2] Suyuque [1] Valle Fértil [1]
H_9DK	1	Suyuque[1]
H_10DK	1	Suyuque[1]
H_11DK	1	Valle fértil[1]
H_12DK	7	Valle fértil[7]
H_13DK	1	Valle fértil[1]
H_14DK	1	Valle fértil[1]
H_15DK	3	Miranda[3]
H_16DK	2	Miranda[2]
H_17DK	2	Miranda[2]
H_18DK	1	Miranda[1]
H_19DK	3	Miranda[3]

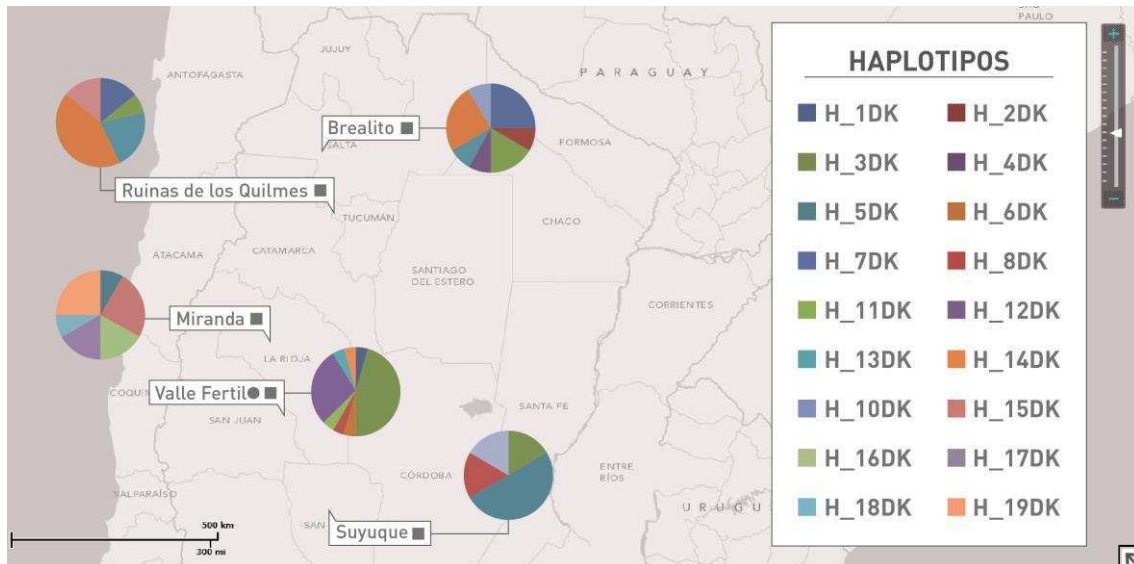


Figura 2.4: Distribución geográfica de los haplotipos de *Drosophila koepferae*.

La red de haplotipos (minimum spanning network) obtenida a partir de la información de mtCOI se muestra en la Fig. 2.5. Se pueden diferenciar 2 grupos (A y B) separados por 13 pasos mutacionales. En el grupo A los haplotipos mayoritarios son H3DK y H4DK (grupo A) en tanto que en B el mayoritario es H5DK. Ruinas de Quilmes es la única población en la que no se encontraron haplotipos únicos y Miranda (MIR) es la población en la que se encontró la mayor cantidad de haplotipos únicos. Valle Fértil es la única población en la que se encontraron haplotipos de ambos grupos (A y B).

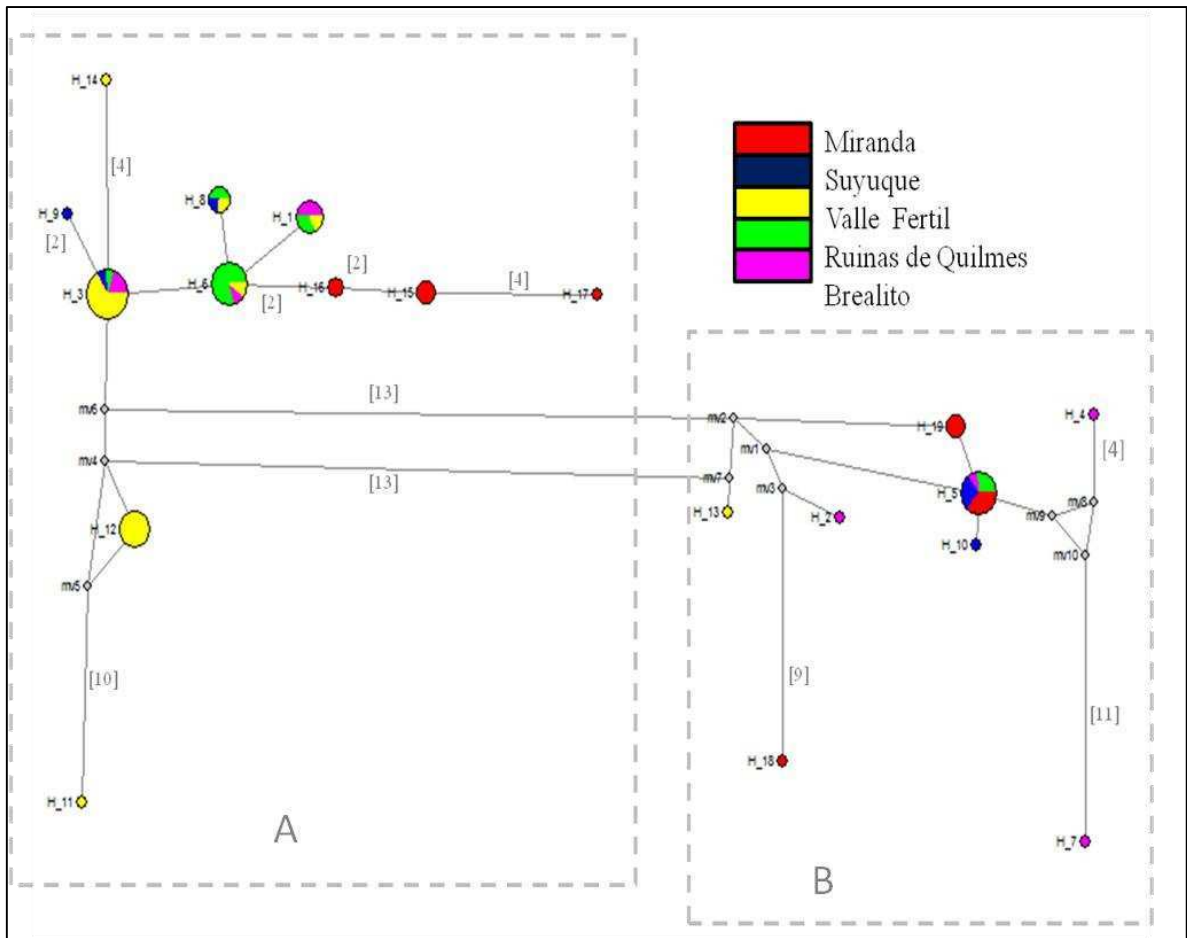


Figura 2.5: Red de haplotipos de mtCOI para *Drosophila koepferae*. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos y la longitud de las ramas es proporcional al número de eventos mutacionales. Los colores indican las localidades muestreadas. Los números en las ramas indican los pasos mutacionales que separan un haplotipo respecto del más cercano, en las ramas donde no se indica ningún número significa que hay sólo un paso mutacional. Las líneas punteadas delimitan los grupos [A] y [B] separados por la mayor cantidad de pasos mutacionales encontrados en la muestra.

Drosophila buzzatii

De los 26 haplotipos encontrados en *Drosophila buzzatii*, 8 son compartidos entre 2 o más poblaciones y los demás se encontraron en una sola localidad. El haplotipo H1DB es el mayoritario y se lo encontró en el 67,6% de los individuos muestreados (176 de 119) (Fig. 2.6, Tabla 2.5). En Vipos y Tilcara se detectaron 3 haplotipos endémicos que es el mayor número de haplotipos particulares para la especie. En las demás localidades se observaron 1 ó 2 haplotipos endémicos. Vipos es la localidad en la que se encontró la mayor cantidad de haplotipos (7), le siguen Villa de Soto con 6 haplotipos, Valle Fértil con 5, Mazán con 4, Lavalle, Güemes y Cadillal con 3 haplotipos cada una y Palo Santo con un solo haplotipo que fue el mayoritario (Fig. 2.7). Se obtuvo una red de haplotipos

(minimum spanning network) en la cual se destaca un grupo principal (grupo A) en el que se encuentra, ocupando una posición central, H1B (grupo A), el haplotipo más frecuente (hallado en 11 de las 14 poblaciones estudiadas). De los haplotipos menos frecuentes se separan 2 grupos, el primero cuyo haplotipo central es el H12B (Grupo B) y grupo C que incluye los haplotipos H3B y H2B. El resto de los haplotipos que se encuentran en baja frecuencia están separados por uno o unos pocos pasos mutacionales o entre 9 y 28 pasos mutacionales. Tilcara es la localidad que muestra haplotipos con el mayor número de pasos mutacionales con respecto al haplotipo mayoritario (Fig. 2.8).

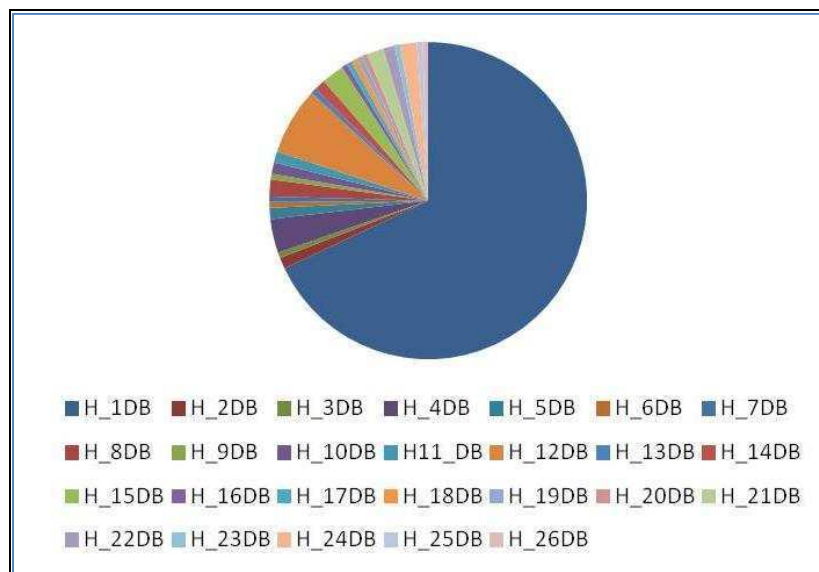


Figura 2.6: Abundancia relativa de cada uno de los haplotipos encontrados en *Drosophila buzzatii*. Por ejemplo el haplotipo H_1DB que es el mayoritario se encontró en 119 individuos de las 176 muestreados (67,6%). Para el detalle del número exacto de haplotipos por población ver Tabla 2.5.

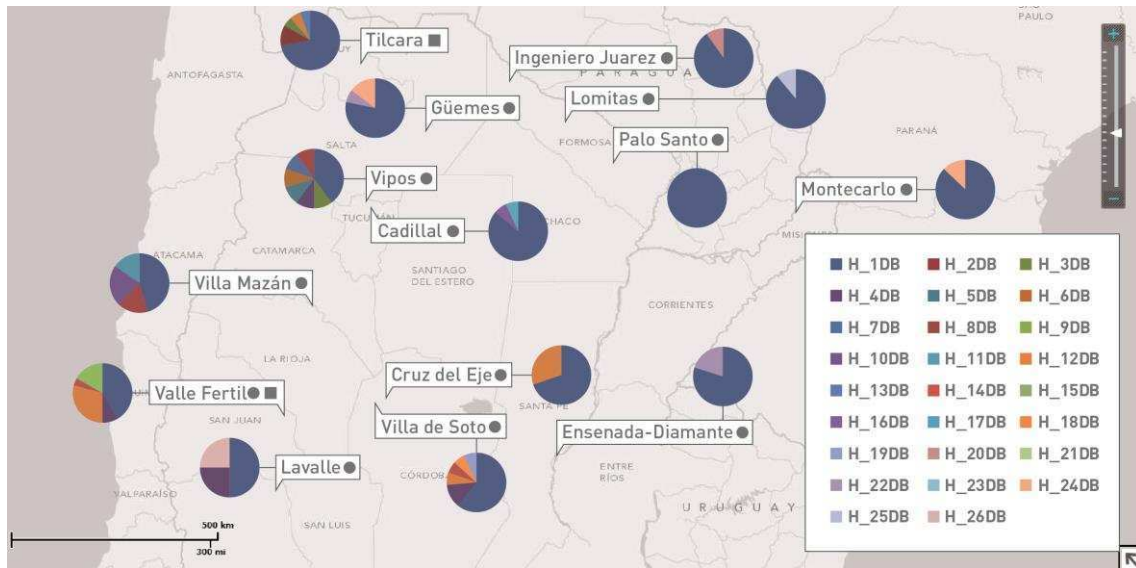


Figura 2.7: Distribución geográfica de los haplotipos de *Drosophila buzzatii*.

Tabla 2.5: Haplotipos detectados en las poblaciones de *Drosophila buzzatii*. Haplotipo (identificación de cada haplotipo), n (cantidad de secuencias en las que aparece cada haplotipo), Población en la que se detectaron los haplotipos y número de individuos de cada población que portaban cada uno de los haplotipos (entre corchetes). En color gris se resaltan los haplotipos que son compartidos por más de una población.

<i>Drosophila buzzatii</i>		
Haplotipo	#	Población [#individuos]
H1DB	119	Tilcara [13] Vipos [4] Mazán [6] Valle Fértil [10] Cadillal [13] Juárez [9] Villa de soto [9] Ensenada [4] Cruz del eje [7] Montecarlo [10] Lomitas [13] Güemes [11] Palo Santo [8] Lavalle [2]
H2DB	2	Tilcara [2]
H3DB	1	Tilcara [1]
H4DB	6	Vipos [1] Valle fértil [2] Villa de soto [2] Lavalle [1]
H5DB	2	Vipos [1] Cadillal [1]
H6DB	1	Vipos [1]
H7DB	1	Vipos [1]
H8DB	3	Vipos [1] Mazán [2]
H9DB	1	Vipos [1]
H10DB	2	Mazán [3]
H11DB	2	Mazán [2]
H12DB	12	Tilcara [1] valle fértil [7] Villa de soto [1] Cruz del eje [3]
H13DB	1	Tilcara [1]
H14DB	2	Valle Fértil [1] Villa de soto [1]
H15DB	4	Valle fértil [4]
H16DB	1	Cadillal [1]
H17DB	1	Cadillal [1]
H18DB	1	Villa de soto [1]
H19DB	1	Villa de soto [1]
H20DB	1	Juarez [1]
H21DB	3	Ensenada [3]
H22DB	2	Ensenada [1] Güemes [1]
H23DB	1	Cruz del eje [1]
H24DB	3	Montecarlo [1] Güemes [2]
H25DB	1	Lomitas [1]
H26DB	1	Lavalle [1]

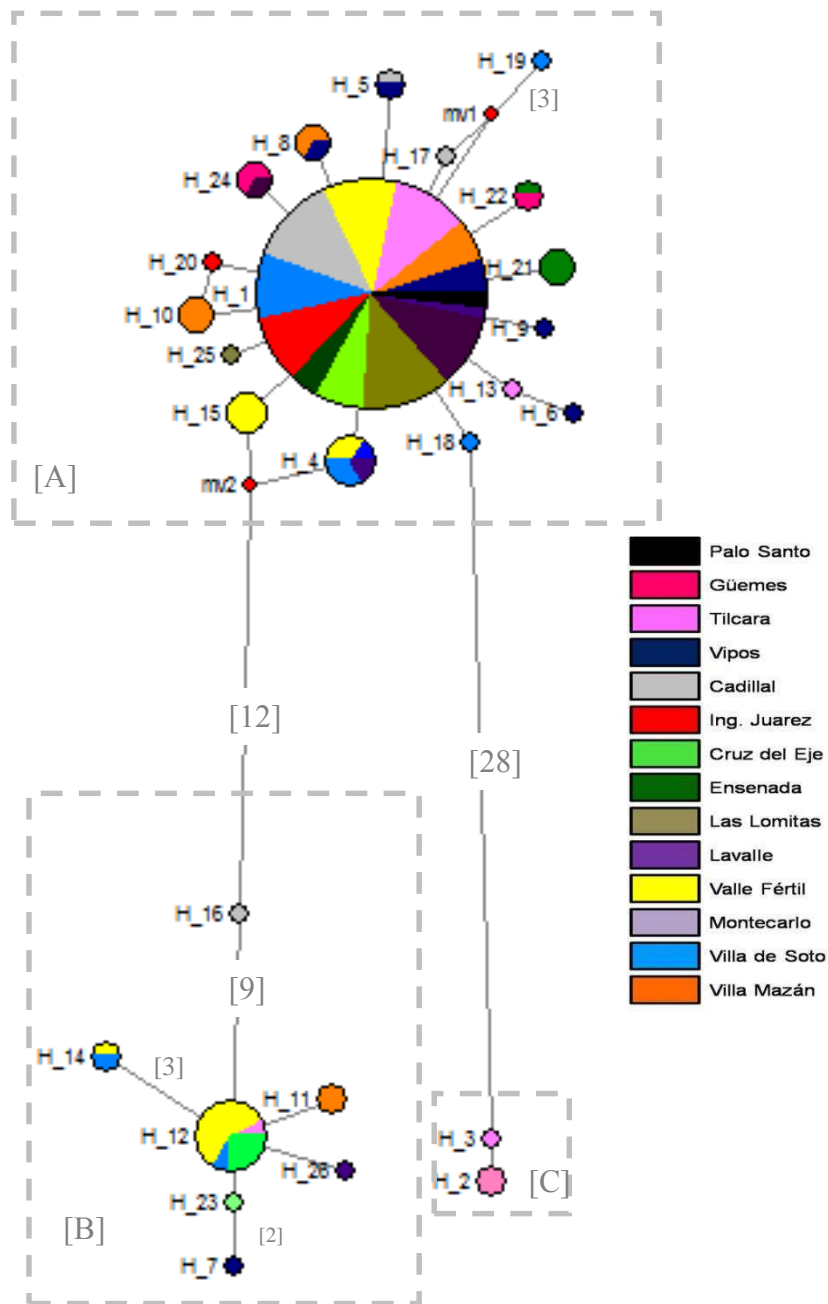


Figura 2.8: Red de haplotipos de mtCOI de *Drosophila buzzatii*. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo y la longitud de las ramas es proporcional al número de eventos mutacionales. Los colores indican las localidades. Los números en las ramas indican los pasos mutacionales de un haplotipo al siguiente, si no hay número significa que hay sólo un paso mutacional. Las líneas punteadas delimitan los grupos [A], [B] y [C] separados por la mayor cantidad de pasos mutacionales encontrados en la muestra.

2.3.3- Análisis demográficos

2.3.3.1 Pruebas de neutralidad

Se utilizaron los test de D_T Tajima (1989), F_s para evaluar el ajuste de la variación observada respecto de la esperada bajo neutralidad. Estas pruebas, como ya se ha mencionado, son útiles para detectar discrepancias respecto del modelo neutro debidas a procesos demográficos como crecimiento poblacional, cuello de botella y sub-estructuración poblacional.

Drosophila koepferae

El valor de D_T estimado para la muestra global de *Drosophila koepferae* fue negativo y no significativo ($D_{TDK} = -1,59637$, $p > 0,05$). Es decir que la discrepancia respecto de lo esperado bajo el modelo neutro no es estadísticamente significativa; por lo tanto no se puede decir que el valor negativo esté relacionado con algún evento demográfico cuando se toman en cuenta todos los individuos muestreados para esta especie (Tabla 2.6). En los análisis realizados para cada población por separado sólo Valle Fértil presentó un valor de D_T negativo y significativo, en tanto que en las restantes 4 poblaciones D_T fue positivo y sólo en Suyuque significativo. Estos resultados sugieren que en esta última población habría una huella de selección equilibradora o de cierta sub-estructuración poblacional.

F_s de F_u fue positivo y no significativo en la muestra total ($F_{SDK} = 2,375$, $p > 0,05$) indicando que no hay apartamiento respecto de lo esperado bajo el modelo neutral (Tabla 2.6). Los valores de F_s fueron positivos para todas las poblaciones y sólo en Brealito significativo (Tabla 2.6).

Tabla 2.6: Pruebas de ajuste a modelos de equilibrio deriva/mutación para cada población de *Drosophila koepferae* total de 71 secuencias totales (Total). D_T ; F_s de F_u , p : simulación coalescente. Entre corchetes se indica el tamaño muestral para cada población. En negrita se resaltan los valores significativos.

Población [Nro. Individuos]	<i>Drosophila koepferae</i>	
	$D_T(p)$	F_s de F_u (p)
1.Brealito [11]	0,45534 ($p > 0,05$)	2,112 ($p < 0,05$)
2.Ruinas de Quilmes [15]	0,0419 ($p > 0,05$)	5,487 ($p > 0,05$)
3.Suyuque [7]	2,0028 ($p < 0,05$)	0,705 ($p > 0,05$)
4.Valle Fértil [25]	-2,5002 ($p < 0,001$)	0,0686 ($p < 0,01$)
5.Miranda [14]	1,41289 ($p > 0,01$)	5,507 ($p > 0,05$)
Total [72]	-1,59637 ($p > 0,05$)	2,375 ($p > 0,05$)

Drosophila buzzatii

D_T para la muestra total de *Drosophila buzzatii* fue negativo y significativo ($D_{TDb} = -1,594$, $p=0,029$). Esta desviación respecto de lo esperado bajo neutralidad se debe a un exceso de variantes en baja frecuencia, que podría deberse tanto a un barrido selectivo o a una expansión tras un cuello de botella (Tabla 2.7). También F_s fue negativo, aunque no significativo ($F_{SDb} = -1,943$, $p=0,401$). Cabe aclarar que F_s tiende a ser negativo cuando hay un exceso de mutaciones recientes que generan alelos raros. Sin embargo, como el valor de este estadístico no fue significativo no puede tomarse como evidencia contra la neutralidad de las mutaciones ni en contra de la constancia del tamaño poblacional efectivo (Tabla 2.7). Para las poblaciones de Cadillal, Montecarlo y Vipos se obtuvieron valores de D_T negativos y significativos, lo cual concuerda con el resultado obtenido para la población total y está de acuerdo con la hipótesis de una expansión poblacional reciente. A su vez en Güemes, Juárez, Lomitas, Lavallo, Tilcara, Villa Soto y Villa Mazán, el valor de D_T fue negativo y estadísticamente no significativo. En cambio, D_T mostró valores positivos en las poblaciones de Cruz del Eje, Valle Fértil y Ensenada, aunque sólo fueron estadísticamente significativos en las dos primeras (Tabla 2.7). Es importante mencionar que la prueba de Tajima no pudo realizarse para la muestra de Palo Santo ya que fue monomórfica para todos los sitios de mtCOI. De las restantes 13 poblaciones D_T fue negativo en 10, de los que sólo tres resultaron significativos. De las 13 poblaciones de *D. buzzatii* 6 mostraron un F_s positivo y no significativo (Cruz del Eje, Lavallo, Tilcara, Valle Fértil, Villa de Soto y Villa Mazán), en tanto que en las 7 restantes, F_s fue negativo y sólo en Güemes significativo (Tabla 2.7). Por tanto, si bien no hay pruebas concluyentes contra el modelo neutro, tampoco deben descartarse discrepancias respecto de lo esperado bajo la hipótesis nula, puesto que ambos estadísticos sugieren que hay un cierto exceso de alelos raros lo cual podría ser producto de una expansión poblacional.

Tabla 2.7. Pruebas de ajuste a modelos de equilibrio deriva/mutación para cada población de *Drosophila buzzatii*, y para toda la muestra de 176 secuencias totales (Total). D_T ; F_s de F_u , p : simulación coalescente. Con asterisco se indican los valores estadísticamente significativos.

Población [Nro. Individuos]	<i>Drosophila buzzatii</i>	
	D_T (p)	F_s de F_u (p)
1.Cadillal [16]	-2,30746 (0,041) *	-1,475 (0,035)*
2.Cruz del Eje [11]	2,06706 (p<0,05) *	9,736 (0,998)
3.Ensenada [8]	0,6935 (0,595)	-0,224 (0,278)
4.Güemes [14]	-1,59492 (0,216)	-1,943 (0,009)*
5.Juárez [10]	-1,11173 (0,123)	-0,339 (0,396)
6.Las Lomitas [14]	-1,15945(0,109)	-0,595 (0,304)
7.Lavalle [4]	-0,71353(p>0,05)	2,810 (0,972)
8.Tilcara [18]	-1,2980 (0,113)	8,349 (0,996)
9.Valle Fértil [24]	2,33747(p<0,01) *	8,261 (0,992)
10.Villa de Soto [15]	-1,5888(0,121)	2,760 (0,945)
11.Villa Mazán [13]	-0,52951 (0,32)	5,672 (0,979)
12.Vipos [10]	-2,02458 (0,001)*	-0,255 (0,41)
13.Montecarlo [11]	-1,12850 (0,016)*	-0,410 (0,488)
Total [176]	-1,59492 (0,029)*	-1,943 (0,401)

2.3.3.2 Pruebas de expansión poblacional

Drosophila koepferae

El análisis de la distribución de diferencias pareadas no mostró diferencias significativas con respecto a lo esperado bajo un modelo de tamaño poblacional constante ($r=0,0079$, no significativo, Fig. 2.9). Si bien la distribución del estadístico rg fue bimodal, lo cual podría indicar cierta estructuración poblacional o bien un cuello de botella (Harpending 1994), tanto rg ($rg = 0,0779$ $p=0,11$) como R_2 ($R_2=0,0780$ $p= 0,24$) fueron no significativos.

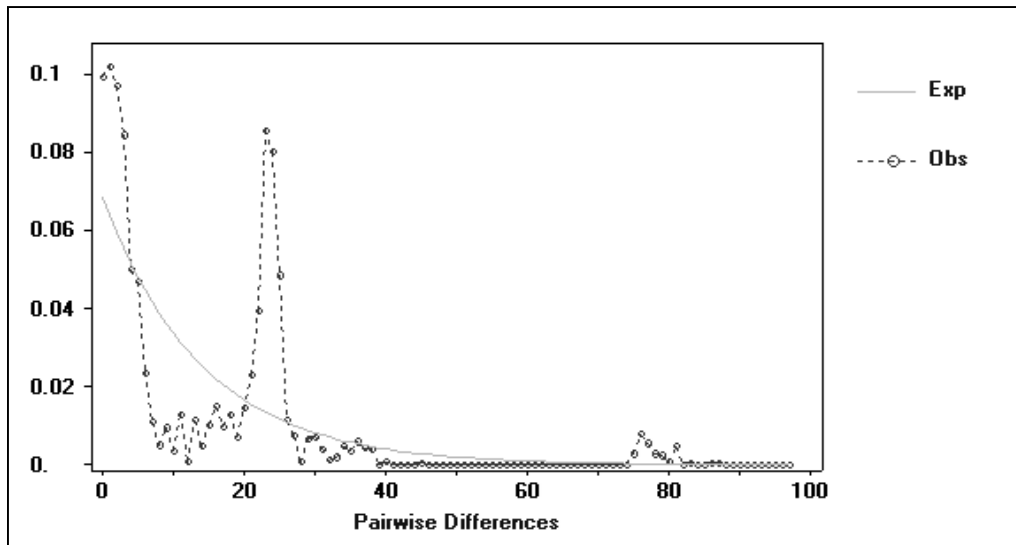


Figura 2.9: Distribución de diferencias pareadas en todos los individuos muestreados de *Drosophila koeferae*. La línea continua indica los valores esperados en una población estable (equilibrio y no recombinación), ie., una población de tamaño poblacional constante (Slatkin & Hudson, 1991). La línea punteada muestra las distribuciones de diferencias pareadas registradas en la muestra.

Drosophila buzzatii

La distribución de diferencias pareadas no mostró diferencias estadísticamente significativas diferente respecto de lo esperado bajo un modelo de tamaño poblacional constante ($r=0,1021$, $p=0,42$). El número de diferencias pareadas mostró una distribución bimodal, como se espera bajo un modelo de coalescencia básica con apareamiento al azar, y sin ningún tipo de evento demográfico que lo afecte (Fig. 2.10). Sin embargo, la prueba de Ramos-Onsins y Rozas, si bien no fue significativa, sugiere una posible expansión poblacional reciente dado que el valor de R_2 fue bajo y cercano al límite de la significación ($R_2=0,0454$ [$p=0,06$]; $rg= 0,1021$ [$p=0,94$]).

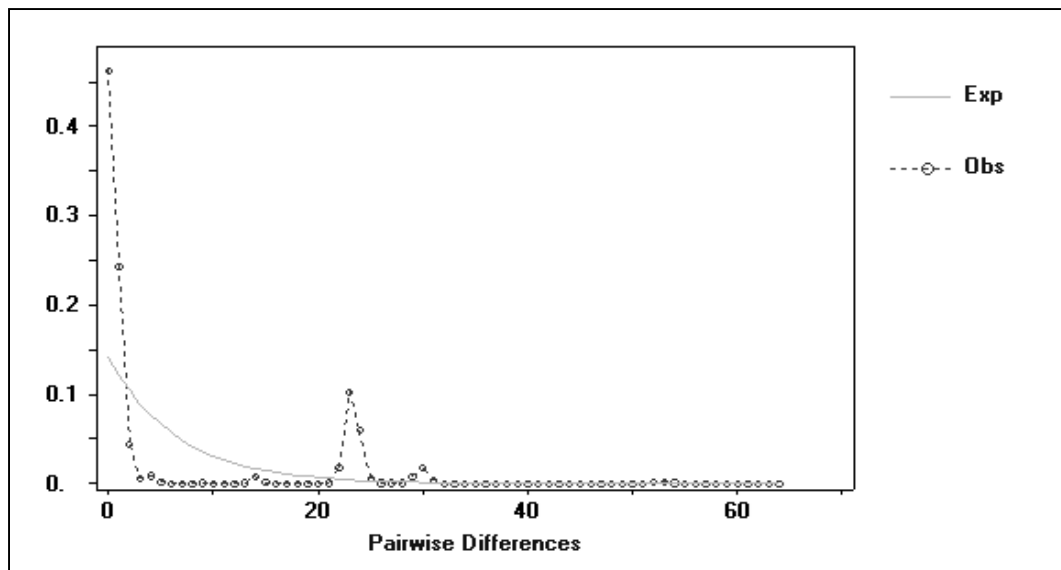


Figura 2.10. Distribución de diferencias pareadas entre todos los individuos muestreados de *Drosophila buzzatii*. La línea continua indica los valores esperados en una población estable (equilibrio y no recombinación), ie., una población de tamaño poblacional constante (Slatkin y Hudson, 1991). La línea punteada muestra las distribuciones de diferencias pareadas registradas en la muestra.

2.3.4- Análisis de estructura poblacional

2.3.4.1 Análisis de varianza molecular

Drosophila koepferae

El AMOVA jerárquico considerando las poblaciones y las regiones fitogeográficas Monte norte (Ruinas de Quilmes y Brealito), Monte sur (Miranda y Suyuque) y Chaco serrano (Valle Fértil), no mostró varianza, a su vez, los componentes de variación entre poblaciones (dentro de las regiones) y dentro de las poblaciones fueron estadísticamente significativos, en tanto que las diferencias entre regiones no lo fueron (Tabla 2.8). Los componentes de varianza dentro de poblaciones y entre poblaciones (dentro de regiones) explican cerca del 85% y 15% de la varianza total, respectivamente.

Tabla 2.8. AMOVA Jerárquico para *Drosophila koepferae*. Grados de libertad (GL), Suma de cuadrados (SM), componentes de varianza (CV), porcentaje de la varianza (%VAR), los valores estadísticamente significativos se indican con *.

Drosophila koepferae					
Fuente de variación	GL	SM	CV	%VAR	
Entre regiones	2	17.217	-1.42679 Va	0	$F_{CT} : -0.2529$ ($p=0.8$)
Entre poblaciones dentro de región	2	77.911	2.29138** Vb	15,33	$F_{SC} : 0.32422$ ($p=0,000$)
dentro poblaciones	66	315.210	4.77590** Vc	84.67	$F_{ST} : 0.15328$ ($p=0,000$)
Total	70	410.338			

Los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones variaron entre 0,07 y 0,53 (Tabla 2.9) indicando que la diferenciación entre poblaciones fue de baja a moderada dependiendo de la comparación particular (Hartl y Clark 2007). En cuanto a las comparaciones particulares Valle Fértil es, en promedio, la población que más se diferenció del resto, particularmente el valor de F_{ST} con Suyuque fue el mayor (Tabla 2.9). Brealito por su parte es la población que menos se diferenció del resto ya que la mayoría de los valores de F_{ST} no fueron estadísticamente significativos, salvo con la muestra de Valle Fértil con la que si bien se encontró una diferenciación moderada, resultó estadísticamente significativa (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Matriz con las distancias genéticas F_{ST} de a pares de poblaciones para *Drosophila koepferae*. Abreviaturas, Brealito (BRE), Ruinas de Quilmes (RUI), Suyuque (SUY), Miranda (MIR), Valle Fértil (VFK). Con un asterisco se resaltan los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

	BRE	RUI	SUY	MIR
BRE	0			
RUI	0,0711	0		
SUY	0,02612	0,23833	0	
MIR	0,04962	0,24650	0,09836*	0
VFK	0,264325*	0,15049	0,52624*	0,50909*

Drosophila buzzatii

El AMOVA jerárquico considerando las poblaciones según las regiones fitogeográficas (Chaco distrito oriental, Chaco distrito occidental, Chaco serrano, Prepuna, Espinal, Monte sur y Selva misionera) mostró un varianza total del 23%. La variación dentro de poblaciones, también estadísticamente significativa, explicó una elevada proporción de la varianza total (>74%) en tanto que la varianza explicada por la diferenciación entre poblaciones (dentro de regiones) fue baja (2%) y estadísticamente no significativa (Tabla 2.10).

