

Tesis Doctoral

Genómica poblacional del comportamiento de oviposición en *Drosophila melanogaster*

Betti, María Isabel Luján

2016-03-07

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:

Betti, María Isabel Luján. (2016-03-07). Genómica poblacional del comportamiento de oviposición en *Drosophila melanogaster*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Betti, María Isabel Luján. "Genómica poblacional del comportamiento de oviposición en *Drosophila melanogaster*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-07.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



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

Genómica poblacional del comportamiento de oviposición en *Drosophila melanogaster*

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

María Isabel Luján Betti

Director de tesis: Dr. Esteban Hasson

Director Asistente: Dr. Juan José Fanara

Consejero de Estudios: Dr. Juan José Fanara

Buenos Aires, 7 de Marzo del 2016

Genómica poblacional del comportamiento de oviposición en *Drosophila melanogaster*

Resumen

Comprender la relación entre la variación fenotípica y la genotípica ha sido y sigue siendo uno de los mayores desafíos de la biología moderna, ya que implica alcanzar una interpretación holística de la descripción de caracteres complejos y sus relaciones evolutivas utilizando de manera conjunta herramientas de la genómica funcional, la genética cuantitativa, la bioinformática y la genética ecológica.

En insectos fitófagos el comportamiento de oviposición constituye un componente importante de la elección de hábitat. Dada la multiplicidad de factores genéticos y ambientales que parecen afectar su expresión fenotípica, el mismo puede definirse como un carácter complejo resultante de la participación de varios caracteres interdependientes. En esta tesis nos proponemos contribuir al conocimiento de la arquitectura genética del comportamiento de oviposición por medio del estudio genómico poblacional de dos caracteres complejos relacionados, la preferencia por el sitio de oviposición (PO) y la aceptación de recursos de oviposición (AO) en la especie modelo *Drosophila melanogaster*. Para cumplir con nuestros objetivos, cuantificamos la PO y la AO utilizando recursos que las moscas explotan como sustratos de cría en su hábitat natural: uva, tomate y naranja. Los resultados mostraron amplia variación fenotípica tanto de la AO como de la PO en todos los recursos y combinaciones de recursos ofrecidos. Para ambos caracteres, encontramos que la variación tiene una base genética y que su expresión depende del recurso (o combinación de recursos) ofrecido. En otras palabras se trata de caracteres cuya expresión depende del ambiente (plasticidad fenotípica). Posteriormente, realizamos análisis de asociación entre la variación fenotípica y la variación genética con el objetivo de establecer la arquitectura genética de la AO y la PO. Encontramos que la arquitectura genética de ambos caracteres es poligénica y que los genes que participan de su expresión se encuentran interactuando en redes génicas relacionadas con el desarrollo del sistema nervioso y del sistema visual. Finalmente, identificamos genes que actúan a través de los distintos niveles que conforman el mapa genotipo – fenotipo, presentando evidencia de su accionar en cada nivel por medio de los análisis de asociación entre la variación fenotípica y la variación a nivel transcriptómico.

Podemos concluir, que a lo largo de la presente tesis hemos contribuido al estudio del comportamiento de oviposición, aportando evidencia de cómo se compone la arquitectura genética del mismo a través de los distintos niveles del mapa fenotipo-genotipo e infiriendo la importancia del comportamiento de oviposición en la historia evolutiva de *D. melanogaster*.

Palabras Claves: *Drosophila melanogaster*, Preferencia de oviposición, Aceptación de recursos de oviposición, recursos naturales, variación genética, variación fenotípica, genómica, análisis de asociación genotipo - fenotipo, análisis de asociación fenotipo – transcriptoma, redes génicas.

Population genomics of the oviposition behavior in *Drosophila melanogaster*

Abstract

Understanding the relationship between the phenotype and the genotype is one of the biggest challenges in modern biology. It implies reaching a holistic interpretation of the description of complex traits and their evolutionary relationships using functional genomics, quantitative genetics, bioinformatics and ecological genetics tools.

In phytophagous insects, oviposition behavior is an important component of habitat selection and given the multiplicity of genetic and environmental factors affecting its expression, it is defined as a complex character resulting from the sum of interdependent traits. In this thesis, we contribute to the knowledge of the genetic architecture of oviposition behavior by studying the population genomics of oviposition site preference (PO) and the acceptance for oviposition resources (AO) in the model species *Drosophila melanogaster*. First, we quantified the PO and AO by offering females grape, tomato and orange as breeding resources. Our results showed that phenotypic variation, in both traits, depends on the environment (phenotypic plasticity) and has a genetic basis.

Next, we proceed to delineate the genetic architecture of PO and AO by performing genome wide association studies (*GWAS*). We found that the genetic architecture of both traits is enriched in many genes that participate in genetic networks related to development of the nervous and visual systems.

Finally, we identify genes that are involved at different levels of the genotype – phenotype map by means of association analysis between phenotypic and transcriptomic variation. Our results are a contribution to the knowledge of oviposition behavior and its importance in the evolutionary history of *D. melanogaster* by successfully combining the study of variation across the genetic, transcriptomic and phenotypic levels.

Key words: *Drosophila melanogaster*, Oviposition preference, Oviposition acceptance, natural resources, Genetic variation, phenotypic variation, genomics, genome wide association, phenotypic - transcript associations, genetics networks.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis directores Esteban y Juanjo por darme la oportunidad de poder realizar esta tesis de doctorado. Por las innumerables correcciones y ayuda desde el momento de diseñar los experimentos hasta el largo proceso de escritura y sobre todo, por la paciencia que me tuvieron a lo largo de estos años. Gracias.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, que hicieron de esta tesis una experiencia inolvidable: Ale Pettino Zapata, Betina Colines, Cristian Corio, Diego De Panis, Gonzalo Sabaris, Ignacio Soto, Julian Mensch, Julián Padró, Julieta Goenaga, Marcos Imberti, Nahuel Cabrera, Nicolás Lavagnino, Nicolás Mongiardino, Pau Lipko, Patricia Iglesias, Pedro Fontanarrosa, Sato, Valeria Carreira y Vicky Ortiz. Una especial mención a Edu Soto, que fue mentor desde el momento que entre al laboratorio hace muchos años atrás.

También quiero agradecer a mis adoradas amigas que conocí gracias a la Biología: Fernanda, Gabriela, Gisela, María, Nadia, Pablo y Coco, y tambien a sus pequeños: Lucia, Mia, Pipo y Valentín. A mis amigas de toda la vida: Ayelen, Paola y Silvana, y a Toto. Porque están ahí siempre, bancando en las buenas como en las malas y haciendo que la vida sea más linda y por sobre todo divertida.

A mi mis suegros, Moni y Julio, y mi cuñado, Ale, por hacerme parte de su familia y brindarme su apoyo siempre.

A mi sobrino Francisquito.

A mi perrita Luna, que estuvo sentada al lado mío todas las largas horas que pase escribiendo y re-escribiendo la tesis.

A mis papas, Isabel y Jorge, porque ellos hicieron posible que pueda estudiar biología y que pueda llegar a este momento. Siempre me bancaron y apoyaron en todas mis decisiones. Los quiero.

A Gayo, mi amor, por estar ahí siempre pero siempre, apoyándome en todas mis decisiones y proyectos... no hay palabra que puedan expresar lo que siento, sin vos no hubiera nunca podido terminar esta tesis.

A mi Papá
A mi Mamá

Capítulo I: Introducción General

1. La variación a nivel de caracteres cuantitativos	2
2. Arquitectura Genética de los caracteres cuantitativos	6
3. El Mapa Genotipo–Fenotipo	6
4. Mapeo Genético de alta resolución: Análisis de asociación Genotipo - Fenotipo de genoma completo.....	8
5. El comportamiento de oviposición: La Aceptación de recursos de oviposición y la preferencia por los sitios de oviposición.....	11
6. Modelo de estudio: <i>Drosophila melanogaster</i>	14
7. Historia evolutiva de <i>Drosophila</i>	14
8. Subgrupo <i>melanogaster</i>	16
9. Especialización dentro del subgrupo <i>melanogaster</i>	18
10. Ciclo y hábitos de vida de <i>D. melanogaster</i>	18
11. Genética y genómica de <i>D. melanogaster</i>	19
12. Objetivos y plan general	21

Capítulo II: Variación del comportamiento de oviposición: Aceptación y Preferencia de sitios de oviposición

1. Introducción	23
2. Objetivos e hipótesis.....	27
3. Materiales y Métodos	28
4. Resultados	
A. Aceptación de los recursos de oviposición (AO)	31
B. Preferencia de oviposición (PO).....	38
5. Conclusiones	44

Capítulo III: Arquitectura genética de la Aceptación y Preferencia de sitios de oviposición: Análisis de asociación fenotipo – genotipo

1. Introducción General	48
2. Objetivos.....	51

Sección I: Análisis de asociación genotipo – fenotipo

3. Materiales y Métodos	53
4. Resultados	
A. Aceptación de los recursos de oviposición (AO).....	57
B. Preferencia de oviposición (PO)	81
5. Conclusiones	97

Sección II: Pruebas de validación funcional

1. Materiales y Método	100
------------------------------	-----

2. Resultados	101
3. Conclusiones	103

Sección III: Prueba de complementariedad

1. Materiales y Métodos	107
2. Resultados	111
3. Conclusiones	113
4. Conclusiones generales	114

Capítulo IV: Arquitectura genética de la Aceptación y Preferencia de sitios de oviposición: Análisis de asociación entre la variación fenotípica y la variación en los niveles de transcripción

1. Introducción	116
2. Objetivos	118
3. Materiales y Métodos	119
4. Resultados	
A. Aceptación de los recursos de oviposición (AO)	121
B. Preferencia por sitios de Oviposición (PO).....	131
5. Conclusiones	135

Capítulo V: Conclusiones Finales..... 138

Bibliografía.....	141
Anexo Metodológico	159
Anexo de Resultados.....	165

CAPÍTULO I

Introducción

1. La variación a nivel de caracteres cuantitativos

La biodiversidad actual es el resultado de procesos históricos, biogeográficos y adaptativos que han actuado desde el origen de la vida hace aproximadamente 3600 millones de años. Por biodiversidad se entiende la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, comprendiendo desde la diversidad dentro de cada especie, entre las especies hasta la de los ecosistemas (Preámbulo de la convención sobre Diversidad Biológica, Brasil 1992). En este sentido, uno de los mayores desafíos que enfrenta la biología moderna es comprender cómo y cuánto cambio puede ocurrir en el seno de las poblaciones naturales (Mackay, 2001 a y b; Mackay *et al.*, 2012) y establecer, cuánto de este cambio se traduce en divergencia que puede conducir al origen de nuevas especies, o en otras palabras nueva biodiversidad (Coyne y Orr, 2004). A nivel específico, la biodiversidad se ve reflejada en la variación fenotípica observable a nivel de casi cualquier carácter fenotípico: morfológico, comportamental, fisiológico y del desarrollo y en la variación genética presente en las poblaciones naturales.

La distinción entre genotipo y fenotipo es fundamental para comprender cómo la información se transmite entre los organismos a través de las sucesivas generaciones y además, para entender cómo es su crecimiento y desarrollo. Wilhelm (1911) fue el primero en introducir los conceptos de genotipo y fenotipo a raíz del redescubrimiento de las leyes de Mendel. En la actualidad, entendemos por genotipo a la totalidad de la información genética codificada en el ADN de un organismo mientras que el fenotipo es la manifestación de un dado carácter por parte de un individuo.

Llamamos caracteres cuantitativos a aquellos caracteres que presentan una distribución continua de la variación fenotípica. Tal variación continua suele ser el resultado de la acción de muchos genes, a los cuales se llama *genes de caracteres cuantitativos o QTG's* (por sus siglas en inglés, *Quantitative Trait Gene*) y del efecto de la variación ambiental.

La genética cuantitativa es el área de la biología encargada de estudiar la dinámica de las frecuencias de los caracteres cuantitativos que se basa en el análisis estadístico de la variación fenotípica (Falconer y Mackay, 1996). La variación fenotípica de un carácter se debe al aporte de factores genéticos, ambientales y la relación entre estos. De este modo, la varianza fenotípica se puede particionar en componentes según la siguiente ecuación:

$$V_F = V_G + V_{Amb} + V_{(G \times Amb)} + 2 \text{Cov}_{(G \times Amb)},$$

donde V_F es la varianza fenotípica, V_G es la varianza genética, V_{Amb} es la varianza ambiental, $V_{G \times Amb}$ es la varianza de la interacción genotipo-ambiente y $\text{Cov}_{(G \times Amb)}$ es la correlación Genotipo - Ambiente.

Históricamente a los últimos dos componentes, $V_{G \times Amb}$ y $\text{Cov}_{(G \times Amb)}$, se los ha considerado despreciables. Sin embargo, diversos autores coinciden en resaltar su importancia (Falconer y Mackay, 1996; Conner y Hartl, 2004; Ridley, 2004). La importancia relativa de cada componente se puede visualizar como una proporción de la varianza fenotípica total, siendo la magnitud relativa de los distintos componentes los que permiten caracterizar a la población para un cierto carácter.

La varianza genética puede, a su vez, descomponerse en componentes según la ecuación:

$$V_G = V_A + V_D + V_I,$$

donde V_A es la varianza aditiva, V_D es la varianza de dominancia y V_I es la varianza epistática. La varianza aditiva implica la existencia de distintos alelos de múltiples genes que contribuyen de manera independiente y lineal a la variación. La varianza de dominancia se define como el producto de la interacción entre alelos de un mismo locus, en tanto que la varianza epistática es el resultado de las interacciones entre alelos de diferentes genes. La varianza ambiental se refiere a la variación de origen no genético. La importancia relativa de la misma depende del carácter y del organismo en estudio. Las causas externas más comunes que contribuyen a la variación ambiental son los factores climáticos y los relacionados con la alimentación, los cuales se tratan de controlar en los diseños experimentales que normalmente se implementan en los estudios genético-cuantitativos (Falconer y Mackay, 1996). Los análisis de correlación genotipo-ambiente, permiten establecer el grado de dependencia que la varianza genotípica tiene respecto a la varianza ambiental (Falconer y Mackay, 1996; Conner y Hartl, 2004). Finalmente, la proporción de la varianza fenotípica total que se atribuye al componente genético se conoce con el nombre de heredabilidad (h^2) (Falconer y Mackay, 1996; Conner y Hartl, 2004).

En este contexto, un concepto importante es el de norma de reacción del genotipo, que se define como el patrón de expresión fenotípica de un genotipo en diferentes ambientes (Schlichting y Pigliucci, 1998). La norma de reacción es plástica si el fenotipo varía en los diferentes ambientes a los que se ve sometido el genotipo (Schlichting y Pigliucci, 1998; Via, 1987). La posibilidad de estudiar diferentes genotipos para un mismo carácter permite analizar si las normas de reacción dependen del genotipo. La variación genética para la plasticidad fenotípica, que se percibe como ausencia de paralelismo en las normas de reacción, se la denomina interacción genotipo - ambiente (IGA) y puede contribuir en forma significativa a la variación fenotípica total del carácter (Falconer y Mackay, 1996).

Una IGA puede ser consecuencia tanto de *i*) diferencias en la magnitud de la varianza de respuesta que exhiben distintos genotipos en ambientes alternativos (que comúnmente se definen como cambios de escala o magnitud) como de *ii*) cambios en el ordenamiento relativo de los genotipos entre ambientes (comúnmente denominados como cambios de “ranking”) (Robertson, 1959). Los posibles patrones de respuesta de diferentes genotipos en distintos ambientes (A1 y A2) se ilustran en la Figura 1.

El primer caso ilustra una situación en la que los genotipos difieren significativamente para un cierto carácter pero sus valores fenotípicos no varían a través de los dos ambientes (Fig. 1[A]). En este caso el valor fenotípico de cada fenotipo no depende del ambiente, lo cual se verifica en las pendientes nulas a través de los ambientes que sugieren respuestas no plásticas. Además, las normas de reacción analizadas expresan el mismo patrón de variación (normas de reacción paralelas) lo cual permite inferir una IGA no significativa. En la Fig. 1[B], puede verse que los genotipos difieren entre sí y que los valores fenotípicos de los diferentes genotipos varían entre ambientes aspecto que sugiere una respuesta plástica. En este caso, la IGA tampoco es significativa ya que las normas de reacción son paralelas. En la Fig. 1[C], si bien existe variación entre los genotipos, los valores fenotípicos medios medidos en A1 y A2 no se diferencian. Sin embargo, los rangos de variación fenotípica en ambos ambientes difieren ya que la varianza entre genotipos es mayor en A2 que en

A1. Las normas de reacción no son paralelas (IGA significativa) pero los genotipos conservan el orden de rango entre ambientes. En este caso la IGA significativa puede atribuirse a diferencias en la magnitud de la varianza entre ambientes. La Fig. 1[D] ilustra el caso en que los genotipos difieren significativamente y, aunque los valores fenotípicos de los genotipos varían a través de los ambientes, las diferencias entre A1 y A2 no son significativas (efecto de compensación). Sin embargo, hay IGA como lo indican las normas de reacción no paralelas. Aquí, a diferencia del caso anterior, la IGA puede atribuirse a cambios en el ranking u orden (ordenados por su valor fenotípico) de los genotipos entre ambientes. Por último, la situación en la que hay diferencias fenotípicas entre genotipos, entre ambientes y además, las normas de reacción no son paralelas se ilustra en la Fig. 1[E]. En este caso la IGA se explica tanto por el cambio de rango como por el cambio de escala.

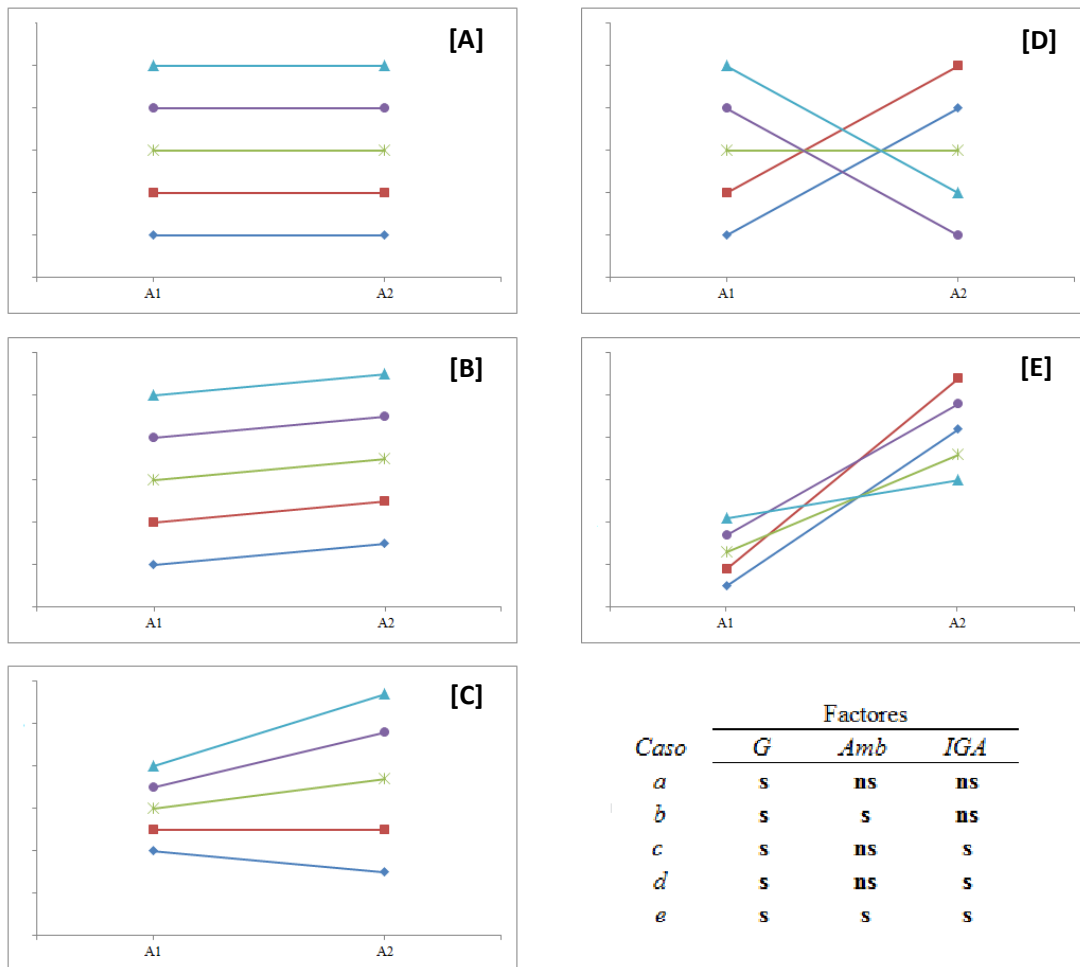


Figura 1. Patrones de variación fenotípica. Se indican los valores fenotípicos medios de diferentes genotipos en distintos ambientes y los resultados de un hipotético ANOVA que considera la variación entre Genotipos (G1-G5), entre Ambientes (A1 y A2) y la interacción Genotipo x Ambiente (IGA). Las distintas líneas representan la norma de reacción de cada genotipo (G1-G5). S efecto significativo, NS efecto no significativo.