Tabla 2.10. AMOVA Jerárquico para *Drosophila buzzatii*. Grados de libertad (GL), Suma de cuadrados (SM), componentes de varianza (CV), porcentaje de la varianza (%VAR), los valores significativos se indican con *.

AMOVA	<i>Drosophila buzzatii</i>				
Fuente de variación	GL	SM	CV	%VAR	
Entre regiones	3	40,521	0,81*	23,74	Fct= 0,23; p=0,002*
Entre poblaciones dentro de región	10	47,448	0,7	2,07	Fsc=0,02 p=0,13
dentro poblaciones	162	440,674	2,54*	74,19	Fst= 0,25 p=0,00*
Total	175	528,642	3,343		

El cálculo de los F_{ST} se realizó para cada par de poblaciones y sin tener en cuenta el agrupamiento utilizado en el AMOVA, para poder identificar los pares de poblaciones más diferenciadas genéticamente. Los valores de F_{ST} pareados variaron entre 0 y 0.2936 (Tabla 2.11) indicando, globalmente, que la diferenciación entre poblaciones fue baja (Hartl y Clark 2007). En particular la mayor diferenciación se observó entre Lavalle y Lomitas (0,3474 $p < 0,05$) y Lavalle y Montecarlo (0,2896 $p < 0,05$). Si bien estos resultados parecen indicar que Lavalle sería la población más diferenciada respecto del resto es necesario tener en cuenta que el estudio incluyó solamente 4 secuencias de esta localidad. También Montecarlo mostró valores de F_{ST} más altos (dentro de los valores globalmente bajos obtenidos) indicando que esta población está relativamente más diferenciada respecto del resto.

Tabla 2.11. Matriz con las distancias genéticas F_{ST} de a pares de poblaciones para *D.buzzatii*. Abreviaturas: 1:Tilcara, 2: Villa Mazán, 3:Valle Fértil, 4:Villa de Soto, 5:Cruz del Eje, 6:Lavalle, 7:Vipos, 8:Cadillal, 9:Juárez, 10:Lomitas, 11:Palo Santo, 12:Güemes, 13:Ensenada, 14:Montecarlo. En negrita se indican los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Los valores negativos son considerados 0, puesto que teóricamente los valores de F_{ST} negativos no tienen significado biológico. Sin embargo hemos decidido mostrar los valores tal como los ha dado el test.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0												
2	0,0509	0											
3	0,1654	0,0339	0										
4	0,0437	-0,0505	0,0535	0									
5	0,1573	0,0291	-0,0652	0,0588	0								
6	0,0068	-0,1264	-0,1322	-0,1155	-0,1544	0							
7	0,0208	-0,060	0,0687	-0,0681	0,0723	-0,0990	0						
8	0,0597	0,0369	0,1961	0,0050	0,2531	0,1528	-0,0248	0					
9	0,0390	0,0565	0,2116	0,0275	0,2725	0,2551	0,0041	-0,0272	0				
10	0,0678	0,0989	0,2464	0,0590	0,3291	0,3474	0,0401	-0,0076	0,0051	0			
11	0,0197	0,0434	0,1960	0,0117	0,2470	0,2180	-0,0141	-0,0503	-0,0241	-0,0452	0		
12	0,0689	0,1002	0,2470	0,0622	0,3259	0,3275	0,0427	-0,0006	0,0239	0,0384	-0,0016	0	
13	0,0268	0,0606	0,2001	0,0342	0,2446	0,1969	0,0147	0,0356	0,2012	0,2539	0,2142	0,1706	0
14	0,0484	0,0776	0,2260	0,0421	0,2936	0,2896	0,0201	-0,0215	0,0004	0,0024	-0,0316	-0,0592	0,2152

2.3.5- Correlación entre las matrices de distancia genética y geográfica

2.3.5.1 Análisis de *clusters*

Drosophila koepferae

Los resultados del análisis de clusters, utilizando como medida de distancia los valores de F_{ST} pareados se presentan en la Fig. 2.11. En esta pueden observarse que los agrupamientos corresponden a las regiones fitogeográficas a las que se asignaron las poblaciones. Adicionalmente, para investigar si la distancia geográfica estaba correlacionada con la diferenciación genética se realizó un el test de Mantel (Fig. 2.12) que no mostró una correlación estadísticamente significativa entre las matrices de F_{ST} y la de distancias geográficas (\log_{10} [Km]) entre pares de poblaciones (Matriz 2). Esto sugiere que el patrón de variación detectado no se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia ($r = -0,144$; $p = 0,311$) a pesar de la evidente estructuración poblacional.

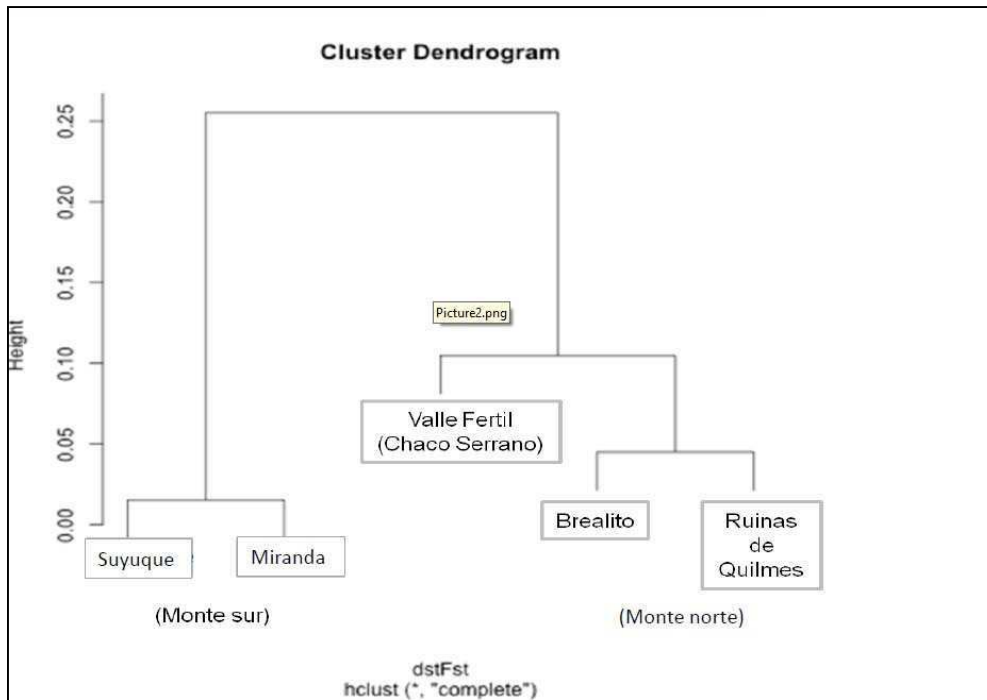


Figura 2.11 Dendrograma construido con la función hclust del paquete stats del programa R utilizando como distancia entre localidades los valores de F_{ST} pareados. Miranda (MIR), Suyuque (SUY), Valle Fertil (VFK), Brealito (BRE), Ruinas de Quilmes (RUI). Se indica la región fitogeográfica.

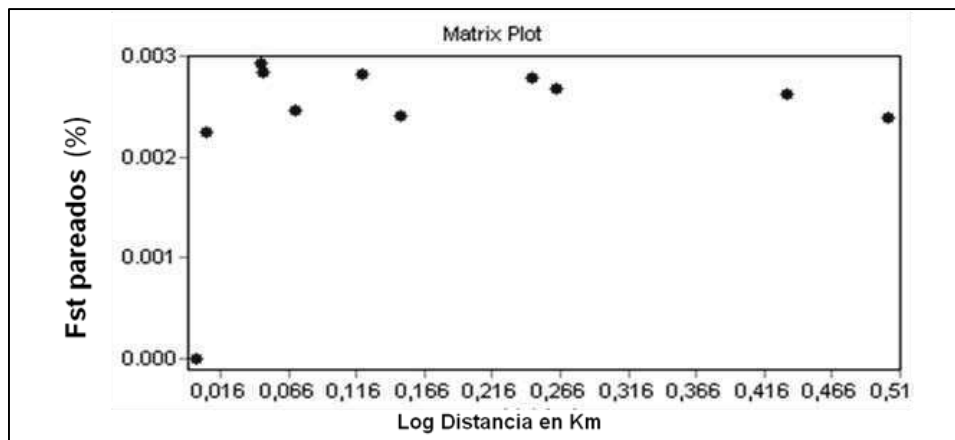


Figura 2.12. Representación gráfica para *Drosophila koepferae* de la correlación entre Distancia Geográfica y F_{ST} pareados ($r = -0,144$, $p = 0,311$).

Drosophila buzzatii

El análisis de cluster se realizó utilizando como medida de distancia los F_{ST} pareados y mostró tres agrupamientos (Fig. 2.13) que no concuerdan plenamente con las regiones fitogeográficas, ni con las distancias geográficas entre poblaciones, evidenciando la ausencia de estructuración poblacional. Esto concuerda con los resultados obtenidos con

el AMOVA y los F_{ST} , en los que se observa sólo una leve estructuración poblacional. Las poblaciones de Lavalle, Cruz del Eje y Valle Fértil estarían más cercanas entre sí que con las poblaciones de Juárez, Villa Mazán y Villa de Soto que tienen mayor similitud con las de la región de Chaco (Fig. 2.13). El test de Mantel (Fig. 2.14) no mostró una correlación significativa entre las matrices de diferenciación genética (F_{ST}) y distancia geográfica en Km (Log (distancia), indicando que no hay un patrón de aislamiento por distancia ($r=-0,058$, $p=0,3011$).

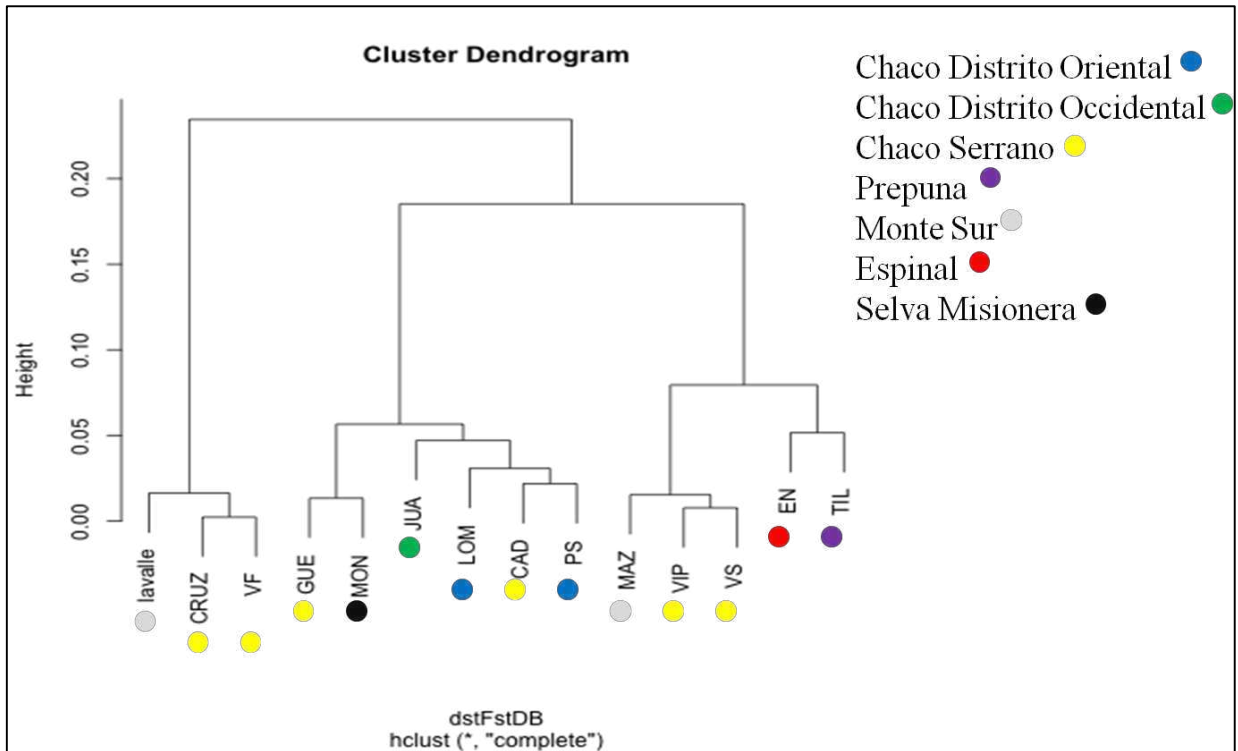


Figura 2.13. Dendrograma para *Drosophila buzzatii* construido utilizando la función `hclust` del paquete `stats` del programa R utilizando como distancia entre localidades los valores de F_{ST} pareados. Lavalle, Cruz del Eje (CRUZ), Valle Fértil (VF), Güemes (GUE), Montecarlo (MON), Ing. Juárez (JUA), Las Lomitas (LOM), Cadillal, (CAD), Palo Santo (PS), Villa Mazán (MZ), Vipos (VIP), Villa de Soto (VS), Ensenada (EN), Tilcara (TIL). Las regiones fitogeográficas esta representadas con círculos de colores, y se indica a que región pertenece cada población.

2.4 Discusión

El estudio de la variación del fragmento de 552pb del gen mtCOI reveló diferencias entre *Drosophila koepferae* y *D. buzzatii*. Estas diferencias se observan en los niveles de variación, en la distribución de los haplotipos, en los patrones de estructuración genético-poblacional y en lo que estos resultados sugieren respecto a la historia demográfica de cada una de estas especies. Comenzaremos analizando comparativamente la variación encontrada en cada especie. Varias líneas de evidencia, entre ellas las estimaciones de los niveles de variación, indican que *D. koepferae* es más variable que *D. buzzatii*. Se detectaron 19 haplotipos en una muestra total de 72 individuos provenientes de 5 poblaciones de *D. koepferae*, mientras que en *D. buzzatii* el análisis de la muestra de 176 individuos correspondientes a 14 poblaciones, reveló la presencia de 26 haplotipos.

Las estimaciones de variación nucleotídica para *Drosophila buzzatii* (5%) y para *D. koepferae* (5,5%) se encuentran dentro del rango de variación reportado para otros drosófilidos. Por ejemplo, el número de diferencias promedio entre pares de alelos de COI abarca un amplio rango. Este parámetro alcanzó un valor de 8% en *D. montana*, *D. borealis*, *D. littoralis* que son especies que forman parte del grupo *D. virilis* (Mirol et al. 2007), valores intermedios como el caso de *D. pachea* con un 3% de diferencias apareadas (Hurtado et al. 2004), hasta valores bajos, menores al 1%, como en *D. mettleri* y *D. nigrospiracula* (Hurtado et al. 2004). Estos últimos valores son menores que los reportados para otros artrópodos, como por ejemplo coleópteros de la familia Curculionidae (0,5%) (Guzman et al. 2010), en lepidópteros considerados plaga de la familia Noctuidae (0,5%) (Salinas-Hernandez et al. 2011) y en animales en general en los que la diversidad nucleotídica promedio varía entre 1 y 2% de diferencias apareadas (Avise et al. 1987).

El análisis de la variabilidad del gen mitocondrial COI para las poblaciones de *Drosophila koepferae* mostró valores de diversidad haplotípica de 0,89 (H_d) y nucleotídica de 0,02 (π), más altos que los estimados para *D. buzzatii* ($H_d= 0,537$; $\pi= 0,01$). A nivel general, la variación encontrada en ambas especies coincide con los resultados de estudios realizados en poblaciones brasileras de *D. buzzatii* donde se ha descrito la presencia de 36 haplotipos en una muestra de 132 individuos de 44 poblaciones (de Brito et al. 2002, Santos 2011). Estos resultados se resumen en la Tabla

2.12, en la que se comparan los valores de Hd y de π reportados en trabajos previos y en la presente tesis para diversas especies de drosófilidos.

Tabla 2.12. Valores comparativos de Diversidad haplotípica (Hd) y de diversidad Nucleotípica (π).

Especie	N	π	Hd	Autor (año)
<i>D. buzzatii</i> región de Caatinga (Brasil)	34	0,0022	0,6192	Santos (2011)
<i>D. buzzatii</i> región de Chaco	19	0,004	0,3860	Santos (2011)
<i>D. buzzatii</i> región de Chaco	176	0,01094	0,537	Presente tesis
<i>D. koepferae</i> región de Chaco	72	0,02457	0,8979	Presente tesis
<i>D. pachea</i>	203	0,007	0,96	Hurtado (2004)
<i>D. mettleri</i>	117	0,002	0,72	Hurtado (2004)
<i>D. nigrospiracula</i>	94	0,0002	0,18	Hurtado (2004)

El valor de π global en *Drosophila buzzatii* está en concordancia con los hallados en especies filogenéticamente cercanas como *D. gouveai*, *D. antonieta*, *D. borborema* y *D. serido* (Franco 2009, Moraes et al. 2009) y en otros drosófilidos cactófilicos como *D. pachea*, *D. mettleri*, *D. nigrospiracula* (Hurtado et al. 2004), en el grupo de los insectos (Abellán et al. 2007, Gray et al. 2008) y en el de los artrópodos en general (Guzman 2010). A su vez es de notar, que los valores aquí informados, son los habituales en especies con alta capacidad de dispersión, que han pasado por procesos de expansión poblacional o que estuvieron sometidos a algún tipo de selección (Joseph et al. 2002, Santos 2011, Santos et al. 2008).

Los AMOVAs mostraron que el principal componente de la variación y que da cuenta de un alto porcentaje de la misma es la variación dentro de las poblaciones, que en *Drosophila koepferae* da cuenta del 84% de la varianza molecular y en *D. buzzatii* del 74%. Con respecto a la estructura genético poblacional, hemos encontrado diferencias entre las dos especies. En *D. buzzatii*, la diferenciación entre poblaciones da cuenta del 2% de la variación total. Esta leve variación no parece estar relacionada ni con las regiones fitogeográficas en las que se encuentran las poblaciones estudiadas (AMOVA: $V_a=0,7$; $p=0,13$), ni con la distancia geográfica entre ellas (Test Mantel: $r = -0,058$; $p = 0,301$). Esta ausencia de correlación se observó a su vez en el dendrograma (ver Fig. 2.11) en el cual los clusters obtenidos no se corresponden con las regiones fitogeográficas muestreadas. Así, varias líneas de evidencias llevan a concluir que, conforme a los valores obtenidos para la región del mtCOI analizada, esta especie no exhibe estructuración genético-poblacional. Por el contrario, la diferenciación entre poblaciones da cuenta del 15% de la variación total en *D. koepferae*, valor que interpretamos como un indicador de estructuración poblacional. Aunque el análisis estadístico indica que esta variación no

estaría correlacionada con las regiones fitogeográficas en las que se encuentran las poblaciones estudiadas (AMOVA: $V_a = -1,4$; $p = 0,8$), ni con las distancias geográficas que las separan (Test Mantel: $r = -0,144$; $p = 0,311$), en esta especie el análisis de clusters mostró agrupamientos con una cierta coincidencia con las regiones fitogeográficas (Fig. 2.13).

Con respecto a lo observado en la red de haplotipos, en primera instancia, podemos decir que es consecuente con lo observado en los análisis ya mencionados. Ambas especies presentan distribuciones de haplotipos claramente diferentes. En *Drosophila buzzatii* se detectó un haplotipo mayoritario (H1DB 68%) que se encuentra presente en todas las poblaciones muestreadas y 25 haplotipos divergentes considerados raros, presentes en menor frecuencia (H12DB 7%; el H4DB 3% y frecuencias menores al 2% el resto). Del total de alelos encontrados, el 76% son exclusivos (20 haplotipos exclusivos/26 haplotipos totales) pero sólo en algunas poblaciones se detectaron alelos exclusivos. Inclusive se encontraron poblaciones monomórficas para el alelo mayoritario (Palo Santo).

En *Drosophila koepferae*, se observa un patrón diferente ya que no se detectó un haplotipo mayoritario, ni un alelo que esté presente en todas las poblaciones. El haplotipo hallado en mayor frecuencia representa el 21% (H5DK), seguido de cuatro haplotipos con frecuencias decrecientes: 15% (H5DK), 14% (H6DK), 11% (H10DK) y 10% (H12DK), en tanto que el resto de los haplotipos tuvieron bajas frecuencias que variaron entre 1 y 4%. A su vez, se encontraron alelos exclusivos en cada área muestreada y el 73% de los haplotipos son exclusivos de una localidad (14 haplotipos exclusivos/19 haplotipos totales).

Asimismo, detectamos diferencias en el modo en que la variabilidad está distribuida geográficamente. Si bien las poblaciones de *Drosophila buzzatii* comparten algunos haplotipos y en algunas de ellas detectamos haplotipos exclusivos, existe un haplotipo mayoritario que está presente en alta frecuencia en todas las poblaciones. Este patrón filogeográfico se asemeja a la categoría II propuesta por Avise (2000), puesto que detectamos grandes discontinuidades genéticas entre algunos haplotipos, con un promedio de más de 20 pasos mutacionales dentro de algunas de las poblaciones estudiadas (p.e. Tilcara). Además del haplotipo mayoritario detectado en todas las poblaciones de *D. buzzatii*, los restantes haplotipos en alta frecuencia se encontraron en 11 de las 14 poblaciones, reflejando la ausencia de una estructura filogeográfica marcada.

Por lo tanto puede considerarse que, exceptuando el caso de los haplotipos más divergentes, el patrón observado tiene una forma aproximadamente estrellada, lo que probablemente refleje la impronta de una hipotética expansión poblacional reciente (Slatkin y Hudson 1991). Esto es consistente con los resultados revelados por las pruebas específicas a las que ya hemos hecho referencia. A su vez, es posible reconocer un patrón en el que se distinguen tres agrupamientos para los haplotipos: el primero ya descrito que presenta una estructura en estrella, el segundo que difiere en varios pasos mutacionales también está conformado por un haplotipo en mayor frecuencia (H12DB que es compartido por varias localidades) y, finalmente, un tercer agrupamiento constituido sólo por haplotipos en baja frecuencia que se hallaron en Tilcara (H3DB y H4DB, ver Fig. 2.4).

En contraste con este patrón, el área muestreada en *Drosophila koepferae* constituye un gradiente norte-sur que presenta una falta de asociación espacial con el patrón de distribución de haplotipos encontrado (aunque la prueba de asociación genética y geográfica no fue significativa, como se ha descrito anteriormente). En los extremos de la distribución están las localidades de Brealito y de Suyuque ambas distanciadas por 850 km lineales, las cuales comparten dos haplotipos (H5DK y H3DK) que también están presentes en las poblaciones de Miranda y Ruinas de Quilmes. A su vez ambas localidades tienen haplotipos exclusivos que difieren entre sí en un rango que va de 4 a 31 diferencias mutacionales (ver Tabla Anexo I donde se muestran las diferencias en pasos mutacionales entre cada par de haplotipos). Entre los haplotipos exclusivos se detectaron grandes discontinuidades genéticas (mayores a 15 pasos mutacionales), incluso en la misma área (ver Anexo I y Fig. 2.5). Para analizar estos resultados podemos emplear las categorías filogeográficas propuestas por Avise et al. 1987, Avise 2000 (ver Capítulo 1). La categoría filogeográfica II de Avise (2000), propuesta para *D. buzzatii*, se caracteriza por grandes discontinuidades entre haplotipos así como entre los haplotipos compartidos por áreas. Este patrón se asemeja, sólo parcialmente a lo observado en *D. koepferae*, puesto que además se hallaron haplotipos exclusivos, particularidad no contemplada en esta categoría. Mientras que la categoría V contempla haplotipos compartidos y haplotipos exclusivos entre las áreas muestreadas, pero no grandes discontinuidades genéticas como las encontradas en nuestro estudio. Por lo tanto, el patrón filogeográfico hallado en *D. koepferae* parece corresponder a un patrón mixto entre las categorías II y V de Avise. Dado que las categorías propuestas por Avise son empíricas (1987, 1999, 2000), sobre la

resultados distintos entre ambas. En *D. buzzatii* la prueba de Tajima dio un valor negativo y significativo ($D_{TD_b} = -1,594$, $p=0,029$) mientras los estadísticos de Fu ($F_{S_{D_b}} = -1,943$, $p=0,401$), de Ramos-Onsins, ($R_2=0,0454$ [$p=0,06$]); y Harpending ($rg= 0,1021$ [$p=0,94$]) no fueron significativos. Los valores negativos de estos estadísticos indican un exceso de alelos en baja frecuencia (Fu 1997, Tajima 1989). D_T es un estadístico general y los resultados significativos del mismo pueden ser producto tanto de procesos selectivos como de factores demográficos. F_s (Fu 1997) y la prueba de Ramos-Onsins y Rozas (2002) permiten analizar con mayor profundidad los posibles efectos de los cambios poblacionales sobre los patrones de variación. F_s tiende a ser negativo cuando hay exceso de alelos raros, de modo que un valor significativo puede considerarse como evidencia de la no neutralidad de las mutaciones y el exceso de alelos raros como producto de expansiones poblacionales recientes. Si bien F_s no resultó significativo y R_2 tomó un valor que está en el límite de significación estadística, la prueba de D_T , junto con la configuración que adopta la red de haplotipos previamente descrita, apoya la idea de una expansión reciente en *D. buzzatii*. A su vez, los resultados de las pruebas de Tajima y Fu concuerdan con los obtenidos en el estudio de Santos (2011), que incluye poblaciones de Brasil y unas pocas de Argentina. En efecto, este autor observó valores negativos y significativos. En particular, los resultados de las pruebas de neutralidad son comparables con los que obtuvo Santos (2011) en las poblaciones de la región de Chaco (Tabla 2.13). Algo similar se ha informado para otras especies cactófilas como *D. pachea*, *D. mettleri* y *D. nigrospicurata* que habitan los desiertos de América del Norte de Hurtado (2004, Tabla 2.13).

Tabla 2.13. Análisis comparativo de los resultados de las pruebas de neutralidad de Fu (F_s) y Tajima (D_T) N: número de individuos analizados, D_T es el D de Tajima (1989), F_s de Fu (1997). *: Significativo al 0,05; ns: No significativo al 0,05

Especie	N	D_T	F_s	Autor (año)
<i>D. buzzatii</i> Dominio de Caatinga (Brasil)	132	-2,215 **	-28,67**	Santos (2011)
<i>D. buzzatii</i> Dominio de Chaco (Argentina)	19	-1,51 ns	-3,57**	Santos (2011)
<i>D. buzzatii</i> Dominio de Chaco (Argentina)	176	-1,59 *	-1,943 ns	Presente tesis
<i>D. koepferae</i> Dominio de Chaco (Argentina)	72	-1,57*	2,375 *	Presente tesis
<i>D. pachea</i>	203	-1,70	-11,63	Hurtado 2004
<i>D. mettleri</i>	117	-2,04	-8,92	Hurtado 2004
<i>D. nigrospicurata</i>	94	-2,26	-12,19	Hurtado 2004

Nuestros resultados (principalmente los valores negativos de las pruebas de neutralidad y la ausencia de un patrón de aislamiento por distancia) conjuntamente con datos previamente informados en la bibliografía (Rossi et al. 1996, Rodriguez et al. 2000, Piccinalli et al. 2004, 2007) sugieren que las poblaciones de *Drosophila buzzatii* estarían lejos del equilibrio deriva-mutación y que podrían haber tenido una expansión poblacional reciente. Por lo tanto, la baja estructuración global observada podría ser consecuencia no sólo de los actuales niveles de flujo génico sino también de la conectividad histórica entre poblaciones. En cambio, F_s fue positivo y no significativo ($F_{SDk} = 2,375$, $p > 0,05$), D_T negativo y no significativo ($D_{TDk} = -1,59637$, $p > 0,05$) y R_2 resultó no significativo ($R_2 = 0,0780$, $p = 0,24$) en *D. koepferae*.

Con respecto a las pruebas de mismatch distribution y al estadístico de Harpending, aunque son reconocidas pruebas para analizar eventos demográficos, en los casos aquí analizados sólo pueden ser empleados para inferir tendencias que permitan interpretar la historia evolutiva de estas especies, puesto que en ambos casos los valores obtenidos no fueron significativos.

A su vez, las historias demográficas descriptas para cada especie, son consistentes con estudios realizados en otros drosófilidos. Por ejemplo estudios realizados para *Drosophila mettleri* y *D. nigrospicula* utilizando alozimas y mtCOI muestran una estructuración poblacional muy pequeña o nula (Pfeiler y Markow 2011). No obstante, no todos los drosófilidos muestran este patrón, ya que se han identificado especies que evidencian estructura genética poblacional, como es el caso de las poblaciones peninsulares de las especies *D. nigrospiculata*, *D. mettleri* y *D. mojavenis* (Pfeiler y Markow 2011). Como ya se ha mencionado en el capítulo 1, en *D. buzzatii* y *D. koepferae* también se han estudiado varios genes nucleares. En el caso de α -esterasa-5 ($\alpha E5$) se ha observado que es más polimórfico para sitios no-sinónimos que para sitios sinónimos en *D. buzzatii*, mientras que en *D. koepferae* ocurre exactamente lo contrario (Piccinalli et al. 2007). Estos resultados son discutidos en virtud de que la variación estocástica puede producir grandes cambios en los niveles de variación nucleotídica (Piccinalli et al. 2007) sumado al hecho de que son consistentes con los estudios basados en los genes nucleares *Xdh* y $\alpha E5$ que muestran que *D. buzzatii* es dos veces más variable en sitios no-sinónimos, sinónimos y silenciosos que *D. koepferae* (Piccinalli et al. 2004, 2007). Estos resultados fueron atribuidos a posibles diferencias interespecíficas en el tamaño poblacional histórico o en el ambiente recombinacional en el que cada gen se encuentra, dada la

localización particular de cada gen respecto de las inversiones polimórficas que segregan en el cromosoma 2 que es donde mapean los loci mencionados (Piccinali et al. 2004, 2007). El gen $\alpha Est5$ se aparta de lo esperado por neutralidad y se propone que el peculiar patrón encontrado para este locus podría deberse a alguna forma de selección diversificadora en *D. buzzatii* (Piccinali et al. 2007). A su vez, Piccinali y colaboradores (2007) encontraron que *D. koepferae* está genéticamente estructurada para sitios silenciosos del gen $\alpha Est5$ y que las variaciones nucleotídicas están jerárquicamente estructuradas entre regiones filogeográficas. En un trabajo anterior, Piccinali y colaboradores (2004) encontraron una estructura similar en un estudio basado en el gen nuclear *Xdh* indicando que este patrón no es locus específico y que las poblaciones de *D. koepferae* se comportan como poblaciones semi-asiladas con flujo génico limitado. Podemos concluir, entonces, en base a los resultados obtenidos con los genes nucleares $\alpha Est5$, *Xdh* y otros y en haplotipos mitocondriales que sobre la base del estudio de estos marcadores, *D. buzzatii* no exhibe signos detectables de estructuración poblacional. Esta tesis aporta evidencias que apoyan la idea de que *D. buzzatii* no está estructurada genéticamente en Argentina, a diferencia de su especie hermana *D. koepferae* en la que se evidencian signos de estructuración poblacional. No obstante ello, para *D. buzzatii*, algunos marcadores moleculares ($\alpha Est5$), algunos loci aloenzimáticos (Rodríguez et al. 2000), el polimorfismo de inversión (Hasson et al. 1995, Rodríguez et al. 2000, Soto et al. 2010) y algunos caracteres cuantitativos (Fanara et al. 2006; Folguera et al. 2010; Soto et al. 2013) sí exhiben marcada estructuración poblacional compatible con la ocurrencia de fuertes presiones de selección diversificadora, que frecuentemente se observa en gradientes ambientales. Es sabido que no siempre los patrones filogenéticos que ofrece un gen determinan el camino que ha seguido efectivamente la especie a lo largo del tiempo, es por eso que para tener un panorama más completo se deberían realizar estudios comparativos con diferentes caracteres, en virtud de lo cual indagaremos en el siguiente capítulo la estructura genética de estas especies con marcadores moleculares de otra índole. Hasta el momento de la escritura de esta tesis la única publicación que presenta datos de secuencias de mtCOI de *D. koepferae* es la de Oliveira et al. (2012). Estos autores realizaron una reconstrucción de la filogenia de drosófilidos del grupo repleta. Así, la presente tesis es el primer trabajo que realiza un análisis de estructura poblacional de esta especie con el gen mitocondrial COI.

2.5 Conclusiones

- *Drosophila koepferae* es más variable en cuanto a la secuencia de COI que *D. buzzatii*
- Las distribuciones de haplotipos de las secuencias de COI en *Drosophila koepferae* y *D. buzzatii* difieren de manera estadísticamente significativa en tres aspectos principales, el número de haplotipos, la cantidad de haplotipos exclusivos por población y la frecuencia en la cual se encontraron los haplotipos compartidos. A saber:
 - El número de haplotipos encontrados y el número de haplotipos exclusivos por población para *Drosophila koepferae* fue mayor que en *D. buzzatii*.
 - En *Drosophila koepferae* los haplotipos más frecuentes no se encontraron representados en todas las poblaciones.
 - En *Drosophila buzzatii* el haplotipo más frecuente fue encontrado en más del 96% de las poblaciones muestreadas
- *Drosophila koepferae* muestra patrones de estructuración poblacional mientras que *D. buzzatii*, no.

► La estructura poblacional de *Drosophila koepferae* y *Drosophila buzzatii* utilizando marcadores moleculares de alta resolución (microsatélites).

Resumen del capítulo

Introducción: Los marcadores microsatélite son una herramienta efectiva para analizar la estructura genética poblacional. En este capítulo desarrollamos y probamos nuevos loci microsatélites especie específicos para investigar los niveles de estructuración poblacional de *Drosophila koepferae* y *D. buzzatii*.

Materiales y Métodos: Se desarrolló un conjunto de microsatélites especie específicos, se los caracterizó, y se eligió un subconjunto de 9 loci, que amplificaban adecuadamente en ambas especies. Se genotiparon 60 individuos de *Drosophila koepferae* y 156 de *D. buzzatii*. Se analizaron los datos utilizando análisis molecular de la varianza (AMOVA) y análisis bayesianos.

Resultados: Los 9 loci resultaron altamente variables en ambas especies, el número de alelos por locus varió en un rango de 7 a 16 en el estudio de caracterización preliminar en el que analizó una muestra limitada a una única población. El número de alelos por locus alcanzó valores de hasta 50 alelos en los estudios de estructura poblacional. Asimismo, se verificó que el grado de ligamiento entre loci no fuera significativo. Los valores de heterocigosidad en *Drosophila koepferae* variaron desde 0,7 a 0,9 para la esperada y desde 0,7 a 1 para la observada. Los valores de H_e y H_o para *D. buzzatii* variaron de 0,66 a 0,87 y 0,93 a 0,96. Los valores de los índices de fijación fueron $F_{SC}=0,071$, $F_{IT}=0,104$ para *D. koepferae*, y $F_{SC}=0,084$, $F_{IT}=0,173$ para *D. buzzatii*. El análisis de inferencia bayesiana mostró estructuración en *D. koepferae* y una muy leve estructuración en *D. buzzatii*.

Conclusiones: *Drosophila koepferae* es más variable que su especie gemela en cuanto a cantidad de alelos por locus en las poblaciones analizadas. En *D. buzzatii* se detectaron signos de una leve estructuración genético poblacional a diferencia de su especie hermana, que mostró signos más marcados de estructuración poblacional.

3.1 Introducción

Los microsatélites son secuencias de ADN conformadas por motivos cortos, de una longitud de entre 2 y 6 pares de bases (pb), los cuales se repiten consecutivamente una cantidad variable de veces. Son ampliamente utilizados en diversos tipos de investigaciones como: estudios de variación genética intra e interespecífica, análisis de linajes y de sistemas reproductivos, para estimar el tamaño poblacional efectivo, para determinar el origen de poblaciones e identificar el origen de individuos, así como también para definir unidades de manejo en conservación. Estas regiones genómicas pueden ser amplificadas a partir de un par de primers (cebadores) específicos con secuencias complementarias a las secuencias únicas que flanquean al microsatélite. Los segmentos amplificados a partir de estos sitios presentan, en general, polimorfismos que resultan de la variación en el número de repeticiones de motivos simples. Así, cada “isla” de microsatélite, independientemente del elemento repetido (p.e: CA, TG, ATG) constituye un locus génico, altamente variable, multialélico y de gran contenido informativo. Es decir, cada segmento amplificado de tamaño diferente (generalmente de varias decenas hasta algunas centenas de pares de bases) representa un alelo diferente del mismo locus. Esta variación en el número de veces que se repite el motivo es la causa de su alto polimorfismo.

Los microsatélites constituyen, desde hace algunos años, unos de los marcadores moleculares más utilizados en estudios de estructura poblacional. Aunque su función en el genoma no está clara, en general se asume que son marcadores neutrales desde el punto de vista de la selección natural. Sin embargo, si un microsatélite particular se encuentra ligado (por proximidad física en el genoma) a un locus bajo selección entonces podrá exhibir patrones de variación incompatibles con las expectativas bajo neutralidad (Goldstein y Schlötterer 1999, Avise 2004). Existe evidencia, además, de que algunos microsatélites podrían tener influencia sobre la organización de la cromatina, la regulación del metabolismo del ADN (replicación, recombinación, etc) o la regulación de la actividad génica, por lo que al menos en microsatélites implicados en estas funciones, la variación podría exhibir patrones de variación incompatibles con neutralidad (Li et al. 2004). Otras características de estos marcadores moleculares son que los loci microsatélites parecen somáticamente estables, son codominantes, es decir que pueden detectarse ambos alelos de un individuo heterocigótico y a nivel poblacional y

discriminarse todos los alelos de cada locus. Además, al ser marcadores nucleares aportan información sobre el flujo génico más reciente (a diferencia del ADNmt que aporta información sobre el flujo génico histórico) por lo cual se usan ampliamente en genética de poblaciones y genética evolutiva (Goldstein y Schlötterer 1999).

El genotipado de cada locus de microsatélite consiste en realizar una amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando primers específicos y posterior determinación del tamaño de los productos de PCR por electroforesis de alta resolución. Para lo cual se necesitan primers especie específicos o de alguna especie cercana. Si bien el trabajo con microsatélites tiene muchas ventajas, la mayor dificultad radica en su desarrollo de novo.

Para llevar adelante este estudio se utilizaron microsatélites especie específicos. Luego de que se realizara la caracterización de todos los loci disponibles se eligió un grupo para el estudio de la estructura poblacional de ambas especies que es el objetivo de la presente tesis.

Hay evidencias, basadas en estudios previos, que señalan la escasa estructuración de *Drosophila buzzatti* en el territorio argentino (Rossi et al. 1996), en contraste con lo que ocurre con su especie hermana *D. koepferae* (Piccinalli et al. 2004, 2007). En el capítulo anterior analizamos la estructuración poblacional de estas dos especies utilizando el marcador mitocondrial COI. Bajo los mismos argumentos expuestos con anterioridad y teniendo en cuenta que los marcadores moleculares microsatélites tienen una alta resolución es que se llevó adelante esta parte de la investigación. Las hipótesis con las que se trabajó fueron las siguientes:

- 1- La variación alélica en loci microsatélites revela patrones de estructuración poblacional en *Drosophila koepferae*.
- 2- *Drosophila buzzatii* no muestra diferenciación interpoblacional en las frecuencias alélicas de los diferentes loci de los marcadores nucleares utilizados.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1- Construcción de una biblioteca enriquecida en microsatélites

Se extrajo el ADN genómico de ejemplares de *D.koepferae* y *D. buzzatii* utilizando el Kit comercial Gentra Puregene Systems® (ver Materiales y Métodos, Capítulo 2). El ADN extraído se utilizó para construir 2 bibliotecas genómicas, una por cada especie, enriquecidas con secuencias de microsatélites según el protocolo de Hamilton et al. (1999). El primer paso de este protocolo consiste en la digestión de 50ng de ADN genómico con 100U de cada una de las enzimas de restricción NheI y AluI. Posteriormente los fragmentos resultantes fueron ligados con adaptadores. La librería fue enriquecida en secuencias con repeticiones de dinucleótidos usando oligonucleótidos biotinilados (CA)₁₅ o (GA)₁₅ (en dos conjuntos de reacciones independientes) como sondas que fueron adheridas a partículas paramagnéticas (Streptavidin MagneSphere, Promega) de acuerdo a la instrucciones del fabricante. Se amplificaron por PCR las fracciones enriquecidas en secuencias que contenían microsatélites usando los primers complementarios a los adaptadores específicos, los cuales se ligaron al vector pGEM-T (Promega). Los fragmentos fueron clonados transformando bacterias *Escherichia coli*, cepa XL-1 Blue. Las células transformadas se cultivaron en placas de agar conteniendo ampicilina (100 µg/ml), galactosidasa (50 µg/ml) y 30 µl de isopropil b-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) (20 mg/ml). Se seleccionaron las colonias blancas (aquellas que contenían el vector con inserto) y se conservaron a -80°C. Los plásmidos de estas colonias se purificaron y se secuenciaron los clones positivos, luego de lo cual se diseñaron los primers (Fig. 3.1).

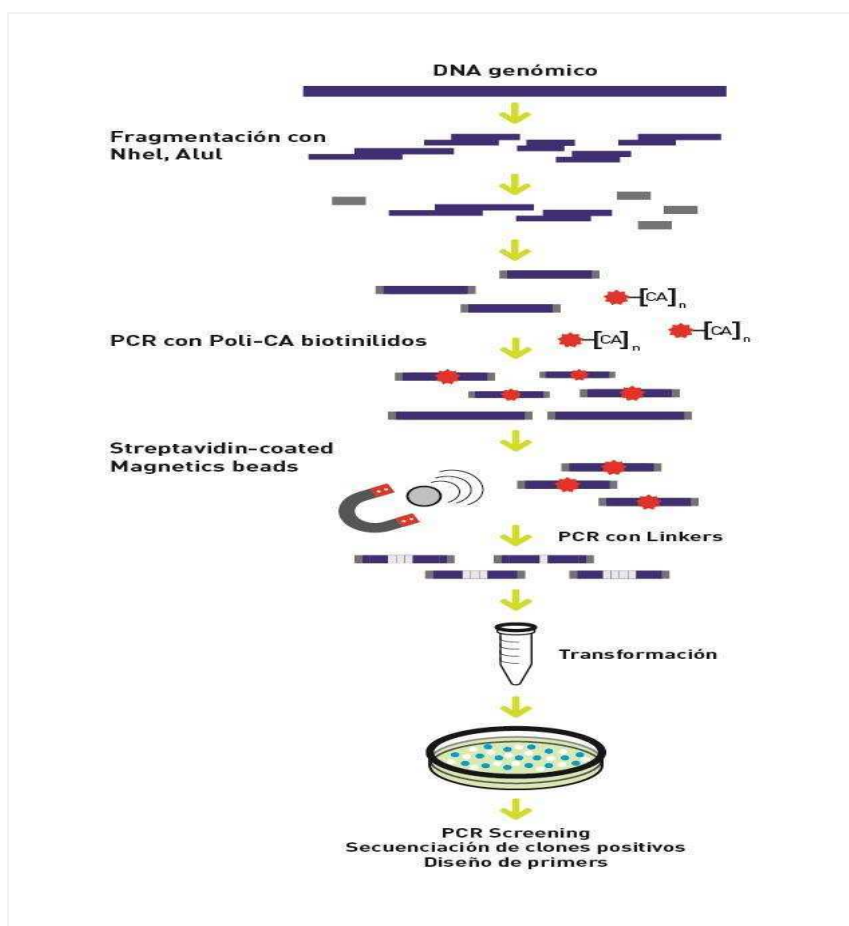


Figura 6: Esquema del protocolo seguido para la obtención de una biblioteca de microsatélites a partir de ADN genómico y el diseño de primers. Se utilizó el mismo protocolo para ambas especies (Hamilton 1999).

Los resultados de las secuenciaciones fueron visualizados y analizados con el programa “BioEdit sequence alignment editor” (Hall 1999). Las secuencias forward y reverse fueron alineadas para chequear los resultados y resolver ambigüedades. Se excluyeron las secuencias que no contenían microsatélites o con microsatélites demasiado cerca del final de la secuencia como para permitir el diseño de primers. Luego se identificaron las secuencias repetitivas simples (SSRs) y se diseñaron primers específicos para cada locus. Este protocolo fue realizado para cada especie por separado.

3.2.2- Caracterización de los *loci* microsatélites

En una primera instancia, previamente a su caracterización, se probó si los primers diseñados permitían la amplificación del producto esperado. Luego de lo cual se eligió un grupo de loci para los estudios de estructuración poblacional.

A continuación se detalla la metodología para la amplificación de los microsatélites y los criterios para la elección de los loci que se utilizaron en el análisis de estructura poblacional de cada especie. Uno de los primers de cada locus se marcó con uno de tres fluorocromos: HEX, 6-FAM o NED. Las PCRs se llevaron a cabo en un volumen total de 15 μ l conteniendo los siguientes componentes: 1,2 μ L de ADN templado (50 μ g/ml), 0,06 μ L de Taq polimerasa (Invitrogen), 1,5 μ l \times buffer Taq polimerasa, 0.2 mM de cada dNTP, 0.3 mM de cada primer y 2.5 mM MgCl₂. Las PCRs se realizaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) usando el siguiente programa: 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, la temperatura de asociación específica del primer (T_a) por 30 segundos, y 72°C por 30 segundos, y un paso de extensión final de 3 minutos a 72°C. Los genotipos se determinaron utilizando el servicio de Genescan de Macrogen (Korea) y se visualizaron con el programa GeneMapper® (Applied Biosystems).

Es conocido que durante el proceso de identificación y aislamiento de los primers mediante la reacción de PCR pueden ocurrir diferentes errores: 1- Alelos nulos, donde uno o más alelos no son amplificados, 2- Tartamudeo (stuttering), ligeros cambios que se producen en el tamaño de los alelos durante la reacción de PCR, 3- Pérdida de alelos grandes, los alelos de mayor longitud tienen riesgo de no amplificar con igual eficiencia que los de tamaño más pequeño. Para ayudar a detectar estos posibles errores en la interpretación de los datos de los microsatélites se utilizó el programa MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Este programa usa simulaciones basadas en la cadena de Montecarlo (bootstrap) y calcula las frecuencias alélicas esperadas y la de presuntos alelos nulos bajo equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Al optimizar las condiciones de PCR se pudieron obtener productos satisfactorios de 9 loci que amplificaban en ambas especies, 4 aislados a partir de ADN genómico de *Drosophila buzzatii* y 5 de *D. koepferae*.

3.2.3- Análisis de datos

El programa Arlequin v3.15 (Excoffier et al. 2006) se utilizó para calcular las heterocigosis observada y la esperada (H_o y H_e respectivamente) y para realizar los tests de bondad de ajuste a las proporciones esperadas bajo el Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada locus y de desequilibrio de ligamiento entre loci. Durante la puesta a punto se evaluaron los niveles de polimorfismo para los 9 loci en una muestra de 24 individuos capturados en la localidad de Valle Fértil (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Caracterización de 9 loci de microsatélites aislados a partir de ADN genómico de *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*. Ta: temperatura de asociación (°C). En el nombre del locus se indica si se obtuvo a partir de ADN genómico de *D. buzzatii* (B) o de *D. koepferae* (K).

Locus	Motivo de repetición	Rango de tamaño	Secuencia del cebador (5' - 3')	Ta °C
K-76 (P1DK)	(TG) ₁₀	106-238	F: TTAACAGACAAGTCGATGCCGCTTC R: CGATCTCAAATGCAAGCACTACCTG	58
B-63 (P2DB)	(GT) ₁₃	100-242	F: GCACAATTTCGAATATAATCACAAAGG R: TTCGATAAGCGGCCCAACAATTATTG	54
B-55 (P3DB)	(AC) ₁₄	124-208	F: CCGGATGAACTGTCCAATAGATTAC R: AAGTTCCACTCGCATTTCGCTACATC	58
K-60 (P4DK)	(CA) ₅	142-201	F: CAACCATTGCCATTTTCATCTTACTGC R: AAGACAATCCAGCTTTCTATATGGCG	56
B-65 (P6DB)	(GT) ₁₉	104-194	F: GAATTGTGGCCAAGTTTCGTAGAATC R: CTGCCACTAGTGAAGTATCAACAATG	56
K-75 (P7DK)	(AC) ₁₅	104-242	F: TGCCCTGAATACCAGGAGCATAAT R: ATAGGCAAACAGAGCGGCAAATAAC	56
B-60 (P9DB)	(CA) ₁₁	142-201	F: CCAGGTCCGTTACTCGCATTG R: AGCACTTACACGAATAGGCAGC	56
K-66 (P10DK)	(GT) ₉	100-238	F: CTGGGTCAGCACAGCTGAGAAC R: CGCACACTCGAAACACTCTCGC	59
K-72 (P11DK)	(GT) ₁₀	114-252	F: CAAATGACCAGAGGGAAGCGG G R: CGCCGAGGCACAGGAGCTGTT G	59

Posteriormente, para el estudio de estructura poblacional se calcularon: el número de alelos, el rango de tamaño de los alelos, la heterocigosis observada y esperada, los tests de ajuste al Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y de desequilibrio de ligamiento para cada combinación de población y locus con el programa Arlequin v3.15 (Excoffier et al.

2006). El programa SGoF se utilizó para realizar las pruebas de corrección por comparaciones múltiples en el caso que fuera necesario y alternativamente se utilizó la corrección de Bonferroni. Esta es una herramienta útil para ajustar los resultados de las pruebas estadísticas en el caso de comparaciones múltiples. Se calcula un α corregido (α_c) como el cociente entre el valor α y el número de comparaciones a realizar. El intervalo de confianza del 95% de la heterocigosis esperada para cada población se calculó utilizando el paquete PopGenKit de R.

3.2.4 Recolección de muestras

Para realizar este estudio se utilizaron ejemplares colectados en las mismas localidades que en el estudio con mtCOI, pero diferentes individuos. La recolección de muestras se llevó adelante durante los veranos de 2007 a 2010. Los ejemplares de *Drosophila koepferae* se colectaron en las localidades de: Brealito (BRE), Ruinas de Quilmes (RUI), Suyuque (SUY), Valle Fértil (VFK) y Miranda (MIR). Las localidades de Brealito y Ruinas de Quilmes se encuentran en la región denominada Monte norte, Miranda y Suyuque en la región fitogeográfica denominada Monte sur. Valle Fértil se encuentra en el Chaco serrano (ver Materiales y Métodos del Capítulo 2). Los ejemplares de *D. buzzatii* se colectaron en las siguientes localidades: 1-Vipos (VIP), 2-Villa Mazán (MZ), 3-Tilcara (TIL), 4-Valle Fértil (VFB), 5-Cadillal (CAD), 6-Villa de Soto (VS), 7- Ingeniero Juárez (JUA), 8-Ensenada (ENS), 9-Cruz del Eje (CRUZ), 10- Montecarlo (MON), 11- Las Lomitas (LOM), 12- Palo Santo (PS). 13-Güemes (GUE) (ver Materiales y Métodos del Capítulo 2). Las localidades de Las Lomitas y Palo Santo se encuentran en la región denominada Chaco distrito oriental e Ingeniero Juarez en la región Chaco distrito occidental. Las localidades de Güemes, Vipos, Cadillal, Villa de Soto, Cruz del Eje y Valle Fértil en la región denominada Chaco serrano. En la región de la Prepuna se encuentra Tilcara, y en Monte sur se encuentran Lavalle y Mazán, Ensenada en el Espinal y Montecarlo en la Selva misionera.

3.2.5- Obtención de datos

Luego de finalizada la caracterización de todos los microsatélites se eligieron los 9 que produjeron patrones de amplificación más reproducibles. Estos se amplificaron en al menos 12 individuos de cada localidad. Esto sumó un total de 60 individuos de *D. koepferae* y 156 de *D. buzzatii*.

La amplificación de los 9 microsatélites en las 5 poblaciones de *Drosophila koepferae* y en las 13 poblaciones de *D. buzzatii* se realizó utilizando el mismo protocolo mediante el cual se caracterizaron los microsatélites en la etapa de puesta a punto. Se realizó una reacción por locus y por individuo en cada tubo de reacción de PCR, y luego se enviaron los productos para la genotipificación a MacroGen (Korea). Para visualizar los microsatélites se utilizó el programa GeneMapper® (Applied Biosystems) y los errores de genotipado y alelos nulos fueron evaluados con el programa Microchecker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Este método asume que las desviaciones respecto del EHW son producto del efecto Wahlund. Se estimó la frecuencia potencial de alelos nulos siguiendo el método de Brookfield (Van Oosterhout et al. 2004). Una vez obtenida la matriz de datos de cada especie con el tamaño de los alelos por individuo y por población (Anexo II), se procedió al análisis de los datos.

3.2.6 - Variación genética molecular

El programa Arlequín v3.5.1.3 (Excoffier et al. 2009) se utilizó para calcular el número de alelos, la heterocigosis observada (H_o) y la esperada (H_e), los tests de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), de desequilibrio de ligamiento. También con Arlequin se obtuvo el índice Garza-Williamson (2001) ($GW=k/(R+1)$), que es el cociente entre el número de alelos de un locus (k) y el rango de tamaño de los alelos (R). GW es sensible al tamaño poblacional, dado que el rango de variación del tamaño de los alelos (es decir el número mínimo y máximo en el cual se encuentran los alelos de microsatélites) tiende a ser mayor que el número de alelos en poblaciones que han disminuido su tamaño recientemente. Por esto la distribución del tamaño de los alelos puede tener “sitios libres”. Se espera que el índice GW sea muy pequeño en poblaciones que han sufrido un cuello de botella reciente y cercana a 1 en poblaciones estacionarias. Se realizaron las correcciones múltiples con el método de Bonferroni (1936).

3.2.7- Diferenciación interpoblacional

Se calculó la distancia genética D_A de Nei entre pares de poblaciones de *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*. Se construyeron dendogramas utilizando los métodos Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei 1987) y UPGMA con los programas Poptree2 (Takezaki et al. 2010) y con Genetree (Balding et al. 1994, Griffiths 1994).

El estimador de distancia genética D_A propuesto por Nei (Nei et al. 1983) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$D_A = 1 - \frac{1}{r} \sum_j^r \sum_i^{m_j} \sqrt{x_{ij}y_{ij}}$$

Donde x_{ij} e y_{ij} son las frecuencias del alelo i -th en el locus j -th de las poblaciones X e Y respectivamente, m_j es el número de alelos del locus j -th, y r es el número de loci usados. Según Takezaki y Nei (1996, 2008) D_A es el estimador de distancia genética más eficiente para obtener la correcta topología del árbol con datos de microsatélites.

3.2.8- Variación genética geográfica

3.2.8.1 Análisis jerárquico de la varianza molecular

Con el objeto de estudiar la contribución de los diferentes componentes de la variación molecular intra e interpoblacional se realizó un análisis jerárquico de la varianza molecular (Hierarchical Analysis of Molecular variance = AMOVA) cuya validación estadística se realizó en base a 1.023 permutaciones (Excoffier et al. 1992). El AMOVA consiste en el análisis de la correlación dentro y entre subpoblaciones, equiparándose al análisis de diversidad haplotípica (es decir a la correlación entre haplotipos que provienen del mismo o de distintos demos) utilizando medidas de distancia genética. Esto implica que, en lugar de utilizar la correlación de alelos en un único locus, se utiliza la correlación de múltiples alelos provenientes de varios loci. Para este análisis se consideraron 3 niveles de estructuración jerárquica: las regiones fitogeográficas (T), las poblaciones (S) dentro de regiones y los individuos dentro de poblaciones (I). Para la realización de los AMOVA, el cálculo de los índices de fijación (Weir y Cockerham 1984) entre pares de poblaciones y su significación estadística (que se evaluó mediante pruebas de permutación) se utilizó el programa Arlequín (Excoffier y Lischer 2011). Este análisis, además, entregó los componentes de varianza sobre la base del coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (F_{ST}), el coeficiente de endogamia específico de cada población (F_{IS}) y el coeficiente de endogamia global (F_{IT}) (Excoffier et al. 1992). La prueba de diferenciación entre poblaciones contra la hipótesis nula de uniformidad genética se corrigió por el método secuencial de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1995) basado en 1000 permutaciones de genotipos multilocus entre pares de poblaciones utilizando el programa Arlequín (Excoffier et al. 2003, 2006, 2009).

Para determinar los niveles de diferenciación genética entre pares de poblaciones, se utilizó primero el índice de fijación F_{ST} . Este parámetro se basa en la diferencia entre la heterocigosis esperada total (agrupando a todos los individuos de todas las poblaciones) y la heterocigosis promedio esperada por población. Esta diferencia es relativizada a la heterocigosis esperada total de forma que si el valor de F_{ST} es igual a cero implica que las poblaciones no están diferenciadas, o en otras palabras que sus frecuencias alélicas son prácticamente iguales. En cambio, F_{ST} es igual a uno si en las poblaciones se han fijado diferentes alelos. Así, el parámetro F_{ST} determina el grado de subdivisión genética de la población total (Freeland 2005). Es decir, que F_{ST} mide el efecto de la subdivisión poblacional a través de la reducción de la heterocigosis total debida a la deriva genética en poblaciones con flujo génico reducido. Asimismo, se estimaron los valores del índice F_{IS} (que se basa en la diferencia entre la heterocigosis esperada y observada dentro de cada demo) como medida de la endogamia específica para cada población, F_{IT} (coeficiente de endogamia total) que incluye la contribución debida, por un lado al apareamiento no al azar debido a la estructuración en subpoblaciones (F_{IS}) y por otro, a la contribución debida a la subdivisión de la misma (F_{ST}). De este modo, F_{IT} mide la discrepancia de la heterocigosis esperada considerando a todas las subpoblaciones en conjunto respecto de la heterocigosis promedio dentro de cada subpoblación. Los índices de endogamia se calculan del siguiente modo:

$$F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S; F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T \text{ y } F_{IT} = (H_T - H_I) / H_T,$$

donde: H_I es la heterocigosis observada promediada entre las subpoblaciones, H_S es la heterocigosis esperada promedio en cada subpoblación equivalente y H_T es la heterocigosis esperada en la población total con apareamiento al azar.

Además, se realizaron análisis de correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas entre pares de poblaciones para evaluar el ajuste de la divergencia genética entre las poblaciones a un modelo de aislamiento por distancia (IBD) mediante el Test de Mantel (Mantel 1967). En estos análisis se utilizaron la matriz de valores de F_{ST} entre pares de poblaciones y la matriz de distancias geográficas medidas en Km lineales entre pares de poblaciones. Estas pruebas se realizaron con el programa Arlequín (Excoffier et al. 2009)

3.2.8.2 Análisis de inferencia bayesiana

La estructuración poblacional se exploró, también, mediante el método bayesiano de clusters propuesto por Pritchard et al. (2000) e implementado en el software Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2007, Hubisz et al. 2009). Este método consiste en asumir la existencia de un número k de clusters (grupos) cada uno caracterizado por un determinado conjunto de frecuencias alélicas en cada locus. Los individuos son luego asignados probabilísticamente a un cluster o a una mezcla de clusters si sus genotipos indican una ancestralidad mixta. Los análisis se llevaron a cabo para valores de k entre 1 y 5 para *Drosophila koepferae* y entre 1 y 13 para *D. buzzatii*. Se utilizó un modelo con el siguiente conjunto de parámetros:

- 1) Ancestralidad mixta (Admixture model). Asume que cada individuo pudo haber heredado una fracción de su genoma de ancestros de cada uno de los k clusters.
- 2) Información de muestreo (Locprior model) (Hubisz et al. 2009). Utiliza como información a priori los lugares de procedencia de las muestras para asistir la detección de estructura cuando la señal de diferenciación es muy débil.
- 3) Frecuencias alélicas correlacionadas (Correlated allele frequencies model). Asume que las frecuencias alélicas en los distintos clusters derivan de una misma población ancestral.
- 4) Modelo con alelos recesivos (Falush et al. 2007). Asume la existencia de alelos recesivos (o nulos) en los loci indicados por el usuario.

Los autores del programa sugieren el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas para poblaciones con baja diferenciación.

Se realizaron 6 corridas independientes para cada valor de k . Para *Drosophila koepferae* fueron un total de 30 corridas y 78 para *D. buzzatii*. Análisis preliminares mostraron que un descarte inicial (burn-in) de 50.000 iteraciones es suficiente para alcanzar la zona de convergencia, luego de las cuales se realizaron 100.000 iteraciones adicionales para obtener las estimaciones finales. El valor correcto de k fue estimado realizando una inspección visual de las réplicas (Evanno et al. 2005).

3.3 Resultados

Ninguno de los loci seleccionados para este trabajo tiene similitud estadísticamente significativa con primers de loci de microsatélites publicados en los estudios de Barker et al. (2002, 2009) en el caso de *Drosophila buzzatii*; en tanto que para *D. koepferae* es la primera vez que se caracterizan loci de microsatélites hasta la fecha de la escritura de esta tesis.

3.3.1- Caracterización preliminar de los microsatélites

En la Tabla 3.2 se muestra la cantidad de alelos encontrados en la caracterización preliminar de los loci, junto con la H_o y la H_e promedio calculada para la muestra de Valle Fértil. El número de alelos por locus varió en un rango de 7 a 16. Los valores de H_e variaron entre 0,7 y 0,9, mientras que la H_o entre 0,7 y 1. Las pruebas de probabilidad exacta de ajuste a Hardy-Weinberg (HW) rechazaron la hipótesis nula de equilibrio en un solo locus (K-76) ($p < 0,05$).

Tabla 14: Caracterización de 9 loci polimórficos de microsatélites de *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*. **N°A:** número de alelos, **He.** Heterocigosis esperada, **Ho:** heterocigosis observada. En el nombre del locus se indica si es original de *D.buzzatii* (DB) o de *D. Koepferae* (DK). La muestra corresponde a 24 ejemplares de *D. koepferae* de la localidad de Valle Fértil, Provincia de San Juan. Entre paréntesis figura el nombre del locus que se utilizará como referencia a lo largo del trabajo.

Locus	N°A	Ho	He	Valor de p (EHW)
1-K-76 (P1DK)	10	0,75000	0,90580	0,03550
2-B-63 (P2DB)	12	0,75000	0,87681	0,05583
3-B-55 (P3DB)	7	1,00000	0,85145	0,07971
4-K-60 (P4DK)	11	1,00000	0,92391	0,85661
5-B-65 (P6DB)	9	0,66667	0,86594	0,05953
6-K-75 (P7DK)	16	1,00000	0,96377	1,00000
7-B-60 (P9DB)	8	0,83333	0,85507	0,15109
8-K-66 (P10DK)	10	0,58333	0,70652	0,29041
9-K-72 (P11DK)	6	0,91667	0,78623	0,49595

3.3.2- Variabilidad genética y Desequilibrio de Ligamiento

Luego se procedió a realizar el genotipado de 12 individuos de cada una de las poblaciones de *Drosophila buzzatti* y de *D. koepferae* muestreadas para este trabajo. Se genotiparon 60 individuos de *D. koepferae* y 156 de *D. buzzatii* para los 9 loci. El número de alelos fue muy elevado y varió entre especies. Los loci p7k y p1k mostraron niveles de variación equivalente en ambas especies; p2k, p3b, p4k y p9b presentaron menor variación en *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. El locus p4k fue 64% menos variable en *D. buzzatii* que en *D. koepferae* y ésta fue la máxima diferencia hallada entre especies. La menor diferencia entre especies fue en el locus p7k para el que *D. buzzatii* mostró un 8% menos de variación que *D. koepferae*. Los loci p10k y p11k fueron un 10% y un 22% más variables en *D. buzzatii* que en *D. koepferae*, resultado que va en la dirección opuesta a la tendencia general que muestra que *D. koepferae* es, en promedio, más variable que *D. buzzatii*. Es importante remarcar que las diferencias de variabilidad entre especies no parecen estar relacionadas con la especie de la que fue aislado cada microsatélite. El locus que mayor variabilidad mostró en la muestra total de 60 individuos de *D. koepferae* fue p4k, para el que se encontraron 40 alelos, en tanto que el menos variable fue p1k con 16 alelos. En la muestra global de *D. buzzatii* el locus para el que se detectaron más alelos fue p11k con 50 alelos en tanto que los loci con menor cantidad de alelos fueron p4k y p6k con 32 y 33 alelos, respectivamente.

Drosophila koepferae

El número total de alelos en *Drosophila koepferae*, varió entre 16 alelos en el locus p1k hasta un máximo de 40 en p4k. En el locus p1k la población de Suyuque fue la que menos alelos presentó (4), en cambio esta misma población fue la que más alelos presentó en p4k (12). Estos loci son altamente variables llegándose a encontrar hasta 13 alelos por población por ejemplo en Suyuque (Tabla 3.3). La cantidad de alelos exclusivos por población varió entre 17 y 38, siendo las poblaciones de Miranda y de Brealito en las que se encontró el mayor número de alelos exclusivos (Tabla 3.3). La heterocigosis observada (promediada entre localidades) varió, según el locus, entre 0.733 y 0.950 mientras que la esperada bajo el EHW varió entre 0,896 y 0.970 (Tabla 3.4). El índice GW por locus reveló que *D. koepferae* no es, globalmente, una población estacionaria, dado que el valor del índice en todos los casos es pequeño y más cercano a 0 que a 1 (Tabla 3.4). El mismo

patrón se observó tomando a cada una de las poblaciones como una sola unidad. Es importante tener en consideración que este índice es sensible al tamaño muestral y que en este caso la muestra total de individuos fue de 60 (12 individuos x 5 poblaciones).