El cambio de orden en el “ranking” de genotipos entre ambientes podría conducir, bajo ciertas condiciones, al mantenimiento de la variabilidad genética para el carácter a diferencia del cambio de escala o magnitud que podría provocar el reemplazo de un genotipo por otro. Por lo cual, el análisis de las contribución relativa de cada componente de la interacción genotipo-ambiente puede contribuir a una mejor comprensión del papel de la IGA en el mantenimiento de la diversidad biológica (Futuyma, 1991).

2. Arquitectura genética de caracteres cuantitativos

Llamamos arquitectura genética (AG) de un carácter cuantitativo a la forma en que los factores genéticos interactúan entre sí y con el ambiente de forma tal de construir y controlar la tanto la expresión fenotípica del carácter como su variación (Hansen, 2006). La AG puede estudiarse en los distintos niveles de organización jerárquica, por ejemplo nos podemos preguntar en cuánto difiere la AG de un carácter entre las distintas poblaciones de una misma especie o si son los mismos genes los que están involucrados en la expresión del mismo carácter fenotípico en distintas especies. De acuerdo a Anholt y Mackay (2004) el estudio de la AG de un carácter implica:

- Identificar los factores genéticos (regiones genómicas, genes y/o variantes nucleotídicas) responsables de la variación del carácter.
- Establecer si los factores genéticos interactúan (interacción de dominancia y/o epistásis) conformando ensambles funcionales.
- Establecer si los factores genéticos que afectan el carácter tienen efectos pleiotrópicos, es decir, si afectan a otros caracteres aparte del carácter en estudio.
- Conocer el modo en que los factores genéticos se combinan con los factores ambientales para determinar la expresión del carácter, es decir conocer si los genes tienen efectos diferenciales sobre el fenotipo dependiendo de las condiciones ambientales (efecto contexto-dependiente).

La importancia del estudio de la AG de los caracteres complejos radica en que permite describir y establecer cómo varían los caracteres y es, justamente, esta variación la que determina su potencial evolutivo (Hansen, 2006; Pigliucci, 2010).

3. El mapa genotipo – fenotipo

Uno de los tópicos que ha marcado el desarrollo de la biología en general y de la genética en particular es la relación entre el genotipo y el fenotipo. Desde los trabajos fundacionales de la genética a principios del siglo XX, se inició un largo camino con el propósito de dilucidar esta relación. En la primer mitad del Siglo XX, durante el desarrollo de la teoría Sintética de la Evolución se trató de explicar la relación entre el genotipo y el fenotipo de una forma simple considerando que los genes eran los determinantes del fenotipo de una forma directa, dejando de lado el desarrollo. Sin embargo, con el paso de los años, se acumuló evidencia que no respaldaba la relación uno a uno entre gen y fenotipo y se empezó a observar que para entender el cambio evolutivo era necesario incorporar los procesos que modifican al individuo en desarrollo.

En 1991, Alberch propone el concepto mapa Genotipo – Fenotipo (MGF) considerándolo como una función matemática que permitiría describir cómo influye el genotipo en el fenotipo de un organismo. El mapa se encuentra caracterizado por distintos espacios o niveles y por las relaciones que se establecen entre cada uno de ellos. En un principio el MGF solo concebía dos espacios: el genético y el fenotípico, pero con el avance en el conocimiento, se fueron agregando otros espacios como el transcriptómico, el proteómico y el metabolómico, aumentando considerablemente su complejidad (Figura 2).

Cuatro conclusiones derivan de la formulación del concepto del MGF:

- El MGF es más complejo que lo que implica la concepción basada en la relación uno a uno entre el genotipo y el fenotipo. Es más, un mismo fenotipo puede obtenerse a partir de distintos genotipos debido a procesos epigenéticos que ocurren durante el desarrollo de los organismos.
- El área del espacio en el cual un determinado fenotipo existe, nos da una idea de su estabilidad o robustez. Esta se refiere a la capacidad que detenta un fenotipo de tolerar alteraciones en el desarrollo o perturbaciones tanto ambientales como genéticas sin que ocurran cambios.
- Los espacios se encuentran llenos de áreas llamadas “límites transformacionales”. Estas son áreas en donde cambios pequeños en los parámetros del desarrollo causan la transición entre estados fenotípicos.
- La estabilidad fenotípica de una población dependerá del área del espacio que ocupa y de su cercanía a algún área de “límites transformacionales”.

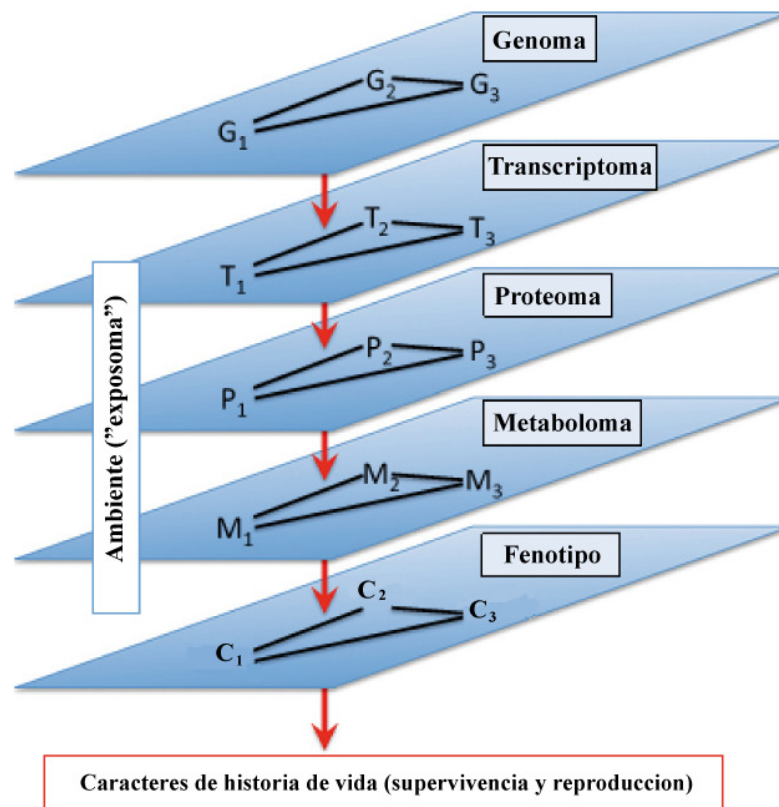


Figura 2. Representación esquemática del MGF. La relación entre el espacio Genómico y el espacio Fenotípico no es directa sino que incluye los efectos de los espacios del Transcriptoma, el Proteoma y el Metaboloma, y todos ellos son a su vez influenciados por el Ambiente. Modificada de Hoffman *et al.* (2014).

Utilizando como marco teórico los conceptos básicos de AG y MGF podemos plantear los posibles mecanismos que subyacen a la evolución fenotípica. Una aproximación a la dilucidación de los mecanismos se realiza a través de los modelos de optimalidad, que se basan en la suposición de que la selección natural optimiza los caracteres dentro de ciertos límites. Este tipo de modelos han generado una gran controversia con respecto a la unidad de la evolución y los límites de la acción optimizadora de la selección natural. El modelo infinitesimal de la genética cuantitativa (Fisher 1930) postula que la expresión de los caracteres cuantitativos es el resultado de la acción de muchos genes con efectos aditivos pequeños e independientes, de modo tal que el fenotipo es el resultado de la suma de los efectos individuales (varianza aditiva) de los genes y de la variación impuesta por el ambiente, considerando despreciable el aporte de la varianza no aditiva (fundamentalmente la varianza epistática). Según este modelo, las poblaciones bajo idénticas condiciones ambientales se dirigen hacia un único pico adaptativo debido a la acción de la selección natural como principal fuerza evolutiva.

Sewall Wright (1931), a su vez, planteó el modelo conocido como “Teoría de los Equilibrios cambiantes”, en el que, además del efecto aditivo de los genes, las interacciones epistáticas, cumplen un rol fundamental en la evolución fenotípica. Bajo la visión Wrightiana, el cambio evolutivo es la resultante de la interacción entre la selección natural y procesos estocásticos, como la deriva génica. Una población tiene, bajo este modelo genético-evolutivo, potencialmente más de un óptimo adaptativo y puede cambiar de un pico adaptativo a otro sin llegar a estabilizarse en ninguno de ellos (Wright, 1978). A pesar de las diferencias, los dos modelos comparten la importancia del efecto de la variación ambiental sobre los loci que afectan los caracteres cuantitativos y su evolución.

4. Mapeo Genético de alta resolución: Análisis de asociación Genotipo – Fenotipo de genoma completo

Hasta el momento hemos explicado las bases teóricas de la variación fenotípica y genética, cómo se relacionan entre sí y la importancia que tienen en el marco de la Teoría Evolutiva, pero aún no hemos indagado en las metodologías que en la actualidad están disponibles para investigar estas cuestiones. Indudablemente uno de los procedimientos que revolucionó la Genética Cuantitativa es el mapeo de *QTL* (por sus siglas en inglés *Quantitative Trait Loci*). Este tiene como objetivo identificar regiones cromosómicas con efecto significativo sobre la variación fenotípica (Mackay, 2001b).

El mapeo de *QTL* se combina el uso de marcadores genéticos con métodos estadísticos muy potentes. Se basa en el desequilibrio de ligamento (DL) entre los marcadores y los factores genéticos asociados a la variación fenotípica del carácter. En otras palabras, si un *QTL* asociado con un cierto carácter está ligado a un marcador genético, entonces individuos con diferentes genotipos a nivel de este marcador tendrán diferentes valores fenotípicos para el carácter en estudio.

Para poder llevar a cabo el mapeo por *QTL* se necesitan: *i*) un mínimo de dos organismos que difieran genéticamente entre sí con respecto a un carácter cuantitativo; *ii*) marcadores genéticos que nos permitan distinguir el origen parental de diferentes regiones del genoma, *iii*) la producción de una F1 entre parentales fenotípicamente diferentes, seguido de cruzamientos controlados F1 x F1 para producir una F2 o de retrocruzamientos de la F1 con uno o ambos parentales con el fin de

generar una población segregante (Darvasi, 1998) y iv) métodos estadísticos potentes que permitan detectar las pequeñas diferencias que puedan existir entre genotipos de los marcadores ligados a los *QTL*.

Entre los problemas asociados a este tipo de mapeo podemos destacar que los *QTL* quedan definidos como regiones genómicas dentro de las cuales puede haber cientos o miles de genes, de los cuales solo uno o unos pocos podrían estar asociados con la variación del carácter. Por esta razón, el mapeo de *QTL* debe ser complementado con mapeos de alta resolución con el fin de reducir los *QTL* a su mínima longitud para así poder identificar con mayor precisión los genes que participan de la expresión del carácter (Fanara *et al.*, 2002). Asimismo, no debemos olvidar que el número de marcadores genéticos en DL con los *QTL* es un factor limitante. También, hay que tener en cuenta que los *QTL* pueden tener efectos muy pequeños sobre la variación fenotípica del carácter y que puede ser susceptibles a la variación ambiental, por lo cual, se requiere de tamaños muestrales grandes y condiciones experimentales específicas para poder llevar a cabo estos estudios (Mackay, 2001).

En la última década, los avances tecnológicos en la secuenciación de ADN han permitido el desarrollo de metodologías de mapeo genético más potentes, entre las cuales se destacan los estudios de asociación del genoma completo o *GWAS* por sus siglas en inglés *Genome Wide Association Studies*. El primer estudio exitoso de *GWAS* fue publicado hace aproximadamente 10 años (Klein *et al.*, 2005) y se realizó en pacientes con degeneración macular relacionada con la edad. En este estudio se lograron identificar genes hasta el momento desconocidos que participan en la expresión de la enfermedad. A partir de ese momento el número de publicaciones utilizando *GWAS* aumentó en forma exponencial (<http://www.genome.gov/gwastudies/>). Si bien en un principio se realizaban con el fin de identificar genes relacionados con enfermedades en humanos, en los últimos años se produjo un incremento en el número de estudios de *GWAS* en especies modelo como *Arabidopsis thaliana* (Atwell *et al.*, 2010), ratón, *Mus musculus* (Flint y Eskin, 2012), *Solanum lycopersicum* (Ranc *et al.*, 2012) y *Drosophila melanogaster* (Mackay *et al.*, 2012).

Al igual que en el mapeo de *QTL* tradicional, los *GWAS* buscan establecer asociaciones estadísticas entre la variación genética y la variación fenotípica. Brevemente, para poder llevar a cabo un *GWAS* necesitamos una población variable para un carácter cuantitativo. A diferencia de los mapeos tradicionales, no necesitamos que los individuos estén relacionados entre sí ni debemos realizar cruzamientos entre ellos. Segundo, se procede a secuenciar los genomas completos de una colección de individuos y se identifican las variantes genéticas. Por lo general, la unidad de variación genética utilizada en los *GWAS* son los Polimorfismos de Nucleótido Simple o *SNP* (por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) y en menor medida, las inserciones y/o deleciones de bases nucleotídicas (*INDEL*) (Figura 3). Por último, se realizan las pruebas de asociación, entre los polimorfismos definidos y la variación fenotípica, mediante el uso de herramientas bioinformáticas (Mackay *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014).

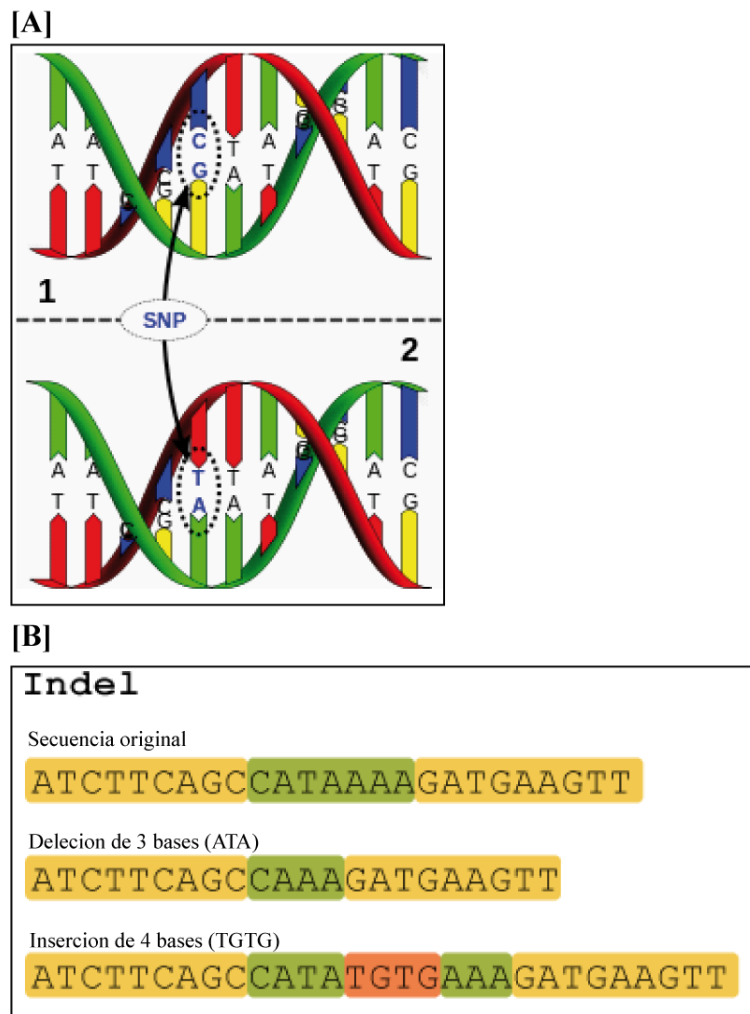


Figura 3. Representaciones gráficas de las unidades de variación genética más frecuentemente empleadas en los *GWAS*. [A] Polimorfismo de nucleótido simple o *SNP*. Las dos cadenas de ADN difieren entre sí en un solo par de bases (C – T). Realizado por David Hall (2007). [B] ejemplos de *INDEL* (inserción y/o delección) de bases en una secuencia de ADN.

Entre las ventajas del *GWAS* podemos destacar que la disponibilidad de genomas completos permitió aumentar la resolución de los estudios, ya que ahora es posible establecer si existe asociación entre la variación fenotípica y cientos de miles y hasta millones de polimorfismos distribuidos a lo largo del genoma. Además, estos estudios permiten asociar la variación fenotípica al nivel de los genes individuales y/o regiones genómicas regulatorias (Pearson y Manolio, 2008; Mackay *et al.*, 2009, 2012; Huang *et al.*, 2014).

Entre las desventajas del *GWAS* podemos subrayar los posibles falsos positivos que, como consecuencia de la enorme cantidad de polimorfismos que se analizan simultáneamente puede ser elevada. Esto significa que los resultados de los análisis pueden estar enriquecidos en polimorfismos que estadísticamente exhiben una asociación significativa pero que en realidad no están implicados en la expresión del carácter (Mackay *et al.*, 2009, 2012; Huang *et al.*, 2014). Otra

desventaja es la falta de información sobre las funciones de los genes candidatos, lo cual influye negativamente en la posibilidad de realizar análisis “a posteriori” que permitan un mayor detalle en el estudio de los factores genéticos involucrados en la expresión del carácter en estudio. Finalmente, no pueden excluirse de los inconvenientes asociados a esta metodología los errores de secuenciación y la necesidad de grandes tamaños muestrales (Pearson y Manolio, 2008).

5. El comportamiento de oviposición: La aceptación de recursos de oviposición y la preferencia por los sitios de oviposición.

El comportamiento es la suma de las acciones que desarrolla un organismo en respuesta a su ambiente externo e interno (Sokolowski, 2001). En los insectos fitófagos, el comportamiento de oviposición es un carácter complejo, resultante de la suma de varios caracteres interdependientes. La preferencia por el sitio de oviposición (PO) y la aceptación de recursos de oviposición (AO) son dos de los caracteres cuantitativos con mayor influencia en el comportamiento de oviposición y considerados centrales en la teoría de selección de hábitat (Fox, 1993). La PO se puede definir como la tendencia de las hembras a oviponer en un determinado sustrato cuando se les da la opción de elegir entre varios disponibles en igual proporción (Singer, 1986; Soto *et al.*, 2011; 2012, 2014; Betti *et al.*, 2014). A su vez, la AO, puede definirse como la cantidad de huevos que deposita una hembra en un determinado recurso en ausencia total de recursos alternativos (Fanara y Hasson, 2001; Schoonhoven *et al.*, 2005).

Aunque su estudio sigue siendo relevante en las investigaciones de los factores ecológicos en la especiación (Jaenike y Holt, 1991; Soto *et al.*, 2014), el comportamiento de oviposición ha tenido, en los últimos años, un resurgimiento como modelo para el estudio del comportamiento asociado con la toma de decisiones (Yang *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2009).

Se han planteado tres hipótesis que dan cuenta de la importancia adaptativa del comportamiento de oviposición. La más conocida es la hipótesis de “*Preferencia – performance*” (Levins y MacArthur, 1969; Jaenike, 1978), que postula que la hembra elige oviponer en recursos en los que se maximiza el *fitness* de su descendencia. Por tanto, la predicción de esta hipótesis es una relación directa entre la preferencia y el desempeño de la descendencia en dicho recurso. En otras palabras, esperamos encontrar que las hembras tengan preferencia por aquellos recursos en los que las larvas alcanzan un desarrollo exitoso.

La segunda es la hipótesis del “Forrajeo óptimo” (Stephens y Krebs, 1986; Gripenberg *et al.*, 2010). En este caso, la hembra elige oviponer en aquellos recursos que maximizan su propio *fitness*, lo cual se ve reflejado en términos de mayor fecundidad y longevidad. Por lo general las hembras suelen alimentarse en el mismo lugar donde oviponen y una mejor alimentación aumenta la disponibilidad de los nutrientes necesarios para la producción de huevos y a la vez, predispone a una mayor longevidad (Fanara y Hasson, 2001; Gripenberg *et al.*, 2010).

Por último, la hipótesis del “*espacio libre de enemigos*” (Price *et al.*, 1980; Silberbush y Blaustein, 2011; Kacsoh *et al.*, 2013) postula que la hembra elige el sitio de oviposición dependiendo de la presencia o ausencia de predadores y parásitos que puedan afectar el exitoso desarrollo de la descendencia. En otras palabras, las hembras podrían preferir oviponer en recursos de menor calidad para el desarrollo larval pero que se encuentren libres de predadores y/o parásitos, antes que en recursos de mayor calidad para el desarrollo larval pero con potenciales enemigos.

La evidencia disponible apunta a que la primer hipótesis será válida en insectos cuya descendencia se encuentra restringida, durante el desarrollo, al recurso elegido por la madre, mientras que las otras dos hipótesis se postula que serán prevalentes en insectos cuya descendencia tiene la capacidad de movilizarse de un recurso a otro o en especies incapaces de evaluar a través de sus sentidos la calidad del recurso (Videla *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2012). Igualmente, debemos destacar que las dos primeras hipótesis no deberían verse, necesariamente, como independientes ya que podemos esperar que las hembras tiendan a maximizar su *fitness* optimizando su propia *performance* y la de su descendencia.

El comportamiento de oviposición está determinado tanto por factores genéticos como por factores ambientales. Entre los factores ambientales que lo afectan podemos nombrar la luz y la temperatura ambiental (Fogleman, 1979; Wogaman y Seiger, 1983), la composición química del sustrato de cría (Amlou *et al.*, 1998; Fanara y Hasson, 2001), su textura (Chess y Ringo, 1985) y específicamente en los insectos saprofitofagos, la composición de la flora microbiana que participa en el proceso de descomposición del sustrato de cría (Hoffman y Harshman, 1985; Oakeshott *et al.*, 1989; Palanca *et al.*, 2013).

Las hembras adultas de *Drosophila melanogaster*, y de la mayoría de las especies de drosofilidos, depositan sus huevos en frutos en descomposición en los que se alimentan (las larvas y los adultos) de bacterias y levaduras que participan del proceso de fermentación produciendo como resultado de su metabolismo alcoholes, ácidos, esteroides, cetonas y aldehídos (algunos de ellos son compuestos volátiles) (Begon, 1982; Graf y Sokolowski, 1989). De esta manera, tanto los adultos como los estadios larvales están expuestos a una gran variedad de estímulos olfativos y gustativos. Por tanto, los procesos que intervienen en la recepción de estos estímulos químicos son vitales en la relación del organismo con su medio ambiente.

El sistema quimiorreceptor incluye receptores de olfato y gusto, los cuales interactúan en forma específica con proteínas de unión a partículas de olor (Whiteman y Pierce, 2008). En *D. melanogaster*, por ejemplo, los órganos asociados al gusto y al olfato se encuentran distribuidos en todo el cuerpo de la mosca, pero los puntos de mayor concentración son las alas, las extremidades, las antenas, la probóscide y, en las hembras, el aparato ovipositor (Figura 4). El sistema quimiorreceptor está formado por un tipo especial de pelos denominados sensillas. Cada sensilla protege al extremo apical de las neuronas especializadas que se denominan “Olfactory Receptor Neuron” (ORN) o “Gustatory Receptor Neuron” (GRN). El número de sensillas es un carácter sexualmente dimórfico. En las hembras, la capacidad sensorial gustativa más desarrollada se encuentra en la placa vaginal en el extremo inferior del abdomen (Vosshall y Stocker, 2007). Según estos autores el desarrollo gustativo en la placa vaginal tendría relación directa con la elección del sitio de oviposición.

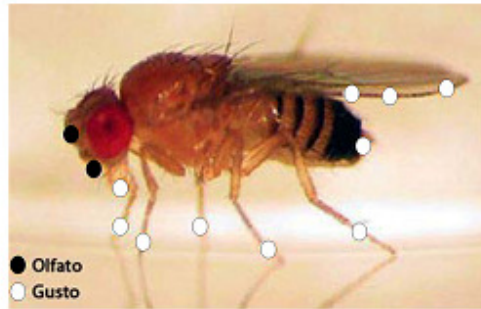


Figura4. Distribución de las regiones sensitivas de olfato y gusto en *D. melanogaster*. Fotografía modificada de Vosshall y Stocker (2007).

Es también importante mencionar que cuando la hembra de *Drosophila* elige un recurso de oviposición, determina el ambiente donde se desarrollará su descendencia ya que las larvas no poseen la capacidad de movilizarse hacia otros recursos, por tanto su supervivencia dependerá, en gran medida, de aquella decisión.

La especiación se define como la acumulación de suficientes diferencias entre poblaciones o entre los individuos de una población, hasta tal punto que se interrumpe el flujo génico. En los últimos años hemos sido testigos de una visión renovada de la idea Darwiniana de la especiación adaptativa. En el marco de lo que se ha dado en llamar especiación adaptativa pueden reconocerse dos grandes categorías: *i)* la especiación ecológica (que contiene los modelos clásicos de especiación alopátrica, peripátrica, parapátrica y simpátrica) y *ii)* la especiación por mutación. Por la primera, entendemos la evolución de barreras reproductivas entre poblaciones o entre individuos de una población que son consecuencia de la adaptación a distintos ambientes o nichos ecológicos. Por la segunda se entiende la evolución de barreras reproductivas como consecuencia de la ocurrencia y fijación de distintos alelos entre poblaciones que se encuentran bajo presiones selectivas similares (Schulter, 2009). Las bases genéticas de las barreras reproductivas consisten, en gran parte, de genes involucrados en la expresión de caracteres sencillos pero que en conjunto acarrearán diferencias significativas entre fenotipos (Schulter, 2009).

La idea de que la especiación en los insectos fitófagos puede ocurrir a través de cambios de hospedador, fue formulada hace más de un siglo por Benjamín Walsh (1864). En la década de los '60 del siglo XX, Maynard Smith postuló un modelo para explicar los posibles mecanismos de este tipo de especiación. El primer paso del modelo, es el establecimiento de polimorfismos en ambientes heterogéneos en donde los alelos alternativos de un locus se seleccionan diferencialmente en los distintos nichos ecológicos disponibles. Entonces, si el polimorfismo se mantiene gracias a una intensa selección de hábitat (selección diversificadora) es probable que ocurra especiación (Jaenike y Selander, 1979). Por tanto, cambios significativos en el comportamiento de oviposición podrían conllevar a un incremento en la frecuencia de genotipos capaces de sobrevivir en el nuevo hospedador o viceversa, pudiendo conducir al origen de nuevas razas ecológicas y, en caso de detectarse una asociación significativa entre la emergencia de determinados hospedadores con la elección de pareja (proveniente del mismo hospedador), a la especiación (Takamura y Fuyama, 1980; Jaenike y Grimaldi, 1983; Sezer y Butlin, 1998; Craig *et al.*, 2001).

6. Modelo de estudio: *Drosophila melanogaster*

En los primeros años del siglo XX T.H. Morgan comenzó a utilizar a *Drosophila melanogaster* como modelo biológico en sus ensayos genéticos. A partir de ese momento la especie se convirtió en el modelo biológico por excelencia para estudios genéticos y evolutivos. *D. melanogaster* (Phylum *Arthropoda*, Clase *Insecta*, Orden *Diptera*, suborden *Brachycera*, Familia *Drosophilidae*, género *Drosophila*, subgénero *Sophophora*) fue descrita por Johan Meigen en 1830 (Meigen, 1830).

Actualmente se debate de forma activa su clasificación biológica ya que estudios recientes han establecido que el género es parafilético y por tanto no puede ser mantenido como tal (Van Der Linde, 2007). Como consecuencia el componente genérico de su nombre científico debería cambiar al del nuevo género que se propone. En este caso Van der Linde propuso elevar *Sophophora* (actualmente subgénero) a la categoría de género, de modo que el nombre de la especie debería ser *Sophophora melanogaster*, quedando el nombre *Drosophila* como género que incluiría a las especies del subgénero homónimo. Sin embargo, se ha preferido mantener la nomenclatura actual dado que el cambio generaría conflictos ya que en la bibliografía tanto *Drosophila* como *Drosophila melanogaster* son usados, sin distinción, como sinónimos del nombre de la especie. Dado que el conflicto no se ha resuelto hasta el momento, en esta tesis hemos optado por seguir nombrando al modelo de estudio con su nombre histórico.

7. Historia evolutiva de *Drosophila*

La evidencia fósil más temprana del orden *Diptera* proviene del Triásico inferior hace unos 240 millones de años (MA) (Krzemiński y Krzemińska, 2003). Estudios recientes sugieren que el orden pasó por al menos tres radiaciones adaptativas las cuales dieron origen a la gran diversidad de especies actual. Las primeras radiaciones ocurrieron en la era Mesozoica, fines del período Triásico hace unos 200 MA y en el período Jurásico hace unos 180 MA, mientras que la última fue al principio del Paleoceno (hace 60 MA) en la era Cuaternaria. (Wiegmann *et al.*, 2011). Es interesante destacar que cada una de estas radiaciones aparece asociada en el registro fósil con la explotación de un nuevo recurso alimentario tal como se muestra en la Figura 5.

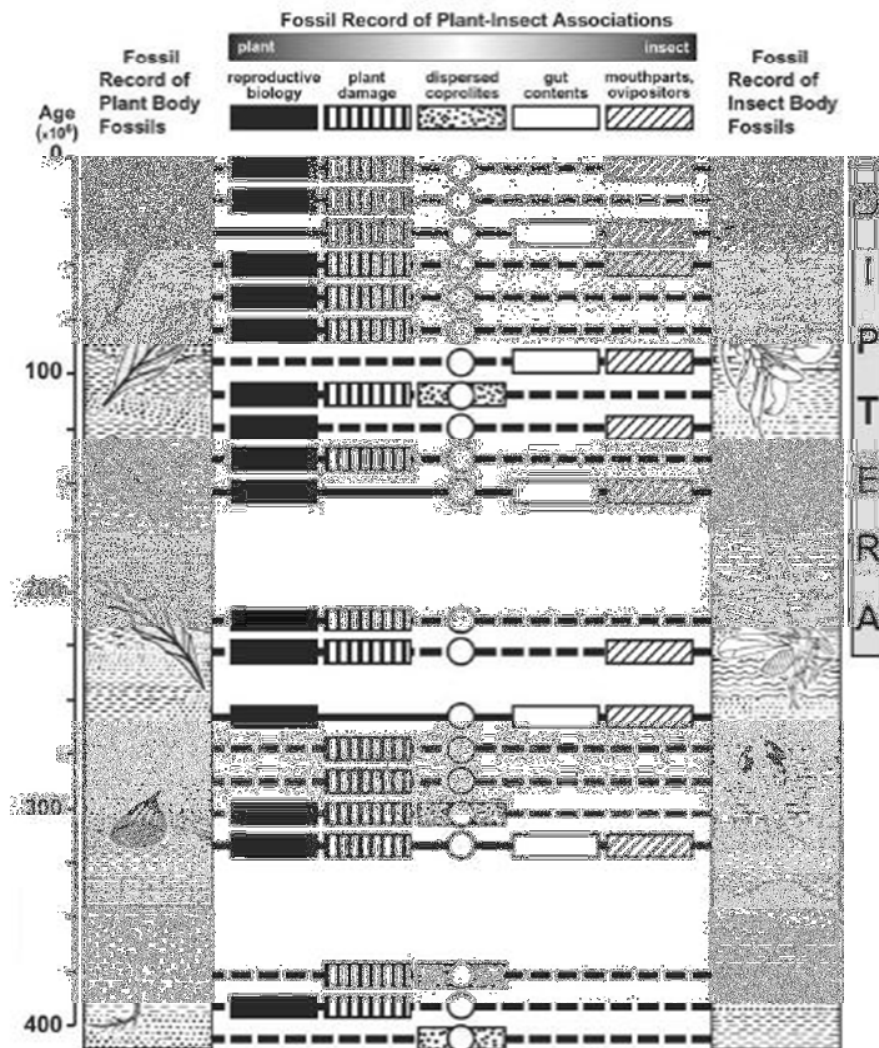


Figura 5. Registro fósil que representa la asociación insecto – planta a través del tiempo geológico. Diagrama tomado de Yeates y Wiegmann (2005).

Los orígenes de la familia *Drosophilidae* se remontan al Eoceno, hace unos 50 MA. La evidencia fósil consiste de especímenes del género extinto *Electrophortica* conservados en ámbar (Hennig, 1965). Además, en base a la distribución de *Lissocephala*, grupo basal de drosofilidos, se cree que el origen geográfico de la familia fue en el hemisferio sur en las regiones tropicales de África.

El género *Drosophila* incluye unas 1500 especies descritas y actualmente está subdividido en 10 subgéneros (Ashburner, 1989), de los cuales *Drosophila* y *Sophophora* son, en ese orden, los más diversos. En conjunto estos subgéneros incluyen el 90% de la diversidad que se observa en la naturaleza.

8. Subgrupo *melanogaster*

Ocho especies cercanamente emparentadas conforman el subgrupo *melanogaster* (Figura 6). Todas las especies son saprofitófagas, ya que se crían y alimentan de la comunidad microbiana (bacterias, hongos y levaduras) asociada a la descomposición de una gran variedad de frutos. Seis de las ocho especies, *D.simulans*, *D. mauritiana*, *D. yakuba*, *D. santomea*, *D. orena* y *D. melanogaster*, tienen hábitos de vida generalista, mientras que *D. erecta* y *D. sechellia* son especialistas.

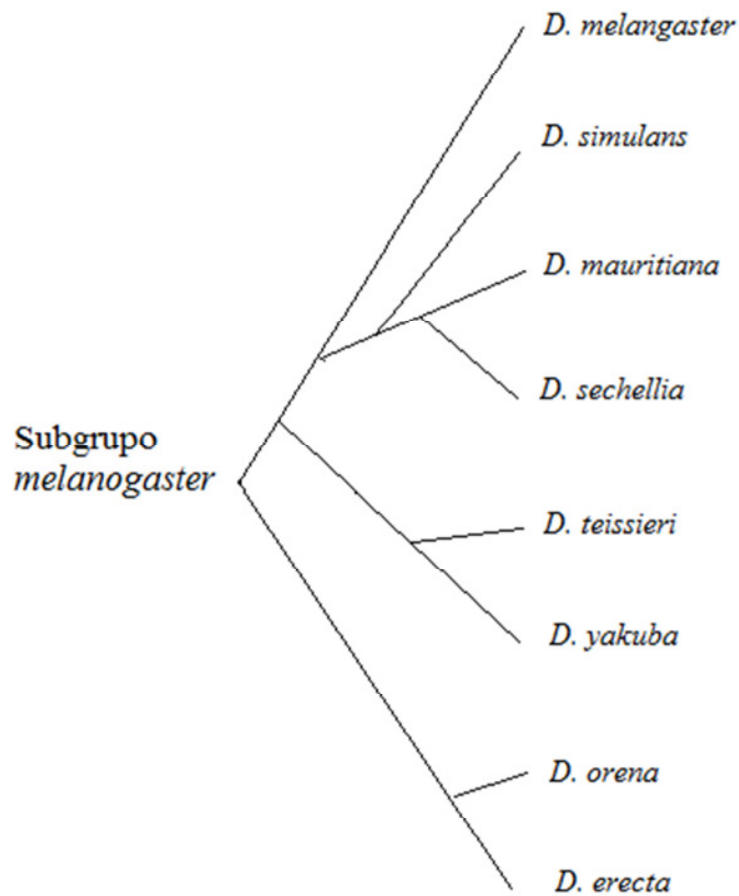


Figura 6. Relaciones filogenéticas entre las ocho especies que conforman el subgrupo *melanogaster*. Modificado de la base de datos *Flybase*.

Lachaise y Sylvain (2004) proponen un origen africano para el subgrupo y especiación en alopátria de las distintas especies (figura 7). Se postula que *D. simulans* se habría originado en la isla de Madagascar y *D. sechellia* y *D. mauritiana* en las islas del océano Índico cercanas a la costa, Seychelles y Mauricio, respectivamente. En cambio, *D. melanogaster* se habría originado en África central continental (figura 7). De las especies del subgrupo solamente *D. simulans* y *D. melanogaster*, ambas comensales del hombre, se han dispersado alrededor del mundo. *D.*

simulans hasta el momento no es considerada una especie cosmopolita ya que no hay registro de ella en Asia ni en África septentrional; en tanto que *D. melanogaster* sí lo es.

Se ha propuesto que la ruta de dispersión de *D. melanogaster* fue desde África hacia Medio Oriente (actualmente Palestina/Israel) y de allí a Europa al finalizar el período glacial hace unos 10000 años. La expansión es coincidente con la expansión de cultivos de banana (género *Musa*). Estudios recientes indican que la colonización de América ocurrió en tiempos recientes y que la expansión al resto del continente ocurrió en menos de 150 años (Langley, 2012). El primer registro de *D. melanogaster* en América, data de fines del siglo XIX en la Ciudad de Nueva York (Langley, 2012) mientras que las primeras evidencias de la colonización de Sudamérica se dan en los registros de captura de Dobzhansky y Pavan (1950) realizados en el sur de Brasil.

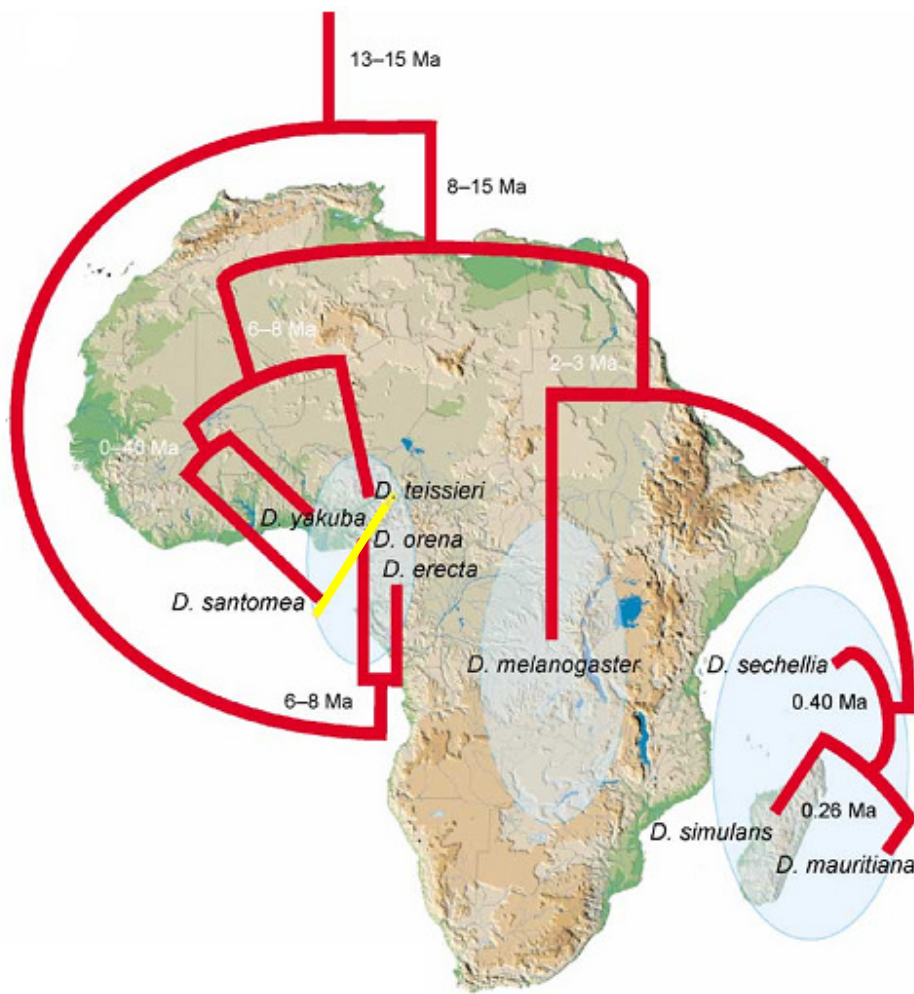


Figura 7. Posible historia evolutiva del subgrupo *melanogaster*. Las líneas rojas representan las relaciones filogenéticas entre las especies. Extraído de Lachaise y Sylvain (2004).