La Fig. 3.2 muestra las diferencias entre la heterocigosis esperada y la observada. En la misma se observa que en Ruinas de Quilmes y Brealito hay una deficiencia de heterocigotas en p11k, mientras que para el mismo locus se observa un exceso de heterocigotas en Suyuque, Valle Fértil y Miranda. Para el locus p10k se observa un exceso de heterocigotas en las poblaciones de Valle Fértil y Miranda, en tanto que para p9b hay un marcado exceso de heterocigotas en Suyuque y más moderado en Ruinas de Quilmes y Brealito. En Miranda, Suyuque y Valle Fértil se observa un exceso de heterocigotas en el locus p7k y en p6b en Suyuque y Ruinas de Quilmes. Estas dos junto con Brealito presentan un leve exceso de heterocigotas en el locus p4k. Para el locus p3b salvo Suyuque las demás poblaciones presentan un exceso moderado de heterocigotas. A su vez Brealito y Suyuque presentan un mayor exceso de heterocigotas que Ruinas de Quilmes y Valle Fértil en p2k. Finalmente, para el locus p1k hay un leve exceso de heterocigotas en Valle Fértil y Miranda. En conclusión, no parece haber, globalmente, una tendencia marcada hacia exceso o defecto de heterocigotas, sino que esto parece depender de cada locus microsatélite particular.

Las pruebas de bondad de ajuste a lo esperado bajo el EHW, evaluando cada población y cada locus por separado, fueron significativas sólo en 6 de las 45 pruebas realizadas (9 loci x 5 poblaciones, Tabla 3.5 y 3.6). La prueba de desequilibrio por ligamiento (DL) detectó 11 desvíos significativos ($p < 0,05$) sobre un total de 180 tests (6,1%). Sin embargo, sólo p2K y p4K en Suyuque continuaron mostrando una asociación estadísticamente significativa luego de aplicar la corrección de Bonferroni (Tabla 3.6 y 3.7).

Tabla 3.3: Número de alelos totales por locus y por población y entre paréntesis número de alelos exclusivos por locus y por población en *Drosophila koepferae*. En la última fila se muestra la cantidad de alelos exclusivos en cada población.

<i>Drosophila koepferae</i>										
N° alelos totales (N° de alelos exclusivos)										
	1-P1k	2-P2b	3-P3b	4-P4k	5-P6b	6-P7k	7-P9b	8-P10k	9-P11k	Total
Brealito	6 (2)	6 (3)	12 (6)	7 (9)	5 (2)	4 (1)	12 (3)	7 (6)	10 (6)	(38)
Ruinas Quilmes	7 (3)	10 (3)	11 (2)	9 (6)	6 (1)	9 (3)	8 (2)	5 (0)	6 (0)	(17)
Suyuque	4 (0)	10 (2)	13 (6)	12 (3)	10 (2)	10 (3)	4 (0)	9 (2)	9 (2)	(20)
Valle Fértil	6 (1)	7 (0)	12 (2)	10 (7)	8 (1)	8 (1)	10 (2)	7 (2)	6 (2)	(18)
Miranda	7 (1)	14 (10)	11 (1)	9 (9)	10 (5)	7 (4)	11 (2)	7 (2)	8 (2)	(36)

Tabla 3.4: Heterocigosis observada y esperada (Ho, He) por locus y por población de *Drosophila koepferae*.

<i>Drosophila koepferae</i>										
Locus	Brealito		Ruinas de Quilmes		Suyuque		Valle Fértil		Miranda	
	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
P1k	0,833	0,818	0,666	0,768	0,750	0,757	0,833	0,818	0,750	0,855
P2k	1,000	0,807	0,916	0,891	1,000	0,884	0,833	0,804	0,833	0,927
P3b	0,916	0,865	0,916	0,913	0,916	0,942	1,000	0,931	1,000	0,884
P4k	0,833	0,815	0,916	0,873	0,833	0,902	0,833	0,905	0,916	0,851
P6b	0,333	0,528	0,750	0,728	0,916	0,902	0,833	0,869	0,833	0,902
P7k	0,500	0,692	0,833	0,855	0,916	0,880	0,833	0,822	1,000	0,862
P9b	1,000	0,909	0,916	0,858	1,00	0,677	0,750	0,826	0,916	0,920
P10k	0,583	0,826	0,666	0,800	0,750	0,807	0,833	0,807	0,916	0,880
P11k	0,666	0,876	0,666	0,855	0,916	0,800	0,916	0,800	0,916	0,840

Tabla 3.5: Heterocigosis observada (Ho) y esperada (He), número de alelos, rango de tamaño de los alelos e índice de Garza-Willamson (GW) por locus en las 5 poblaciones de *Drosophila koepferae* estudiadas.

<i>Drosophila koepferae</i>					
Locus	Ho	He	N° de alelos	Rango de alelos	GW
P1k	0,76667	0,89678	16	36	0,43243
P2k	0,91667	0,91653	23	136	0,16788
P3b	0,95000	0,95518	39	128	0,30233
P4k	0,86667	0,97017	40	132	0,30075
P6b	0,73333	0,86148	21	88	0,23596
P7k	0,81667	0,92787	25	122	0,20325
P9b	0,91667	0,90392	24	122	0,19512
P10k	0,75000	0,92577	24	120	0,19835
P11k	0,81667	0,91975	17	34	0,48571

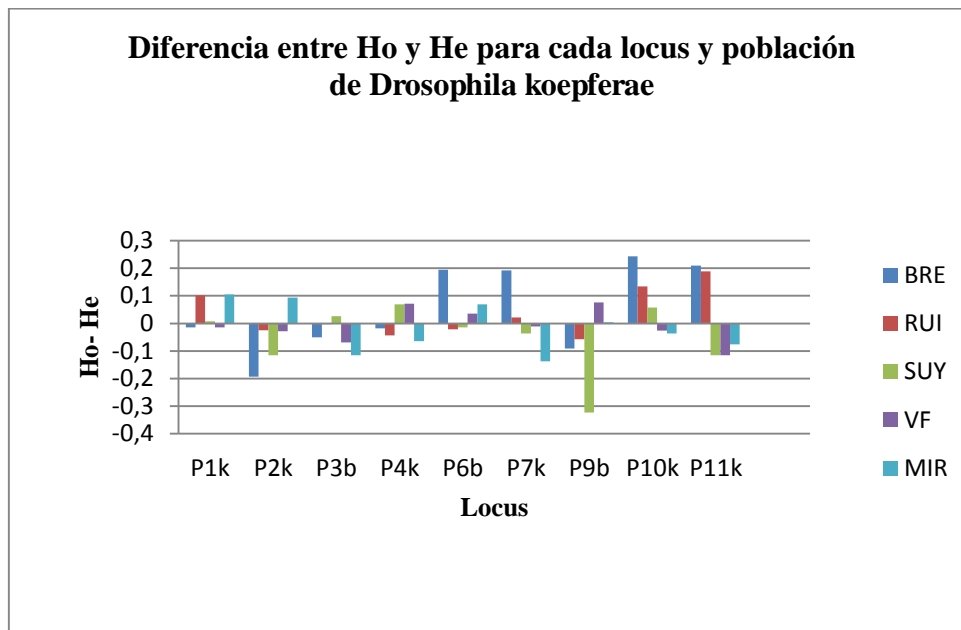


Figura 3.2: Diferencias entre heterocigosis observada (Ho) y la Heterocigosis esperada (He) por locus y población de *Drosophila koepferae*. Abreviaturas: RUI: Ruinas de Quilmes, BRE: Brealito, SUY: Suyuque, VF: Valle Fértil, MIR: Miranda.

Tabla 3.6: Valores de p obtenidos mediante el test de permutaciones para estudiar desvíos significativos respecto del EHW. Se indica con un asterisco los valores significativos ($p < 0,05$), y en con dos asteriscos los valores que continúan siendo estadísticamente significativos luego de aplicar la corrección de Bonferroni ($\alpha_B = \alpha/9 = 0,005$; $p < 0,005$).

Drosophila koepferae					
	Valor p (EHW)				
Locus	Brealito	Ruinas de Quilmes	Suyuque	Valle Fértil	Miranda
1- P1k	0,007 *	0,127	0,001 **	0,576	0,129
2- P2k	0,003 *	0,086	0,514	0,000 **	0,141
3- P3b	0,888	0,913	0,714	0,135	0,514
4- P4k	0,281	0,873	0,004 *	0,122	0,370
5- P6b	0,044 *	0,728	0,962	0,002 **	0,754
6- P7k	0,371	0,855	0,146	0,025 *	0,004 **
7- P9b	0,101	0,858	0,009 *	0,001 **	0,201
8- P10k	0,134	0,800	0,269	0,438	0,001 **
9- P11k	0,107	0,855	0,702	0,238	0,406

Tabla 3.7: Se indican los valores de p obtenidos mediante el test de permutaciones y la corrección secuencial de Bonferroni. Se muestran los pares de loci ligados según la comparación realizada. Entre paréntesis la pareja de loci probada para la población. Se han renombrado los locus según la siguiente asignación: 0: p1k, 1: p2k, 2:p3b, 3:p4k, 4:p6b, 5:p7k, 6:p9b, 7:p10k, 8:p10k, 9:p11k. Se realizaron 11 pruebas, el nivel de significación fijado fue de 0,05. El valor- p y p corregido mediante la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples fue de $p < 0,004$. En negrita y con un asterisco se indica el valor que luego de la corrección continua siendo significativo. En la segunda columna se encuentra el valor - p usando la corrección secuencial de Bonferroni. Ambas correcciones aportan los mismos resultados.

Drosophila koepferae		
TEST-ID	Valor-p (0,05)	Valor- p con la corrección secuencial de Bonferroni
SUY(1,3)	0.00228 *	0.02508 *
VF(1,5)	0.00644	0.0644
BRE(0,8)	0.0111	0.0999
VF(1,7)	0.01119	0.0999
SUY(3,6)	0.01297	0.0999
BRE(0,2)	0.01356	0.0999
BRE(2,5)	0.0145	0.0999
RUI(2,6)	0.03198	0.12792
BRE(5,6)	0.0399	0.12792
VF(2,8)	0.04416	0.12792

Drosophila buzzatii

El número de alelos exclusivos por locus varió entre 4 y 17, siendo los loci p6k y p7k en Ing. Juárez los que se encuentran en el límite inferior del rango y p11k en Ensenada en el máximo del rango. El número de alelos exclusivos por población varió en un amplio rango, entre 4 y 31 alelos. Con respecto a los alelos exclusivos por locus se pudo observar, por ejemplo, que Vipos no tenía alelos exclusivos y un máximo de 6 alelos exclusivos como en p7k en Güemes (Tabla 3.8). El número de alelos totales por locus varió entre 5 y 31 (Tabla 3.8). A su vez el valor del índice GW por locus varió globalmente (para todo el conjunto de poblaciones) entre 0,1 y 0,7, de modo que podría decirse que es una población estacionaria como lo indica la mitad de los loci (Tabla 3.9).

La heterocigosis observada (promediada entre localidades) por locus varió entre 0,666 y 0,876, mientras que la esperada bajo el EHW lo hizo entre 0,938 y 0,964 (Tabla 3.9). Se observó un exceso global de heterocigotas y sólo para la población de Villa de Soto una deficiencia marcada de heterocigotas en los loci p11k y p10k (Fig. 3.3 y 3.4).

La desviación respecto del EHW, evaluado por población y por locus, fue estadísticamente significativo en 46 de los 117 de las pruebas (9 loci x 13 poblaciones) es decir, 39,3%. Al aplicar la corrección de Bonferroni, 17 pruebas siguieron siendo estadísticamente significativas (Tabla 3.10).

Las pruebas de desequilibrio por ligamiento (DL) permitieron detectar 42 desvíos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) sobre un total de 468 tests (8,9%). La asociación entre loci que potencialmente se encontrarían ligados se presenta gráficamente para cada población en la Fig. 3.4. Sin embargo, las asociaciones entre pares de loci que siguieron siendo estadísticamente significativas luego de aplicar la corrección de Bonferroni fueron solamente 11 (Tabla 3.10). Además, es de destacar que de las 42 comparaciones que resultaron estadísticamente significativas sólo 8 fueron compartidas por al menos dos poblaciones y sólo 2 por un máximo de 3 poblaciones (Tabla 3.11). Luego de la corrección sólo las asociaciones entre los pares [p2k - p6b] y [p2k - p10k] fueron compartidos por al menos dos poblaciones. El resto de las comparaciones significativas se encontraron sólo en una población. Por lo cual, podemos considerar que no hay evidencias que lleven a concluir que los marcadores elegidos para el estudio estén efectivamente ligados.

Tabla 3.8: Número de alelos exclusivos por locus y por población en *Drosophila buzzatii*. La última fila muestra el total de alelos que se encontraron en cada locus, entre paréntesis el número de alelos compartidos por al menos dos poblaciones. En la última fila se muestra la cantidad de alelos exclusivos en cada población. Abreviaturas: GUE: Güemes, PS: Palo Santo, LOM: Las Lomitas, MON: Montecarlo, CRUZ: Cruz del Eje, ENS: Ensenada, JUA: Juárez, VS: Villa de Soto, CAD: Cadillal, VF: Valle Fértil, TIL: Tilcara, MZ: Villa Mazán, VIP: Vipos.

	<i>Drosophila buzzatii</i>									Total
	N° de alelos totales (N° de alelos exclusivos)									
	1-P1k	2-P2b	3-P3b	4-P4k	5-P6b	6-P7k	7-P9b	8-P10k	9-P11k	
Pop1: VIP	11 (0)	9 (0)	8 (4)	8 (0)	13 (0)	6 (0)	7 (3)	11 (0)	7 (0)	(4)
Pop2: MZ	6 (2)	11 (1)	13 (0)	8 (0)	9 (1)	8 (1)	11 (2)	8 (0)	10 (0)	(7)
Pop3: TIL	11 (1)	10 (7)	11 (0)	10 (1)	6 (0)	8 (2)	13 (0)	11 (6)	10 (0)	(17)
Pop4: VF	12 (2)	10 (0)	14 (0)	7 (0)	6 (0)	9 (0)	14 (0)	11 (0)	13 (4)	(6)
Pop5: CAD	8 (0)	7 (0)	12 (0)	8 (1)	11 (0)	5 (0)	12 (1)	12 (2)	10 (0)	(4)
Pop6: VS	8 (0)	7 (0)	13 (0)	12 (0)	9 (0)	8 (0)	8 (0)	9 (1)	13 (1)	(4)
Pop7: JUA	4 (0)	8 (1)	7 (0)	11 (0)	6 (0)	4 (0)	9 (2)	11 (2)	8 (3)	(8)
Pop8: ENS	9 (0)	14 (4)	7 (1)	8 (1)	9 (0)	13 (2)	8 (2)	8 (2)	17 (5)	(17)
Pop9: CRUZ	5 (0)	10 (1)	12 (3)	8 (0)	7 (0)	8 (3)	6 (0)	8 (1)	12 (1)	(9)
Pop 10: MON	7 (0)	9 (0)	11 (0)	8 (5)	13 (2)	12 (1)	3 (1)	15 (7)	11 (3)	(19)
Pop 11: LOM	11 (2)	9 (0)	12 (2)	10 (0)	14 (1)	9 (2)	11 (6)	8 (0)	9 (1)	(11)
Pop 12: PS	10 (7)	10 (1)	8 (1)	10 (0)	11 (3)	10 (2)	8 (1)	7 (0)	5 (0)	(15)
Pop 13: GUE	10 (2)	12 (9)	7 (2)	11 (0)	9 (2)	17 (6)	8 (3)	11 (4)	6 (3)	(31)

Tabla 3.9: Heterocigosis observada (Ho) y esperada (He) e índice de Garza-Willamson (GW) por locus, número de alelos totales por locus (N°A) y el rango de alelos (Rg) en la muestra global de *Drosophila buzzatii*.

Drosophila buzzatii					
Locus	Ho	He	N°A	Rg	GW
1-P1k	0.73077	0.94740	37	78	0.46835
2-P2k	0.86538	0.94031	41	118	0.34454
3-P3b	0.86755	0.94442	38	87	0.43182
4-P4k	0.86538	0.94196	31	50	0.60784
5-P6b	0.85256	0.93606	32	187	0.17021
6-P7k	0.73077	0.96453	50	70	0.70423
7-P9b	0.66667	0.96325	46	78	0.58228
8-P10k	0.72258	0.93807	49	82	0.59036
9- P11k	0.80921	0.95078	44	181	0.24176

Tabla 3.10: Pruebas de ajuste al EHW. Se indican los valores de p obtenidos mediante el test de permutaciones. Abreviaturas: locus (L), GUE: Güemes, PS: Palo Santo, LOM: Las Lomitas, MON: Montecarlo, CRUZ: Cruz del Eje, ENS: Ensenada, JUA: Juárez, VS: Villa de Soto, CAD: Cadillal, VF: Valle Fértil, TIL: Tilcara, MZ: Villa Mazán, VIP: Vipos. En negrita y con dos asteriscos se presentan los valores estadísticamente significativos luego de aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples ($p < 0,001$).

Drosophila buzzatii													
Valor-p EHW													
Locus	VIP	MZ	TIL	VFB	CAD	VS	JUA	ENS	CRUZ	MON	LOM	PS	GUE
P1k	0.00081**	0.36741	0.00017**	0.01083*	0.02675*	0.01102*	0.14931	0.05172	0.01233*	0.03401*	0.22601	0.00899*	0.02823*
P2k	0.08275	0.12916	0.00047**	0.63659	0.03756*	0.01018*	0.01725*	0.23068	0.26977	0.83859	0.26209	0.91304	0.06240
P3b	0.00999	0.09096	0.00182*	0.04750*	0.85687	1.00000	0.30313	0.36287	0.06628	0.00179*	0.72800	0.82609	0.08518
P4k	0.17129	0.00035**	0.79321	0.01171*	0.27338	0.46831	0.00312*	0.00222**	0.00322**	0.88768	0.09528	0.88406	0.87454
P6b	0.80054	0.07187	0.06484	0.11917	0.30363	0.03337*	0.46326	0.04289*	0.88142	0.93116	0.00507*	0.08525	0.06283
P7k	0.03616*	0.14864	0.20062	0.00000**	0.07919	0.00041**	0.02647*	0.09382	0.25472	0.82609	0.14237	0.89855	1.00000
P9b	0.03069*	0.00058**	0.71655	0.00000**	0.02875	0.00002**	0.19713	0.01924*	0.04487*	0.16304	0.13683	0.88043	0.16113
P10k	0.35697	0.94627	0.09008	0.00000**	0.00041**	0.00000**	0.00000	0.00509*	0.14016	0.03305*	0.00047**	0.11143	0.26258
P11k	0.08174	0.00228*	0.01182*	0.25118	0.00051**	0.00318*	0.08067	0.01329*	0.00241**	0.08358	0.05598	0.93279	0.49331

Tabla 3.11: Heterocigosis observada (Ho) y esperada (He) en cada locus y población de *Drosophila buzzatii*. La última fila indica la heterocigosis esperada promedio (He^{prom.}) para cada localidad. Abreviaturas: GUE: Güemes, PS: Palo Santo, LOM: Las Lomitas, MON: Montecarlo, CRUZ: Cruz del Eje, ENS: Ensenada, JUA: Juárez, VS: Villa de Soto, CAD: Cadillal, VF: Valle Fértil, TIL: Tilcara, MZ: Villa Mazán, VIP: Vipos.

Locus	Ho He												
	VIP	MZ	TIL	VFB	CAD	VS	JUA	ENS	CRUZ	MON	LOM	PS	GUE
P1k	0,66667 0,93478	0,83333 0,81159	0,75000 0,91667	0,66667 0,88043	0,58333 0,72826	0,66667 0,87681	0,41667 0,59058	0,91667 0,90580	0,58333 0,68841	0,83333 0,84783	0,91667 0,88768	0,91667 0,85145	0,75000 0,90580
P2k	1,00000 0,89493	1,00000 0,90580	0,50000 0,86957	0,83333 0,87319	0,66667 0,79348	0,83333 0,77899	1,00000 0,78986	0,91667 0,94928	1,00000 0,88768	0,83333 0,89130	1,00000 0,85507	0,91667 0,91304	0,75000 0,87681
P3b	0,58333 0,76812	0,91667 0,93841	0,89855 0,00182	1,00000 0,94928	0,91667 0,92391	1,00000 0,93841	1,00000 0,82418	0,91667 0,85870	0,75000 0,91304	0,66667 0,92391	0,83333 0,90217	0,75000 0,82609	1,00000 0,85145
P4k	1,00000 0,84783	1,00000 0,86957	0,89855 0,79321	0,75000 0,86957	1,00000 0,86594	1,00000 0,92391	0,66667 0,87319	0,66667 0,83333	0,50000 0,84058	1,00000 0,88768	0,91667 0,86594	0,75000 0,88406	1,00000 0,92391
P6b	1,00000 0,93116	0,91667 0,87319	0,76087 0,06484	0,91667 0,82246	1,00000 0,90942	0,66667 0,85145	0,83333 0,71377	0,75000 0,86957	0,91667 0,78986	0,91667 0,93116	0,91667 0,95652	1,00000 0,88406	0,66667 0,86594
P7k	0,58333 0,77536	0,66667 0,75725	0,89855 0,20062	0,58333 0,90217	0,58333 0,75362	0,66667 0,87681	0,50000 0,71377	1,00000 0,93841	0,91667 0,84058	0,50000 0,82609	0,83333 0,90580	0,75000 0,89855	1,00000 0,96377
P9b	0,91667 0,81522	0,66667 0,92810	0,94203 0,71655	0,58333 0,94565	0,75000 0,90217	0,50000 0,86957	0,66667 0,80797	0,66667 0,88043	0,58333 0,68116	0,08333 0,16304	0,75000 0,89493	0,75000 0,88043	0,83333 0,85507
P10k	0,83333 0,89493	0,91667 0,87319	0,90942 0,09008	0,58333 0,93116	0,58333 0,91304	0,66667 0,84783	0,54545 0,90043	0,75000 0,87681	0,91667 0,85870	1,00000 0,95290	0,66667 0,87319	0,66667 0,82971	0,58333 0,70652
P11k	0,58333 0,84058	0,58333 0,88043	0,84058 0,01182	1,00000 0,94565	1,00000 0,90580	1,00000 0,93841	0,62500 0,90833	0,91667 0,96014	0,75000 0,87319	0,91667 0,86232	0,66667 0,74275	0,83333 0,74275	0,91667 0,78623
He ^{prom.}	0,85588	0,87084	0,88164	0,90217	0,85507	0,79134	0,89694	0,81924	0,80958	0,0958	0,87601	0,85668	0,85950

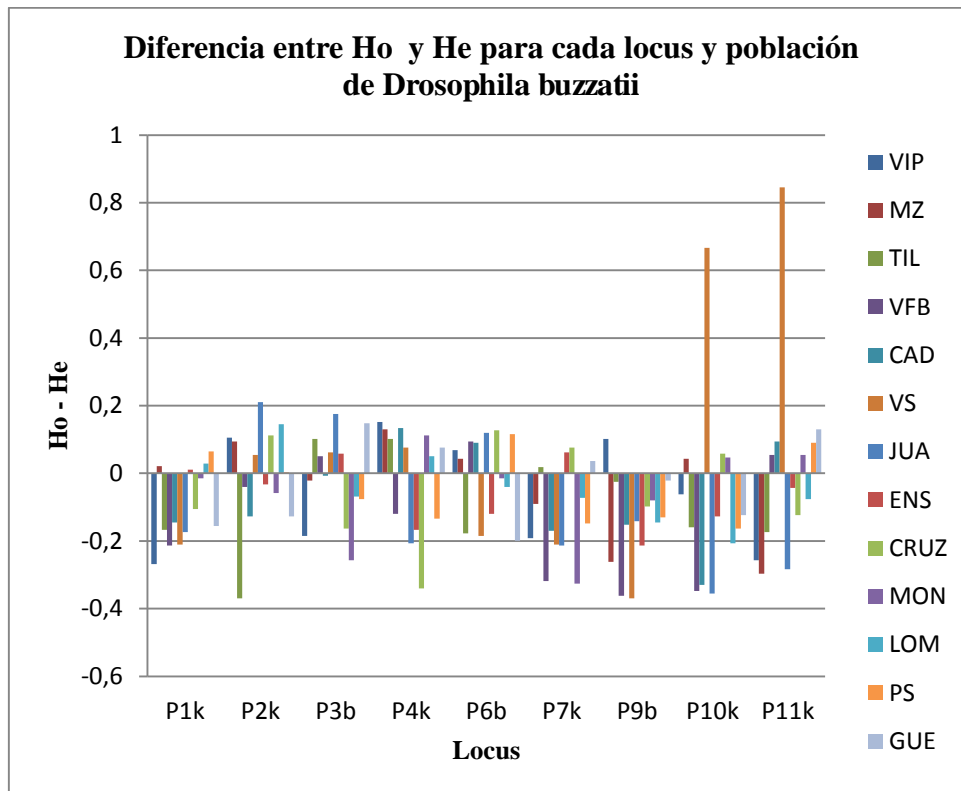


Figura 3.3: Diferencias entre heterocigosis observada (H_o) esperada (H_e) para cada locus y población de *D. buzzatii*. Abreviaturas: GUE: Güemes, PS: Palo Santo, LOM: Las Lomitas, MON: Montecarlo, CRUZ: Cruz del Eje, ENS: Ensenada, JUA: Juárez, VS: Villa de Soto, CAD: Cadillal, VF: Valle Fértil, TIL: Tilcara, MZ: Villa Mazán, VIP: Vipos.

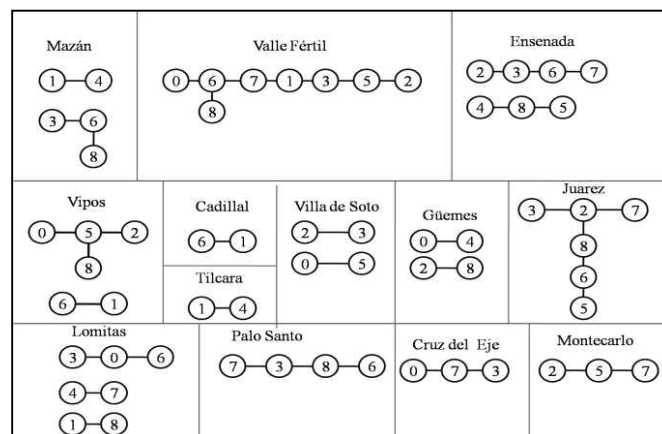


Figura 3.4: Esquema de loci ligados por población de *Drosophila buzzatii*. Miranda no presentó muestras de que ningún locus estuviera ligado. Se han renombrado los loci según la siguiente asignación: 0: p1k, 1: p2k, 2:p3b, 3:p4k, 4:p6b, 5:p7k, 6:p9b, 7:p10k, 8:p10k, 9:p11k.

Tabla 3.12: Pruebas de desequilibrio de ligamiento para cada combinación de pares de loci que produjeron valores de p menores a 0,05 en cada población. Se han renombrado los loci según la siguiente asignación: 0: p1k, 1: p2k, 2:p3b, 3:p4k, 4:p6b, 5:p7k, 6:p9b, 7:p10k, 8:p10k, 9:p11k. En colores se muestran las combinaciones que se repiten en cada población. Valor- p obtenido mediante la corrección de Bonferroni $p=0,011$. Con un asterisco se indican los valores que son estadísticamente significativos luego de aplicar la corrección de Bonferroni.

Drosophila buzzatii		
Población	Combinación de loci	Valor- p
1-Vipos	0-8	0,0005*
	1-6	0,02545
	2-5	0,00020*
	0-5	0,01644
2-Villa Mazán	1-4	0,03139
	3-6	0,00624*
	6-8	0,04050
3-Tilcara	1-4	0,00059*
4-Valle fértil	1-3	0,01376
	2-5	0,01317
	3-5	0,01020
	0-6	0,03079
	1-7	0,01366
	6-7	0,01594
	6-8	0,00921*
5-Villa de Soto	2-3	0,02139
	0-5	0,00069*
6-Juárez	2-3	0,03228
	5-6	0,02723
	2-7	0,01871
	2-8	0,00158*
	6-8	0,02564
7-Ensenada	2-3	0,00861*
	3-6	0,02396
	6-7	0,0000*
	4-8	0,03218
8-Cruz del Eje	5-8	0,02792
	0-7	0,03366
	3-7	0,01842
9-Montecarlo	2-5	0,00109*
	5-7	0,00703*
	3-4	0,05594
10-Las Lomitas	0-3	0,00188*
	0-6	0,01762
	4-7	0,02792
11- Palo Santo	1-8	0,00089*
	3-7	0,03703
	0-8	0,1673
	3-8	0,03812
12- Cadillal	1-6	0,01426
13- Güemes	0-4	0,04762
	2-8	0,00030*

Tabla 3.13: Resumen de las combinaciones que dieron desequilibrio de ligamiento estadísticamente significativo compartidas entre poblaciones luego de aplicar la corrección para comparaciones múltiples de Bonferroni. Hubo un máximo de 3 poblaciones (de las 13 totales) que comparten el par de loci ligados como ser el caso de [2-3] y de [6-8].

Drosophila buzzatii	
Comparación entre loci	Poblaciones
1-4	Villa Mazán, Tilcara
3-6	Villa Mazán, Ensenada
6-8	Villa Mazán, Valle Fértil, Juárez
6-0	Valle Fértil, Lomitas
2-3	Ensenada, Juárez, Villa de Soto
2-5	Valle Fértil, Montecarlo
6-1	Vipos, Cadillal
0-5	Vipos, Villa de Soto

3.3.3- Diferenciación geográfica

Drosophila koepferae

El análisis de estructura poblacional mediante el análisis jerárquico de la varianza (AMOVA) mostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre regiones fitogeográficas. Las diferencias entre las poblaciones dentro de las regiones fueron estadísticamente significativas y esto explica cerca del 7% de la variación total encontrada. Sin embargo, la mayor parte de la variación, poco más del 89%, está explicada por la variación dentro de las poblaciones que sí fue estadísticamente significativa (Tabla 3.14). Los valores de los índices de fijación asociados a la varianza entre poblaciones dentro de regiones (F_{SC}) y el coeficiente de endogamia total (F_{IT}), fueron estadísticamente significativos. El índice F_{IT} , (que puede tomar valores de -1 a 1), da idea de la combinación de efectos intra e interpoblacionales. Los valores de los índices fueron bajos $F_{SC} = 0,071$ y $F_{IT} = 0,104$ lo que sugiere una deficiencia de heterocigotas. En cuanto al índice F_{IS} , globalmente no fue estadísticamente significativo ($F_{IS}^{DK} = 0,007$ $p=0,37$) y los valores calculados para cada población fueron cercanos a 0 (Tabla 3.15). En la Tabla 3.16 se presentan los valores de F_{ST} para cada par de poblaciones, globamente puede verse que el valor medio varió entre 0,5 y 0,7. El test de correlación de Mantel entre las matrices de distancia genética y distancia geográfica no fue estadísticamente significativo ($r = 0,31$; $p = 0,31$) lo cual indica que la diferenciación entre poblaciones no se ajusta a un patrón de aislamiento por distancia.

Tabla 3.14: AMOVA jerárquico para *Drosophila koepferae*. En megrita y con un asterísco se indican los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Grados de Libertad (GL), Suma de Cuadrados (SC), Componentes de varianza (CV), porcentaje de variación (%Var). La última columna indica los índices de fijación, según a la varianza a la cual están asociados.

<i>Drosophila koepferae</i>					
Fuente de variación	GL	SC	CV	%Var	Índices de Fijación
Entre regiones	2	30,408	0,117 Va	2,82	$F_{CT} = 0,028$ $p=0,13$
Entre poblaciones dentro de región	2	21,417	0,288 Vb *	6,94	$F_{SC} = 0,071$ $p=0,00$
Entre individuos dentro de población	55	208,833	0,028 Vc	0,68	$F_{IS} = 0,007$ $p=0,37$
Dentro individuos	60	223,500	3,725 Vd *	89,56	$F_{IT} = 0,104$ $p=0,00$

Tabla 3.15: Valores de F_{IS} por población. Abreviaturas: BRE: Brealito, SUY: Suyuque, VFK: Valle Fértil, RUI: Ruinas de Quilmes, MIR: Miranda, Región 1, corresponde al Monte y se agrupan, Brealito, Valle Fértil, Miranda y Ruinas de Quilmes. Región 2, corresponde al Espinal y a Suyuque. En todos los casos el índice resulto no estadísticamente significativo.

<i>Drosophila koepferae</i>		
Población	F_{IS}	P(Rand $F_{IS} \geq \text{Obs } F_{IS}$)
Brealito	0,097	0,032
Suyuque	0,028	0,298
Valle Fertil	-0,005	0,921
Ruinas de Quilmes	-0,020	0,775
Miranda	-0,005	0,600

Tabla 3.16: En la mitad inferior de la tabla se presentan los valores del índice F_{ST} entre pares de poblaciones y en la mitad superior de la tabla la matriz de distancias de Nei (Da). Abreviaturas: BRE: Brealito, SUY: Suyuque, VFK: Valle Fértil, RUI: Ruinas de Quilmes, MIR: Miranda. Calculadas con el programa POPTREE.