9. Especialización dentro del subgrupo *melanogaster*

Dentro del subgrupo *melanogaster* la especiación relacionada con los cambios de recursos tróficos parece haber ocurrido al menos dos veces a lo largo de su historia. Uno de los ejemplos más conocidos es el caso de *D. sechellia*, una especie endémica del archipiélago volcánico de Seychelles en el norte de África, que utiliza como sitio de cría y alimentación el fruto en descomposición de *Morinda citrifolia* sp. Este fruto, comúnmente llamado noni, es tóxico para *D. simulans* que es la especie más cercanamente emparentada con *D. sechellia*. Se ha propuesto que la especiación de *D. sechellia* habría estado acompañada por cambios en su sistema sensorial, pérdida de genes del gusto y del olfato relacionados con las vías metabólicas de detoxificación (R’Kha *et al.*, 1991; McBride, 2007; Whiteman, 2008). Otra de las especialistas del subgrupo es *D. erecta*, endémica de las selvas en galería del centro-oeste de África, que utiliza las frutas de *Pandanus* sp., pero que a diferencia de *D. sechellia*, puede explotar tres variedades de *Pandanus* (Stone, 1970).

También se ha teorizado que la especialización de *D. erecta* está relacionada con cambios en los sistemas sensoriales, más específicamente con cambios en el sistema olfativo. Linz *et al.* (2013) han encontrado que *D. erecta* es sensible al 3M2BA (3-methyl-2-butenyl acetato), un volátil específico de *Pandanus* sp. La sensibilidad al volátil parece deberse a un incremento en el número de neuronas olfativas (llamadas *OSN* por sus siglas en inglés *Olfactory Sensory Neuron*). Cuando hembras de *D. erecta* son expuestas al volátil incrementan la oviposición en comparación con hembras de *D. melanogaster* expuestas al mismo volátil.

10. Ciclo y hábitos de vida de *D. melanogaster*

Drosophila melanogaster se caracteriza por ser un insecto saprofitófago, es decir que se alimentan de la microbiota (lavaduras, hongos y bacterias) que se establece en los frutos durante el proceso de descomposición. Se sabe que las moscas son vectores de los microorganismos que componen la microbiota descomponedora ya que los depositan en los sitios de alimentación a través de la materia fecal y durante la oviposición (Bakula, 1969; Brummel *et al.*, 2004). A su vez los adultos se traspasan entre si los microorganismos durante la cópula. Esta participación activa de las moscas en la dispersión de su principal fuente de alimentación, lleva a pensar en un proceso de coevolución que moldearía la asociación moscas - microorganismos (Palanca *et al.*, 2013, Soto *et al.*, 2014).

Las moscas de *D. melanogaster* son insectos holometábolos, es decir, que sufren una metamorfosis completa durante su ciclo de vida tal como se puede observar en la figura 8. Los tiempos de duración de cada estadio son variables dependiendo de las condiciones ambientales, pero se puede estimar que el ciclo completo dura entre 7 y 10 días. La maduración sexual, tanto de la hembra como del macho, ocurre dentro de las primeras 24 hs. post-emergencia del pupario. En condiciones de laboratorio, la longevidad media del adulto es de 15 a 20 días.

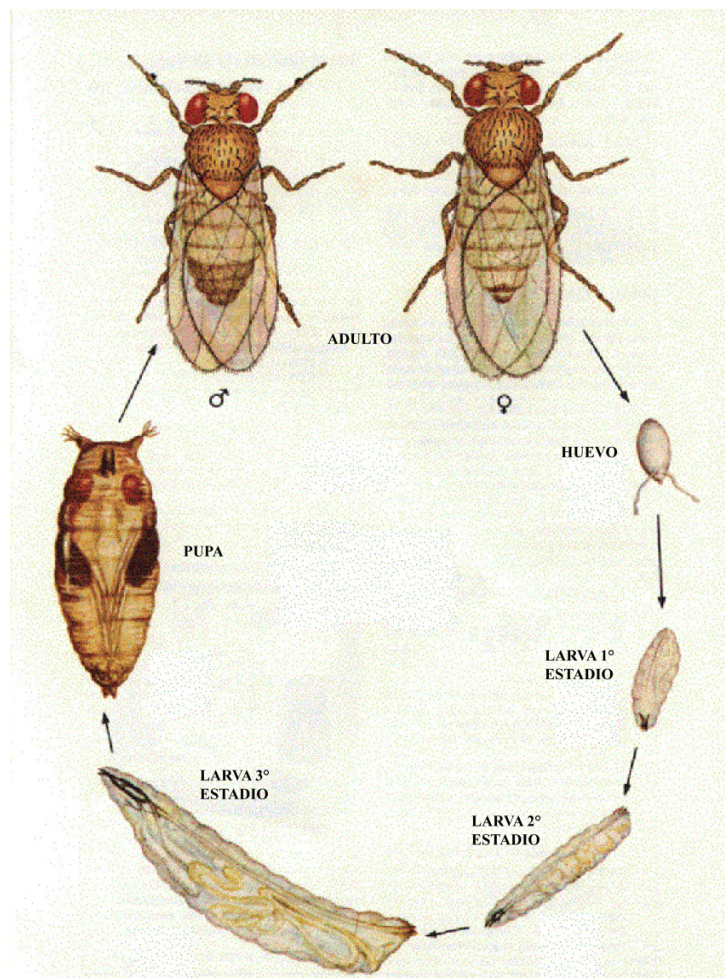


Figura 8. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

11. Genética y genómica de *D. melanogaster*

El tamaño total del genoma de *D. melanogaster* es aproximadamente un 5% del genoma de un mamífero. Sorprendentemente, a pesar de la diferencia de tamaño, 75% de los genes de *Drosophila* tienen homólogos en el genoma de mamífero. Además, se comparten la mayoría de las familias génicas y los mecanismos regulatorios básicos del metabolismo. Su cariotipo está compuesto por cuatro pares de autosomas (denominados 2, 3, 4) y un par de cromosomas sexuales (X e Y). Los cromosomas 2 y 3 suman aproximadamente el 60% de la información genética total, mientras que el par 4 es muy pequeño y se denomina cromosoma puntiforme.

La secuenciación del primer genoma de *D. melanogaster* se completó en marzo del 2000 (Adams *et al.*, 2000) y posteriormente, en el año 2007 se publicaron las secuencias completas de los genomas de otras 11 especies de *Drosophila* (Clark *et al.*, 2007). El conocimiento de la secuencia de los genomas aporta una gran cantidad de información biológica de interés como por ejemplo:

predecir y catalogar el número total de genes, conocer la estructura y las regiones reguladoras, predecir proteínas, describir el paisaje genómico de cada genoma, es decir la distribución de genes y secuencias no codificantes a lo largo de cada cromosoma, inferir la evolución de los genomas a partir de la conservación del orden de los genes y los cambios de la secuencia.

El genoma de *Drosophila* está compuesto por alrededor de 169 millones de pares de bases (169 Mpb), de las cuales aproximadamente 120 Mpb corresponden a regiones eucromáticas. Se estima que el número de genes codificantes es de 13.937 mientras que el número de transcriptos alcanzaría los 29.173 (*Ensemble release 76, 2014*). Sin embargo, a pesar del elevado número de genes descritos, solo alrededor de 4700 (Lin *et al.*, 2007) se encuentran asociados con información fenotípica, por lo cual, el número de genes codificantes podría ser inferior al estimado.

Tal como se había expresado, comprender las relaciones que existen entre la variación fenotípica y la genotípica es uno de los mayores desafíos de la biología moderna. La disponibilidad de la información genómica junto con el desarrollo de técnicas estadísticas y herramientas de análisis bioinformáticas, abrió la posibilidad de investigar las bases genéticas de caracteres complejos y de poder, poner a prueba hipótesis relacionadas con la evolución de las especies (Hasson *et al.*, 2013).

12. Objetivos y esquema general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es contribuir al conocimiento de la arquitectura genética del comportamiento de oviposición por medio del estudio genómico poblacional de dos caracteres complejos, la preferencia por los sitios de oviposición (PO) y la aceptación de recursos de oviposición (AO) en la especie modelo *Drosophila melanogaster*.

Teniendo en cuenta este objetivo general, los objetivos específicos que permitirán dilucidar con mayor exactitud los diferentes aspectos de la arquitectura genética de estos caracteres adaptativos son:

- Estudiar la variación fenotípica de la PO y la AO utilizando tres recursos naturales como estímulos de oviposición.
- Cuantificar la contribución de la variación genética a la variación fenotípica de la PO y la AO.
- Estimar el grado de correlación genética entre la PO y la AO.
- Identificar regiones genómicas candidatas responsables de la variación en la PO y la AO por medio de análisis de asociación fenotipo - genotipo.
- Validar los genes candidatos identificados por medio de pruebas de validación funcional y de ensayos de complementación.
- Modelar la arquitectura genética del comportamiento de oviposición.
- Identificar regiones genómicas candidatas responsables de la variación en la PO y la AO por medio de análisis de asociación entre el fenotipo y la variación a nivel de los transcritos.
- Determinar cuáles son las funciones y procesos en los que participan los genes candidatos.
- Discernir los procesos evolutivos implicados en la determinación de los patrones de variación que forman parte de la arquitectura genética del comportamiento de oviposición.

CAPÍTULO II

*Variación del comportamiento de
oviposición: Aceptación y Preferencia de
sitios de oviposición*

CAPÍTULO II

1. Introducción

Las plantas y los insectos coexisten desde sus orígenes hace unos 450 millones de años (Yeates y Wiegmann, 2005). Se considera que la interfase planta – insecto herbívoro es una zona de interacción biótica que ha sido crucial en la diversificación tanto de los insectos como de las plantas con flores (Grimaldi y Engel, 2006). La selección de una planta hospedadora por parte de las hembras de los insectos fitófagos es de suma importancia tanto ecológica como evolutiva.

En los sistemas planta/insecto la elección de la planta hospedadora constituye un aspecto fundamental en diferentes etapas de la ontogenia ya que en la planta hospedadora los insectos se alimentan, copulan, las hembras depositan sus huevos y se desarrolla su descendencia. En los hábitats naturales, las plantas hospedadoras crecen junto con otras muchas plantas que no son aceptables para los insectos como plantas hospedadoras. Por lo tanto, la habilidad de reconocer, encontrar y explotar una planta hospedadora es central para comprender el origen y mantenimiento de la diversidad de las especies (Bush, 1975; Markow y O'Grady, 2008; Gripenberg *et al.*, 2010).

Durante la elección de una planta hospedadora se pueden definir dos fases principales (Schoonhoven *et al.*, 2005). La primera incluye la búsqueda y elección de un recurso frente a la oferta de recursos alternativos y la segunda se corresponde con la habilidad de explotar el recurso elegido. La secuencia de comportamientos que ocurren durante la selección del hospedador se puede resumir en los siguientes pasos:

- 1) El insecto no tiene contacto físico con el hospedador por lo cual se encuentra descansando o moviéndose de forma aleatoria.
- 2) El insecto percibe señales visuales u olfativas provenientes de una potencial planta hospedadora.
- 3) Las señales visuales y/u olfativas pueden desencadenar una respuesta de acercamiento del insecto hacia la planta hospedadora.
- 4) El insecto examina la superficie de la potencial planta hospedadora.
- 5) La planta es aceptada o rechazada como hospedadora.

El rango de plantas hospedadoras de una especie está lejos de ser una lista fija y determinada. Por esta razón, la secuencia comportamental no ocurre siempre de forma secuencial, y en muchos casos la secuencia se interrumpe en los pasos *iv* y *v*, para volver a comenzar una cantidad finita de veces hasta que se completa la secuencia después de evaluar varias potenciales plantas hospedadoras.

Una vez que la hembra acepta una determinada planta hospedadora se genera una nueva cascada de comportamientos, entre los cuales se encuentra el momento de la oviposición. Yang *et al.* (2008) describieron el momento de la puesta de huevos en *D. melanogaster* como una serie secuencial de programas (figura 1). La secuencia comienza antes de la expulsión del huevo, cuando las hembras inclinan su abdomen hacia abajo hasta alcanzar una posición perpendicular a la superficie del sustrato. En ese momento la hembra extruye el aparato ovipositor y lo introduce en el sustrato, iniciando una serie de movimientos hacia atrás y hacia adelante con el fin de expulsar y depositar el huevo en el sustrato. El tiempo promedio de duración de este comportamiento es de 6 segundos y se

CAPÍTULO II

denomina “programa ovipositor”. Esta secuencia de comportamiento es idéntica a la descrita en el ortóptero *Schistocerca americana* (Thompson, 1986).

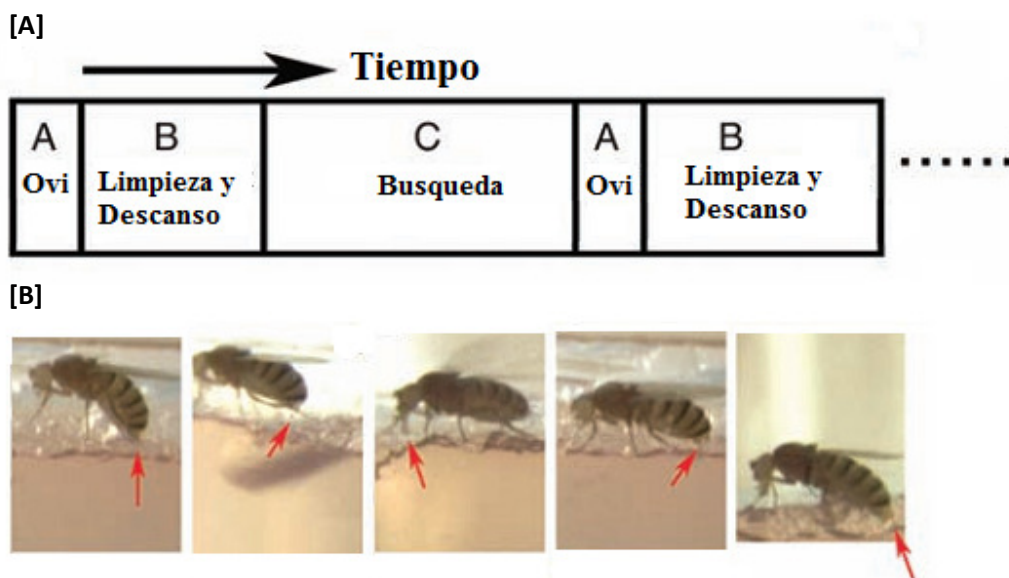


Figura 1. [A] Esquema de la secuencia comportamental de la puesta de huevos en *D. melanogaster*. A: “programa ovipositor”, B: “programa de limpieza y descanso” y C: “programa de búsqueda”. [B] Fotografías detallando la secuencia de puesta de huevos. La flecha roja indica la posición del aparato ovipositor. Figuras y fotografías extraídas y modificadas de Yang *et al.* (2008).

Seguidamente, comienza la segunda parte de la secuencia en la cual la hembra limpia con sus patas posteriores el aparato ovipositor para luego ingresar en un período de descanso durante el cual permanece inmóvil. Este componente de la secuencia se denomina “programa de limpieza y descanso”. Posteriormente, ocurre el “programa de búsqueda” en el cual la hembra localiza el sitio apropiado para depositar el próximo huevo. Durante este programa, la hembra explora el sustrato evaluándolo con su probocis y aparato ovipositor. Como explicamos en la Sección I, las hembras de *D. melanogaster* cuentan con terminales sensoriales del gusto y del olfato en la probocis, las patas y el aparato ovipositor. La duración del programa de búsqueda es variable, pudiendo durar desde unos pocos segundos hasta varios minutos.

La Aceptación de recursos de oviposición (AO) y la Preferencia por sitios de oviposición (PO) son conceptos que se usan en la descripción de la primer fase en la selección de un hospedador y, por lo tanto, componentes básicos de la teoría de selección de hábitat (Fox, 1993). El término AO refiere a situaciones en las cuales un organismo decide usar un recurso en ausencia total de recursos alternativos y está afectado por la motivación, mientras que PO hace alusión a situaciones en las cuales los organismos usan o eligen consistentemente un determinado recurso entre varios alternativos disponibles de forma simultánea y en igual abundancia. Podemos definir un tercer término relacionado con el concepto de Aceptación, al cual llamamos Reconocimiento. Este concepto se refiere al proceso neuronal en el cual el insecto forma una “imagen” de la planta

CAPÍTULO II

hospedadora que le va a permitir reconocerla como hospedadora cuando vuelva a encontrarla (Schoonhoven *et al.*, 2005).

El grado en que una población puede especializarse en un hospedador o recurso depende de la existencia de variación genética para el uso del recurso, de la aceptabilidad, de la persistencia en el hospedador, de la estructura de la población y de la intensidad de la selección que se impone sobre ellos (Futuyma y Peterson, 1985; Jaenike, 1990; Yeates y Wiegmann, 2005). Desde una perspectiva teórica, se ha propuesto que la selección de hábitat puede contribuir al mantenimiento de la variación genética intrapoblacional (Hedrick, 2005) cuando individuos genéticamente diferentes varían en su habilidad para utilizar los recursos dentro de un ambiente heterogéneo (Jaenike, 1986; Barker y Starmer, 1999; Fanara *et al.*, 1999; Fanara y Hasson, 2001; Gorur *et al.*, 2007; Hasson *et al.*, 2009). La idea de que la variación observada para la preferencia de hábitat tiene una base genética, fue sugerida, en un principio, por los trabajos realizados en *Drosophila* y en especies del Phylum *Mollusca* (Jaenike y Holtz, 1991). En este contexto, la caracterización de las bases genéticas de la variación en la preferencia de hábitat tiene una importancia central, ya que de tratarse solo de variación ambiental ésta no tendría impacto evolutivo.

De todos los procesos evolutivos, la Selección Natural (*SN*) es la única que tiene como resultado la adaptación. La *SN* puede actuar sobre un carácter siempre que el mismo exhiba variación fenotípica, que dicha variación tenga base genética y que la variación en el carácter esté asociada con diferencias en el *fitness* (Endler, 1986; Conner y Hartl, 2004; Ridley, 2004). En este contexto, vale la pena diferenciar adaptación del concepto de *fitness*, ya que la primera se refiere a una consecuencia evolutiva mientras que el *fitness* es una cuantificación del éxito reproductivo de los individuos de una población (Endler, 1986).

La literatura que aborda el estudio del comportamiento de oviposición en insectos es abundante (revisado en Joshi *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2008; Joseph, 2009; Grinsperberg *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2011, 2012, 2014; Betti *et al.*, 2014). Estos estudios han demostrado que en las poblaciones naturales existen niveles moderados de variación para la preferencia de oviposición en sustratos que no brindan un medio óptimo para el desarrollo larval (Moreteau *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha observado preferencia por recursos novedosos que no se encuentran en los hábitats naturales de los cuales provienen los individuos (Thompson, 1988; Fox *et al.*, 1994); y también, se ha encontrado que una proporción sustancial de la variación en las preferencias tiene una base genética (Jaenike y Holtz, 1991; Miller *et al.*, 2011; Betti *et al.*, 2014). En este sentido, la variación fenotípica con base genética tiene una importancia central no solo porque hace posible la divergencia ecológica y, por ende, la coexistencia de especies cercanas en simpatria, sino también porque la magnitud de la variación genética entre y dentro de las poblaciones son factores centrales en los modelos de especiación basados en el uso diferencial de los distintos recursos (Jaenike y Grimaldi, 1983; Jaenike y Holtz, 1991; Schluter, 2009; Nosil, 2012).

Drosophila melanogaster es el modelo biológico por excelencia en estudios genéticos, genómicos y evolutivos (Patterson y Stone, 1952; Markow y O'Grady, 2006; Mackay *et al.*, 2012; Huag *et al.*, 2014). La evidencia disponible indica que en la naturaleza, se alimenta de las levaduras que proliferan e intervienen en el proceso de descomposición de los frutos de muchas especies (Becher *et al.*, 2012; Lebreton *et al.*, 2012; Palanca *et al.*, 2013). Cuando las moscas detectan un recurso adecuado, en el mismo se alimentan, tiene lugar el cortejo, el apareamiento y, finalmente, la oviposición.

CAPÍTULO II

A pesar de la amplia variedad de estudios relacionados con el comportamiento de oviposición en *D. melanogaster* (Jaenike, 1983; Jaenike, 1986; Yang *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2011), son pocos los trabajos que lo han abordado utilizando recursos que las moscas explotan en sus hábitats naturales (Soto *et al.*, 2012; Betti *et al.*, 2014). Por lo general, las investigaciones del comportamiento de oviposición emplean compuestos volátiles aislados de frutas (Yang *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2011; Abed-Vieillard *et al.*, 2013) o cepas de levaduras aisladas que participan en el proceso de descomposición de los frutos (Becher *et al.*, 2012; Lebreton *et al.*, 2012; Palanca *et al.*, 2013). La limitación de estos estudios radica en que la información que procesa la hembra antes de oviponer es restringida y esto puede llevar a respuestas comportamentales contrarias a las que ocurren en la naturaleza. Recientemente, Dweck *et al.* (2013) estudiaron la elección de sitios de oviposición en *Drosophila* utilizando 15 variedades de frutas. La conclusión de su trabajo es que las moscas prefieren oviponer en frutos con las características químicas de cítricos, es decir, que tienen compuestos volátiles de la clase de los terpenos como el limoneno y el valenceno.

Finalmente, la información social en la selección del sitio de oviposición es también un factor importante a tener en cuenta en estos estudios. Por ejemplo, la feromona *cis* - vaccenyl acetate (*cVA*) es una hormona producida por los machos y en menor medida por las hembras de *D. melanogaster*, que actúa como señal de atracción. Bartelt (1985) notó que la preferencia por un determinado recurso se ve intensificada por la presencia de *cVA*. Estudios posteriores sugieren que las hembras luego de oviponer, depositan el *cVA* transferido por los machos durante la cópula y el que ellas mismas producen, en el recurso (Guiraudie-Capraz *et al.*, 2007; Yew *et al.*, 2009). Esta marca con *cVA*, es usada posteriormente por otras hembras como señal de que ese recurso es un sitio de oviposición apropiado.

CAPÍTULO II

2. Objetivos e hipótesis

El objetivo de esta sección es estudiar la variación fenotípica y genética del comportamiento de oviposición en un conjunto de 40 líneas que forman parte del panel de referencia genética de *Drosophila melanogaster* (DGRP). El comportamiento de oviposición se estimó a partir del estudio de dos caracteres: la Aceptación de recursos (AO) y la preferencia por sitios de oviposición (PO) utilizando tres especies de frutas como estímulos de oviposición: uva, naranja y tomate.

Para alcanzar estos objetivos pusimos a prueba las siguientes hipótesis:

- Hay variación fenotípica para el carácter AO
- Esta variación depende del estímulo utilizado (naranja, tomate y uva)
- La variación en la AO tiene una base genética
- Hay variación fenotípica para el carácter PO
- Las líneas varían en la PO cuando se las expone a las combinaciones de recursos uva/naranja y uva/tomate
- La variación en la PO tiene una base genética
- La AO y la PO están correlacionadas. Dado que estamos investigando dos caracteres que forman parte del comportamiento de oviposición esperamos un solapamiento de las arquitecturas genéticas entre los distintos ambientes evaluados.

CAPÍTULO II

3. Materiales y métodos

Los ensayos biológicos para medir la AO y la PO se realizaron siguiendo los protocolos descritos en los Anexo metodológico. A modo de resumen, los ensayos consistieron en liberar 20 parejas de moscas (20 hembras y 20 machos sexualmente maduros) de una misma línea en cámaras de oviposición, las cuales contenían en su interior 4 placas con un medio semi-natural preparado con uno de los distintos recursos (uva, tomate o naranja) elegidos según correspondiera el ensayo. En cada ensayo de AO, las 4 placas contenían el mismo recurso de oviposición. La respuesta de cada una de las líneas se midió en cada uno de los tres recursos de oviposición por separado.

Los ensayos de PO consistieron en experimentos de doble elección, donde dos de las placas contenían medio preparado con un recurso y las otras 2 con otro recurso alternativo. En estos experimentos se ofrecieron a las moscas dos combinaciones de recursos diferentes, uva/naranja (UN), por un lado, y uva/tomate (UT), por otro. En los dos tipos de ensayos, transcurridas 36 horas desde la introducción de las moscas se retiraron todas las placas y se fotografiaron con una cámara digital adosada a un microscopio binocular para el posterior conteo de huevos. En todos los casos los experimentos se realizaron bajo condiciones controladas de luz (12 hs de luz: 12hs de oscuridad), temperatura (25°C) y humedad ambiente (70%).

En todos los ensayos se cuantificaron la AO y PO en 40 líneas del *DGRP*. Se corrieron 5 réplicas por línea por recurso o combinación de recursos de manera simultánea.

Es importante aclarar que nuestra elección de los recursos de oviposición no fue al azar sino que se basó en información obtenida en estudios previos sobre la preferencia de oviposición en poblaciones naturales de Argentina (Soto et al 2011; Betti et al 2014) y en base a información disponible sobre los tipos de frutos que se comercializan en el mercado de frutas de la ciudad de Raleigh que es donde se colectaron las moscas de las que derivan las líneas *DGRP* (Dra. T. Mackay comunicación personal). En este punto debemos mencionar que a lo largo de la tesis vamos a considerar como ambientes distintos a cada uno de los recursos de oviposición ofrecidos en los ensayos de AO y a cada combinación de recursos en los experimentos de PO. Debido a que el protocolo experimental de los ensayos es idéntico entre los recursos y/o combinaciones de recursos, es posible establecer comparaciones entre los distintos experimentos.

La particularidad de las líneas del *DGRP* empleadas en estos experimentos es que todas ellas derivan de la misma población natural y son prácticamente isogénicas, dado que cada una de las líneas tienen un 98% de homocigosidad para todo el genoma (Mackay *et al.*, 2012). En este sentido, cada línea se puede considerar como representativa de un genotipo particular muestreado de la población natural original (Ver Anexo metodológico para más información sobre las líneas y sobre el protocolo de isogenización).

La AO se estimó como el número total de huevos depositados en cada recurso de oviposición. Dado que en todos los ensayos se controló el número total de hembras en las cámaras de oviposición, el número total de huevos resulta una medida de la fecundidad total de cada línea en los tres recursos de oviposición ofrecidos. El análisis de datos de AO se realizó mediante ANOVAs. Previo a los ANOVAs y con el fin de cumplir con los supuestos de normalidad y homocedacia se

CAPÍTULO II

empleó la transformación raíz cuadrada (Zar, 1999) de acuerdo a la siguiente formula $\sqrt{x + 3/8}$ donde x es el número total de huevos puestos en cada recurso.

El primer ANOVA consistió en un modelo general mixto de dos factores:

$$y = \mu + L + R + LxR + e,$$

donde L corresponde al factor aleatorio línea (40 niveles), R al factor fijo recurso (tres niveles: uva, naranja y tomate), LxR al término de interacción y e al error.

Luego, se realizaron ANOVAs simples para cada recurso por separado siguiendo en todos los casos el siguiente modelo:

$$y = \mu + L + e,$$

donde L corresponde al factor aleatorio línea (40 niveles) y e al error.

La PO fue estimada utilizando el Índice de Preferencia (IP) propuesto por Joseph (2009). En nuestro caso lo calculamos como el número de huevos puestos en uva menos el número de huevos puestos en naranja o tomate según el ensayo correspondiente dividido el número total de huevos en cada cámara de oviposición. El índice se encuentra acotado entre 1 y -1, siendo 1 la máxima preferencia por uva y -1 la máxima preferencia por el recurso alternativo, naranja o tomate según corresponda. Cuando el índice toma el valor cero, implica que no hay preferencia por ninguno de los dos recursos ofrecidos.

Nuevamente, los análisis estadísticos consistieron en ANOVAS. El primero fue un ANOVA general mixto de dos factores siguiendo el modelo:

$$y = \mu + L + C + LxC + e,$$

donde y es el índice de preferencia, μ es la media poblacional, L es el factor aleatorio línea con 40 niveles, C es el factor fijo combinación con 2 niveles (UT y UN), LxC es la interacción entre los factores y e el error.

Luego se realizaron ANOVA simples para cada combinación de recursos utilizando el siguiente modelo:

$$y = \mu + L + e$$

donde y es el índice de preferencia, μ es la media, L es el factor aleatorio línea y e es el error.

Tanto para AO como PO se realizaron, además, análisis de componentes de varianza con el fin de estimar la contribución relativa de cada fuente de variación a la varianza fenotípica total.

En todos los ANOVAs realizados cada línea isogénica del *DGRP* representa un genotipo particular único. Por lo tanto, el efecto L (genotipo) puede interpretarse como un estimador del componente genético de la variación fenotípica del carácter en estudio (Falconer y Mackay 1996; David *et al.*, 2005). A su vez, las interacciones LxR (en el caso de AO) o LxC (en el caso de PO), pueden

CAPÍTULO II

considerarse como estimadores de la interacción genotipo-ambiente (*IGA*), que indicaría que las diferencias en *AO* o *PO* entre genotipos son ambiente-específicas. Diferencias en el cambio de escala y/o cambio en el ranking de los valores fenotípicos entre las líneas dan como resultado *IGAs* estadísticamente significativas.

La contribución de estos componentes se puede evaluar mediante la ecuación de Robertson (1959):

$$V_{GxA} = [(\sigma_{A1} - \sigma_{A2})^2 + 2 \sigma_{A1} \sigma_{A2} (1 - r_{A1A2})] / 2,$$

en donde V_{GxA} es el componente de varianza de la IGA, r_{A1A2} es la correlación genética entre ambientes y, σ_{A1} y σ_{A2} son la raíz cuadrada del componente de varianza entre el ambiente 1 y el ambiente 2. Los valores de σ_{A1} y σ_{A2} se obtienen de los ANOVAs simples para cada ambiente por separado. El primer término de la ecuación indica el aporte del cambio de escala y el segundo el aporte del cambio de orden en el rango.

Las estimaciones de los parámetros genético-cuantitativos se obtuvieron para cada uno de los recursos y para cada una de las combinaciones de recursos. Bajo nuestro diseño experimental la varianza entre Líneas (σ^2_L) se consideró como un estimador de la varianza genética (V_G) (Lynch y Walsh, 1998; Morgan y Mackay, 2006), la varianza ambiental (V_{Amb}) se estimó a partir del componente de varianza entre réplicas, que no es más que el término de error del ANOVA. La varianza fenotípica se calculó como $V_G + V_{Amb}$ (Falconer y Mackay, 1996; Lynch y Walsh, 1998).

Por último, se realizaron análisis de correlación, tanto para la AO como para la PO, con el propósito de estimar el grado de asociación (correlación) de los valores fenotípicos de las 40 líneas entre los recursos o combinaciones de recursos empleados en este estudio.

Todos los análisis se realizaron utilizando los programas InfoStat versión 2013 (Di Rienzo *et al.*, 2013) y Statistica versión 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

CAPÍTULO II

4. Resultados

A. Aceptación de recursos de oviposición (AO)

Los ensayos de AO revelaron que las hembras de todas las líneas del *DGRP* depositaron huevos en los tres recursos ofrecidos como sitios de oviposición (Anexo de resultados Tabla 1), aunque exhibieron variación entre ellas y en el grado de aceptación de los sustratos ofrecidos (Figura 2).

Los valores mínimos de AO (valor medio del número de huevos $\pm$ error estándar) lo mostraron las líneas RA313 ($\bar{x} = 46.8 \pm 7.5$) en uva, RA315 ($\bar{x} = 44 \pm 6$) en naranja y RA786 ($\bar{x} = 27 \pm 9.7$) en tomate.

Por otro lado, los valores máximos se detectaron en las líneas RA380 ($\bar{x} = 305.6 \pm 35.8$), RA427 ($\bar{x} = 263.8 \pm 34.8$) y RA362 ($\bar{x} = 296.2 \pm 35.4$) en uva, naranja y tomate, respectivamente.

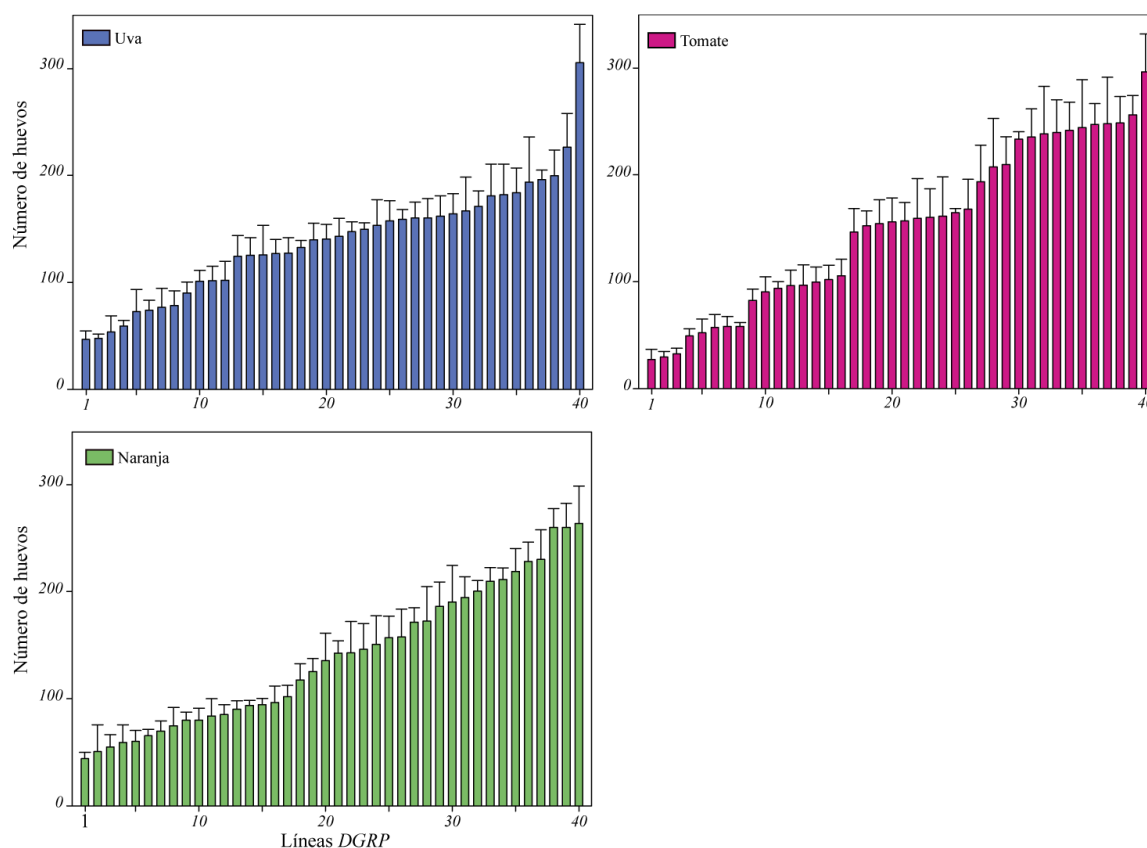


Figura 2. Valores medios y respectivos errores estándar de la AO en las 40 líneas del *DGRP* en cada uno de los recursos evaluados (uva, tomate y naranja). Los valores medios se presentan ordenados de menor a mayor en cada recurso.

En promedio las hembras de todas las líneas depositaron entre 130 y 150 huevos en cada recurso (Figura 3). Si bien las hembras depositaron una mayor cantidad de huevos en tomate (151,2

CAPÍTULO II

huevos), en naranja y uva depositaron, en promedio, cantidades aproximadamente iguales de huevos (138,88 y 137,73, respectivamente). Sin embargo, las diferencias en el número medio de huevos no variaron significativamente entre los recursos (Tabla 1).

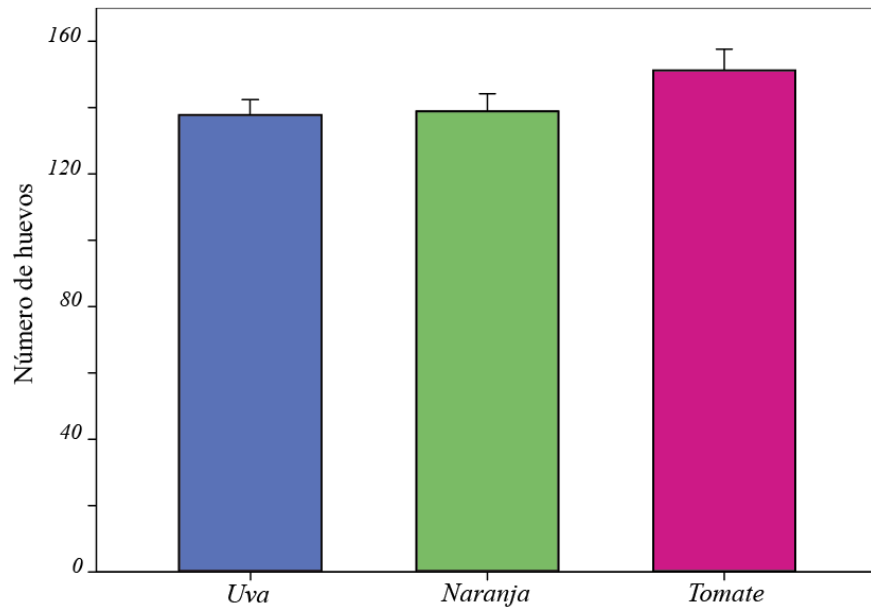


Figura 3. Valores medios y sus respectivos errores estándar para el número total de huevos puestos en cada uno de los recursos ofrecidos a las líneas del *DGRP* ordenados de mayor a menor.

Los resultados del ANOVA general mostraron que el factor *L* y la interacción *LxR* fueron significativos (Tabla 1). El análisis de los componentes de varianza reveló que la varianza entre líneas permite explicar el 36% de la varianza fenotípica total. Bajo nuestro diseño experimental esto implica que una porción importante de la variación fenotípica tiene base genética. A su vez la significativa interacción *LxR*, que permite explicar el 31% de la variación fenotípica total, sugiere que la AO es dependiente del recurso ofrecido.