<i>Drosophila koepferae</i>					
	BRE	RUI	SUY	VFK	MIR
BRE	-	0,620	0,747	0,645	0,815
RUI	0,575	-	0,723	0,560	0,704
SUY	0,516	0,046	-	0,516	0,646
VFK	0,723	0,560	0,704	-	0,575
MIR	0,620	0,747	0,645	0,815	-

En la Figura 3.5 se presentan los fenogramas que muestran los agrupamientos basados en las distancias genéticas entre poblaciones, utilizando tanto la distancia de Nei como los valores de F_{ST} , conforme al método de agrupamiento Neighbor Joining (NJ), en ambos casos. Aunque también se generaron fenogramas mediante el método de UPGMA, los mismos no han

sido incluidos en virtud de que los valores de bootstrap que dan soporte a los nodos fueron muy bajos. Sin embargo, los agrupamientos obtenidos sobre la base de las distancias genéticas ya sea usando NJ o UPGMA muestran a Brealito y Ruinas de Quilmes (ambas ubicadas en la región fitogeográfica denominada Monte norte) formando un cluster con un valor de bootstrap alto (86 y 80 en la Fig. 29-I y II, respectivamente). El resto de las poblaciones analizadas Miranda, Valle Fértil y Suyuque aparecen formando agrupamientos con bajos valores de bootstrap (51 y 62).

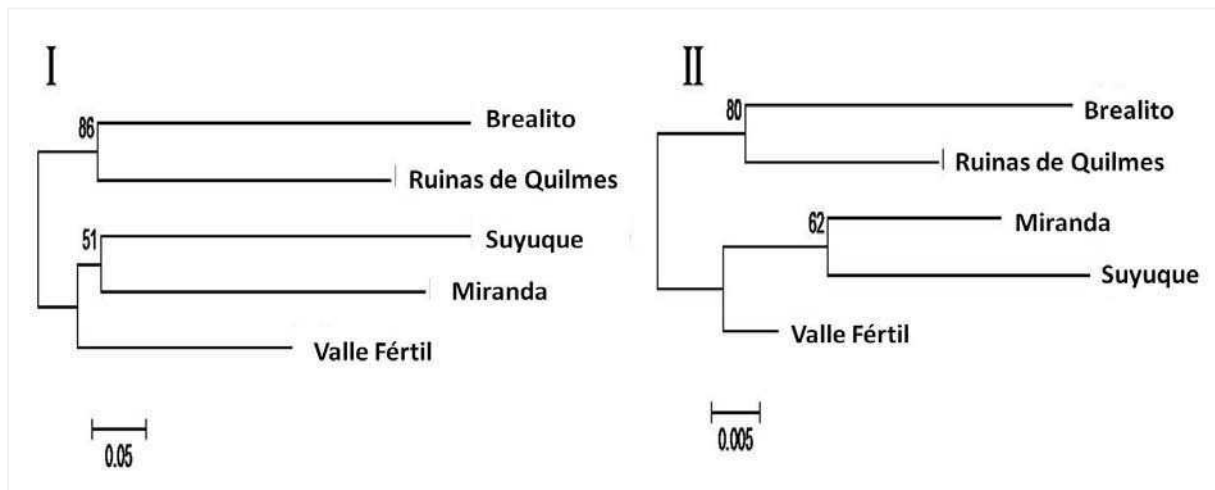


Figura 3.5: Fenogramas de las poblaciones de *Drosophila koepferae* obtenido mediante el método NJ. I) Utilizando la distancia de Nei (D_a), II) utilizando la distancia F_{ST} . Se indican los valores de soporte de las ramas calculados en base a 1000 Bootstraps. Realizado con el programa GENETREE (Balding et al. 1994, Griffiths 1994)

La estructura poblacional también fue investigada mediante un análisis de inferencia bayesiana utilizando el programa STRUCTURE que usa cadenas de Markov para inferir los clusters más probables en base a los datos genotípicos multi-locus que aportan los microsatélites. En el caso de *Drosophila koepferae* se muestran los resultados obtenidos considerando valores de k entre 1 y 5. Los mejores resultados se obtuvieron con un valor de $k=5$ que fue el que mejor permitió explicar los datos. Para todas las poblaciones la proporción de miembros asignados a un dado cluster es cercana a 1 (Tabla 3.17), lo que indica, claramente, un cierto grado de estructuración poblacional. Más del 95% de los individuos muestreados en Brealito, Suyuque, Ruinas de Quilmes y Miranda fueron asignados a sendos clusters, en tanto que los individuos de Valle Fértil fueron asignados al mismo cluster (cluster 3) con una probabilidad menor al 86%. (Tabla 3.17). En otras palabras, los clusters delimitados por STRUCTURE definen a las poblaciones geográficas. En la Figura 3.6 se muestran los resultados de la prueba de asignación bayesiana individual, donde cada columna corresponde a

un individuo (su genotipo multilocus), los diferentes colores representan cada uno de los 5 clusters genéticos y la altura de cada color (en cada columna), la probabilidad con la que cada individuo fue asignado a determinado grupo genético. Los individuos que presentan una predominancia de un color particular son considerados individuos de asignación no ambigua a un dado cluster, en tanto que aquellas columnas donde no hay tal predominancia son de asignación ambigua, presentando su genotipo una asignación fraccionada en más de uno de los 5 grupos genéticos resultantes de la subdivisión. Obtuvimos los valores de distancia genética de cada cluster a una población ancestral cuyas frecuencias alélicas fueron estimadas también por el modelo. El modelo del programa STRUCTURE supone que los diferentes clusters han divergido simultáneamente por deriva de esta población ancestral y que los valores de distancia genética diferirán por el tamaño efectivo de las poblaciones (Pritchard et al., 2010 y Documentation of structure software: Version 2.3). Según Falush et al. (2003), estos valores F , en su modelo constituyen estimadores del F_{ST} medio de cada cluster. Los valores promedio de distancias genéticas (F , calculadas por el programa) entre individuos de un cierto cluster respecto de la población ancestral fueron: cluster 1: 0.8619, cluster 2: 0,8585; cluster 3: 0,8528, cluster 4: 0,8980, cluster 5: 0,8414. [Estimated Ln Prob of Data = -2606,8 Mean value of ln likelihood = -2375,0 Variance of ln likelihood = 463,5]. El valor medio de alpha (=0,0315) fue pequeño, lo cual indica que prácticamente, no hay ambigüedad en la asignación de los individuos a las poblaciones.

Tabla 3.17: Proporción de miembros de cada población predefinida asignados a cada uno de los 5 clusters (grupos). Abajo, valor medio de F para cada uno de los K clusters o grupos inferidos respecto de una población ancestral (cuyas frecuencias también fueron estimadas). Abreviaturas: BRE: Brealito, SUY: Suyuque, VFK: Valle Fértil, RUI: Ruinas de Quilmes, MIR: Miranda.

<i>Drosophila koepferae</i>						
Población	Cluster inferidos					Nro. Ind.
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	
1.BRE	0,013	0,014	0,009	0,006	0,958	12
2.RUI	0,005	0,945	0,007	0,005	0,039	12
3.SUY	0,964	0,007	0,018	0,006	0,004	12
4.VFK	0,031	0,085	0,860	0,018	0,006	12
5.MIR	0,008	0,006	0,010	0,971	0,004	12
Valor medio F inferidos	0,1107	0,1141	0,1224	0,0833	0,1280	

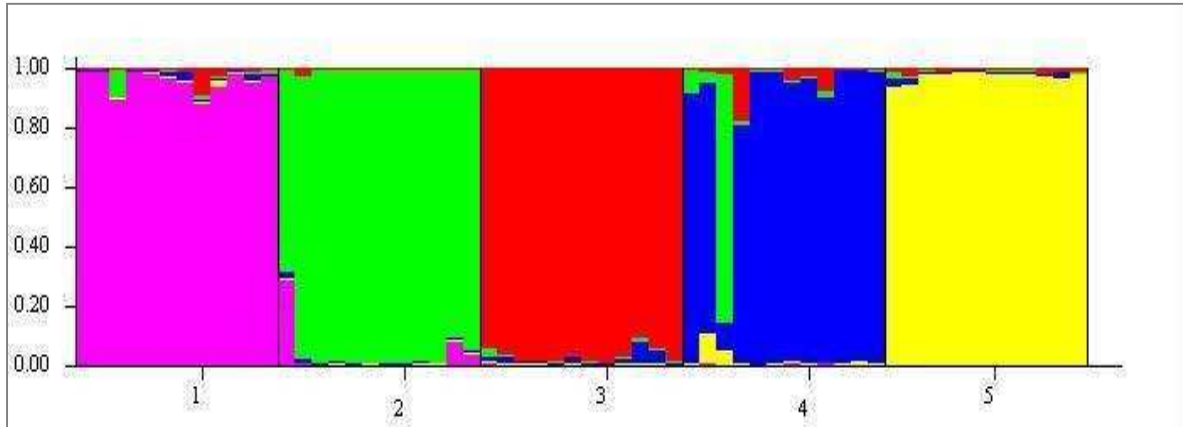


Figura 3.6: Estimación de la estructura poblacional en *Drosophila koepferae* usando el modelo $K=5$ representado por colores. Cada individuo se representa como una delgada línea vertical particionada entre K segmentos que representan la asignación estimada de cada individuo a la fracción n de los K clusters. Los números se corresponden con las poblaciones. 1: Brealito, 2: Ruinas de Quilmes, 3: Suyuque, 4: Valle Fértil, 5: Miranda.

Otra forma de presentar los resultados obtenidos con el programa STRUCTURE es mediante un punto cuya ubicación está dada por la probabilidad de asignación a cada cluster. Cada punto de color representa un individuo, que se encuentra dentro de un triángulo cuyos vértices representan una población o un conjunto de poblaciones, y el área dentro del triángulo es la distancia inferida que representara la pertenencia de cada punto –individuo– a una determinada población. Esto se representa en la Figura 3.7 llamada “The triangle plot of Q ” (donde Q es la asignación de cada individuo a cada cluster). La estimación del vector para un individuo consiste en K componentes. Si $K=3$ los “ancestry vectors” pueden representarse en un triángulo donde cada punto (individuo) se ubica según el componente de distancia respecto de cada vértice (población). Aquellos individuos que se encuentran en uno de los vértices son aquellos que fueron asignados completamente a una dada población. Cuando $K>3$, como en este caso los datos se presentan eligiendo 2 clusters cada vez y agrupando el resto en el tercer vértice. A modo de ejemplo la Figura 3.7 muestra 4 gráficos que son representativos. Se evidencia que cada población corresponde a un cluster, lo que permite concluir que hay estructuración poblacional en *Drosophila koepferae*.

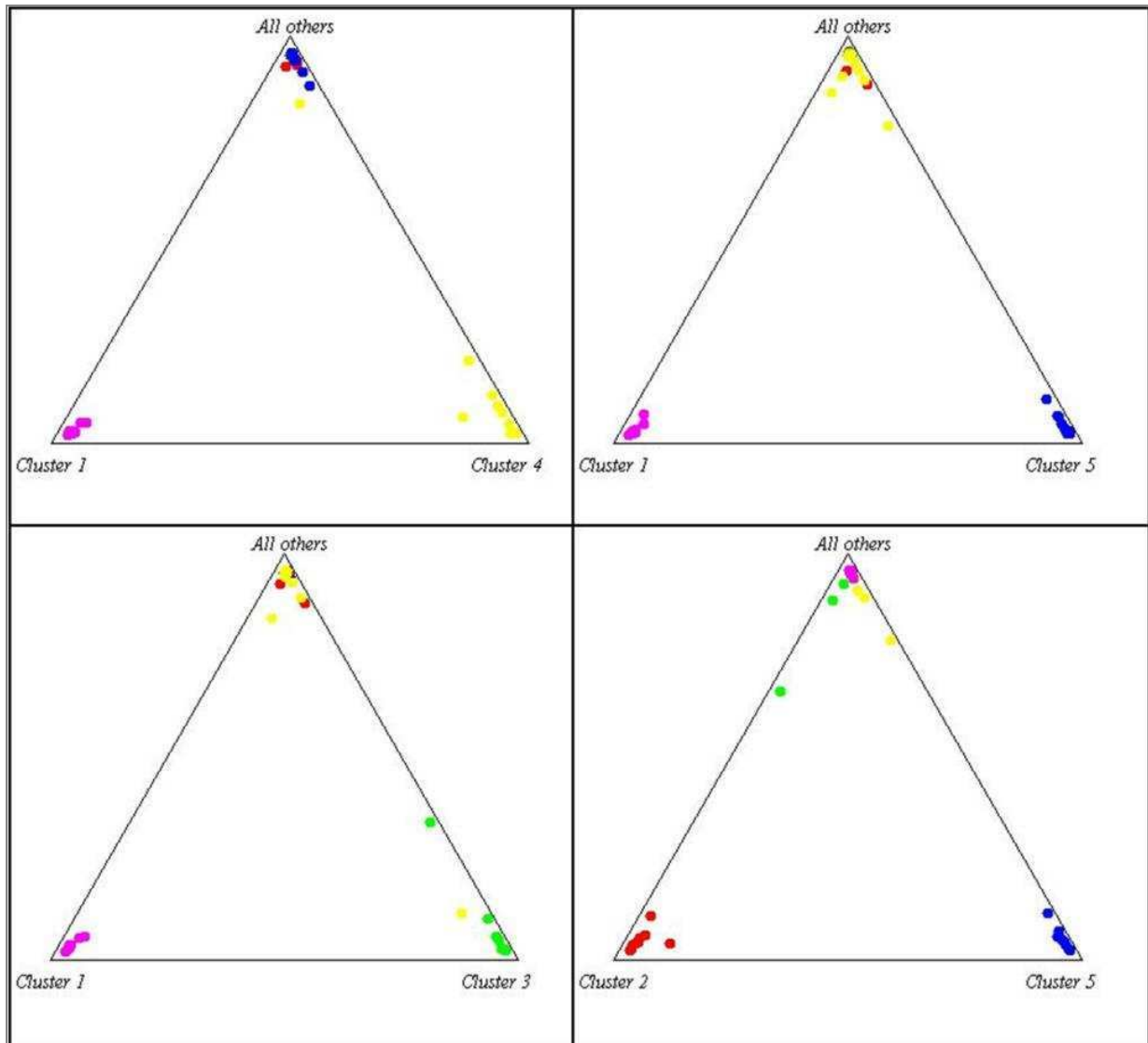


Figura 3.7: Representación gráfica de la estructuración poblacional de *Drosophila koepferae*. Los colores indican la localidad de origen del individuo. Brealito (Rojo), Ruinas de Quilmes (Verde), Suyuque (Azul), Valle Fértil (Amarillo), Miranda (fucsia). Cada individuo está representado por un punto de color y cada color corresponde a cada población asignada a priori. (Para más detalles referirse al texto)

Drosophila buzzatii

El análisis de estructura poblacional mediante el análisis jerárquico de la varianza (AMOVA) mostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre regiones fitogeográficas, pero sí las hay entre poblaciones dentro de regiones (componente que da cuenta de poco menos del 9 % de la variación), entre individuos dentro de poblaciones (que explica el 7% de la variación total) y dentro de individuos (más del 82% de la variación total, ver Tabla 3.18). Del mismo modo los índices de endogamia asociados a las varianzas de cada nivel de la jerarquía

fueron significativos (Tabla 3.19). El valor de F_{IT} de 0,173 indica que hay una leve deficiencia de heterocigotas en tanto que F_{SC} sugiere una baja a moderada diferenciación poblacional. Los valores de F_{IS} por población, que variaron entre 0,07 y 0,11, fueron positivos y estadísticamente significativos en Cadillal, Valle Fértil, Tilcara, Villa de Soto, Montecarlo y Ensenada, lo que sugiere leves deficiencias locales de heterocigotas (Tabla 3.19).

Los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones variaron entre 0,5 – 0,8 (Tabla 3.20). La prueba de correlación de Mantel tampoco fue estadísticamente significativa en *Drosophila buzzatii* ($r = 0,048$ $p = 0,382$), lo que sugiere que los valores de distancia genética no se ajustan a lo esperado bajo un modelo de aislamiento por distancia.

Se obtuvieron fenogramas basados en las distancias genéticas entre poblaciones (D_a y F_{ST}) utilizando los métodos de agrupamiento Neighbor Joining (NJ) y UPGMA. Sólo se muestra el fenograma realizado con la distancia F_{ST} y el método de NJ (Fig. 3.21), puesto que los demás fenogramas mostraron soporte de rama muy bajos. Puede apreciarse que, por un lado, se agrupan las poblaciones de Vipos, Mazán, Tilcara, Las Lomitas, Palo Santo, Güemes, Juárez y Ensenada y por otro Valle Fértil, Cadillal y Miranda (Fig. 3.21), aunque los valores de bootstrap son por lo general bajos.

Tabla 3.18: AMOVA jerárquico para *Drosophila buzzatii*. En negrita se indican los valores significativos ($p < 0,05$). Grados de Libertad (GL), Suma de Cuadrados (SC), Componentes de varianza (CV), porcentaje de variación (%Var). La ante última columna indica los valores de los índices de fijación, ordenados de acuerdo al componente de la que varianza a la están asociados y la última columna indica los valores p de significación estadística (Weir y Cockerham 1984, Excoffier et al. 1992, Weir 1996).

<i>Drosophila buzzatii</i>						
Fuente de variación	GL	SC	CV	%Var	Índices de Fijación	p -valor
Entre regiones	3	90,801	0,052 Va	1,22	$F_{CT} = 0.12$	0.124
Entre poblaciones dentro de regiones	9	79,924	0,380Vb	8,83	$F_{SC} = \mathbf{0.089}$	0.000
Entre individuos dentro de poblaciones	143	592,888	0,315Vc	7,31	$F_{IS} = \mathbf{0.081}$	0.000
Dentro individuos	156	550,000	3,558Vd	82,62	$F_{IT} = \mathbf{0.173}$	0.000
Total	311	1313,612	4,307			

Tabla 3.19: F_{IS} por población para *Drosophila buzzatii*. Abreviaturas: 1VIP: Vipos, 2MZ: Villa Mazán, 3TIL: Tilcara, 4VFB: Valle Fertil, 5CAD: Cadillal, 6VS: Villa Soto, 7JUA: Juárez, 8ENS: Ensenada, 9CRU: Cruz del Eje, 10MON: Montecarlo, 11LOM: Lomitas, 12PS: Palo Santo, 13GUE: Güemes. En negrita se indican los valores de significación estadística.

Drosophila buzzatii		
Población	F_{IS}	P(Rand $F_{IS} \geq$ Obs F_{IS})
1-JUA	0,05754	0,197458
2-LOM	0,05081	0,111437
3-PS	0,05098	0,124145
4-VIP	0,07255	0,041056
5-CAD	0,08288	0,020528
6-GUE	0,03178	0,227761
7-VFB	0,15385	0,000000
8-MAZ	0,01275	0,404692
9-TIL	0,11164	0,002933
10-VS	0,11874	0,000978
11-CRUZ	0,06455	0,079179
12-MON	0,07668	0,025415
13-ENS	0,07390	0,047898

Tabla 3.20: La mitad inferior de la matriz tiene los Km lineales, la mitad superior de la matriz tiene las distancias F_{ST} entre las poblaciones de *Drosophila buzzatii*. Abreviaturas: 1.VIP: Vipos, 2.MZ: Villa Mazán, 3.TIL: Tilcara, 4.VFB: Valle Fértil, 5.CAD: Cadillal, 6.VS: Villa Soto, 7.JUA: Juárez, 8.ENS: Ensenada, 9CRU: Cruz del Eje, 10.MON: Montecarlo, 11.LOM: Lomitas, 12.PS: Palo Santo, 13.GUE: Güemes.

<i>Drosophila buzzatii</i>													
	VIP	MZ	TIL	VFB	CAD	VS	JUA	ENS	CRU	MON	LOM	PS	GUE
1.VIP	0	0,514	0,695	0,556	0,681	0,728	0,610	0,718	0,721	0,611	0,717	0,562	0,732
2.MZ	269,3	0	0,549	0,534	0,695	0,662	0,584	0,804	0,723	0,618	0,576	0,527	0,708
3.TIL	346,02	537,2	0	0,627	0,725	0,742	0,651	0,848	0,818	0,696	0,814	0,772	0,641
4.VFB	519,57	288,46	846,3	0	0,421	0,547	0,646	0,730	0,685	0,650	0,702	0,687	0,802
5.CAD	24,18	220,80	358,75	550,16	0	0,483	0,727	0,768	0,692	0,613	0,749	0,774	0,833
6.VS	450,7	292,13	825,35	350,98	426,98	0	0,600	0,602	0,579	0,561	0,742	0,699	0,755
7.JUA	428,5	689,31	336,35	984,03	472,58	818,40	0	0,682	0,668	0,613	0,663	0,609	0,710
8.ENS	771,29	678,9	1043,12	731,99	738,54	399,84	899,78	0	0,658	0,714	0,749	0,773	0,773
9.CRU	485,57	292,2	809,59	295,34	470,53	37,16	831,98	426,68	0	0,617	0,663	0,724	0,772
10.MON	1098	1210,18	1160,5	1386,56	1096,47	1069,71	773,74	835,13	1096,84	0	0,670	0,590	0,734
11.LOM	520,6	732,86	521,24	1009,62	505,35	779,69	146,24	813,89	816,86	622,52	0	0,560	0,740
12.PS	606,8	789,47	691,52	1057,49	588,58	767,58	316,32	727,85	823,19	461,67	169,91	0	0,670
13.GUE	91,72	162,4	420,65	502,02	77	348,83	517,67	682,12	407,83	1049,39	567,67	631,45	0

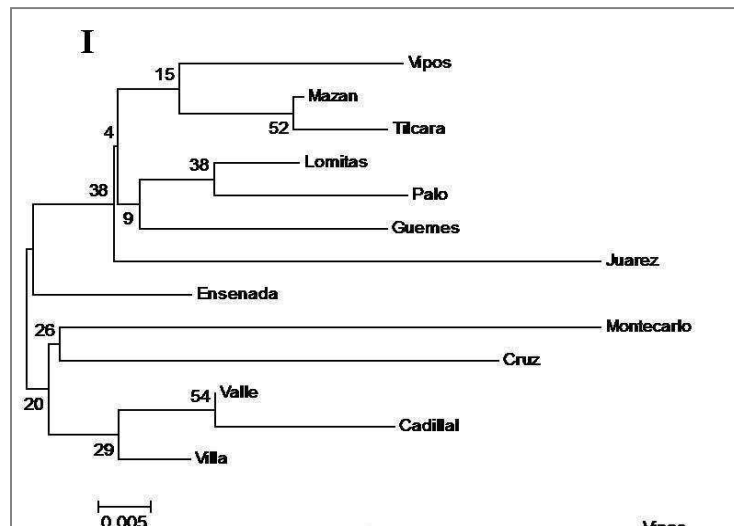


Figura 3.21: Fenogramas basados en de F_{ST} entre las poblaciones de *Drosophila buzzatii*, obtenido mediante los método de Neighbour Joining.

Según el análisis de estructura poblacional realizado con el método de inferencia bayesiana mediante el programa STRUCTURE, se puede ver que las poblaciones de *Drosophila buzzatii*, presentan una muy leve o nula estructuración poblacional. Se llevaron adelante 6 corridas independientes para cada valor de k (k varió entre 1 a 13). La distribución que mejor se ajusta a los datos según la probabilidad a posteriori Logn fue con $k = 13$ y por lo tanto son los únicos resultados que se muestran. En la Tabla 3.22 se observa la probabilidad de pertenencia de los individuos de una determinada población a un cluster dados los datos genotípicos multilocus. En este caso se puede observar que la probabilidad más alta fue del 80% (es el caso de las poblaciones de Güemes y Montecarlo que parecen las mejor definidas). Mientras que para los otros casos las probabilidades de asignación fueron muy bajas, entre 30 y 40% (Tabla 3.22). Esto implica que la probabilidad de asignación de los individuos a una población particular es muy baja, lo que sugiere una estructuración poblacional muy débil. Se puede evidenciar esto mismo gráficamente en las Figuras 3.8 y 3.9 que ilustran la falta de una estructuración poblacional marcada en *D. buzzatii*. En la Figura 3.8 se observa que la mayor parte de las columnas, que representan a cada uno de los individuos muestreados (genotipos multilocus) no presentan un color preponderante, por tanto estos individuos tendrían una asignación ambigua o no unívoca a un cluster genético. Esto es un claro indicio de que no se puede asignar unívocamente a los individuos a cada cluster, y por tanto de una falta de estructuración marcada o una estructuración leve. Esto mismo puede observarse en la Fig. 3.9, en este gráfico (como se ha descrito en la sección anterior) en cada vértice de cada triángulo están los clústers génicos, se muestran sólo 4 gráficos representativos de los resultados obtenidos. En los mismos se puede observar que la mayoría de los puntos de colores (que representan cada individuo) no se ubican agrupados en las cercanías de un vértice, sino que en alguno de los casos se ubican a lo largo de los lados del triángulo, incluso dispersos por el mismo, representando la escasa estructuración poblacional.

Tabla 3.22: Proporción de miembros de cada población predefinida en cada uno de los 13 cluster (grupos).

<i>Drosophila buzzatii</i>														
Población	Cluster inferidos													Nº. Ind.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1.VIP	0,010	0,021	0,008	0,749	0,010	0,019	0,024	0,031	0,008	0,018	0,010	0,051	0,042	12
2.MZ	0,021	0,083	0,014	0,109	0,017	0,033	0,155	0,256	0,011	0,026	0,021	0,187	0,065	12
3.TIL	0,104	0,011	0,005	0,042	0,010	0,016	0,334	0,272	0,004	0,029	0,028	0,126	0,019	12
4.VFB	0,214	0,018	0,017	0,119	0,008	0,392	0,022	0,085	0,016	0,024	0,016	0,037	0,037	12
5.CAD	0,104	0,008	0,007	0,008	0,006	0,663	0,010	0,063	0,014	0,010	0,060	0,027	0,019	12
6.VS	0,323	0,018	0,060	0,008	0,011	0,338	0,013	0,081	0,044	0,015	0,040	0,021	0,029	12
7.JUA	0,022	0,039	0,009	0,049	0,028	0,021	0,029	0,078	0,008	0,614	0,009	0,064	0,031	12
8.ENS	0,009	0,007	0,884	0,007	0,006	0,006	0,009	0,013	0,017	0,006	0,012	0,020	0,020	12
9.CRUZ	0,041	0,017	0,032	0,019	0,008	0,025	0,010	0,019	0,701	0,025	0,031	0,030	0,041	12
10.MON	0,024	0,013	0,007	0,011	0,009	0,009	0,013	0,019	0,019	0,012	0,830	0,015	0,019	12
11.LOM	0,024	0,149	0,008	0,012	0,008	0,008	0,021	0,042	0,022	0,011	0,260	0,011	0,427	12
12.PS	0,010	0,758	0,006	0,091	0,024	0,011	0,009	0,016	0,007	0,012	0,012	0,022	0,022	12
13.GUE	0,008	0,025	0,007	0,010	0,864	0,006	0,010	0,006	0,007	0,017	0,017	0,007	0,017	12

Figura 3.8: Esquema de los resultados de la prueba de asignación bayesiana individual obtenidos por STRUCTURE para la estimación de la estructura poblacional para *Drosophila buzzatii*. Cada columna representa un individuo (su genotipo multilocus), cada color representa los 13 clusters genéticos (k=13) y la altura de cada color (en cada individuo) representa la probabilidad con la que el individuo resultó asignado a determinado grupo génico. Los individuos que no representan un color preponderante (mayoritario) son considerados como individuos de asignación ambigua al cluster génico particular. Lo que significa que estos individuos presentan un genotipo fraccionado en los 13 grupos génicos asignados, según la cantidad de poblaciones muestreadas.

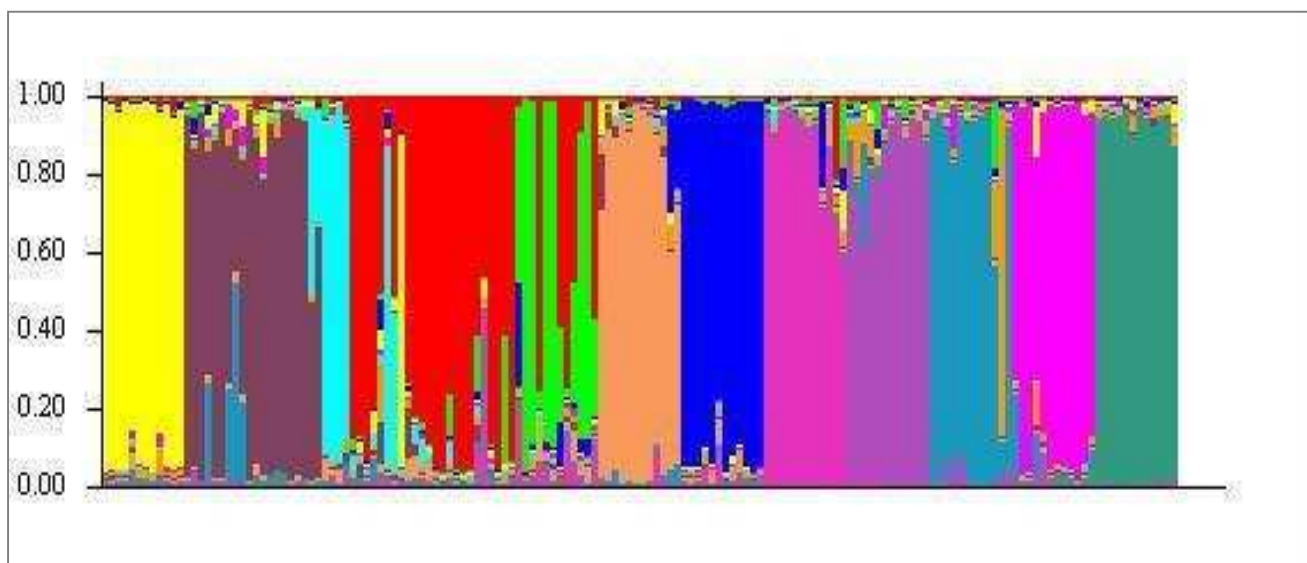
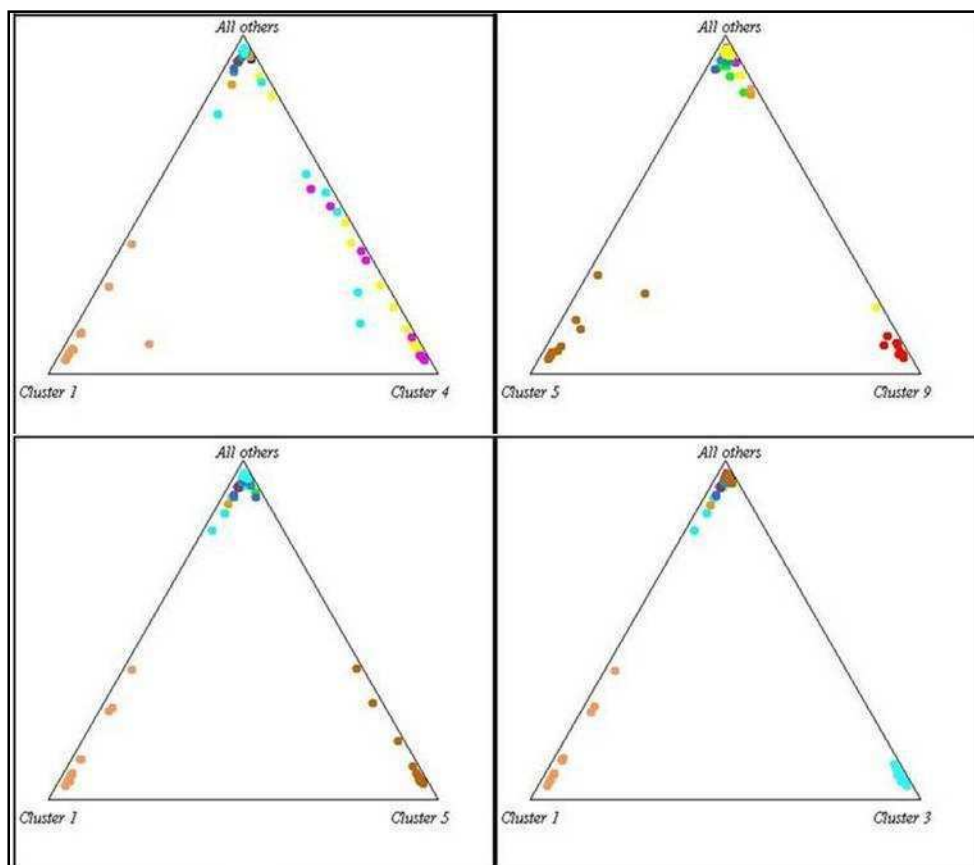


Figura 3.9: Representación gráfica de la estructuración poblacional en *Drosophila buzzatii*. En los ejemplos se muestran gráficamente la asignación de los individuos en 3 clusters genéticos (de los 13 simulados), los puntos son genotipos individuales. Se observa como los puntos de colores (individuos) no se concentran en los vértices si no que lo hacen sobre los lados del triángulo, evidenciando el origen mixto de los individuos tal como se vio en la tabla de asignación de probabilidades a los clusters.