CAPÍTULO II

Tabla 1. ANOVA para la AO en las 40 líneas del *DRGP* en los recursos uva, naranja y tomate. FV son las fuentes de variación, GL los grados de libertad, SC la suma de cuadrados, CM los cuadrados mínimos, F es el estadístico de *Fisher* y % σ^2 el porcentaje de varianza explicado por cada factor. **p* valor < 0.0001

FV	GL	SC	CM	F	% σ^2
<i>L</i>	39	3214.16	41.25	11.11*	36%
<i>R</i>	2	14.89	7.44	0.35	-
<i>LxR</i>	78	1680.27	21.54	5.80*	31%
<i>error</i>	480	1782.33	3.71		33%
<i>Total</i>	599	6691.64			

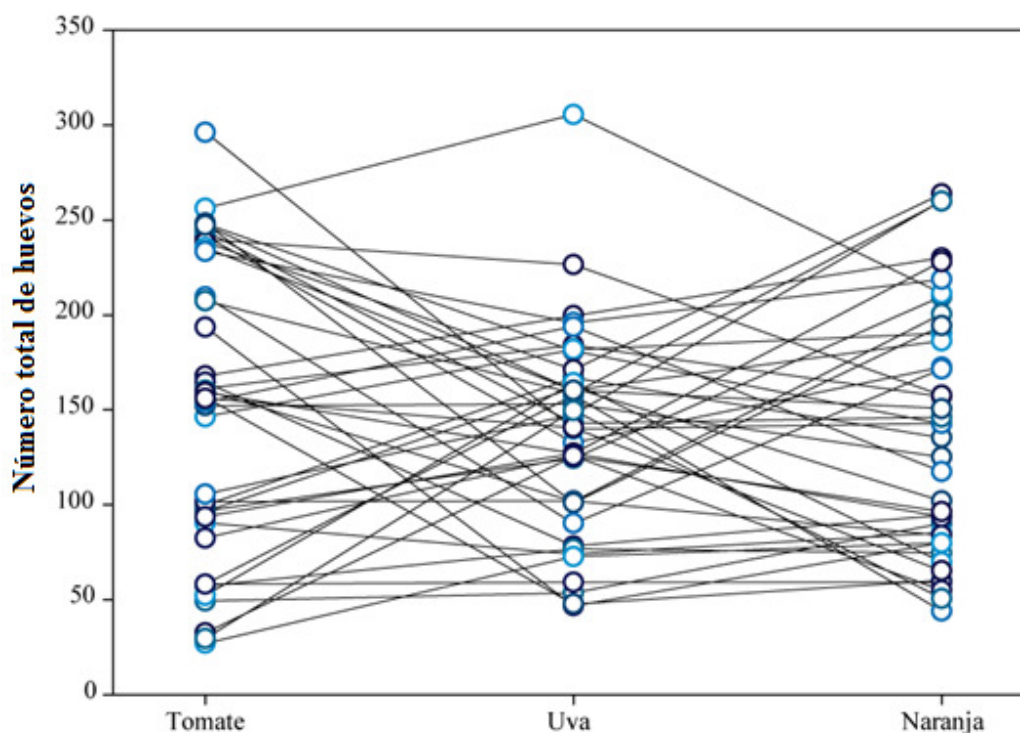


Figura 4. Normas de reacción para la AO medida como el número de huevos totales depositados en cada uno de los recursos ofrecidos en las líneas pertenecientes al DGRP.

El patrón de cambio de la AO según el recurso ofrecido (interacción *LxR*) puede visualizarse en la figura 4. En esta figura puede verse que la cantidad de huevos depositados por las hembras de cada línea depende del recurso ofrecido. Es importante destacar que cuando se ordenaron las líneas en valores crecientes de cantidad de huevos puestos en cada recurso, ninguna línea mostró un fenotipo extremo (estableciéndose como extremo a los 5 mayores y menores) al comparar el orden

CAPÍTULO II

relativo entre todos los recursos analizados. Los cambios de magnitud de la varianza entre ambientes (que revela el cambio de escala) y cambios en el orden relativo de los genotipos entre ambientes (que indica el cambio del ranking) constituyen los componentes causales de la interacción $L \times R$, que es un estimador de la IGA (ver materiales y métodos).

Tomando los recursos de a pares para estimar el aporte relativo de cada componente a la interacción, encontramos que la IGA puede explicarse, en mayor medida, por el cambio de rango para las tres combinaciones de recursos ya que permite explicar entre el 89 y el 96% de la IGA (Tabla 2).

Tabla 2. Aporte de los componentes de cambio de escala y cambio de orden a la IGA.

	% CAMBIO DE ESCALA	% CAMBIO DE RANGO
<i>Uva - naranja</i>	3.98	96.02
<i>Uva - tomate</i>	11.33	88.67
<i>Naranja - tomate</i>	3.50	96.50

Los resultados obtenidos sugieren que las líneas derivadas de la población estudiada exhiben diferentes AO cuando se les ofrece naranja, uva o tomate como recursos de oviposición. Sin embargo, dicho análisis no permite establecer si las líneas difieren en la AO en cada uno de los recursos investigados. Para evaluar este punto se realizaron ANOVAs para cada recurso y se estimaron los parámetros genético-cuantitativos correspondientes. Estos ANOVAs mostraron que las diferencias entre líneas fueron significativas en todos los recursos y que entre un 59% (en uva) y un 79% (en tomate) de la variación fenotípica total puede explicarse por las diferencias genéticas entre líneas (Tabla 3).

Con respecto a los parámetros genéticos cuantitativos encontramos que la magnitud de la varianza ambiental (V_{amb}) no varió entre los ensayos que involucraron diferentes recursos y que la misma siempre fue menor que la varianza genética (V_g) sugiriendo, que el protocolo experimental utilizado permitió minimizar las diferencias en las condiciones de trabajo entre ensayos no simultáneos en los que se utilizó el mismo medio de puesta (error de muestreo). Las diferencias en los valores de varianza genética y, por lo tanto, de la heredabilidad (de acuerdo a las condiciones de V_{amb} descriptas) nos informan cuán variable es el componente genético que subyace la AO en cada recurso ofrecido y del potencial de respuesta de la población frente a cambios en el uso de los recursos. Es importante destacar que los valores de heredabilidad estimados son relativamente altos con respecto a los valores que usualmente se han estimado en estudios de caracteres comportamentales (Roff y Mousseau, 1999).

CAPÍTULO II

Tabla 3. ANOVAs reducidos para la AO en cada uno de los tres recursos medidos. FV corresponde a las fuentes de variación, GL a los grados de libertad, SC a la suma de cuadrados, CM a los cuadrados mínimos y F al estadístico de Fisher. % σ^2 es el porcentaje de varianza fenotípica total explicada por el componente analizado. * p valor < 0.0001.

	FV	GL	SC	CM	F	% σ^2
Tomate	<i>L</i>	39	2232.23	57.24	13.01*	71
	<i>error</i>	160	704.17	4.40	29	29
	<i>Total</i>	199	2936.40			
Uva	<i>L</i>	39	1056.73	27.10	8.14*	59
	<i>error</i>	160	532.61	3.33		41
	<i>Total</i>	199	1589.35			
Naranja	<i>L</i>	39	1605.47	41.17	12.07*	69
	<i>error</i>	160	545.54	3.41		31
	<i>Total</i>	199	2151.01			

Tabla 4. Parámetros genético-cuantitativos para la AO en cada recurso. Vg corresponde a la varianza genética, $Vamb$ a la varianza ambiental, Vf a la varianza fenotípica, H a la heredabilidad en sentido amplio, μ a la media de la variable transformada, CVg al coeficiente de variación genética y $CVamb$ al coeficiente de variación ambiental.

PARÁMETRO	UVA	NARANJA	TOMATE
Vg	4.75	7.55	10.57
$Vamb$	3.33	3.41	4.40
Vf	8.08	10.96	14.97
H	0.59	0.69	0.71
μ	11.40	11.33	11.70
CVg	19.11	24.24	27.78
$CVamb$	15.99	16.28	17.93

Falconer (1952) propuso que si los distintos estados que puede adoptar un carácter (entendiendo como estado del carácter al valor fenotípico en distintos ambientes) se encuentran correlacionados, esto puede deberse a que comparten sus componentes genéticos. Según Via y Lande (1985) las correlaciones genéticas van a afectar la tasa a la cual una población evoluciona para poder expresar el carácter óptimo en todos los ambientes. En la Figura 5 se muestran los resultados de los análisis de correlación de Pearson para la AO tomando los 3 recursos de a pares. Encontramos que todos los coeficientes de correlación entre los tres recursos ofrecidos fueron positivos y significativos sugiriendo que las bases genéticas que regulan la expresión de la aceptación de cada uno de los recursos ofrecidos están compartidas.

CAPÍTULO II

Sin embargo, los resultados del análisis de correlación sugieren que la superposición de los factores genéticos es parcial, ya que el coeficiente de correlación (r^2) varió entre 14% (combinación tomate-uva) y 40% (tomate-naranja). Estos resultados parecen indicar que la AO en un cierto recurso difícilmente pueda predecirse en base a lo observado en otro recurso o, en otras palabras, la variación observada en un recurso solo puede explicarse parcialmente por la correlación con las respuestas que los mismos genotipos mostraron en otro recurso.

CAPÍTULO II

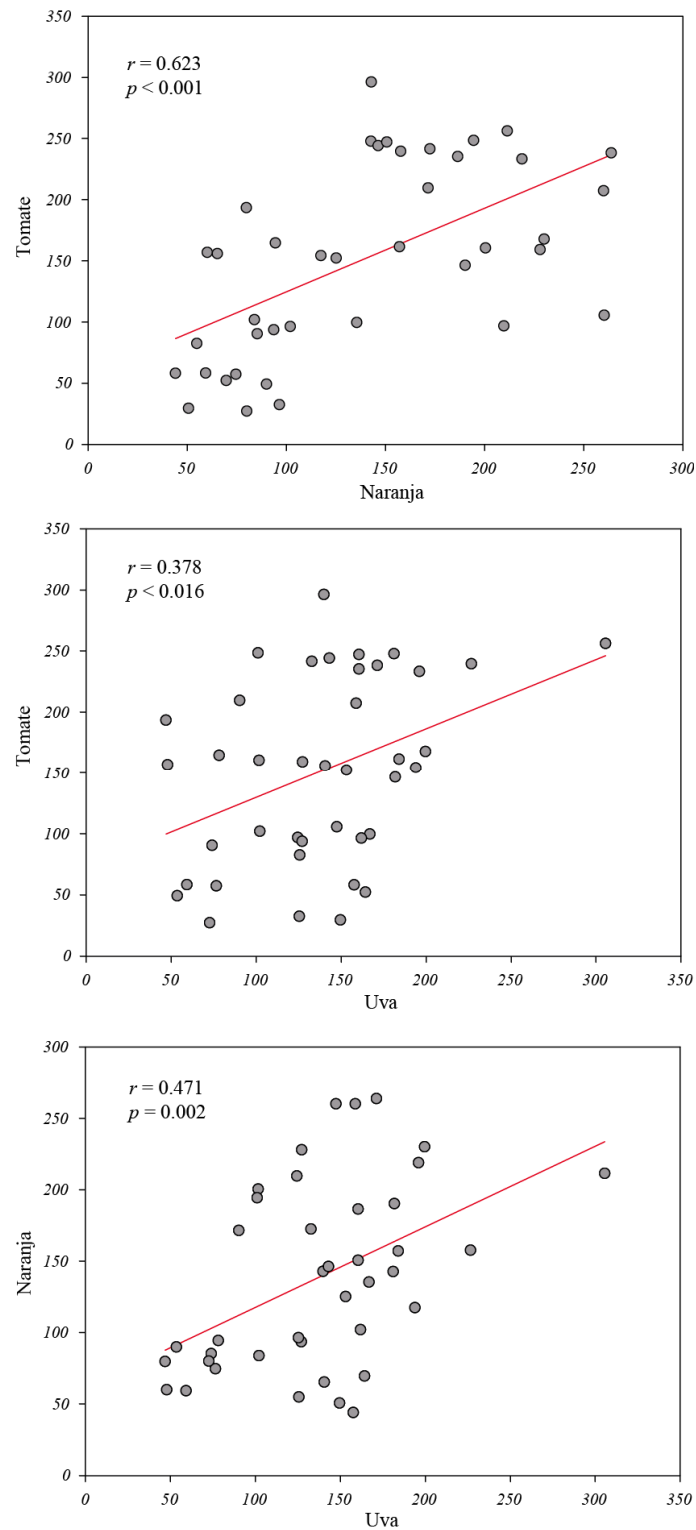


Figura 5. Análisis de correlación de Pearson (r) para la AO entre los distintos recursos de oviposición.

CAPÍTULO II

B. Preferencia de oviposición (PO)

Los resultados de los experimentos de preferencia de oviposición (PO) nos indicaron que, en promedio, las líneas del *DGRP* prefieren como recurso de oviposición a la uva por sobre el tomate y la naranja cuando se les dió la opción de elegir entre dos estímulos (ver Anexo de resultados Tabla 2).

Los valores mínimos de PO (valor medio del índice de preferencia -IP- $\pm$ error estándar) los mostraron las líneas RA730 ($\bar{x} = 0.1 \pm 0.05$) para la combinación UT y la línea RA799 ($\bar{x} = -0.24 \pm 0.1$) en la combinación UN. Los valores máximos se dieron en las líneas RA359 ($\bar{x} = 0.53 \pm 0.05$) y RA517 ($\bar{x} = 0.62 \pm 0.06$) en UT y UN, respectivamente.

En la figura 6 graficamos el IP de cada línea para las combinaciones UN y UT. En la figura 6[B] se observan valores de *IP* mayores a 0 en todas las líneas, lo cual indica que cuando se les dió la opción de elegir entre uva y tomate todas las líneas prefirieron uva. En el caso de la combinación UN observamos que el IP tomó tanto valores negativos como positivos e iguales o muy cercanos a cero (figura 6A).

Así, es posible inferir la presencia de tres clases de fenotipos en la combinación UN: *i*) líneas que prefirieron oviponer en uva, *ii*) líneas que prefirieron oviponer en naranja y *iii*) líneas que no presentaron ningún tipo de preferencia. En cambio en la combinación UT solamente registramos un fenotipo: líneas que prefirieron oviponer en uva.

CAPÍTULO II

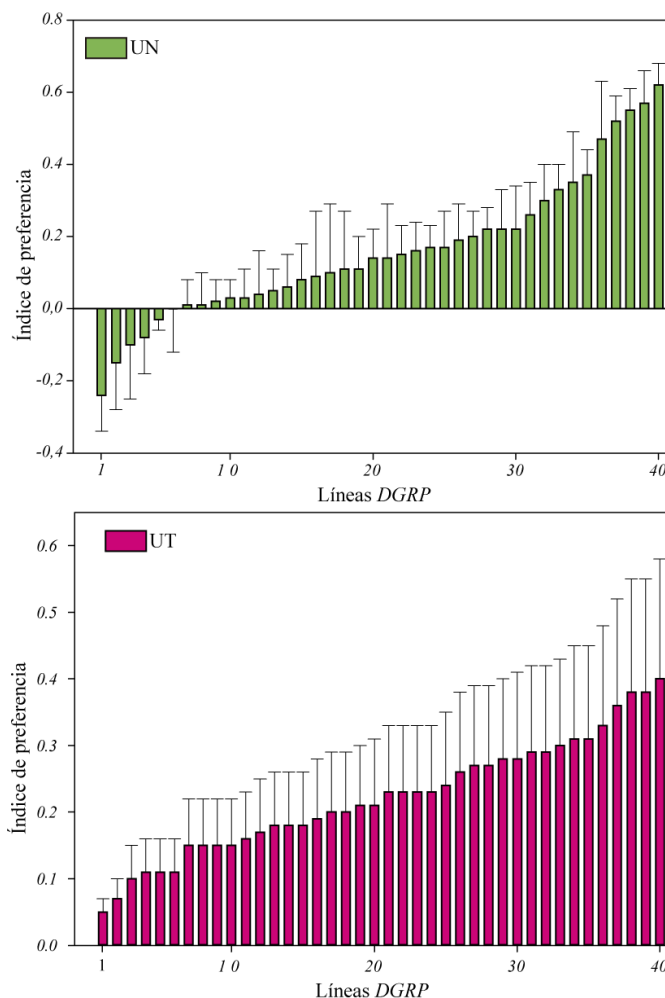


Figura 6. Valores medios del índice de preferencia y los respectivos errores estándar de la PO para todas las líneas estudiadas en la combinación de recursos **[A]** uva-naranja (UN) y **[B]** uva-tomate (UT). Valores positivos indican preferencia por uva en los dos casos, valores cercanos a cero indican no preferencia por ninguno de los recursos y valores negativos indican preferencia por naranja o tomate, según corresponda.

El valor medio de IP de las líneas fue mayor a 0 para las dos combinaciones de recursos ofrecidas (Figura 7), lo cual indica que en promedio las líneas prefirieron oviponer en la uva cuando se les dio la opción de elegir entre esta y cualquiera de los otros dos recursos ofrecidos. En la figura 7 se puede observar que a pesar de la preferencia general por la uva, ésta fue menor cuando el recurso alternativo fue naranja respecto del ensayo en el que la alternativa ofrecida fue tomate.

CAPÍTULO II

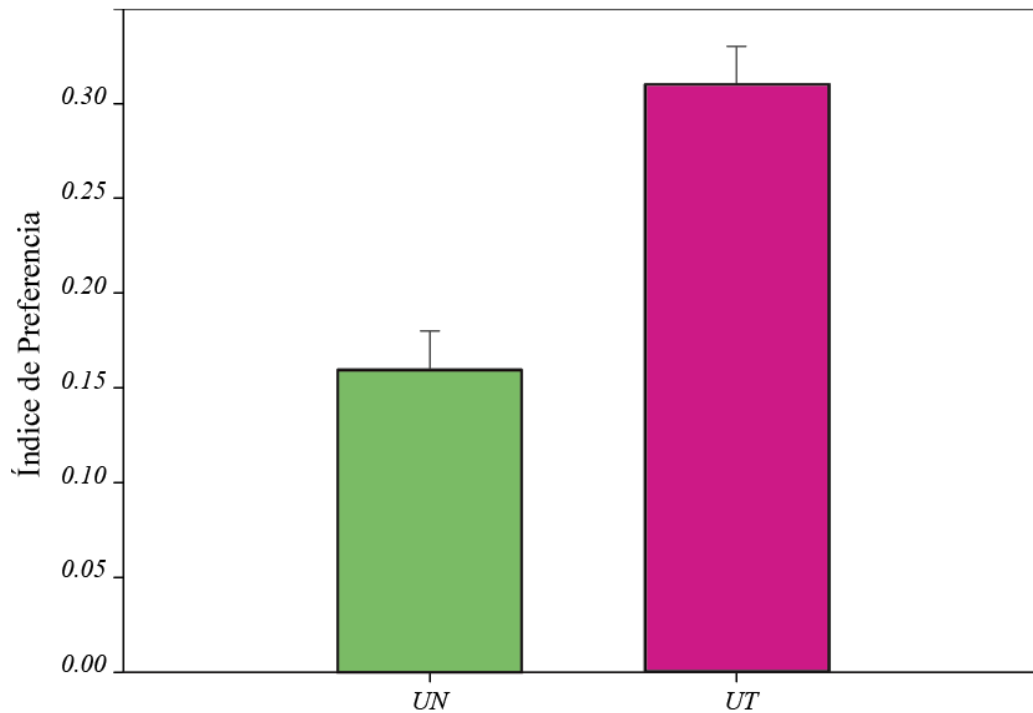


Figura 7. Valores medios y los respectivos errores estándar para el *IP* en las dos combinaciones de recursos ofrecidas a las líneas del *DGRP*, ordenados de menor a mayor.

Los resultados del ANOVA general (Tabla 5) indican que los factores *L* y *C* y la interacción *LxC* resultaron significativos. Nuevamente, al igual que en los ensayos de AO, el factor *L* puede considerarse como un estimador de la variación genética para el carácter y la interacción *LxC* de la interacción Genotipo x Ambiente (IGA). Estos resultados sugieren que las líneas respondieron de forma diferencial, dependiendo de la combinación de recursos que se les presentó en los ensayos de elección del sitio de oviposición.

Tabla 5. ANOVA general para PO. FV corresponde a las fuentes de variación, GL a los grados de libertad, SC a la suma de cuadrados, CM a los cuadrados mínimos, F al estadístico de *Fisher* y % σ^2 al porcentaje de varianza explicado por cada factor. **p* valor < 0.0001

FV	GL	SC	CM	F	% σ^2
<i>L</i>	39	5.39	0.14	2.55*	11.68
<i>C</i>	1	2.14	2.14	15.32*	-
<i>L x C</i>	39	5.44	0.14	2.58*	23.37
<i>error</i>	320	17.33	0.05		64.93
<i>Total</i>	399	30.30			

CAPÍTULO II

En la figura 8 se muestran las normas de reacción para el IP en las dos combinaciones de recursos ofrecidas. El patrón que muestran las normas de reacción permite visualizar las características de la IGA. En efecto, puede verse que la varianza entre líneas fue mayor en la combinación UN que en UT, en tanto que la clasificación de las líneas en base al *IP* produjo ordenamientos diferentes en las dos combinaciones de recursos. El cálculo de los aportes de los cambios de escala y de rango mostró que la IGA puede explicarse en un 77% por el cambio del ranking y un 22% por el cambio de escala.

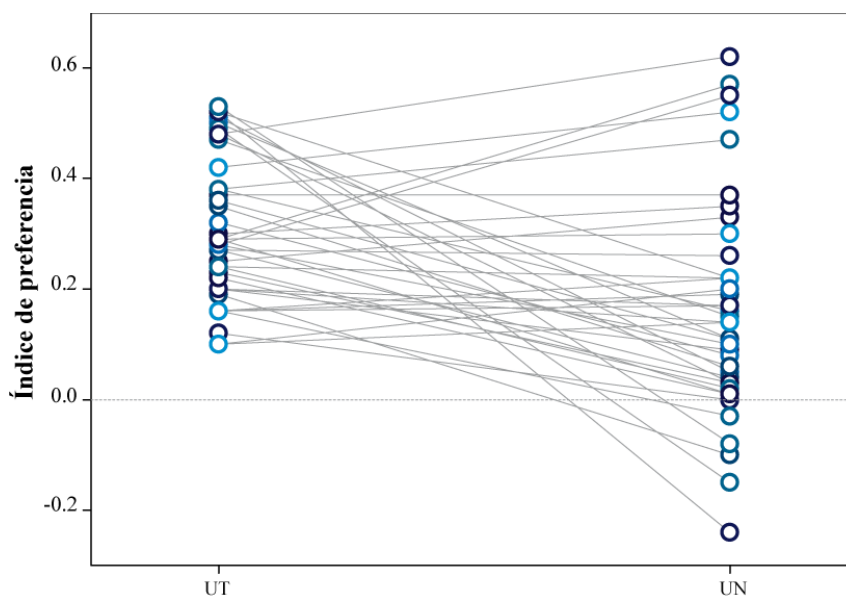


Figura 8. Normas de reacción de las líneas para la PO estimada a partir del índice de preferencia en las dos combinaciones de recursos ofrecidas.

En la Tabla 6 se presentan los resultados de los ANOVAs simples para cada una de las combinaciones de recursos ofrecidas. Se puede observar que en ambos casos el factor *L* fue significativo, explicando un 10% y un 34% de la variación fenotípica observada en las combinaciones UT y UN, respectivamente.

CAPÍTULO II

Tabla 6. ANOVAs simples para la PO para las combinaciones de recursos UT y UN por separado. FV corresponde a las fuentes de variación, GL a los grados de libertad, SC a la suma de cuadrados, CM a los cuadrados mínimos, F al estadístico de *Fisher* y % σ^2 al porcentaje de la varianza explicada por cada factor. * p valor < 0.001

	FV	GL	SC	CM	F	% σ^2
UT	<i>L</i>	39	3.30	0.08	1.57*	34
	<i>error</i>	160	8.65	0.05		66
	<i>Total</i>	199	11.95			
UN	<i>L</i>	39	7.53	0.19	3.56*	90
	<i>error</i>	160	8.68	0.05		10
	<i>Total</i>	199	16.21			

Seguidamente, calculamos los parámetros genético-cuantitativos para la PO (Tabla 7). Con respecto a la V_g encontramos mayor varianza entre líneas para la combinación UN que para UT. En cambio las estimaciones de V_{amb} fueron iguales para las dos combinaciones, lo cual sugiere que las condiciones ambientales bajo las cuales se realizaron los experimentos fueron exitosamente controladas a pesar de no realizarse simultáneamente. En los dos casos, la V_g fue menor que la V_{amb} indicando que la preferencia es un aspecto del comportamiento de oviposición más sensible a pequeñas variaciones en las condiciones experimentales vinculadas al medio de oviposición. La V_f fue menor para la combinación UT que para UN. Por último, los cálculos de heredabilidad en sentido amplio produjeron valores bajos, 0.16 para la combinación UT y 0.30 para UN. En este caso, a diferencia de lo observado para AO, los valores bajos de heredabilidad son compatibles con lo que usualmente se observa en estudios de caracteres comportamentales (Kruuk *et al.*, 2000) y, además, concuerdan con resultados previos de PO en poblaciones naturales de *Drosophila melanogaster* en Argentina (Betti *et al.*, 2014).

Tabla 7. Estimación de los parámetros genético-cuantitativos para la proporción de huevos ovipuestos en uva en las dos combinaciones de recursos ofrecidas. V_g corresponde a la varianza genética, V_{amb} a la varianza ambiental, V_f a la varianza fenotípica, H a la Heredabilidad en sentido amplio, μ a la media de IP para la combinación de recursos, CV_g al coeficiente de variación genética y CV_{amb} al coeficiente de variación ambiental.

PARÁMETRO	UT	UN
V_g	0.01	0.03
V_{amb}	0.05	0.05
V_f	0.06	0.08
H	0.16	0.34
μ	0.31	0.16
CV_g	25.26	104.16
CV_{amb}	74.99	145.55

CAPÍTULO II

Por último, el análisis de correlación de Pearson para el IP entre las dos combinaciones de recursos de oviposición ofrecidas resultó no significativo (Figura 9).

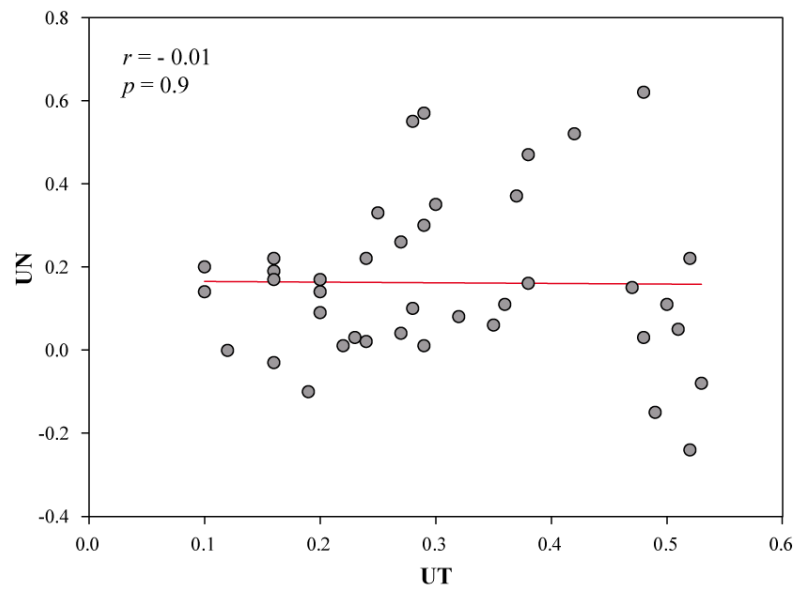


Figura 9. Correlaciones genéticas entre las dos combinaciones de recursos de oviposición ofrecidas. Se presenta el valor del coeficiente de Pearson (r) y su significación (p).

CAPÍTULO II

5. Conclusiones

En esta Sección hemos caracterizado el fenotipo comportamental asociado a la oviposición en 40 líneas que forman parte del panel de referencia genético de *Drosophila* (*DGRP*), a través del estudio de la AO y la PO ofreciendo a las moscas tres recursos de oviposición que suelen encontrar en su hábitat natural: la uva, el tomate y la naranja.

Los resultados revelaron abundante variación tanto fenotípica como genética para la AO en los tres recursos y para la PO en las dos combinaciones de recursos ofrecidas. Además, la interacción Genotipo x Ambiente (IGA) significativa para los dos caracteres estudiados sugiere no solo un cierto grado de plasticidad fenotípica para los dos caracteres, sino también que la plasticidad fenotípica tiene, en ambos casos, base genética. Finalmente, encontramos correlaciones genéticas significativas entre las AOs medidas en los diferentes recursos, pero no para la POs.

Los resultados de los experimentos de AO mostraron que las hembras de las líneas del *DGRP* aceptan a la uva, a la naranja y al tomate como sitios de oviposición, depositando aproximadamente la misma cantidad de huevos en cada uno de ellos. Estos resultados concuerdan con la noción de que *D. melanogaster* es una especie generalista, que posee la capacidad de utilizar como sitios de oviposición los diferentes recursos que encuentran en el ambiente.

En contraste, los resultados de los experimentos de doble elección (PO) mostraron que, en general, las hembras son capaces de discriminar entre los distintos recursos y eligen oviponer de forma preferencial en uno de ellos. En efecto, cuando se les ofreció la posibilidad de elegir entre la uva y el tomate, el 100% de las líneas exhibieron fuerte preferencia por la primera. En cambio, cuando la combinación ofrecida fue uva y naranja, la mayoría mostró preferencia por uva y, aproximadamente, un 15% de las líneas prefirieron naranja.

Una posible explicación para la mayor preferencia por uva y naranja podría estar relacionada con la composición química de estos frutales. Tanto la uva, como la naranja y el tomate son recursos química y nutricionalmente diferentes (Agricultural Research Service United States Department of Agriculture (<http://ndb.nal.usda.gov>). El tomate, originario de América del Sur, es un fruto con escasa cantidad de calorías. Sus principales componentes son el agua y los hidratos de carbono, en la forma de azúcares simples y una importante concentración de vitaminas como B1, B2, B5 y C. La naranja, originaria del sureste asiático, es un frutal de origen híbrido obtenido a partir del pomelo (*Citrus máxima*), la mandarina (*Citrus reticulata*) y el cidro (*Citrus medica*). Sus principales componentes son azúcares simples, vitamina C, flavonoides y limonoides. Finalmente la uva, originaria de la región del Cáucaso, se caracteriza principalmente por la alta concentración de azúcares, como la glucosa y fructosa, vitaminas y flavonoides. Existe evidencia que la composición nutricional de los recursos afecta tanto la supervivencia como la reproducción de los insectos (Lushcak *et al.*, 2013, Flaven-Pouchon *et al.*, 2014). Por ejemplo, algunas especies de mosquitos como *Aedes aegypti* y *Anopheles gambiae* son capaces de identificar a sus presas gracias a la capacidad de detectar tipos específicos de ácidos grasos que son secretados por la piel humana (Barrozo y Lazzari, 2004; Smallegange *et al.*, 2009). Más específicamente, en *D. melanogaster* se ha observado que los adultos prefieren dietas ricas en ácidos grasos saturados mientras que las larvas prefieren dietas ricas en ácidos grasos insaturados (Fougeron *et al.*, 2011). Más aun, se ha observado que al exponer moscas a dietas ricas en ácidos grasos insaturados provoca efectos negativos en caracteres de historia de vida como la duración del desarrollo, la fecundidad, la

CAPÍTULO II

longevidad (Flaven-Pouchon *et al.*, 2014). Los aminoácidos son otro componente esencial de la dieta en los insectos, ya que sin ellos es imposible la síntesis de proteínas. En particular, las hembras poseen una mayor necesidad de dietas ricas en proteínas debido a que las necesitan para la producción de los huevos. Toshima y Tanimura (2012) mostraron que las hembras de *D. melanogaster* son capaces de discriminar entre dietas ricas y pobres en aminoácidos, prefiriendo la dieta con la mayor cantidad de variantes aminoácidas posible. Por tanto, si comparamos la composición nutricional de los tres recursos empleados en los experimentos, podemos notar que de los tres recursos, el tomate representa el medio de menor valor nutritivo. Entonces, es posible que el tomate cuando es ofrecido como estímulo de oviposición junto con la uva, no represente un medio óptimo para satisfacer las necesidades nutritivas de las hembras y/o las de los estadios larvales de *D. melanogaster*. En este punto, debemos recalcar, que nuestro estudio debería ser completado con el análisis de la PO entre tomate y naranja, pero lamentablemente, esto no fue posible debido a cuestiones de tiempo.

Con respecto a la PO observada por la uva y en menor medida por la naranja, podemos proponer varias explicaciones. Recientemente, Dwerck *et al.* (2013) mostraron que los terpenos volátiles característicos de los cítricos son reconocidos por una única clase de neuronas receptoras olfativas caracterizadas por expresar el receptor olfativo *Or19a*. Según estos autores, esta vía de percepción representa una vía olfativa ancestral conservada, ya que es probable que los cítricos hayan sido uno de los hospedadores de la especie cuando se produjo su dispersión hacia Asia menor, de donde es originaria esta clase de frutales. Adicionalmente, la uva es considerada como uno de los posibles hospedadores originales de la especie (Lechaise y Silvain, 2004), pero el origen y comienzo de su explotación no es claro. Keller *et al.* (2007) proponen que la explotación de la uva ocurre simultáneamente con el período en que las moscas se vuelven comensales del hombre y como consecuencia dejan de utilizar los frutos ancestrales silvestres para comenzar a explotar los frutos de especies vinculadas con actividades humanas. En este contexto, la preferencia por la uva y la naranja podría ser explicada por factores históricos propios de la especie *D. melanogaster* ya que tanto la uva como la naranja tendrían similitudes con posibles hospedadores ancestrales silvestres.

Al estudiar el patrón de variación fenotípica de cada uno de los caracteres, los resultados mostraron que en todos los casos, las líneas se diferenciaron entre sí en la respuesta comportamental. Encontramos, tanto para la AO como para la PO, variación entre las líneas y variación entre los recursos ofrecidos como sustratos de oviposición. La variación fenotípica entre líneas, dado nuestro diseño experimental, se puede interpretar como variación genética, ya que cada línea representa un único genotipo de la población original, mientras que la variación entre recursos se interpreta como variación dependiente del ambiente, también llamada interacción genotipo – ambiente (IGA). La importancia evolutiva de las IGAs detectadas es clara ya que bajo ciertas condiciones algunos modelos de selección de hábitat predicen el mantenimiento y expresión de la plasticidad fenotípica y de la variación genética (Via y Lande, 1987; Gillespie y Turelli, 1989; Gurganus *et al.*, 1998; Fernandez Iriarte y Hasson, 2000; Ungerer *et al.*, 2003; Fanara *et al.*, 2006).

La plasticidad fenotípica es una propiedad fundamental de los organismos (Sultan y Stearns, 2005) y se define como el cambio en el fenotipo medio expresado por un determinado genotipo en diferentes ambientes (Via, 1987; Pigliucci *et al.*, 2006). Su ocurrencia ha sido documentada en innumerables estudios (Roff, 1997), llegando a ser considerada en los últimos años más como una regla que como una excepción (Gilbert y Bolker, 2003). A veces puede llegar a ser tan grande que

CAPÍTULO II

se ha llegado a clasificar a individuos de una misma especie que muestran respuestas plásticas extremas como de especies distintas (Schlichting y Pigliucci, 1998). El análisis de la plasticidad fenotípica y las IGAs (Via y Lande, 1987; Via, 1993; Schlichting y Pigliucci, 1998) es una herramienta conceptual eficaz para dilucidar las estrategias de las especie para enfrentar los cambios ambientales. La plasticidad fenotípica y las IGAs son dos procesos que pueden llevar a la adaptación en las poblaciones naturales y se ha propuesto que la plasticidad fenotípica juega un rol importante en la evolución como factor diversificador al contribuir al origen de nuevos caracteres y al alterar las direcciones de cambio de los mismos (West-Eberhard 1989). Schlichting y Pigliucci (1998) postularon dos mecanismos de control genético de la plasticidad fenotípica. Por un lado, la sensibilidad alélica y por el otro, el control regulador. La sensibilidad alélica se refiere a la respuesta diferencial de los diferentes alelos de un determinado locus ante los cambios en las condiciones ambientales, que se traduce en la alteración de la concentración o actividad del producto del gen. En cambio, el control regulador tiene que ver con la regulación de la actividad génica por medio de la acción de un interruptor génico. Para Schlichting y Pigliucci la sensibilidad alélica es una forma pasiva de respuesta plástica que puede ser adaptativa o no y que puede resultar en una variedad de efectos pleiotrópicos en los fenotipos. En cambio, la plasticidad reguladora, representaría una respuesta plástica activa preferentemente adaptativa, producto de la acción epistática de genes relacionados con la plasticidad. En resumen, podemos concluir que nuestros experimentos nos han permitido encontrar evidencia de variación fenotípica, genética y de plasticidad fenotípica en las *DGRP*. Si nos permitimos una extrapolación teniendo en cuenta todos los supuestos pertinentes, podríamos suponer que la población natural de la cual provienen las líneas del *DGRP* reúnen las condiciones necesarias para que eventualmente la SN pudiera conducir a cambios en el uso de los recursos de oviposición. Con respecto al modo de control genético de la plasticidad, teniendo en cuenta que tanto la PO como la AO son caracteres con influencia en el *fitness* es esperable que se encuentren el/los mecanismos responsables del control regulador.

Finalmente, nuestros resultados nos permitieron empezar a entrever algunos aspectos de la arquitectura genética que subyace tanto a la AO como a la PO. Encontramos que las correlaciones genéticas para la AO a través de los recursos medidos fueron significativas, lo cual sugiere un cierto grado de superposición en las bases genéticas que gobiernan la expresión de la AO entre los tres recursos. En cambio, cuando analizamos la PO las correlaciones genéticas no significativas entre combinaciones de recursos sugieren escaso solapamiento entre las arquitecturas genéticas de las POs. El estudio de las correlaciones es importante para entender el grado de inter-dependencia genética de los caracteres. Si dos o más caracteres están correlacionados sus caminos evolutivos van a estar ligados, es decir, si la selección natural afecta a uno de ellos, el resto va mostrar una respuesta correlacionada, tanto en sus valores fenotípicos medios como en los niveles de varianza genética, restringiendo de esta forma la evolución independiente de los caracteres.

En el próximo capítulo vamos a profundizar en la dilucidación del comportamiento de oviposición a través del estudio de la arquitectura genética que subyace la AO y la PO por medio de análisis de asociación –fenotipo – genotipo del genoma completo, más comúnmente conocidos como *GWAS*.

CAPÍTULO III

*Arquitectura genética de la Aceptación y
Preferencia de sitios de oviposición:
Análisis de asociación fenotipo –
genotipo*

CAPÍTULO III

1. Introducción General

Comprender la asociación entre la variación fenotípica y la genética de los caracteres adaptativos complejos es fundamental para entender cómo evolucionan los caracteres y cuáles son las fuerzas que gobiernan el cambio evolutivo. Aunque la Selección Natural (SN) actúa sobre el fenotipo, son los genes los que se transmiten de generación en generación. Sin embargo, debido a la complejidad en el flujo de la información contenida en el genotipo al fenotipo (por los múltiples niveles involucrados) y la dependencia que tienen los caracteres respecto del ambiente, poder dilucidar exitosamente la asociación genotipo-fenotipo es un gran desafío.