3.4 Discusión

Para estudiar poblaciones naturales de *Drosophila koepferae* y *D. buzzatii*, en la primera sección de este capítulo se identificaron, caracterizaron y se evaluaron 9 marcadores moleculares de alta resolución y altamente polimórficos, cuyos productos de amplificación son tanto confiables como reproducibles. De estos 9 marcadores 5 fueron aislados a partir de ADN genómico de *D. koepferae* y 4 de *D. buzzatii*, sin embargo, el grado de variabilidad de cada microsatélite en ambas especies no parece depender de su origen. Para ambas especies la variabilidad genética evaluada mediante la heterocigosis esperada no varió de modo estadísticamente significativo entre las localidades.

Comenzaremos analizando de manera comparativa los patrones de variación entre ambas especies. Globalmente se observó que *Drosophila koepferae* es más variable, tiene mayor cantidad de alelos por locus que su especie gemela *D. buzzatii*. Un patrón de variabilidad molecular similar se encontró para el número total de sitios segregantes tanto a nivel de la variación en la secuencia del gen mitocondrial COI (Ver capítulo 2) como del gen nuclear α Est5 (Piccinali et al. 2007). En el caso de este último gen, *D. koepferae* exhibió mayor cantidad de sitios polimórficos tanto a nivel de sitios sinónimos como no codificantes. En cambio, *D. buzzatii* resultó ser más variable a nivel de los sitios no sinónimos (Piccinali et al. 2007). Asimismo, los patrones descritos para COI y α Est5 son muy diferentes a lo observado en el gen nuclear xantín dehidrogenasa (*Xdh*) para el cual *D. buzzatii* mostró niveles de polimorfismo que duplicaban a los de *D. koepferae* para todos los tipos de variación analizados (Piccinali et al. 2004). No obstante, es importante aclarar en este caso que las diferencias en los niveles de variación encontrados entre especies podrían ser consecuencia del ambiente recombinacional en que se encuentra *Xdh* en cada una de las especies. En efecto, *Xdh* está muy alejado de los segmentos implicados en los polimorfismos de inversión en *D. buzzatii*, en tanto que en *D. koepferae* está incluido en los segmentos reordenados por la mayoría de los eventos de inversión (Piccinali et al. 2007) que han dado lugar a un rico polimorfismo cromosómico (Fontdevila et al. 1988). En este sentido, es importante remarcar que se sabe que existe una correlación positiva entre la tasa de recombinación y los niveles de variabilidad. Además, se ha demostrado desde el punto de vista teórico y experimental que las inversiones paracéntricas reducen (sin llegar a suprimirla) la recombinación en los segmentos reordenados y que la tasa de recombinación se reduce desde el centro de la inversión hacia las vecindades de los puntos de

rotura (ver Hasson y Eanes, 1996, Navarro et al. 2000; Gómez y Hasson 2003, Laayouni et al. 2003).

Una posible explicación de los diferentes niveles de variación entre estas especies está relacionada con diferencias en su demografía histórica, lo que supone que el tamaño efectivo poblacional histórico de *Drosophila koepferae* habría sido mayor que el de *D. buzzatii* (Gómez y Hasson 2003, Piccinali et al. 2007). Esta consideración se basa en la predicción de la Teoría Neutralista (TN) que establece que en una población en equilibrio el valor del parámetro mutacional θ ($4N_e\mu$), que es proporcional a la heterocigosis media poblacional, depende del tamaño efectivo de la población y de la tasa de mutación neutra. Suponiendo que no hay diferencias en la tasa de mutación entre *D. koepferae* y *D. buzzatii* (Moriyama y Hartl 1993, Piccinali et al. 2004), las diferencias en los niveles de variación nucleotídica entre especies serían el resultado de diferencias en el tamaño efectivo poblacional histórico (Piccinali et al. 2004).

El desvío de los marcadores (6 de los 9) respecto de las frecuencias esperadas bajo EHW en *Drosophila koepferae* descarta la posibilidad de que se deba a un efecto aleatorio de un locus en particular. En los loci p11k, p10k, p9k y p2k el desvío se debió a un exceso de heterocigotas. De las 45 pruebas realizadas se encontraron desviaciones estadísticamente significativas respecto del EHW en 9. Luego de aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples siguieron siendo estadísticamente significativas 6. Estas comparaciones fueron, en todos los casos, significativas sólo para una de las 5 poblaciones. Dado que las pruebas de bondad de ajuste a EHW no muestran un patrón sistemático para algún(o) locus (i) o población(es) es posible no rechazar la hipótesis del apareamiento panmítico en las poblaciones. Algo similar se vió en *D. buzzatii* en la que, también, se descarta que los desvíos respecto del EHW sean locus-específico. En este caso se observó una deficiencia de heterocigotas en 17 de las 117 comparaciones realizadas.

En *Drosophila buzzatii*, la diferenciación entre poblaciones dio cuenta del 9% de la variación total, sin embargo, el patrón de variación observado no parece estar relacionado ni con las distancias geográficas (Test de Mantel $r= 0,04$, $p=0,32$), ni con las regiones fitogeográficas en las que se encuentran las poblaciones estudiadas (AMOVA $V_a=0,02164$, $p=0,16325$). Es más, los agrupamientos observados en los árboles de poblaciones obtenidos usando los algoritmos de agrupamiento NJ y UPGMA no muestran ningún patrón específico acorde con el análisis de la varianza molecular y el test de correlación entre la distancia genética

y la distancia geográfica. Estos resultados concuerdan con los resultados de estudios previos con otros marcadores moleculares en los cuales no se ha observado un patrón de estructuración geográfico claro en *D. buzzatii* en el territorio argentino (Rossi et al. 1996, Piccinali et al. 2004, 2007). Asimismo, el análisis bayesiano de estructuración poblacional reveló una leve a nula estructuración genético poblacional en *D. buzzatii*, como lo indica la baja correspondencia entre las poblaciones y los clusters inferidos que no superó el 80% y fue globalmente menor al 50%. En contraste, en *D. koepferae*, si bien no se encontró un patrón de variación geográfico correlacionado con las distancias geográficas (test de Mantel $r=0,059$, $p=0,31$), sí se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones en el AMOVA, cuyos resultados son altamente concordantes con el análisis bayesiano. Este mostró que cada una de las poblaciones se ajusta con una probabilidad mayor al 89% a los 5 clusters definidos. Asimismo, los árboles de las poblaciones obtenidos con el método NJ concuerdan en agrupar a las localidades en lo que serían dos clusters con buen soporte estadístico, uno que incluye a Brealito y Ruinas de Quilmes y el otro a Miranda, Valle Fértil y Suyuque. Los resultados obtenidos, en este caso, concuerdan en algunos aspectos con los de estudios previos utilizando otros marcadores nucleares (Piccinali et al. 2004 y 2007). En efecto, los estudios de los patrones de variabilidad nucleotídica utilizando los genes *Xdh* (Xantín deshidrogenasa) y α Est5 (Piccinali et al. 2004, 2007), muestran patrones de estructuración poblacional concordantes con las Regiones Fitogeográficas de Argentina en *D. koepferae*. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las características ecológicas y la distribución histórica de las cactáceas a las que cada especie se encuentra asociada en la naturaleza (ver capítulo 4, Discusión General).

3.5 Conclusiones

- Tanto para *Drosophila koepferae* como para *D. buzzatii* se presentan 9 loci de microsatélites hipervariables (K-76, B-63, B-55, K-60, B-65, K-75, B-60, K-66, K-72) que amplifican en ambas especies con la misma eficiencia.
- *Drosophila koepferae* tiene mayor variación molecular que *D. buzzatii*, con una mayor cantidad de alelos por loci de microsatélites.
- *Drosophila koepferae* muestra patrones de estructuración poblacional.
- *Drosophila buzzatii* no muestra patrones de estructuración poblacional estadísticamente significativos.

► **Discusión general**

En este trabajo hemos descripto y analizado la variabilidad genética y la estructura genético poblacional en *Drosophila koepferae* y *D. buzzatii*, dos especies cactófilas que habitan las zonas áridas y semiáridas de la Argentina. En los capítulos precedentes analizamos los resultados del análisis de los haplotipos de mtCOI (Capítulo 2) y de los haplotipos determinados por nueve microsatélites específicos (Capítulo 3). A continuación a modo de organizar la información comenzamos discutiendo la variabilidad molecular y seguidamente la estructura poblacional de ambas especies, teniendo en cuenta ambos marcadores y los estudios previos a los cuales, en general, hemos hecho referencia en capítulos precedentes.

Los patrones de variación genética

El patrón de variación genética entre y dentro de poblaciones de una especie está fuertemente influenciado por su historia filogeográfica. Los análisis basados en marcadores moleculares (que suponemos) neutrales nos brindan información que permite inferir eventos demográficos ocurridos en el pasado, como expansiones o colonizaciones. Por otro lado, como las relaciones filogeográficas inter e intraespecíficas pueden depender del marcador estudiado, las historias evolutivas inferidas a partir de cada marcador molecular y/o gen pueden discrepar, dependiendo del modo de transmisión y la historia evolutiva del marcador genético elegido (Tajima 1983, Petit y Excoffier 2009). Para analizar los patrones de variación genética, las secuencias de ADN son un excelente instrumento, puesto que permiten estudiar la demografía histórica de las poblaciones (Harpending 1994). Los eventos demográficos como expansiones o retracciones poblacionales dejan huellas en la distribución de las frecuencias alélicas de una población. Esto se debe a que una disminución del tamaño poblacional conlleva a una pérdida de diversidad genética, en tanto que si hay una expansión poblacional se conservan alelos que de otro modo se hubieran perdido. La inferencia de cambios en el tamaño efectivo de las poblaciones puede realizarse utilizando las variantes o haplotipos del ADN mitocondrial, dado que estas registran

la historia matrilineal de eventos mutacionales (suponiendo ausencia de heteroplasmia). Por su parte, el análisis de los microsatélites brinda información sobre el genoma nuclear, dado que tienen un alto grado de polimorfismo y son codominantes. Teóricamente el tamaño efectivo es diferente entre ambos marcadores, ya que en organismos diploides cada individuo porta una variante mitocondrial y 2 alelos por locus microsatélite. Frente a estas particularidades ambos tipos de marcadores nos permiten inferir la historia evolutiva de las poblaciones ya que la deriva y los eventos demográficos podrían afectar diferencialmente la variación a nivel del ADNmt y de loci nucleares (Goldstein et al.1999, Avise 2009). Es por esto que al interrogante inicial de la tesis sobre la evolución de las poblaciones en el tiempo se lo abordó metodológicamente describiendo y analizando la variabilidad intra e interpoblacional en la secuencia de un fragmento del gen COI y de los haplotipos conformados por un conjunto de marcadores moleculares de alta resolución (microsatélites) específicos para estas especies. En este trabajo utilizamos como unidad de estudio los haplotipos (ya sean del fragmento de mtCOI o del conjunto de los microsatélites) de los individuos (muestreados por población y especie).

Con respecto a la variación molecular nos preguntamos: ¿*Drosophila koepferae* y *D. buzzatii* tienen el mismo nivel de variación molecular? ¿Si no fuera así, cuál es más variable? Nuestros resultados dan respuesta a estas dos preguntas. En relación a la primera: las poblaciones de *D. koepferae* son más variables que las de *D. buzzatii*. En cuanto a la variación molecular del fragmento secuenciado de mtCOI se encontró que *D. koepferae* es dos veces más variable que *D. buzzatii* (ver Discusión Capítulo 2). Una variación similar se encontró al analizar los datos aportados por los microsatélites, se encontraron entre 16 y 40 alelos por locus en *D. koepferae* y entre 4 y 17 en *D. buzzatii* (ver Discusión Capítulo 3). Los nuevos datos aportados en esta tesis indican que a nivel nuclear (microsatélites) y a nivel del ADN mitocondrial (mtCOI) *D. koepferae* es más variable genéticamente que su especie gemela. Esta diferencia en la variabilidad genética observada podría ser el resultado de la historia demográfica particular que ha tenido cada una de estas especies, es decir que los tamaños efectivos poblacionales históricos podrían haber sido diferentes. Una de las predicciones de la teoría neutralista es que en una población en equilibrio la heterocigosis media de la población es proporcional al tamaño efectivo (N_e) y la tasa de mutación neutra (μ), es decir que θ se espera sea igual a $4N_e\mu$. Si aceptamos que la tasa de mutación es la misma en ambas especies, lo cual es válido en otras especies de *Drosophila* (Moriyama y Hartl 1993), entonces las diferencias en los niveles de variabilidad podrían explicarse en base a diferencias en el tamaño

efectivo poblacional histórico (N_e). En este contexto, el N_e de *D. buzzatii* habría sido históricamente más bajo que en *D. koepferae*. Esta explicación es coherente con la evidencia obtenida en este trabajo que sugiere que *D. buzzatii* no estaría en equilibrio deriva-mutación ya que habría atravesado una reciente expansión demográfica.

Estudios previos con otros marcadores moleculares y otras poblaciones de las mismas dos especies concuerdan parcialmente con nuestros resultados que apuntan a que *Drosophila koepferae* es genéticamente más variable que *D. buzzatii*. Por ejemplo, para genes nucleares se observó que *D. koepferae* es más variable que *D. buzzatii* para los sitios sinónimos de los genes *Xdh* y *Est5*, en tanto que *D. koepferae* es menos variable que *D. buzzatii* a nivel de los sitios no sinónimos de este gen (Piccinalli et al. 2004, 2007).

Las especies estudiadas tienen diferentes patrones de estructuración poblacional.

La variabilidad molecular y el tamaño efectivo histórico de las especies se relacionan con la estructura poblacional observada en la actualidad. La información aportada por el análisis de mtCOI sugiere un cierto grado de estructuración genético-poblacional en *Drosophila koepferae*. A su vez, los datos aportados por los microsatélites apuntan a una estructuración más marcada. En general, nuestros resultados muestran que las poblaciones de *D. koepferae* están genéticamente diferenciadas y que el patrón de estructuración no está correlacionado con la distancia geográfica (medida en kilómetros lineales) entre localidades.

En cuanto a *Drosophila buzzatii* nuestros resultados indican que las poblaciones no están genéticamente estructuradas. El análisis de la distribución de la variación a nivel de las secuencias de mtCOI muestra la falta de estructuración, mientras que el análisis de variación bayesiano a nivel de marcadores nucleares (empleando microsatélites) detectó casi nula estructuración. Las poblaciones de *D. buzzatii* muestreadas se encuentran distribuidas en el norte y el noreste argentino, separadas por distancias que van desde 25 a 1200 km (Ver Capítulo 2). Incluso las poblaciones más distantes comparten el haplotipo mayoritario de mtCOI, que se encuentra en alta frecuencia (ver Capítulo 2). Estos resultados sugieren que el mayor rango de distancias (1200 km lineales) no parece ser suficiente para limitar el flujo génico en esta especie. En cambio, estudios en poblaciones brasileras de *D. buzzatii*, que habitan el dominio de Caatinga, basados en la caracterización del gen mitocondrial COI detectaron una leve

estructuración genética (Santos et al. 2011). Las poblaciones brasileras parecen ser poblaciones derivadas más recientes, dado que la evidencia más sólida apunta a que el centro de origen de *D. buzzatii* la región biogeográfica del Chaco (ver Capítulo 1). Para obtener mayor información hubiera sido óptimo contar con las secuencias de las poblaciones de *D. buzzatii* en la región de Brasil para incluirlas en un análisis global de estructuración poblacional. No obstante nuestros esfuerzos, los investigadores que las obtuvieron no sólo no nos las facilitaron, sino que tampoco las enviaron a los bancos de secuencias de ADN donde dicha información podría estar disponible para el público (GenBank). Esperamos que próximamente se puedan realizar trabajos cooperativos con el fin de aumentar el conocimiento y corroborar una vez más la validez de nuestros resultados.

La ausencia de estructura genético poblacional observada en este trabajo en *Drosophila buzzatii* está en franca contradicción con la fuerte estructuración geográfica observada para el polimorfismo cromosómico (Hasson et al. 1995, Rodríguez et al. 2000). En efecto, las frecuencias de las variantes en el ordenamiento de genes producidas por inversiones cromosómicas se correlacionan con diferentes variables geográficas, como latitud, longitud y altitud y con variables climáticas, como la temperatura, la presión, la humedad y las precipitaciones. A su vez, se encontraron patrones de variación clinal del polimorfismo cromosómico convergentes y paralelos entre las áreas de distribución original (Argentina) y de colonización reciente (Australia) lo cual sugiere su origen selectivo (Ruiz et al. 1982, Hasson et al. 1995, Rodríguez 2000). Asimismo, los estudios en poblaciones naturales han mostrado que el mantenimiento del polimorfismo de las inversiones está correlacionado con características de los cactus hospedadores de las moscas (Fernández Iriarte y Hasson 2000; Fernández-Iriarte et al. 2002). Dado lo cual, nos podemos preguntar si las diferencias en los patrones de estructuración entre *D. koepferae* y *D. buzzatii* están relacionadas con los cactus hospedadores específicos, lo cual exploraremos a continuación.

La estructura poblacional y los cactus hospedadores.

Las especies cactófilas *Drosophila koepferae* y *D. buzzatii* tienen hospedadores (cactus) bien definidos: la primera explota, principalmente, los tejidos necróticos de cactus columnares como *Trichocereus tercheskii* (cardón) como recurso de cría, en tanto que la segunda utiliza, primariamente, los tejidos en descomposición de tunas como *Opuntia sulphurea*, aunque es importante recordar que el recurso principal de una es el alternativo de la otra.

Teóricamente se predice que las especies que explotan recursos que tienen distribución discontinua experimentan mayores restricciones al flujo génico que aquellas que usan recursos con distribución más homogénea y continua (Shoemaker y Jaenike 1997, Pfeiler y Markow 2001). Esto podría subyacer a las diferencias en la distribución, y por tanto en la capacidad de dispersión de ambas especies. Podríamos suponer, dado el rango mayor de distribución de *Drosophila buzzatii* con respecto a *D. koepferae*, que la primera tiene una mayor vagilidad o capacidad dispersiva, lo cual está relacionado con la distribución de los cactus hospedadores. Si consideramos que una de las diferencias en cuanto a la estructura genético poblacional de estas especies está dada por su acople a la distribución de sus hospedadores, es menester interrogarse sobre la distribución diferencial de los cactus en la actualidad y la historia de la misma.

La distribución diferencial entre cactus hospedadores puede ser el resultado de diversos factores, tales como sus estrategias reproductivas, características biológicas y habilidad para colonizar nuevos hábitats (Hasson et al. 1992). En particular, las tunas (nombre genérico que reciben las cactáceas del género *Opuntia*) tienen la capacidad de reproducirse vegetativamente, lo cual posibilita la colonización de nuevos ambientes y la expansión de su distribución de modo más rápido que la de cactus columnares. Esto hace que las tunas y los cactus columnares se diferencien en sus patrones de distribución geográfica, en relación a su predictibilidad espacial y temporal, que son aspectos fundamentales para el ciclo de vida de las moscas (Fanara et al. 1999). Es decir, las tunas son un recurso más abundante, aunque a su vez dado el menor tamaño de sus cladodios (tallos modificados) son más efímeros que los columnares. Además, los sustratos de tunas se descomponen con más rapidez y se secan antes que los de los columnares, de manera que estos últimos se vuelven un recurso temporalmente más estable en el que las moscas pueden reproducirse y criarse por varias generaciones, contrariamente a las tunas cuyos sustratos pueden soportar muy pocas generaciones de moscas (Hasson et al. 1992).

Nuestros resultados concuerdan con la predicción. Por un lado, *Drosophila koepferae*, principalmente, asociada a cactus columnares que se caracterizan por una distribución discontinua que los hace poco predecibles para la oviposición, pero predecibles para el desarrollo de las larvas por su larga duración, muestra un cierto grado de estructuración genética (Heed y Morgan 1986, Hasson et al. 1992, Etges 1993, Fanara et al. 1999, Fanara y Hasson 2001, Fernández Iriarte et al. 2002). Por otro lado, la falta de estructuración poblacional en *D. buzzatii* es coherente con las características del tipo de planta hospedadora que explota,

preferencialmente, en la naturaleza, las tunas del género *Opuntia* (*O. quimilo*, *O. vulgaris*, *O. sulphurea*). En efecto, el uso de un hospedador que se caracteriza por una distribución más continua (debido a su capacidad de reproducirse vegetativamente) que lo hace espacialmente predecible pero que son temporalmente poco predecibles (efímeros) debido al menor tamaño de sus cladodios y menor duración como sustratos para las moscas, podría explicar la falta de estructuración poblacional en *D. buzzatii*.

Un trabajo reciente en un sistema paralelo (mosca-cactus hospedador) en el norte de América encontró que no hay estructuración genético-poblacional en *Drosophila mojavensis* ni en *D. mettleri*) en las áreas donde usan como hospedadores a tunas y que habitan la región de Baja California (Polihronakis Richmond et al. 2013).

La relación de los mecanismos de detoxificación con la distribución de las moscas en función de los hospedadores.

Como hemos descrito en el primer capítulo, tanto *Drosophila buzzatii* como *D. koepferae* utilizan tejidos necróticos de cactus como sitio de ovoposición, de reproducción y de desarrollo de larvas donde éstas se alimentan. Las larvas se alimentan de la flora microbiana que habita los tejidos necróticos (en putrefacción) de los cactus, y este micro-hábitat al que las drosófilas cactófilas están adaptadas, es potencialmente tóxico para otras especies de *Drosophila*. En general las interacciones insecto-planta hospedadora están asociadas a adaptaciones específicas, como mecanismos especializados de detoxificación de aleloquímicos. Esto permite a los insectos (como es el caso de las moscas cactófilas) alimentarse sobre plantas cuyos metabolitos secundarios son potencialmente dañinos (Krieger et al. 1971, Karban y Agrawal 2002, Li et al. 2007, Matsuki et al. 2011). La asociación de *Drosophila* con los cactus es el resultado de la especialización adaptativa de varios aspectos de la historia de vida, que van desde señales olfatorias hasta preferencia por sitios de alimentación de la larva (Markow y O'Grady 2008). Por ejemplo, Craft et al. (2010) encontraron que las tasas de alimentación de larvas de *D. mojavensis* del desierto de Sonora (América del Norte) son más altas cuando se las alimenta con cactus columnares que con tunas, siendo los columnares los hospedadores en mayor abundancia y lo que prefieren estas especies en estado natural.

Las tunas y columnares como recursos tróficos tienen, además de lo ya mencionado otras características que los diferencian y que a la vez son relevantes para el ciclo de vida de las drosófilas. Los cactus columnares cuentan con compuestos tóxicos (antiherbivoría) como por

ejemplo alcaloides y triterpenos y, por lo tanto, representan un ambiente estresante durante el desarrollo larval; en tanto que las tunas ofrecen un ambiente químico más benigno y rico desde el punto de vista nutricional que los columnares (Hasson et al. 2009, Soto et al. 2012; Corio et al. 2010). Las tunas (Opuntioideae) y los columnares (Cactoideae) forman parte de diferentes subfamilias de la familia de las cactáceas (Cactaceae), de modo que están lejanamente emparentadas desde el punto de vista filogenético (Gibson y Horak 1978, Cota y Wallace 1997 en Polihronakis Richmond et al. 2013), por tanto, las diferencias en su composición química son esperables en cuanto a presencia/ausencia de compuestos tóxicos y en relación a su suficiencia nutricional como sitios de cría de las moscas (Fogleman y Danielson 2001).

Las interacciones insecto-planta hospedadora en general están asociadas a adaptaciones específicas, como mecanismos de detoxificación, esto permite a los insectos alimentarse sobre plantas que poseen metabolitos secundarios que de otra forma le resultarían dañinos (Karban y Agrawal 2002, Li et al. 2007, Matsuki et al. 2011). En este sentido, existe evidencia de efectos de detoxificación en drosófilas del desierto que muestran cambios evolutivos en genes que participan en los procesos de detoxificación, como los genes nucleares Alcohol dehidrogenasa y Glutathione- S-transferasa (Maztkin et al. 2008, 2012). Por lo anterior mencionado, los cambios de hospedadores son un desafío ecológico significativo. *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae* a pesar de que poseen la capacidad de utilizar como hospedadores tanto tunas como columnares, ambas tienen hospedadores primarios, las tunas para *D. buzzatii* y los cactus columnares para *D. koepferae* (ver Capítulo 1). En la siguiente sección discutiremos al respecto.

Cambios en las plantas hospedadoras y su influencia en la distribución de las especies.

En un trabajo reciente, Oliveira y colaboradores (2012) presentan a *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae* como especies que utilizan como plantas hospedadoras tanto a columnares como a tunas. Sin embargo, como hemos mencionado, gracias a trabajos de nuestro grupo de investigación sabemos que hay una clara preferencia de tunas por *D. buzzatii* y de cactus columnares por *D. koepferae* (Hasson et al. 1992, Fanara y Hasson 2001, Soto et al. 2012). Según Olivera y colaboradores (2012) hace aproximadamente 11.3 millones de años el ancestro común entre *D. buzzatii* y *D. koepferae* experimentó un cambio de hospedador hacia un ambiente menos tóxico (ver Fig. en Anexo III), este cambio de hospedador implica un desafío ecológico significativo (Futuyma et al 1995, Polihronakis Richmond et al 2013). Cuando *D.*

koepferae se constituyó como especie hace aproximadamente 2.5 a 4.6 millones de años (Gómez y Hasson, 2003, Oliveira et al. 2012) tenía la capacidad de elegir entre dos hospedadores bioquímicamente muy diferentes como ser tunas y cactus columnares, y actualmente esta especie tiene preferencia por los columnares. Esta especialización (o preferencia) de *D. koepferae* hacia los columnares, habría impuesto una restricción al flujo génico, lo cual habría sido un determinante relevante en el rango de distribución restringido de esta especie al noroeste de la Argentina y sur de Bolivia (Fontdevila et al 1988). Un razonamiento análogo han realizado Polihronakis Richmond y colaboradores (2013) para explicar por qué la cactófila *D. nigrospiracula* no amplió su rango de distribución más allá de donde se encuentra su cactus hospedador en el área de Baja California.

Factores que pudieron haber influenciado en la distribución de las cactáceas.

Dado que los cactus hospedadores de las cactófilas han influenciado la distribución de las moscas, nos podemos preguntar sobre qué factores podrían haber influenciado a su vez en la distribución de los cactus. Se sabe que fenómenos paleoclimáticos influyeron fuertemente en la distribución y composición de toda la paleovegetación a lo largo del continente sudamericano (Ab'Saber 1977; Colinvaux et al. 1996; Bennett 2000, Haberle y Lumley 2000, Betancourt et al. 2000), y es muy probable que hayan tenido también influencia (posiblemente de diferente modo) sobre la distribución los cactus columnares y las tunas (Betancourt et al. 2000, Bennett et al. 2000, Baker et al. 2001). Una evidencia concreta de este efecto proviene del Desierto de Atacama en Chile, cerca de la Prepuna Argentina. Estudios de microfósiles realizados en la cuenca del Salar de Atacama, revelaron la presencia de restos de *Trichocereus* sp. de unos 10000 a 16000 años de antigüedad, a pesar de que hoy este género no se encuentra en la cuenca (Betancourt et al. 2000). De esta manera, expansiones y contracciones diferenciales en la distribución de los cactus hospedadores habrían sido determinantes en la distribución de las poblaciones en la naturaleza, y por tanto en la estructuración genético poblacional actual de *Drosophila koepferae* y *D. buzzatii*. Esta idea es consistente con los resultados de un análisis cladístico anidado que se realizó en las especies *D. serido*, *D. seriema*, *D. antonietae* y *D. gouveai* (De Brito et al. 2002) que están cercanamente emparentadas con *D. buzzatii* y *D. koepferae* (Manfrin y Sene 2006, Hasson et al. 2009). En este estudio los autores proponen que las alteraciones en la distribución de los cactus durante el Período Cuaternario habrían tenido

un fuerte impacto sobre los patrones de distribución y diferenciación de estas especies en Brasil. La dispersión y la vagilidad son importantes factores que moldean los patrones fitogeográficos de las especies (Smith y Farrell 2006, Kodandaramaiah 2009, Pfeiler y Markow 2011).

La estructura poblacional de las especies está moldeada por la importancia relativa de diferentes factores, como la deriva genética, el flujo génico y la selección (Slatkin 1989), factores históricos como la vicarianza y la colonización (Hewitt et al. 1994), lo cual a su vez está íntimamente asociado con los hospedadores particulares de cada especie. En este sentido sería interesante, a futuro, realizar al menos dos estudios. Uno de análisis de distribución de los cactus hospedadores, y otro de correlación con otras variables climáticas, ya sea latitud o humedad para ver si esta estructuración poblacional encontrada en *Drosophila koepferae* está vinculada con alguna de ellas, y poder postular algún mecanismo involucrado en la disposición espacial de esta especie. Este análisis de microvarianza, podría ser fundamental para evaluar las relaciones ecológica-evolutivas entre las moscas cactófilas, y el micro-hábitat necrótico que habitan, en los desiertos en general y en particular en el noroeste argentino.

Estudios relacionados con otras cactófilas.

En relación a otros estudios de estructura poblacional en otras moscas cactófilas, podemos hacer referencia a *Drosophila nigrospiracula* y *D. mettleri* ambas viven en Baja California (América del Norte) y tienen la capacidad de usar una amplia variedad de cactus hospedadores (Fellows et al. 1972, Breitmyer et al. 1998, Markow et al. 2002, Pfeiler y Markow 2011). A pesar de compartir su área de distribución no compiten directamente por los recursos puesto que *D. nigrospiracula* se cría en los tejidos necróticos de los cactus y *D. mettleri* lo hace en el suelo anegado que contiene el exudado de los tejidos en descomposición del mismo cactus. Ambas especies tienen una gran capacidad dispersiva (Johnston y Heed 1979, Markow et al. 2000, Pfeiler y Markow 2011), y una falta de estructuración genética con respecto a alozimas y a ADN mitocondrial (Pfeiler y Markow 2011). La falta de estructura poblacional de *D. buzzatii* podría ser análoga a este caso, esta especie tiene una alta capacidad de dispersión, y si bien como se ha señalado tiene preferencia por tunas, puede utilizar otros cactus hospedadores. A diferencia de *D. nigrospiracula* y *D. mettleri*, las especies estudiadas en esta tesis (*D. buzzatii* y *D. koepferae*) pueden potencialmente competir por el recurso, puesto que las dos se alimentan directamente del tejido necrótico de los cactus (ambas conservan la capacidad, más allá de sus

preferencias, de utilizar como hospedadores tanto tunas como columnares) y de la fauna microbiana (hongos y bacterias) que allí habita.

Interpretaciones teóricas de los patrones de estructuración de ambas especies.

Teóricamente, para *Drosophila koepferae* la estructuración poblacional encontrada podría explicarse con modelo de islas de flujo génico entre múltiples demos, donde cada demo (población) contribuye con gametos al pool génico común (Templeton 2006). Este modelo supone que una población ancestral se fragmentó en islotes locales de modo de que habría una pequeña correlación entre la distancia geográfica y el aislamiento (Templeton 2006). Si bien en nuestro estudio no se encontró correlación entre la distancia geográfica y la estructuración, no podemos descartar que futuros estudios (por ejemplo de microvarianza) encuentren una asociación entre ambas variables.

Teóricamente la falta de estructuración de *Drosophila buzzatii* puede deberse a dos factores principales, uno como hemos mencionado, al tratarse de una especie que ha atravesado una expansión reciente, puede que aún no haya tenido tiempo suficiente para alcanzar una condición de equilibrio de deriva –mutación. Si las condiciones ambientales se mantuvieran como las actuales, es teóricamente esperable que esta especie alcance este equilibrio. Otro factor podría ser que dado que es una especie con gran capacidad dispersiva, que a su vez tiene como hospedador primario las tunas, el flujo génico entre poblaciones no se vea interrumpido como para que la especie presente rasgos de diferenciación genética.

Conclusiones finales

- *Drosophila koepferae* tiene mayor variación molecular que *D. buzzatii* tanto para el gen mitocondrial COI, como para 9 microsatélites específicos de ubicación genómica.
- *Drosophila koepferae* y *D. buzzatii* muestran diferencias en la variabilidad molecular relacionadas con la historia demográfica de ambas.
- En *Drosophila koepferae* los patrones observados de variación molecular coinciden con lo esperado en poblaciones antiguas bajo un equilibrio deriva -mutación.
- En *Drosophila buzzatii* los patrones observados de variación molecular se desvían respecto del modelo deriva- mutación, lo cual se explicaría por eventos demográficos, tal como una expansión poblacional. Las causas de esta expansión estarían asociadas con la alteración en la distribución de las especies de cactus sobre las cuales esta especie se alimenta y se cría
- *Drosophila koepferae* está estructurada genéticamente tanto para el gen mitocondrial COI como para los 9 pares de marcadores de alta resolución que se analizaron. Esta estructuración genética no está vinculada a la distancia geográfica.
- *Drosophila buzzatii* no está estructurada genéticamente.
- Las diferencias entre las historias demográficas de ambas especies así como su distribución actual están relacionadas con la distribución de los cactus hospedadores donde se alimentan y se crían.

BIBLIOGRAFÍA

A-

Ab'Saber AN. 1977. Espacios ocupados pela expansao dos climas secos da América do Sul, por ocasio dos periodos glaciais quaternarios. *Paleoclimas* 3: 1-19.

Abellán P, Gómez-Zurita J, Millán A, Sánchez-Fernández D, Velasco J, Galián J y Ribera I. 2007. Conservation genetics in hypersaline inland waters: mitochondrial diversity and phylogeography of an endangered Iberian beetle (Coleoptera: Hydraenidae). *Conservation Genetics* 1: 78-88.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3): 403-10.

Aris-Brosou S y Excoffier L. 1996. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Mol. Biol. Evol.* 13: 494-504.

Atkinson P y Shorrocks B. 1977. Breeding site specificity in the domestic species of *Drosophila*. *Oecologia (Berl)* 20: 223-233.

Avise JC, Arnold J, Ball M, Bermingham E, Lamd T, Neigel J, Reeb C y Saunders N. 1987. Intraespecific phylogeography: The Mitochondrial DNA bridge between population genetics and sytematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.

Avise, JC. 1994 *Molecular markers, natural history and evolution.* Chapman & Hall, New York.

Avise, JC. 1998. The history and pureview of phylogeography: a personal reflection. *Mol. Evol.* 7:371-379.

Avise, JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species.* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Avise, JC 2009. Phylogeography: restrospect and prospect. *J. Biogeography* 36: 3-15.

B-

Baechli G. 2005. Taxodros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae. <http://www.taxodros.uzh.ch/>

Baimai V, Sene FM y Pereira MAQR. 1983. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactusbreeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica* 60: 81-82.

- Balding D, Donnelly P, Griffiths RC, Tavaré S.** 1994. Inferring coalescence times from DNA sequence data. *Genetics* 145: 505-518.
- Bandelt HJ, Forster P y Röhl A.** 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16(1): 37-48.
- Baker PA, Seltzer GO, Fritz SC, Dunbar RB, Grove MJ, Tapia PM, Cross L, Rowe HD y Broda JD.** 2001. The history of South American tropical precipitation for the past 25,000 years. *Science* 291: 640-643.
- Barker GM.** 2002. Phylogenetic diversity: a quantitative framework for measurement of priority and achievement in biodiversity conservation. *Biol. J. Linn. Soc.* 76: 165–194.
- Barker JSF.** 1982. Population genetics of *Opuntia* breeding *Drosophila* in Australia. Pages 209-224 in Starmer JSFBaWT, ed. *The Cactus-Yeast-Drosophila Model System. Ecological Genetics and Evolution.* Academic Press, New South Wales, Australia.
- Barker JSF y Mulley JC.** 1976. Isozyme variation in natural populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 30: 213-233.
- Barker JSF, Sene FM, East PD y Pererira MAQR.** 1985. Allozyme and chromosomal polymorphism of *Drosophila buzzatii* in Brazil and Argentina. *Genetica* 67.
- Barker JSF, Frydenberg J, González, H I Davies, A Ruiz, J G Sørensen y V Loeschke.** 2009. Bottlenecks, population differentiation and apparent selection at microsatellite loci in Australian *Drosophila buzzatii*. *Heredity* 102, 389–401; doi:10.1038/hdy.2008.127.
- Barker JSF, Frydenberg J, Sarup P y Loeschke V.** 2011. Altitudinal and seasonal variation in microsatellite allele frequencies of *Drosophila buzzatii*. *J. Evol. Biol.* 24(2):430-439.
- Benado M y Montero C.** 1988. Competition between the cactophilic species *Drosophila starmeri* and *D. unisetata*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 61: 187-190.
- Bandelt HJ, Forster P y Röhl A.** 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37.
- Bennett DK, Haberle SG y Lumley LS.** 2000. The last Glacial-Holocene transition in southern Chile. *Science* 290: 325-328.
- Bertone MA y Wiegmann BM.** 2009. *Diptera in Hedges and Kumar (eds.) The Timetree of Life.* Oxford University Press, New York.
- Betancourt JL, Latorre C, Rech JA, Quade J y Rylander KA.** 2000. A 22,000-Year Record of Monsoonal Precipitation from Northern Chile's Atacama Desert. *Science* 289: 1542-1546.
- Bizzo N.** 1983. Estudos sobre a biologia e isolamento reprodutivo em *Drosophila serido*. Master Thesis. Depto. Genética, Instituto Biociências, USP, São Paulo, Brazil.
- Bonferroni CE.** 1936. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità, *Pubbl. d. R. Ist. Super. di Sci. Economia e Commerciali di Firenze (in Italian)* 8: 1–62, Zbl 0016.41103.

Bossart JL y Prowell DP. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *TREE*. 13: 202-206.

Bowler PJ y Morus IR, 2005. Panorama general de la ciencia moderna. Ed. Crítica España.

Breitmeyer CM y Markow TA. 1998 Resource availability and population size in cactophilic *Drosophila*. *Funct. Ecol.* 12: 14-21.

Brcic D. 1983. Ecology of flower-breeding *Drosophila* in Ashburner M, Carson R, Thompson D. (eds). *The genetics and Biology of Drosophila*, vol. 3d. Academic Press, London.

Brown WM, Wright JW. 1975. Mitochondrial DNA analyses and the origin of parthenogenesis in whiptail lizards (*Cnemidophorus*). *Herpetol. Rev.* 6: 70-71

C-

Cabrera A. 1976. Regiones Fitogeográficas de la Argentina in ACME S, ed. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Ganadería*, vol. Fascículo 1. Buenos Aires.

Carreira VP, Soto EM, Hasson ER y Fanara J. 2006. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *J. Evol. Biol.* 19: 1275-1282.

Carson HL. 1971. The ecology of *Drosophila* breeding sites. Arboton Lecture. University of Hawaii 2: 1-28.

Carson HL. 1974. Three flies and three islands: parallel evolution in *Drosophila*. *PNAS* 71: 3571-3521.

Colinvaux PA, De Oliviera PE, Moreno MC, Miller ME y Bush MB. 1996. A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in Glacial times. *Science* 274: 85-88.

Corio C, Soto E, Betti M, Soto I y Hasson ER. 2010. Efecto de los alcaloides sobre la aptitud darwiniana en el modelo cactus-*Drosophila*. Péster. IV Reunión Binacional de Ecología, XXIV Reunión Argentina de Ecología XVII Reunión de la Sociedad de Ecología de Chile, Santiago, Chile.

Craft J. 2010. Feeding rates of *D. mojavensis sonorensis* on native and non-native hosts. *Drosophila Information Service* 93: 47-49.

Crisci JV, Katinas L y Posadas P, eds. 2000. *Introducción a la Teoría y Práctica de la Biogeografía Histórica*. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.

D-

Darwin CR. 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. Nature. London: John Murray.

De Brito RA, Manfrin MH y Sene FM. 2002. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian population of *Drosophila buzzatii*. *Genet Mol Biol* 25: 161-171.

Depew DJ, y Werber BH, eds. 1996. *Darwinism Evolving. Systems Dynamics and the Genealogy of Natural Selection.* MIT Press, Cambridge, Massachusetts

Durando C, Baker R, Etges WJ, Heed W, Wasserman M y DeSalle R. 2000. Phylogenetic analysis of the repleta species Group of Genus *Drosophila* using multiple source of characters. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16: 296-307.

E-

East PD. 1982. Non-specific esterases of *Drosophila buzzatii*. Pages 323-328. *Ecological genetics and evolution. The cactus-yeast-Drosophila model system.* Sydney, Australia: Barker, J S F Starmer, W T.

Etges WJ. 1993. Genetics of host-cactus response and life-history evolution among ancestral and derived populations of cactophilic *Drosophila mojavensis*. *Evolution* 47:750-767

Evanno G, Regnaut S y Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Biol. Evol.* 14: 2611-2620.

Excoffier L, Smouse PE y Quattro JM. 1992. Analysis of the molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Excoffier L. 2003 Analysis of Population Subdivision. In: Balding D, Bishop M, Cannings C, eds. *Handbook of Statistical Genetics.* 2nd Edition. New York: John Wiley and Sons, Ltd; pp. 713–750.

Excoffier L, Laval G, y Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1:47-50.

Excoffier L y Heckel G. 2006. Computer programs for populations genetics data analysis: a survival guide. *Nature Rev. Genet.* 7: 745-758.

Excoffier L. 2009. Arlequin Ver 3.5. An Integrated Software package for population genetics data analysis. Swiss Institute of Bioinformatics. Universitat Bern.

Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3): 564-7.

F-

Falush D, Stephens M y Pritchard JK. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes* 7: 574-578.

Fanara J y Hasson ER. 2001. Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. *Evolution* 55: 2615-2619.

- Fanara J, Fontdevila A y Hasson ER.** 1999. Oviposition preference, viability, developmental time and body size in the cactophilic species *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association to their natural hosts. *Evol. Ecol.* 13: 173-190.
- Fanara JJ, Folguera G, Iriarte PF, Mensch J y Hasson E.** 2006. Genotype by environment interactions in viability and developmental time in populations of cactophilic *Drosophila*. *J. Evol. Biol.* 19: 900-908.
- Fellows DP y Heed WB.** 1972. Factors affecting host plant selection in desert-adapted cactophilic *Drosophila*. *Ecology.* 53, 850–858.
- Fernández Iriarte PJ y Hasson ER.** 2000. The role of the use of different cactus hosts in the maintenance of the inversion polymorphism in *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 54:1295-1302.
- Fernández-Iriarte PJ, Rodríguez C y Hasson ER.** 2002. Inversion and allozyme polymorphism show contrasting patterns of microgeographical population structure in a natural population of *Drosophila buzzatii* from Argentina. *J. Evol. Biol.* 15: 226 - 234.
- Folguera G y Lipko P.** 2007. La Teoría Sintética y la población como (única) unidad evolutiva. *Fundo Mackenzie de Pesquisa (MackPesquisa) Sao Paulo*, pp 191-202.
- Folguera G, Mensch J, Muñoz J, Ceballos S, Hasson ER y Bozinovic F.** 2010. Ontogenetic stage-dependent effect of temperature on developmental time and metabolic rate in a holometabolous insect. *J. Insect Physiol.* 76:1679-1684.
- Fontdevila A.** 1989. Founder effects in colonizing populations: the case of *Drosophila buzzatii*. pp 74-95. En A. Fontdevila E., ed. *Evolutionary Biology of Transient Unstable Populations*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Fontdevila A, Ruiz A, Alonso G y Ocaña J.** 1981. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. I. Natural chromosomal polymorphism in colonized populations of the Old World. *Evolution* 35: 148-157.
- Fontdevila A, Pla C, Hasson ER, Wasserman A, Sanchez H, Naveira A y Ruiz Jimenez M.** 1988. *Drosophila koepferae*: a new member of the *D. serido* superspecies taxon. *Ann. Entom. Soc. Am.* 83: 380-385.
- Fogleman J y Danielson P.** 2001. Chemical interactions in the cactus-microorganism-*Drosophila* model system of the Sonora Desert. *Am. Zool.* 41:877-889.
- Franco FF.** 2009. História evolutiva do “cluster” *Drosophila buzzatii* (grupo *D. repleta*): eventos históricos e diversificação de espécies no Brasil. Tesis doctoral, Universidade De São Paulo.
- Freeland JR.** ed. 2005. *Molecular Ecology*. Wiley, West Sussex.
- Fu Y.** 1997. Statistical Test of neutrality of mutations against population growth hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Futuyama D J, Keese MC y Funk DJ.** 1995. Genetic constraints on macroevolution: the evolution of host affiliation in the leaf beetle genus *Opherella*. *Evolution* 49: 797-809.

Futuyma DJ, ed. 1997. *Evolutionary Biology*. Sunderland, Massachusetts.

G-

Garza JC y Williamson EG. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 10: 305-318.

Gray DA, Huang H y Knowles LL. 2008. Molecular evidence of a peripatric origin for two sympatric species of field crickets (*Gryllus rubens* and *G. texensis*) revealed from coalescent simulations and population genetic tests. *Mol. Ecol.* 17: 3836-3855.

Griffiths RC. 1994. Genetree software Version 9.0. <http://www.stats.ox.ac.uk/~griff/software.html>.

Gómez GA y Hasson E. 2003. Traspécific polymorphism in an inversion linked Esterase locus in *Drosophila buzzatii*. *Mol. Biol. Evol.* 20: 410-423.

Gould SJ. 1983. La Evolución como hecho y como teoría "Dientes de gallina y dedos de caballo". Pag. 215-222 en *Dientes de gallina y dedos de caballo*. Crítica, Barcelona.

Gould SJ. 2004. *La estructura de la teoría de la Evolución*. Tusquets, Barcelona.

Goldstein DB y Schlöterer C. 1999. *Microsatellites, Evolution and applications*. Ed. Oxford. United Kingdom.

Guzman NV. 2010. Filogeografía comparada de dos especies de gorgojos plaga con distintos modos de reproducción. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

H-

Hamilton K. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques* 27: 500-507.

Hall T. 1999. BioEdit in Ibis Biosciences An Abbott company 2251 Faraday Avenue Carlsbad ed. 7.0.

Hardy DE. 1965. *Insects of Hawaii* vol. 12. Diptera: Cyclorrhapha II, Series Schizophora, Section Acalypterae I. Family Drosophilidae Honolulu.

Hartl DL, Clark AG. 2007. *Principles of Population Genetics*, 4th ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts

Hasson ER. 1988. Ecogenética evolutiva de *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae* en las regiones áridas y semiáridas de la Argentina. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Hasson ER, Neveira H y Fontdevila A. 1992. The breeding sites of Argentinian cactophilic species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group) *Rev. Chil. Hist. Nat.* 63: 319-326.

Hasson ER, Rodriguez C, Fanara J, Neveira H, Reig O, y Fontdevila A. 1995. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXVI. Macrogeographic patterns of inversion polymorphism in New World populations. *J. Evol. Biol.* 8: 369-384.

Hasson, ER y WF Eanes. 1996. Contrasting Histories of Three Gene Regions Associated With In (3L) Payne of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144: 1565-1575.

Hasson ER, Soto IM y Carreira V. 2009. Host plants, fitness and developmental instability in a guild of cactophilic species of the genus *Drosophila*. En: Santos E. ed., *Ecotoxicology Research Developments*. Nova Science Publishers, Hauppauge.

Heed W. 1978. Ecology and genetics of Sonoran Desert *Drosophila* in P.F.Brussard, Nyamathi A, eds. *Ecological Genetics: The Interface*. Springer-Verlag, New York

Heed WB y Morgan RL. 1986. Community ecology os Sonora Desert *Drosophila*. Pag. 311-345 in Ashburner M, Carson R, Thompson D, eds. *The genetics Biology of Drosophila*. Academic Press, New York.

Heed WB y Mangan RK. 1989. Community ecology of the Sonoran Desert *Drosophila*. Pag. 311-345 in M. Ashburner H L., Carson AJNTJ, eds, vol. 3 Academic Press, New York.

Hewitt GM. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos. Trans. R. Soc. London, B* 359: 183-195.

Hey J y Machado C A. 2003. The study of structured populations: a difficult and divided science has new hope. *Nature Rev. Genet.* 4: 535-543.

Hudson R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. pp 1-44 En Futuyama D y Antonovics J, ed. *Evolutionary biology*, vol. 7. Oxford University Press, New York.

Hurtado L, Erez T, Castrezana S y Markow T. 2004. Constrasting population genetic patterns and evolutionary histories among sympatric Sonora Desert cactophilic *Drosophila*. *Mol. Ecol.* 13: 1365-1375

Hutchison DW y Templeton AR. 1999. Correlation between pair-wise genetic and geographic distances measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53: 1898-1914.

Hubisz MJ, Falush D, Stephens M y Pritchard JK. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Resour.* 9: 1322-1332.

J-

Jaenike JG. 1983. Genetic variation for host preference within and among populations of *Drosophila tripunctata*. *Evolution* 37: 1023-1033.

Johnston JS y Heed WB. 1976 Dispersal of desert-adapted *Drosophila*: The saguaro-breeding *D. nigrospiracula*. *Am. Nat.*, 110: 629–651.

Joseph L, Wilke T y Alpers D. 2002. Reconciling genetic expectations from host specificity with historical population dynamics in an avian brood parasite, Horsfield's Bronze-Cuckoo *Chalcites basalis* of Australia. *Mol. Ecol.* 11: 829-837.

K-

Karban R, y Agrawal AA. 2002. Herbivore offense. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33:641-664.

Kimura M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution.* Cambridge University Press, Cambridge.

Kingman J. 1982. On the genealogy of large populations. *J. Appl. Probab.* 19: 27-43.

Knibb WR y Barker JSF. 1988. Polymorphic inversion and esterase loci complex on chromosome 2 of *Drosophila buzzatii*. II. Spatial variation. *Aust J Biol Sci* 41: 239-246.

Kirchman JJ, Whittingham LA y Sheldona FH 2000. Relationships among Cave Swallow Populations (*Petrochelidon fulva*) Determined by Comparisons of Microsatellite and Cytochrome b Data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 14(1): 107-121.

Kodandaramaiah U. 2009. Vagility: The neglected component in historical biogeography. *Evol. Biol.* 36: 327-335.

Kowles LL y Madison WP. 2002. Statistical phylogeography. *Mol. Ecol.* 11: 2623-2635

Krieger RI, Feeny PP y Wilkinson CF. 1971. Detoxification enzymes in the guts of caterpillars: an evolutionary answer to plan defence? *Science.* 172: 579-581.

Krzaeminki W y Krzamisnska E. 2003. Triassic Diptera: descriptions, revisions and phylogenetic relations. *Acta Zool. Cracov.* 46: 153-184.

L-

Laayouni H, Santos M y Fontdevila A. 2000. Toward a physical map of *Drosophila buzzatii*: use of randomly amplified polymorphic DNA polymorphisms and sequence-tagged site landmarks. *Genetics* 156: 1797-1816.

Laayouni, H, Hasson ER, Santos M y Fontdevila A. 2003. The Evolutionary History of *Drosophila buzzatii*. XXXV. Inversion Polymorphism and Nucleotide Variability in Different Regions of the Second Chromosome. *Mol. Biol. Evol.* 20:931-944.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mole. Ecol.* 11: 2453-2465.

Li XC, Schuler MA y Berenbaum MR. 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Ann. Rev. Entomol.* 52: 231-253.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

M-

- Manfrin MH y Sene FM.** 2006. Cactophilic *Drosophila* in South America: a model for evolutionary studies. *Genetica* 126: 57-75.
- Manfrin MH, De Brito FM y Sene FM.** 2001. Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) cluster using mtDNA. *Ann. Entomol. Soc. Am* 94: 333-346.
- Mantel, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209-220.
- Matsuki M, Kay N, Serin J y Scott JK.** 2011. Variation in ability of larvae of phytophagous insects to develop on evolutionarily unfamiliar plants: a study with gypsy moth *Lymantria dispar* and *Eucalyptus*. *Agric. Forest Entomol.* 13: 1-13.
- Marin I y Fontdevila A.** 1993. Evolutionary conservation and molecular characteristics of repetitive sequences of *Drosophila koepferae*. *Heredity* 76: 355-366.
- Marin I, Ruiz A, Pla C y Fontdevila A.** 1993. Reproductive relationships among ten species of the *Drosophila repleta* group from South America from the West Indies. *Evolution* 47: 1616-1624.
- Matzkin LM.** 2008. The molecular basis of host adaptation in cactophilic *Drosophila*: Molecular evolution of Glutathione- S-transferase (GST) in *Drosophila mojavensis*. *Genetics.* 178:1073-1083.
- Matzkin LM.** 2012. Population transcriptomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. *Mol. Ecol.* 21:2428-2439.
- Markow TA y Castrezana S.** 2000. Dispersal in cactophilic *Drosophila*. *Oikos*, 89:378-386.
- Markow TA, Castrezana S y Pfeiler E.** 2002. Flies across the water: genetic differentiation and reproductive isolation in allopatric desert *Drosophila*. *Evolution* 56:546-52.
- Markow TA y O'Grady P.** 2006. *Drosophila: A Guide to Species Identification and Use.* Academic Press, London.
- Markow TA y O'Grady P.** 2008. Reproductive ecology of *Drosophila*. *Funct. Ecol.* 22: 747-759.
- Mayr E,** ed. 1982. The growth of biological thought. Diversity, Evolution and Inheritance. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Michalakis Y y Excoffier L.** 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142(3):1061-1064
- Mirol P, Schafer A, Orsini L, Routtu J, Scholotterer C, Hoikkala A y Butlins R.** 2007. Phylogeographic patterns in *Drosophila montana*. *Mol. Ecol.* 16.

Moraes E, Yotoko K, Manfrin MH, Solferini V y Sene FM. 2009. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. *J. Biogeogr.* 36: 2136-2147.

Moriyama EN, y Hartl DL. 1993. Codon usage bias and base composition of nuclear genes in *Drosophila*. *Genetics* 134: 847-858.

N-

Navarro A, Barbadilla A, y Ruiz A. 2000. Effect of inversion polymorphism on the neutral nucleotide variability of linked chromosomal regions in *Drosophila*. *Genetics* 155:685–698.

Naveira H y Fontdevila A. 1986. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XII. The genetic basis of sterility in hybrids between *D. buzzatii* and its sibling *D. serido*. *Genetics* 114: 841-857.

Nei M, Tajima F y Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19: 153-170.

Nordborg M y Innan H. 2003. The genealogy of sequences containing multiple sites subject to strong selection in a subdivided population. *Genetics* 163: 1201- 1213.

Nosil, P. 2012. Ecological speciation. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

O-

O'Grady P, Baker R, Durando C, Etges WJ y DeSalle R. 2001. Polytene chromosomes as indicators of phylogeny in several species groups of *Drosophila*. *BMC Evol. Biol.* 1:6.

Oliveira D, Almeida F, O'Grady P y Armella M. 2012. Monophyly divergence times, and evolution of host plant used inferred from revised phylogeny of the *Drosophila repleta* species group. *Mol. Phylogenet. Evol.* 64(3): 533-544.

P-

Patterson J y Wheeler A. 1942. Description of new species of the sub-genus *Hirtodrosophila* and *Drosophila*. *Univ. Texas Publs* 4213: 67-109.

Patterson J y Stone WS. 1952. Evolution in the genus *Drosophila*. Macmillan, New York.

Pavey SA, Collin H, Nosil P y Rogers SM. 2010. The role of gene expression in ecological speciation. *Ann. NY Acad. Sci.* 1206:110–129.

Petit RJ, y Excoffier L. 2009. Gene Flow and species delimitations. *TREE* 24: 386-393.

Pfeiler E y Markow T. 2011. Phylogeography of the Cactophilic *Drosophila* and Other Arthropods Associated with Necroses in the Sonora Desert. *Insects* 2: 218-231.

Piccinali R, Aguade M y Hasson ER. 2004. Comparative molecular population genetics of the Xdh locus in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Mol. Biol. Evol.* 21: 141-152.

Piccinali R, Mascord LJ, Barker JSF, Oakeshott y Hasson ER. 2007. Molecular Population Genetics of the a-Esterase5 Gene Locus in Original and Colonized Populations of *Drosophila buzzatii* and Its Sibling *Drosophila koepferae*. *J. Mol. Evol.* 64. 158–170.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Polihronakis Maxi Richmond M, Sarah Johnson S., Haselkorn TS, Lam M, Laura K Reed, L K, y Markow, TA. 2013. Genetic differentiation of island populations: geographical barrier or host switch? *Biol. J. Linn. Soc.* 108, 68-78.

Powell JR. 1997. *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: the Drosophila Model.* Oxford University Press, New York, USA.

R-

Ramos-Onsins SE y Rozas J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2092-2100.

Rodriguez C, Piccinali R, Levy E, y Hasson ER. 2000. Contrasting populations genetic structures using allozymes and inversion polymorphism in *Drosophila buzzatii*. *J. Evol. Biol.* 13: 976-984.

Rousset F (ed.) 2000. Inferences from spatial population genetics, in *Handbook of Statistical Genetics.*

Rossi MS, Barrio E, Latorre A, Quezada-Diaz JE, Hasson ER, Moya A y Fontdevila A. 1996. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXX Mitochondrial DNA Polymorphism in Original and colonizinf population. *Mol. Biol. Evol.* 13: 314-323.

Rozas J y Rozas R. 1995. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data. *Comput. Applic. Biosci* 11: 621-625.

Rozas J y Rozas R. 1997. DnaSP version 2.0: a novel software package for extensive molecular population genetics analysis. *Comput. Applic. Biosci.* 13: 307-311.

Rogers AR y Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. and Evol.* 9: 552-569.

Ruiz A y Heed WB. 1988. Host-plant specificity in the cactophilic *Drosophila mulleri* species complex. *J. Anim. Ecol.* 57: 237-249.

Ruiz A y Wasserman M. 1993. Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity* 70: 582-596.

Ruiz A, Fontdevila A y Wasserman M. 1982. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. III. Cytogenetics relationships between two sibling species of the *buzzatii* cluster. *Genetics* 101: 503-518.

S-

Saitou N y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4): 406–425.

Salinas-Hernandez H y Saldamando-Benjumea CI. 2011 Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains from Colombia. *Neotrop. Entomol.* 40 (4): 421-30.

Santos MH, Lopes IF y Del Lama SN. 2008. Population genetic study of mitochondrial DNA in Roseate spoonbill (Aves; *Platalea ajaja*) breeding colonies from the Pantanal wetlands, Brazil. *Biochem. Genet.* 46: 492-505.

Santos M. 2011. As rotas de dispersao de *Drosophila buzzatii* na America do Sul. Tesis doctoral, Universidades de Sao Pablo, Riberao Preto.

Sene FM, Pereira MAQR y Vilela CR. 1988. Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. *Pacif. Sci.* 42: 81-88.

Shoemaker DD y Jaenike JG. 1997. Habitat continuity and the genetic structure of *Drosophila* populations. *Evolution* 51: 1326-1332.

Silva AFG y Sene FM. 1991. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.* 35: 455-468.

Simonsen KL, Churchill GA y Aquadro CF. 1995. Properties of Statistical Tests of Neutrality for DNA Polymorphism Data. *Genetics* 141: 413-429.

Slatkin M y Hudson R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations *Genetics* 129: 555 -562.

Slatkin M. 1994. Gene flow and population structure in Real L, ed. *Ecological genetics*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Smith CI y Farrell BD. 2006. Evolutionary consequences of dispersal ability in cactus-feeding insects. *Genetica* 126(3): 323-334.

Smith G, Fang Y, Liu X, Kenny J, Cossins AR, de Oliveira CC, Etges WJ, y Ritchie MG. 2013 Transcriptome-wide expression variation associated with environmental plasticity and mating success in cactophilic *Drosophila mojavensis*. *Evolution* 67(7): 1950–1963.

Sokal RR y Rohlf FJ. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. Freeman, New York.

Soto EM, Soto IM, Cortese MD y Hasson ER. 2011. Oviposition site preferences and performance in natural resources in the human commensals *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Fly*, 5(2): 102-109.

Soto EM, Goenaga J, Hurtado J, y Hasson ER. 2012. Oviposition and performance in natural hosts in cactophilic *Drosophila*. *Evol. Ecol.* 26: 975-990.

Soto IM, Carreira VP, Fanara J y Hasson RE. 2007. Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affects genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. *BMC Evol. Biol.* 7: 335-346.

Soto IM, Carreira VP, Soto EM y Hasson RE. 2008. Wing morphology and fluctuating asymmetry depend on the host plant in cactophilic *Drosophila*. *J. Evol. Biol.* 21: 598-609.

Soto IM, Manfrin M y Hasson ER. 2008. Host-dependent phenotypic plasticity of male genital morphology in cactophilic sibling *Drosophila* of the *repleta* group (Diptera, Drosophilidae). *J. Zool. Sys. Evol. Res.* 46: 368-373.

Soto IM, Soto EM, Corio C, Carreira VP, Manfrin M y E Hasson. 2010. Male genital and wing morphology in the cactophilic sibling species *Drosophila gouveai* and *D. antonietae* and their hybrids reared in different host plants. *Environ. Entomol.* 39(3): 865-873.

Soto IM, Carreira V, Soto EM, Márquez F, Lipko P y Hasson ER. 2013. Rapid divergent evolution of male genitalia among populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolutionary Biology*. En prensa. DOI: 10.1007/s11692-013-9223-x.

Sturtevant AH, Spencer WP, Patterson JT y Wheeler MR. 1942. The classification of the genus *Drosophila*, with descriptions of nine new species. Austin, Tex.: The University.

T-

Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of dna-sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.

Tajima, F. 1989. Stastical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Takezaki N y Nei M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics.* 144(1): 389-99.

Takezaki, N., y M. Nei. 2008. Empirical tests of the reliability of phylogenetic trees constructed with microsatellite DNA. *Genetics.* 178: 384-392.

Takezaki N, Nei M y Tamura K. 2010. POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface. *Mol. Biol. Evol.* 27: 747-752.

Templeton AR. 1982. Adaptation and integration of evolutionary forces. En Milkman, ed. *Perspectives on Evolution*. Sinauer, Sunderland.

Templeton AR 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. En Endler DOyJ, ed. *Speciation and its consequences*. Sinauer, Sunderland.

Templeton AR 1997. Nested Clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7: 381-397.

Templeton AR. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7: 381-397.

Templeton AR. 2006. *Population Genetics and Microevolutionary Theory.* Wiley, Hoboken, New Jersey.

Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-80.

Thompson LG. 1998. A 25,000-year tropical climate history from Bolivian ice cores. *Science* 282: 1858-1864.

Thibert-Plante X y Hendry A. 2011. The consequences of phenotypic plasticity for ecological speciation. *J. Evol. Biol.* 24:326–342.

Throckmorton LH. 1975. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. En *Handbook of Genetics. Invertebrates of Genetic Interest.* Plenum, New York. 3: 421.

Tidon-Sklorz R y Sene FM. 1995. *Drosophila seriema*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superspecies taxon. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 139-142.

Tidon-Sklorz R y Sene FM 2001. New Species of the *Drosophila serido* Sibling Set (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia, Sér. Zool.* 90: 141-146.

Tosi D y Sene FM. 1989. Further studies on chromosomal variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Genét.* 12(4): 729-746.

V-

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM y Shipley P. 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535-538.

Vilela CR. 1983. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera; Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.* 27: 1-114.

Vilela CR, y Sene FM. 1977. Two new neotropical species of the repletagroup of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Pap. Avulsos Zool.* 30: 295-299.

W-

Wasserman M. 1982. Evolution of the repleta group. En: Ashburner, M., Carson, H. L. y Thompson, J. N., eds. *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 3b. Academic Press, London.

Watterson, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetic models without recombination. *Theor. Pop. Biol.* 7:256-276.

Weir BS y Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Weir BS. 1996. *Genetic Data Analysis*, vol. II. Sinauer Associates.

Wenink PW, Baker AJ, Rösner H, y Tilanus MGJ. 1996. Global mitochondrial DNA phylogeography of holarctic breeding dunlins (*Calidris alpina*). *Evolution* 50: 318-330.

Wilson A, Stoneking M y Cann RL. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*: 325: 31-36.

Wright S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.

Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.

Wenker K. 2000. A new subspecies of Toucane. *Ornitología Neotropical*. 11:253-257.

Z-

Zink RM y Remsen, JV (jr). 1986. Evolutionary processes and patterns of geographic variation in birds. *Curr. Ornithol.* 4:1-69.

ANEXO



Haplotipos obtenidos en la presente tesis de un fragmento del gen COI de la especie *Drosophila koepferae*

>H1 DK

TAGGAACATCTTTAAGAATTTAATTCGTGCTGAATTAGGTCACCCCTGGAGCTTTAATTGGTGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTA
TAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAAATAAGTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACTTTTGTAGTAAGTAGTATAGTGG
AAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACGTTTACCCCTCTATCTCTGGATTGACATGGTGGTCTTCAGTTGATTAGCTATTTCTCTTTACACTTAGCTGGAATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAAT
TTATTACAACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGATCGAATACCTTTAATTGTCTGATCAGTTGTAATTACTGCTTTATTACTTCTTTATCTTTACCTGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACT
TTTAACTGATC

>H2 DK

TAGGAACATCTTTAAGAATTTAATTCGTGCTGAATTAGGTCACCCCTGGAGCTTTAATTGGTGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTA
TAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATAAAGTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACTTTTGTAGTAAGTAGTATAGTGG
AAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACGTTTACCCCTCTATCTCTGGATTGACATGGTGGTCTTCAGTTGATTAGCTATTTCTCTTTACACTTAGCCGGAATTTCTCAATTTTAGGGCAGTAAAT
TTATCACACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGACCGAATACCTTTAATTGTGTGATCAGTAGTAATTACTGCTTTATTGCTTCTCTATCTTTACCAGTTTTAGCCGGAGCAATTACTATACT
TTTTAACTGACC

>H4 DK

TAGGAGCATCTTTAAGAATTTAATACGTGCTGAATTAGGTCATCCCGGAGCTTCAATCGGTAACGACCAAAATTTAATGTAATTGTAACAGCTCAGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTATACCTATT
ATAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATAAAGTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACTTTTGTAGTAAGTAGTATAGTGG
GGAAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACGTTTACCCCTCTATCTCTGGATTGACATGGTGGTCTTCAGTTGATTAGCTATTTCTCTTTACACTTAGCCGGAATTTCTCAATTTTAGGGCAGTAAAT
ATTTTATCACACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGACCGAATACCTTTAATTGTGTGATCAGTAGTAATTACTGCTTTATTGCTTCTCTATCTTTACCAGTTTTAGCCGGAGCAATTACTATACT
TACTTTAACTGACC

>H5 DK

TAGGAACATCTTTAAGAATTTAATTCGTGCTGAATTAGGTCATCCCGGAGCTTTAATTGGTAACGACCAAAATTTAATGTAATTGTAACAGCTCAGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTATACCTATTA
TAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATAAAGTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACTTTTGTAGTAAGTAGTATAGTGG
GAAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACGTTTACCCCTCTATCTCTGGATTGACATGGTGGTCTTCAGTTGATTAGCTATTTCTCTTTACACTTAGCCGGAATTTCTCAATTTTAGGGCAGTAAAT
TTTTATCACACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGACCGAATACCTTTAATTGTGTGATCAGTAGTAATTACTGCTTTATTGCTTCTCTATCTTTACCAGTTTTAGCCGGAGCAATTACTATACT
ACTTTTAACTGACC

>H6 DK

TAGGAACATCTTTAAGAATTTAATTCGTGCTGAATTAGGTCACCCCTGGAGCTTTAATTGGTGATGACCAAAATTTAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTA
TAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATAAAGTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACTTTTGTAGTAAGTAGTATAGTGG
GAAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACGTTTACCCCTCTATCTCTGGATTGACATGGTGGTCTTCAGTTGATTAGCTATTTCTCTTTACACTTAGCCGGAATTTCTCAATTTTAGGGCAGTAAAT
TTTTATCACACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGACCGAATACCTTTAATTGTGTGATCAGTAGTAATTACTGCTTTATTGCTTCTCTATCTTTACCAGTTTTAGCCGGAGCAATTACTATACT
ACTTTTAACTGACC

>H7 DK

TGGGAACATCTTTAAGAATTTAATTCGAGCTGAATTAGGACATCCGGAGCTTTAATCGGTAACGACCAAAATTTAATGTAATTGTAACAGCTCAGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTATACCTATT
ATAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATAAAGTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACTTTTGTAGTAAGTAGTATAGTGG
GGAAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACGTTTACCCCTCTATCTCTGGATTGACATGGTGGAGCTTCAGTTGATTAGCTATTTCTCTTTACACTTAGCCGGAATTTCTCAATTTTAGGGCAGTAAAT
ATTTTATCACACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGACCGAATACCTTTAATTGTGTGATCAGTAGTAATTACTGCTTTATTGCTTCTCTATCTTTACCAGTTTTAGCCGGAGCAATTACTATACT
TACTTTTAACTGACC

>H8 DK

TAGGAACATCTTTAAGAATTTAATTCGTGCTGAATTAGGTCACCCCTGGAGCTTTAATTGGTGATGACCAAAATTTAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTA
TAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATAAAGTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACTTTTGTAGTAAGTAGTATAGTGG
AAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACGTTTACCCCTCTATCTCTGGATTGACATGGTGGTCTTCAGTTGATTAGCTATTTCTCTTTACACTTAGCTGGAATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAAT
TTATTACAACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGATCGAATACCTTTAATTGTCTGATCAGTTGTAATTACTGCTTTATTACTTCTTTTATCTTTACCTGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACT
TTTAACTGATC

>H9 DK

TAGGAACATCTTTAAGAATTTAATTCGTGCTGAATTAGGTCATCCCGGAGCTTTAATTGGTAACGACCAAAATTTAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTA
TAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATAAAGTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACTTTTGTAGTAAGTAGTATAGTGG
AAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACGTTTACCCCTCTATCTCTGGATTGACATGGTGGTCTTCAGTTGATTAGCTATTTCTCTTTACACTTAGCCGGAATTTCTCAATTTTAGGGCAGTAAAT
TTATTACAACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGATCGAATACCTTTAATTGTCTGATCAGTTGTAATTACTGCTTTATTACTTCTTTTATCTTTACCTGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACT
TTTTAACTGATC

>H10 DK

TAGGAACATCTTTAAGAATTTAATTCGTGCTGAATTAGGTCATCCCGGAGCTTTAATTGGTAACGACCAAAATTTAATGTAATTGTAACAGCTCAGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTATACCTATTA
TAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATAAAGTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACTTTTGTAGTAAGTAGTATAGTGG
GAAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACGTTTACCCCTCTATCTCTGGATTGACATGGTGGTCTTCAGTTGATTAGCTATTTCTCTTTACACTTAGCCGGAATTTCTCAATTTTAGGGCAGTAAAT
TTTTTATCACACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGACCGAATACCTTTAATTGTGTGATCAGTAGTAATTACTGCTTTATTACTTCTTTTATCTTTACCTGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACT
ACTTTTAACTGACC

>H3 DK

TAGGAACATCTTTAAGAATTTAATTCGTGCTGAATTAGGTCATCCCGGAGCTTTAATTGGTGATGACCAAAATTTAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTA
TAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATAAAGTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACTTTTGTAGTAAGTAGTATAGTGG
AAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACGTTTACCCCTCTATCTCTGGATTGACATGGTGGTCTTCAGTTGATTAGCTATTTCTCTTTACACTTAGCTGGAATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAAT
TTATTACAACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGATCGAATACCTTTAATTGTCTGATCAGTTGTAATTACTGCTTTATTACTTCTTTTATCTTTACCTGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACT
TTTTAACTGATC

>H11 DK

	1	1	2	3	5				
	1	6	7	8	0	2	3		
	1	2	8	8	6	2	0	3	7
H1 DB	T	A	A	C	A	T	T	T	A
H2 DB	T
H3 DB
H4 DB
H5 DB	C	.	.	.
H6 DB	.	.	G
H7 DB	.	.	.	T
H8 DB	G
H9 DB
H10 DB
H11 DB	C	.
H12 DB
H13 DB
H14 DB	.	G
H15 DB
H16 DB
H17 DB	G
H18 DB
H19 DB
H20 DB
H21 DB
H22 DB
H24 DB	C	.	.
H25 DB
H26 DB

Tabla A 5: *Drosophila buzzatii* singletons. 9 de un total de 552 sitios

ANEXO



A1- Matriz de tamaño de alelos por individuo por población y para *Drosophila koepferae*.

ind	pob	P1-K	P2-B	P3-B	P4-K	P6-B	P7-K	P9-B	P10-K	P11-K
13-1	13	226 224	108 113	173 177	181 173	184 184	197 197	196 192	241 241	176 178
13-2	13	224 230	108 108	177 183	173 175	184 184	197 192	196 192	241 241	172 172
13-3	13	214 226	108 113	177 181	171 179	104 104	197 197	196 192	244 248	170 178
13-4	13	214 214	108 113	179 179	173 175	104 106	181 181	196 188	195 195	174 174
13-5	13	226 224	117 119	177 179	173 175	104 108	181 181	112 178	195 195	156 176
13-6	13	214 226	119 117	199 205	153 155	182 184	201 201	172 168	237 241	148 164
13-7	13	214 226	108 113	175 199	173 179	184 184	188 188	172 176	240 238	174 178
13-8	13	236 236	120 118	177 189	171 175	184 184	201 197	172 178	238 243	172 172
13-9	13	230 232	120 118	187 203	175 175	184 184	197 201	108 178	239 253	176 154
13-10	13	224 226	119 117	177 179	175 181	184 184	197 201	172 178	240 250	174 182
13-11	13	224 230	106 108	177 194	181 181	184 184	197 207	172 200	240 250	176 176
13-12	13	224 226	119 117	177 199	173 175	184 104	192 192	194 202	240 250	176 174
14-1	14	226 240	?	177 177	182 182	182 184	190 194	202 230	242 240	176 176
14-2	14	240 240	118 112	184 194	180 194	184 184	196 204	190 190	242 248	176 174
14-3	14	240 242	171 171	184 184	182 184	184 184	196 206	194 190	242 248	172 170
14-4	14	238 228	118 116	176 189	178 186	184 186	196 206	198 194	240 240	166 170
14-5	14	240 226	118 116	184 176	140 182	184 186	196 196	198 230	236 240	166 170
14-6	14	?	118 116	199 210	176 178	184 186	196 196	196 190	242 242	166 170
14-7	14	242 250	103 112	174 189	182 184	186 186	194 204	196 192	236 246	168 172
14-8	14	246 226	112 114	189 215	178 186	180 186	196 206	202 192	236 246	168 168
14-9	14	226 226	108 116	181 184	184 190	180 186	194 206	196 192	240 242	174 174
14-10	14	226 226	122 118	181 176	182 184	184 192	192 200	196 192	248 248	168 170
14-11	14	226 226	112 114	176 210	176 178	104 184	188 197	196 192	240 248	166 166
14-12	14	226 240	118 108	200 210	176 184	182 186	201 192	196 188	248 248	168 174
15-1	15	224 240	108 120	198 204	198 214	184 186	188 190	172 178	236 236	168 174
15-2	15	224 240	108 120	204 284	206 200	178 180	188 196	172 178	234 244	155 150
15-3	15	240 240	115 120	194 238	154 172	188 178	214 164	172 176	236 236	150 150
15-4	15	224 236	104 110	188 238	180 174	178 184	178 186	172 178	250 236	150 155
15-5	15	240 240	104 120	166 198	176 174	188 190	184 184	172 178	234 250	160 150
15-6	15	234 236	112 120	192 206	206 214	182 184	184 190	172 178	234 254	150 162
15-7	15	224 240	110 104	194 192	180 174	186 186	182 184	172 178	234 238	150 155
15-8	15	240 240	126 110	194 206	156 156	178 190	182 214	174 178	22 228	160 166
15-9	15	234 236	126 120	190 222	156 156	174 172	188 201	174 178	236 236	150 166
15-10	15	234 236	112 118	192 220	150 148	174 186	184 190	174 178	234 244	170 155
15-11	15	234 236	106 114	194 198	150 148	178 186	184 190	174 178	236 234	155 150
15-12	15	234 236	126 120	214 214	156 206	184 188	188 190	172 178	236 234	150 166

16-1	16	226 226	114 118	176 190	169 174	182 182	190 188	172 174	210 248	176 176
16-2	16	234 226	108 126	190 180	168 174	180 180	196 190	172 180	240 240	174 178
16-3	16	226 234	114 118	160 172	174 178	182 184	194 272	154 158	242 160	170 174
16-4	16	234 238	118 110	178 190	148 158	178 186	186 186	172 174	246 248	176 172
16-5	16	218 234	108 126	204 184	164 164	140 182	190 182	172 174	240 242	176 172
16-6	16	238 238	112 112	186 184	164 150	176 178	190 182	178 178	246 248	176 172
16-7	16	224 226	108 126	186 184	206 150	182 184	190 184	178 178	240 242	176 172
16-8	16	218 234	108 126	192 190	169 170	178 186	190 188	174 176	238 240	170 176
16-9	16	226 238	108 108	192 194	174 178	184 190	184 184	172 172	238 246	170 176
16-10	16	222 238	108 126	196 194	160 150	182 184	190 182	174 172	246 240	172 182
16-11	16	222 226	108 126	204 184	169 167	176 178	190 184	116 118	240 240	172 182
16-12	16	234 218	106 126	194 196	150 150	176 178	188 190	116 120	240 246	172 178
17-1	17	228 238	116 118	186 196	252 240	184 174	190 196	176 178	236 242	174 152
17-2	17	222 222	114 118	184 198	242 236	184 180	190 196	172 172	238 252	156 150
17-3	17	238 238	228 232	184 196	244 234	182 182	196 154	172 180	236 242	156 154
17-4	17	222 224	218 222	184 196	248 236	184 152	158 150	174 176	234 238	158 156
17-5	17	222 228	232 232	184 196	236 236	150 150	190 196	170 180	234 240	154 174
17-6	17	214 244	232 232	178 184	238 240	150 166	156 158	176 186	234 252	156 154
17-7	17	228 238	208 116	194 198	244 236	174 166	156 154	180 172	240 252	158 156
17-8	17	214 238	150 112	176 180	238 240	174 154	190 196	154 178	224 224	154 154
17-9	17	234 240	130 12	176 178	236 240	184 176	154 156	154 172	234 238	158 154
17-10	17	234 238	162 144	182 184	240 238	174 176	156 184	116 118	236 242	160 162
17-11	17	234 240	218 232	184 190	246 248	150 176	156 184	118 116	236 242	154 158
17-12	17	222 222	162 112	198 200	240 236	174 148	156 184	112 154	234 238	156 150

Los números de la primera columna indican las poblaciones. 13- Brealito, 14- Ruinas de Quilmes, 15-Suyuque, 16- Valle Fértil y 17- Miranda.

A2- Matriz de tamaño de alelos por individuo por población y para *Drosophila buzzatii*.

ind	pob	P1-K	P2-B	P3-B	P4-K	P6-B	P7-K	P9-B	P10-K	P11-K
1-1	1	232 250	104 108	182 182	150 156	192 186	236 236	210 230	242 236	150 154
1-2	1	232 232	124 138	182 182	160 156	188 184	236 236	220 220	236 238	150 150
1-3	1	236 236	110 138	182 182	160 168	186 180	236 236	210 220	234 234	148 148
1-4	1	238 250	110 126	182 180	150 156	192 188	236 236	212 234	236 244	158 158
1-5	1	222 228	118 108	150 176	152 160	190 186	190 200	232 230	234 242	156 162
1-6	1	230 230	122 138	150 150	154 158	184 162	196 196	232 254	236 236	156 150
1-7	1	238 240	108 120	174 172	150 156	188 186	190 200	210 230	236 244	158 156
1-8	1	248 248	126 110	154 182	156 148	190 186	190 196	210 230	186 178	150 150
1-9	1	222 228	126 124	174 152	156 148	156 148	182 200	210 234	184 190	158 148
1-10	1	228 242	110 126	150 176	158 152	160 152	196 198	210 230	226 236	154 148
1-11	1	238 240	120 122	154 182	156 158	154 156	198 236	220 210	182 184	158 158
1-12	1	220 228	110 126	182 182	156 150	194 184	196 236	210 230	226 238	160 148
2-1	2	196 194	104 108	192 190	156 148	182 182	158 150	220 220	242 240	150 130
2-2	2	178 178	104 108	192 202	158 152	180 194	150 150	220 198	226 240	164 164
2-3	2	196 178	124 138	210 210	158 152	182 184	148 154	194 180	228 234	164 164
2-4	2	192 196	116 126	188 192	158 152	178 186	158 158	188 234	234 236	158 156
2-5	2	192 196	108 120	182 184	154 150	140 182	162 156	186 186	238 242	150 150
2-6	2	194 192	108 104	190 202	150 158	176 178	158 150	186 186	236 238	158 158
2-7	2	196 204	138 124	216 204	144 154	182 184	158 154	190 222	228 238	156 162
2-8	2	196 200	118 108	188 192	156 160	178 186	114 104	?	234 238	156 150
2-9	2	192 194	124 110	196 198	156 160	184 190	158 148	?	236 246	158 156
2-10	2	194 194	120 124	210 226	156 160	182 184	158 158	?	228 234	150 150
2-11	2	204 196	164 110	190 202	156 160	176 178	158 158	210 230	234 234	122 198
2-12	2	192 196	124 122	180 184	156 160	176 184	158 150	210 230	228 236	154 176

3-1	3	224 238	236 236	176 180	158 152	182 176	166 160	204 194	276 276	174 178
3-2	3	214 238	242 240	176 174	158 152	182 184	166 158	220 238	278 276	150 158
3-3	3	234 238	236 236	190 206	162 152	182 184	166 158	194 238	274 270	164 164
3-4	3	230 234	226 238	176 192	158 166	182 182	160 150	194 222	276 270	164 164
3-5	3	234 234	234 234	190 206	168 160	174 184	160 150	210 222	272 234	150 130
3-6	3	226 236	226 226	176 178	160 150	178 182	156 156	210 238	276 234	150 130
3-7	3	244 244	224 224	192 208	154 150	176 176	158 162	210 230	272 266	164 164
3-8	3	214 226	224 244	190 206	160 146	176 178	158 162	234 222	276 234	150 158
3-9	3	226 263	224 224	190 206	156 150	176 176	156 152	260 227	220 220	148 170
3-10	3	214 238	224 222	196 198	156 150	176 176	160 152	216 226	176 176	184 150
3-11	3	240 240	224 222	206 190	152 156	176 176	148 160	216 220	166 172	150 150
3-12	3	226 228	236 246	208 204	150 158	172 178	148 152	156 156	166 176	180 164
4-1	4	228 260	112 116	190 214	154 156	150 160	240 240	156 166	220 220	214 22
4-2	4	226 262	112 116	184 182	156 148	158 154	158 150	178 178	232 226	166 158
4-3	4	226 236	104 116	196 198	156 160	156 160	228 228	156 178	232 236	158 166
4-4	4	260 260	126 126	214 190	160 150	154 156	240 240	160 200	234 228	150 156
4-5	4	260 260	110 116	180 208	156 154	160 162	158 150	148 160	238 196	160 150
4-6	4	226 226	108 106	190 214	158 150	158 158	148 152	150 150	198 198	158 154
4-7	4	260 260	112 114	182 210	158 150	160 150	236 236	150 150	176 172	164 176
4-8	4	242 2230	112 126	198 182	158 150	160 158	236 236	210 230	234 234	150 154
4-9	4	234 236	102 126	202 184	148 148	150 160	158 150	220 220	228 238	198 220
4-10	4	244 226	124 114	188 204	148 148	156 160	158 150	216 260	236 236	122 198
4-11	4	214 244	112 112	194 184	154 168	150 160	238 230	222 223	220 220	154 176
4-12	4	248 246	112 110	186 194	154 154	154 156	238 230	216 260	232 226	220 198
5-1	5	228 228	104 104	206 190	146 168	160 158	228 228	222 223	146 180	174 176
5-2	5	228 228	104 114	198 190	148 168	158 150	238 230	178 176	182 146	174 178
5-3	5	228 228	114 114	194 190	146 160	178 176	238 240	156 156	162 148	180 176
5-4	5	228 228	114 124	200 190	150 164	150 154	240 240	160 148	228 228	122 198
5-5	5	228 230	114 124	202 198	146 164	160 158	236 240	178 176	242 250	174 178
5-6	5	228 230	114 104	186 186	146 166	160 148	236 238	160 148	228 228	174 176
5-7	5	238 238	124 114	206 194	148 160	180 176	240 238	180 178	238 238	174 178
5-8	5	228 238	112 112	224 216	160 148	156 180	236 236	158 152	236 236	180 176
5-9	5	246 236	126 114	196 192	158 148	158 160	236 236	156 166	236 234	194 184
5-10	5	228 230	108 116	202 194	160 148	156 158	240 238	178 178	242 234	194 184
5-11	5	222 224	114 114	198 188	146 168	156 162	236 236	156 178	228 222	120 116
5-12	5	230 226	108 116	190 186	164 146	172 156	236 240	160 200	236 236	194 184
6-1	6	221 224	112 112	186 192	182 186	176 186	186 184	148 160	226 226	178 170
6-2	6	190 190	116 114	192 200	186 148	188 188	200 206	150 150	220 226	120 116
6-3	6	190 190	114 114	194 226	182 194	194 176	200 206	150 150	232 226	126 112
6-4	6	236 234	116 114	202 200	148 158	180 180	194 194	148 160	232 226	194 184
6-5	6	222 224	116 114	234 200	148 156	174 180	186 184	156 180	220 220	178 170
6-6	6	236 234	102 122	226 190	152 160	188 188	188 188	156 180	220 220	176 170
6-7	6	222 232	102 124	190 200	148 150	180 180	238 240	198 198	232 226	174 176
6-8	6	228 236	110 116	188 198	144 154	178 182	238 206	148 148	232 236	174 176
6-9	6	222 234	114 116	186 190	152 154	178 180	188 188	148 148	234 228	174 178
6-10	6	232 232	114 116	188 186	152 142	188 190	188 240	156 156	238 196	180 176
6-11	6	232 232	114 116	124 238	152 142	188 186	188 188	156 180	198 198	122 198
6-12	6	232 236	112 114	192 196	156 148	188 186	238 240	178 158	232 226	122 198

7-1	7	234(240	216 110	198 178	150 156	182 184	188 194	220 221	234 234	148 148
7-2	7	234 234	110 118	190 192	152 160	184 184	194 194	222 223	228 238	158 158
7-3	7	234 234	110 118	190 180	154 158	184 184	188 192	260 227	236 236	156 162
7-4	7	240 240	110 118	190 198	182 182	184 186	188 192	216 226	236 228	156 122
7-5	7	234 234	118 126	190 198	148 150	184 186	188 188	216 220	236 228	178 126
7-6	7	234 240	110 118	190 198	152 142	184 186	198 198	216 216	236 236	176 176
7-7	7	234 224	118 126	218 208	196 196	184 186	198 188	216 220	238 238	126 148
7-8	7	234 234	110 118	?	196 196	186 188	194 194	216 220	242 240	122 148
7-9	7	224 226	110 118	?	196 196	180 182	194 194	216 260	148 162	?
7-10	7	240 240	116 120	?	152 142	186 182	194 194	222 223	142 244	?
7-11	7	234 234	114 112	?	201 196	184 192	188 192	220 227	260 260	?
7-12	7	240 234	110 116	?	201 196	184 186	188 194	216 229	?	?
8-12	8	234 234	106 108	192 160	182 182	178 186	172 196	198 198	196 198	186 185
8-13	8	240 238	102 100	182 160	182 182	178 186	192 200	188 178	188 178	160 161
8-14	8	234 240	134 126	192 160	182 182	162 168	172 196	178 178	178 178	152 159
8-15	8	226 224	112 106	160 160	182 182	186 192	178 206	196 198	196 198	204 221
8-16	8	220 236	116 114	186 160	182 184	178 184	196 194	196 198	196 198	154 165
8-17	8	226 240	116 114	218 208	196 200	180 182	188 184	188 188	188 188	180 179
8-18	8	232 246	102 114	182 184	184 196	180 160	172 196	196 198	196 198	178 159
8-19	8	232 246	116 116	192 218	180 186	168 160	182 200	184 200	184 200	148 161
8-20	8	236 238	112 110	192 184	190 188	168 160	188 210	202 196	202 196	188 154
8-21	8	236 238	126 124	192 186	188 190	168 168	186 188	184 184	184 184	170 156
8-22	8	236 238	121 110	182 184	186 184	168 168	186 208	180 196	180 196	170 156
8-23	8	220 238	170 180	182 184	180 186	180 180	186 184	180 184	180 178	180 179
9-1	9	234 238	106 108	187 224	196 198	180 184	200 206	148 160	226 238	380 384
9-2	9	226 226	128 112	190 196	188 178	180 182	206 202	150 150	226 238	372 370
9-3	9	226 238	128 134	224 224	178 178	180 190	206 202	148 148	226 228	352 356
9-4	9	226 238	104 112	188 190	196 196	180 190	206 202	148 160	226 240	352 380
9-5	9	226 226	108 112	187 196	178 178	180 186	202 210	148 148	228 226	180 342
9-6	9	226 226	108 116	224 224	196 196	188 186	202 202	160 158	240 238	352 352
9-7	9	226 226	108 112	182 299	196 198	180 180	206 204	160 156	238 236	150 152
9-8	9	234 238	110 104	224 234	188 188	180 178	212 210	148 148	226 238	352 352
9-9	9	234 236	104 116	190 230	184 200	186 190	202 206	148 148	184 224	150 152
9-10	9	234 238	102 118	188 222	196 200	180 184	204 200	148 160	236 238	352 352
9-11	9	226 226	128 112	200 198	196 180	180 184	240 200	160 176	236 236	150 152
9-12	9	234 232	112 128	182 182	194 194	182 190	200 198	160 148	224 174	156 170

10-1	10	228 238	108 112	184 196	160 156	180 180	176 188	158 158	176 156	312 298
10-2	10	222 222	112 112	216 190	160 168	182 188	104 112	158 158	160 176	352 354
10-3	10	238 228	126 110	198 190	150 156	180 192	126 124	158 158	240 252	380 384
10-4	10	238 228	126 104	194 194	152 160	182 194	200 198	158 158	242 238	372 370
10-5	10	222 224	112 126	194 194	148 154	188 168	186 186	158 158	244 236	352 356
10-6	10	214 214	126 124	196 214	152 160	176 196	237 223	158 158	248 238	352 380
10-7	10	228 238	124 114	204 188	154 158	176 198	184 184	158 158	234 236	180 342
10-8	10	214 238	110 116	192 192	150 156	180 198	184 184	158 158	234 236	352 356
10-9	10	214 238	114 114	214 188	156 148	186 188	200 198	158 158	150 158	312 380
10-1	10	234 240	108 114	192 192	158 152	198 170	184 184	158 158	236 234	352 356
10-1	10	234 238	110 114	214 204	152 150	184 190	184 184	158 158	174 114	352 356
10-1	10	214 240	110 120	208 204	156 150	180 190	184 184	200 154	242 156	352 352
11-1	11	196 204	126 110	199 196	196 204	104 118	100 100	242 238	246 236	150 152
11-2	11	201 196	126 104	187 193	201 196	160 160	104 112	238 236	236 236	156 156
11-3	11	190 201	112 126	196 204	190 201	180 196	126 124	238 238	226 234	156 158
11-4	11	187 196	112 126	190 196	187 196	104 118	114 104	246 240	228 238	156 158
11-5	11	200 202	126 124	224 224	200 202	184 186	114 104	236 242	226 234	156 162
11-6	11	200 202	124 114	188 190	202 200	172 192	126 110	234 242	220 220	156 162
11-7	11	201 196	110 120	187 196	196 198	128 110	114 108	236 236	236 236	158 172
11-8	11	194 204	126 110	196 192	202 200	178 192	108 100	104 118	238 240	156 156
11-9	11	196 204	126 104	192 192	201 190	178 478	126 100	126 238	238 236	156 156
11-1	11	221 221	102 138	198 190	202 202	162 178	104 110	112 112	238 240	176 170
11-1	11	214 238	102 124	208 192	221 225	180 196	114 108	128 118	228 238	176 160
11-1	11	238 196	126 110	208 210	196 198	172 192	184 184	242 238	220 220	156 156

12-1	12	196 226	126 104	196 196	152 152	192 186	186 104	246 236	228 242	152 152
12-2	12	114 118	104 108	200 204	152 152	188 184	234 188	236 236	228 238	152 158
12-3	12	108 126	124 168	196 196	152 152	186 180	188 184	226 234	228 238	158 152
12-4	12	114 116	110 126	198 192	156 154	192 188	186 186	228 238	234 234	150 158
12-5	12	118 126	118 108	158 194	158 156	190 186	237 223	226 234	234 234	158 154
12-6	12	112 112	104 108	208 158	152 154	190 186	184 184	220 220	234 238	152 156
12-7	12	108 126	122 138	208 196	160 188	184 162	184 184	236 236	230 230	154 152
12-8	12	108 126	108 120	196 208	240 242	188 186	168 182	238 240	236 240	152 154
12-9	12	108 126	126 110	198 204	154 144	190 186	182 188	238 236	230 238	152 154
12-1	12	108 126	122 124	192 208	142 144	190 186	182 188	238 240	236 238	154 158
12-1	12	106 126	122 108	196 192	144 158	156 148	104 188	228 238	236 238	154 154
12-1	12	200 126	120 120	196 196	142 156	160 152	234 180	220 246	238 238	154 158
23-1	23	226 240	230 236	200 228	160 188	186 186	182 214	192 206	231 231	150 130
23-2	23	240 188	192 211	190 194	160 154	186 178	186 213	204 194	231 231	146 156
23-3	23	188 176	292 336	192 190	142 154	104 104	186 197	220 238	234 234	156 156
23-4	23	176 176	228 242	196 190	152 154	184 184	186 208	194 238	230 230	130 156
23-5	23	188 188	236 236	194 232	160 188	104 104	180 196	206 194	230 276	146 144
23-6	23	226 222	236 236	190 194	240 242	184 180	171 190	194 208	230 244	156 144
23-7	23	222 226	224 242	190 194	154 144	184 180	180 118	204 196	234 230	156 132
23-8	23	234 234	292 242	192 196	142 144	160 164	108 118	196 196	226 231	156 146
23-9	23	202 250	178 186	200 228	144 158	184 182	112 114	206 194	231 231	130 150
23-1	23	226 240	186 224	190 196	142 156	104 106	112 196	206 194	231 2333	130 156
23-1	23	226 238	236 236	190 194	142 200	186 106	116 122	192 194	194 201	132 156
23-1	23	228 234	184 236	200 192	152 158	186 104	108 124	196 196	186 190	132 156

ANEXO III

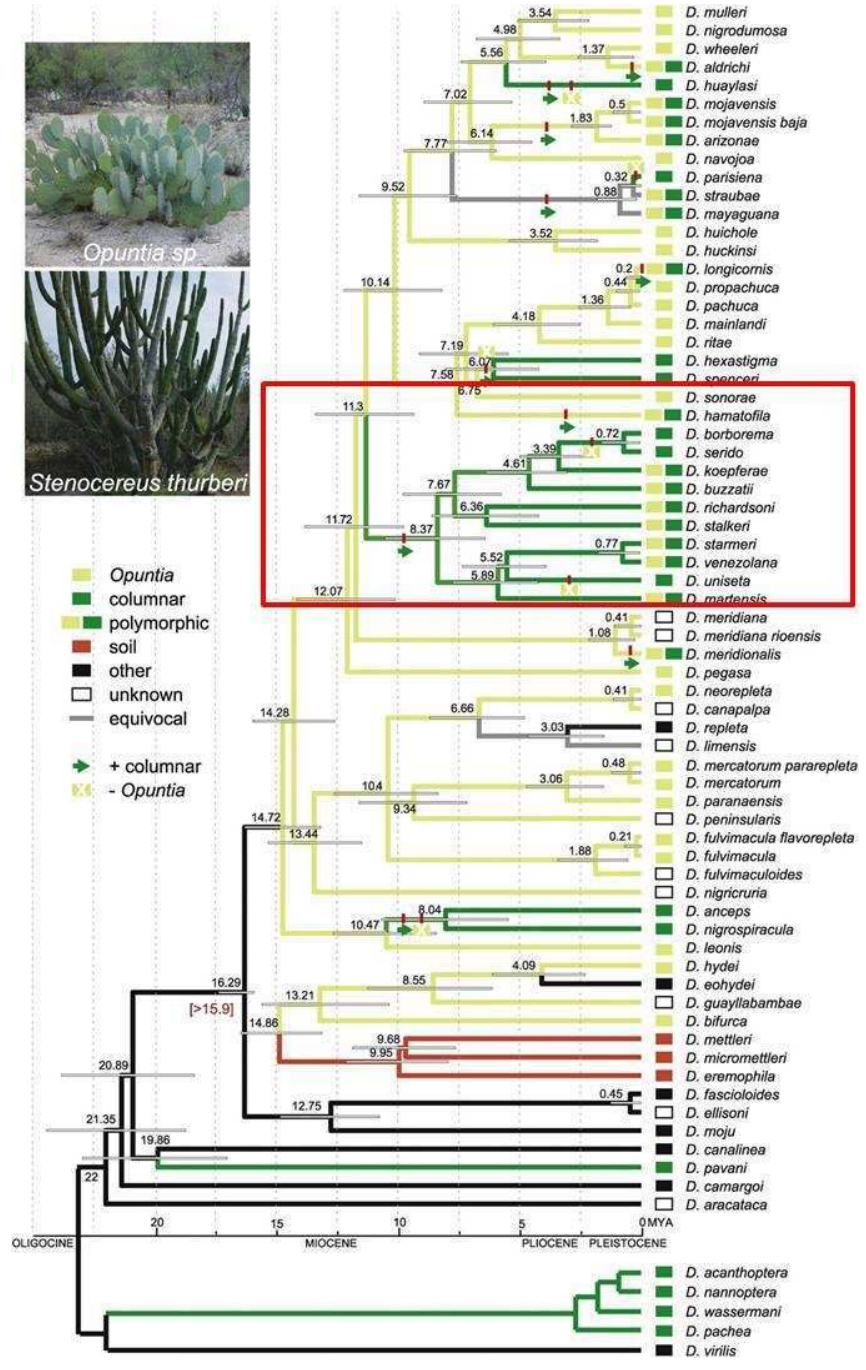


Figura AIII.1: Tipos de hospedador y tiempos de divergencia en el grupo *D. repleta*. Los números de los nodos representan las estimaciones del tiempo de divergencia y las barras representan el 95% del intervalo de confianza. Las imágenes ilustran una típica *Opuntia* spp. (tuna) y el crecimiento de un típico cactus columnar. En rojo se delimita la sección que representa el cambio de hospedador hace 11.3 ma. (Extraído y modificado de Oliveira et al 2012).