Hasta no hace mucho el conocimiento de las bases genéticas de los caracteres se reducía al cálculo de la heredabilidad en sentido amplio y estricto, a la estimación de los efectos de dominancia o efectos pleiotrópicos de los genes, al estudio del desequilibrio de ligamiento (DL), etc. (Falconer y Mackay, 1996, Hasson *et al.*, 2013). Gracias a los avances tecnológicos y el desarrollo de metodologías de análisis genómico y nuevas herramientas estadísticas se ha podido profundizar el conocimiento de la genética de los caracteres de forma excepcional en los últimos años.

El panel de referencia genética de *Drosophila* (DGRP por sus siglas en inglés *Drosophila Genetic Reference Panel*) es una de tales herramientas (Mackay *et al.*, 2008). Básicamente el panel consiste de una colección de líneas isogénicas (homocigóticas para todos sus loci) de *D. melanogaster* derivadas de una población natural de la ciudad de Raleigh en Carolina del Norte, EEUU. El genoma de cada una de ellas está completamente secuenciado, de modo que es posible conocer todas las variantes genómicas que segregan en la población y en cada línea. Además, se ha obtenido el transcriptoma y han estimado los niveles de expresión génica de todas ellas en el estadio adulto (ver capítulo IV). Sabiendo que las diferencias fenotípicas entre las líneas son reflejo de la variación alélica presente en la población natural de la cual provienen, el panel nos ofrece la posibilidad de cuantificar aspectos hasta el momento desconocidos de la arquitectura genética de los caracteres cuantitativos (Mackay *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2014). Esto es posible gracias al uso de nuevas metodologías informáticas que permiten establecer la asociación entre la variación a nivel de las secuencias de ADN (genómica) y del carácter cuantitativo en estudio, mediante la llamada prueba de asociación del genoma completo o GWAS (por sus siglas en inglés de *Genome-Wide Association Study*, más detalles en el Capítulo I sección 1.4.). Este tipo de análisis permite identificar las regiones variables del genoma que contribuyen a la expresión de los caracteres complejos (Mackay *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014). Sin embargo, es importante notar que la gran mayoría de los caracteres cuantitativos (morfológicos, fisiológicos, comportamentales, etc) están orquestados por la manifestación de numerosos genes (poligenes) que, a su vez, pueden formar parte de redes de genes y rutas metabólicas en las que los genes intervinientes pueden interactuar de diferentes maneras. Asimismo, dado que parte de la variación de los caracteres cuantitativos puede ser contexto-dependiente, es necesario comprender cómo los factores ambientales involucrados en la manifestación de un dado carácter afectan el funcionamiento de las redes y caminos metabólicos, los efectos de los genes individuales y las interacciones entre genes.

La genómica funcional es el área de la biología que se encarga del estudio del flujo de información que subyace la expresión de los caracteres complejos. Ella utiliza un amplio rango de herramientas experimentales y métodos estadísticos que cuantifican e integran los grandes

CAPÍTULO III

volúmenes de información obtenida en los distintos niveles que conforman el mapa genotipo – fenotipo permitiendo obtener una visión holística de la expresión de los caracteres complejos.

Una de las herramientas más utilizada en la genómica funcional es el análisis de enriquecimiento de ontologías génicas (*GO* por sus siglas en inglés *Gene ontology*). Las *GOs* surgieron, hace aproximadamente una década, a partir de la necesidad de desarrollar un vocabulario biológico aplicable a todas las especies con el fin de anotar las funciones de los productos génicos de forma consistente a través de las distintas bases de datos (Ashburner *et al.*, 2000; Bodenreider, 2008).

La información de las *GO* se encuentra estructurada en tres categorías principales:

- Procesos Biológicos (PB): objetivo biológico al cual contribuyen un gen o los productos génicos asociados. Por lo general, los PB involucran una transformación química o física, en el sentido de que algo ingresa a un proceso y algo diferente se obtiene a su salida, que sucede debido a la acción de un conjunto de funciones moleculares (FM) organizadas. Ejemplo de PB son: "crecimiento y mantenimiento celular", "traducción de señales", "biosíntesis de cAMP", etc.
- Funciones Moleculares (FM): actividad o potencial actividad bioquímica de un producto génico, incluyendo la unión a *ligandos* específicos o estructuras, sin especificar ni tiempo ni espacio donde se produce. Ejemplos de FM son "enzima", "ligando", "transporte".
- Componentes Celulares (CC): lugar exacto de la célula donde un producto génico es activo. Ejemplos de CC son: "ribosoma", "aparato de Golgi", "membrana nuclear".

En el marco del estudio de las *GO*, el análisis de enriquecimiento funcional consiste en determinar qué procesos, funciones y componentes están sobre o sub-representados en un grupo y/o lista de genes. El método consiste en calcular el porcentaje de genes en una categoría de *GO* determinada y comparar este porcentaje con un valor de referencia, que por lo general es el número total de genes con esa anotación en el genoma completo.

Complementariamente al análisis de *GO*, se suele usar el análisis de redes de interacciones de genes en base a la co-expresión, co-localización, e interacciones génicas y/o físicas (Montgomery *et al.*, 2014). El análisis de redes busca entender cómo los genes de interés se relacionan entre sí y con el resto de los genes, lo cual nos permite comprender el rol que cumplen las interacciones génicas en la arquitectura genética de los caracteres cuantitativos (Mackay *et al.*, 2015). Las interacciones génicas como la epistasis o interacción entre loci, se considera un concepto clave en la teoría evolutiva, ya que, es el mecanismo genético que subyace a la canalización y la especiación (Cheverud y Routman, 1995; Phillips, 2008; Mackay *et al.*, 2015).

Numerosos trabajos demuestran la utilidad del *DGRP* en el estudio de la arquitectura genética de caracteres complejos. Se ha estudiado la asociación fenotipo - genotipo para una gran variedad de caracteres, como la resistencia a la inanición, la recuperación del coma provocado por el frío, el comportamiento agresivo, la sensibilidad al alcohol, sueño, actividad metabólica, etc. (Jordan *et al.*, 2012, Jumbo-Lucioni *et al.*, 2012, Mackay *et al.*, 2012, Magwire *et al.*, 2012, Weber *et al.*, 2012, Bastide *et al.*, 2013, Brown *et al.*, 2013, Chow *et al.*, 2013, Harbison *et al.*, 2013, Swarup *et al.*, 2013). En todos estos trabajos se pudieron verificar las asociaciones entre genes y caracteres,

CAPÍTULO III

previamente establecidas mediante el uso de otras metodologías, pero además, se logró identificar una cantidad considerable de genes nunca antes relacionados con los caracteres cuantitativos en estudio. Esto indica que la técnica de asociación fenotipo - genotipo del genoma completo (*GWAS*) es una herramienta poderosa que permite profundizar y mejorar nuestro conocimiento acerca de la arquitectura genética que subyace a la expresión de los caracteres complejos.

El comportamiento de oviposición es un carácter adaptativo complejo, por lo cual entender sus bases genéticas requiere la identificación de los genes involucrados en su expresión, de la variación alélica responsable de la variación fenotípica que se observa en las poblaciones naturales, de estimar la frecuencia y efecto de los alelos y de conocer cómo estos factores están regulados por el ambiente. Debido a la naturaleza compleja del comportamiento podemos esperar que la arquitectura genética de estos caracteres se encuentre determinada por la acción de múltiples genes, es decir, que sea poligénica.

Aunque se ha demostrado que el comportamiento de oviposición tiene una base genética (Jaenike y Holtz, 1991) en varias especies, incluida *D. melanogaster* (Miller *et al.*, 2011, Betti *et al.*, 2014), muy poco se conoce acerca de las regiones genómicas responsables de su expresión. Algunos de los genes que se han asociado con la oviposición en *D. melanogaster* son el par de genes circadianos *period* (*per*) y *timeless* (*tim*) (Manjunatha *et al.*, 2008). Específicamente se ha reportado que las proteínas codificadas por estos genes se sobre-expresan en los ovarios de las hembras de *D. melanogaster* (Plautz *et al.*, 1997, Hardin, 2005) y que las hembras con deficiencias en alguno de los dos genes producen alrededor de un 50% menos de huevos, al igual que las hembras vírgenes, en las cuales la producción de oocitos maduros se reduce a la mitad (Beaver *et al.*, 2003). Otro ejemplo, es el gen *logjam* (*loj*) que se expresa en el sistema nervioso central de los adultos de *D. melanogaster*. Carney y Taylor (2003) observaron que en las hembras mutantes para *loj* los huevos ya formados quedaban encerrados en el útero. Como último ejemplo, podemos citar al gen *gustatory receptor 5a* (*Gr5a*) que codifica un receptor de membrana neuronal que detecta compuestos dulces como por ejemplo la sacarosa. Se ha reportado que *Gr5a* afecta la preferencia por los sustratos de oviposición (Yang *et al.* 2008). Al anular experimentalmente la funcionalidad de *Gr5a* se observó que las moscas deficientes depositan una cantidad significativamente mayor de huevos en sustratos con alta concentración de sacarosa en comparación con moscas portadoras de *Gr5a* funcional.

En este contexto, esta tesis representa el primer estudio de la arquitectura genética del comportamiento de oviposición mediante un análisis de asociación fenotipo - genotipo examinando el efecto de recursos que las moscas utilizan como sitio de oviposición en la naturaleza.

CAPÍTULO III

2. Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es caracterizar las bases genéticas de la variación fenotípica del comportamiento de oviposición a través de la realización de análisis de asociación fenotipo – genotipo de la Aceptación (AO) y Preferencia (PO) por el sitio de oviposición.

El capítulo se encuentra dividido en tres secciones. En la sección I se presentan los resultados de los análisis de asociación fenotipo – genotipo, la identificación y caracterización de los polimorfismos significativos y los análisis ontológicos - funcionales de los genes candidatos. En la sección II se presentan los resultados de las pruebas de validación funcional, que tienen como objetivo proveer evidencia de la participación de algunos de los polimorfismos significativos en la expresión fenotípica del carácter. Finalmente, en la sección III se resumen los resultados de las pruebas de complementación génica en las cuales además de poner a prueba la funcionalidad, se evalúa el efecto que producen las variantes alélicas de tres *SNPs* que ocurren en *Twister (tst)*, uno de los genes candidatos asociados a la variación de la PO.

CAPÍTULO III

Sección 1

Análisis de asociación genotipo-fenotipo

1. Materiales y métodos

Análisis de asociación genotipo - fenotipo

Los análisis de asociación genotipo – fenotipo del genoma completo (*GWAS*) buscan establecer la relación estadística entre variables genéticas y valores fenotípicos de un carácter cuantitativo. En los casos de asociaciones estadísticamente significativas se considera que la variante genética es candidata a estar involucrada en la variación fenotípica del carácter y consecuentemente a ser parte de la expresión fenotípica del mismo. Por tanto, para poder llevar a cabo los análisis es necesario contar con los valores fenotípicos de cada uno de los genotipos bajo análisis y la información sobre la variación genética de los organismos en estudio. En nuestro caso, los valores fenotípicos se obtuvieron como se describió en el Capítulo II, mientras que la información sobre las variantes genéticas de las líneas del *DGRP* se obtuvo siguiendo el protocolo descrito en el Anexo metodológico.

Realizamos un total de 9 *GWAS*, 6 para los experimentos de aceptación de recursos de oviposición (AO) y 3 para la preferencia de oviposición (PO). En los primeros utilizamos como variable la media transformada del número total de huevos puestos en cada recurso ofrecido (uva, naranja y tomate), mientras que en los *GWAS* realizados para la PO utilizamos como variable la media del índice de preferencia (IP) para cada combinación de recursos (uva-tomate y uva-naranja). En ambos casos las unidades experimentales fueron 40 líneas del *DGRP*. Los restantes *GWAS* se realizaron para los análisis de los efectos de interacción entre pares de recursos para la AO y entre las dos combinaciones de recursos para PO. Las variables utilizadas en estos consistieron en la diferencia entre los valores medios del número total de huevos puestos tomando los recursos de a pares (uva-tomate, uva-naranja y naranja-tomate) en el caso de la AO, mientras que para la PO, la variable de asociación fue la diferencia entre las medias del índice de preferencia (IP) en cada combinación de recursos. Es importante aclarar que los *GWAS* realizados para investigar las interacciones tienen sentido biológico dado que las interacciones genotipo – ambiente (IGA) resultaron significativas (Mackay *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2014) tanto para AO como para PO (ver sección 2.4).

Con respecto a la variación genética, el análisis de los genomas de las 205 líneas del *DGRP* permitió identificar 4.853.802 polimorfismos de nucleótidos simples (*SNP* por sus siglas en inglés *single nucleotide polymorphism*) y 1.296.080 de polimorfismos de inserción y/o delección (INDEL) menores a 20 pares de bases en el *freeze 2.0* del *DGRP* (Huang *et al.*, 2014). En nuestros ensayos fenotípicos utilizamos solo 40 líneas del *DGRP*, por lo cual cada análisis de asociación se realizó contra un conjunto más reducido de 1.453.947 de polimorfismos (*SNP* más INDELs). Los sitios polimórficos considerados en los *GWAS* fueron, a su vez, filtrados en base a los siguientes criterios: *i*) la frecuencia de la variante minoritaria tiene que ser no menor a 0,25, es decir, estar presente en al menos 10 de las 40 líneas, *ii*) el valor de cobertura media de la secuenciación del fragmento que contiene el polimorfismo tiene que ser mayor a 2 y menor a 30 y *iii*) solo dos variantes tienen que estar segregando para cada *SNP* o INDEL.

Los análisis de asociación se realizaron en dos etapas. En la primera las medias fenotípicas de cada línea se corrigieron para: *i*) los efectos de la infección por *Wolbachia sp.* que sufren algunas de las líneas y *ii*) el efecto de las inversiones cromosómicas de mayor longitud (In(2L)t, In(2R)NS, In(3R)P, In(3R)K) que segregan en las 40 líneas del *DGRP* estudiadas (Huang *et al.*, 2014). En la

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

segunda etapa, las medias fenotípicas corregidas se asociaron a los polimorfismos (SNPs o INDELs) según el siguiente modelo lineal mixto

$$Y = Xb + Zu + e,$$

donde Y es el valor fenotípico medio ajustado, X la matriz de efectos fijos de los polimorfismos llamada b , Z la matriz de parentesco genético de efecto aleatorio llamada u y e el error (Huang *et al.*, 2014). Fue necesario incorporar la matriz Z de parentesco genético al análisis de asociación debido a que aquellas líneas que comparten la misma inversión cromosómica tienen mayor probabilidad de estar relacionadas genéticamente (Van Raden, 2008, Ober *et al.*, 2012). Todos los análisis de asociación se realizaron utilizando la plataforma online www.dgrp2.gnets.ncsu.edu (Mackay *et al.* 2012, Huang *et al.* 2014).

Como resultado de los GWAS se obtuvieron valores de probabilidad para cada polimorfismo incluido en la prueba (distribución de P valores) que da idea de la chance de que la asociación detectada sea meramente por azar. Para una rápida visualización de los resultados se realizaron dos tipos de gráficos diagnósticos: *i)* *Manhattan* que muestra de forma esquemática la posición cromosómica y el P valor asociado a cada polimorfismo y *ii)* los gráficos *cuantil – cuantil (C-C)* en los cuales se representa la distribución observada de P valores en función de la distribución esperada. Estos gráficos se realizaron usando el programa R con la librería “gap” (R Core Team, 2013).

Antes de continuar es necesario aclarar que debido a la cantidad de hipótesis de asociación que se ponen a prueba en cada *GWAS* los resultados pueden presentar un elevado porcentaje de polimorfismos significativos pero que en realidad no participan de la expresión fenotípica del carácter, en otras palabras, falsos positivos. A pesar de que existen varias metodologías de corrección para detectar el enriquecimiento en falsos positivos, no hay un consenso sobre cuál usar, ya que el número de falsos positivos es dependiente tanto del tipo de datos como de la metodología de asociación utilizada. Por lo general, se busca evaluar varios métodos de corrección hasta llegar a un consenso entre los métodos más y menos conservativos. El método más conservativo es la corrección de *Bonferroni* por pruebas múltiples, en la cual se recalcula el valor crítico de significación (P) teniendo en cuenta el número total de hipótesis que se ponen a prueba:

$$P^* = \alpha / n,$$

donde P^* es el P valor corregido, α es el P valor de significación usado típicamente de 0.05 y n es el número de pruebas estadísticas realizadas (en este caso 1.453.947). De esta manera, en nuestros análisis el valor de corte de acuerdo a la corrección de *Bonferroni* debería ser $3,43 \times 10^{-08}$. Otra metodología, es la de controlar la cantidad de falsos positivos usando la tasa de descubrimientos falsos o *FDR* (por sus siglas en ingles *False Discovery Rate*). En la bibliografía se considera aceptable para los análisis de asociación que los P valores de corte tengan una *FDR* entre 1% y 10%, es decir, se aceptan valores de P de corte que contemplen entre 1% y 10% de falsos positivos. En todos los análisis de asociación que presentaremos en esta Sección utilizamos un P valor menor o igual a 1×10^{-05} como valor de corte, que es el valor de corte consenso usado en los estudios de asociación realizados con el *DGRP* que contempla una *FDR* de aproximadamente 10% (Mackay *et*

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

al., 2012; Swarup *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2012; Jordan *et al.*, 2012; Jumbo – Luciani *et al.*, 2012; Chow *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014; Anholt y Mackay, 2015).

Identificación y clasificación de polimorfismos y genes candidatos

La caracterización de los polimorfismos significativos se realizó conforme a la clasificación propuesta por el Sequence Ontology Project (SO) (Eilbeck *et al.*, 2005), que propone las siguientes clases según el sitio de ocurrencia del polimorfismo en el genoma:

- **Intergénica:** a más de 1000 pares de bases de cualquier secuencia codificante descripta.
- **Río Abajo:** a menos de 1000 pares de bases del extremo 3'UTR de una secuencia codificante.
- **Río Arriba:** a menos de 1000 pares de bases del extremo 5'UTR de una secuencia codificante.
- **UTR:** en alguna de las dos regiones no traducidas del gen (5'UTR o 3'UTR). Estas regiones son importantes en la regulación de la expresión de la secuencia.
- **Intrónica:** en algún intrón.
- **Sinónima:** en un exón de un transcripto codificante y no modifica el aminoácido codificado por el codón donde ocurre.
- **No sinónima:** en un exón de un transcripto codificante y consiste en la sustitución de una base que resulta en un cambio del aminoácido codificado por el codón donde ocurre.
- **No codificante:** el polimorfismo ocurre en el exón de un transcripto no codificante.

La identificación de los genes en los cuales ocurren los polimorfismos candidatos se realizó utilizando la información disponible en la base de datos genéticos de *Drosophila Flybase* versión *FB2014 06* (Tweedie *et al.*, 2009).

Análisis ontológico – funcional

Los análisis ontológicos – funcionales se realizaron utilizando los servidores online *GeneCoDis3* (Tabas-Madrid *et al.*, 2012) y *GeneMANIA* (Warde-Farley *et al.*, 2010). El primer servidor se utilizó para realizar los análisis de enriquecimiento de términos de *GO*. El algoritmo que utiliza *GeneCoDis3* computa los valores de probabilidad por medio de la distribución hipergeométrica y realiza automáticamente la corrección por pruebas múltiples de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995). Consideramos que una lista de genes candidatos se encuentra enriquecida en un determinado término de *GO* si este tiene un *P* valor corregido menor a 0.05.

La identificación de redes de interacción génica en base a la co-expresión co-localización e interacciones genéticas y/o físicas se realizaron con el servidor *GeneMANIA*. Las opciones de análisis elegidas fueron “*Automatically selected weighting method*” y “*Biological process based weighting method*” con un máximo de 20 genes interactuando con los genes candidatos (Montgomery *et al.*, 2014). *GeneMANIA* también utiliza la distribución hipergeométrica y la corrección de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995) para los cálculos de las

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

probabilidades de enriquecimiento en términos de GO. Nuevamente el valor de significancia fue un P valor corregido < 0.05 . Las gráficas de las redes y sub-redes de interacción se construyeron utilizando el plugin de *GeneMANIA* en *Cytoscape* v3.2.0 (Saito *et al.*, 2012).

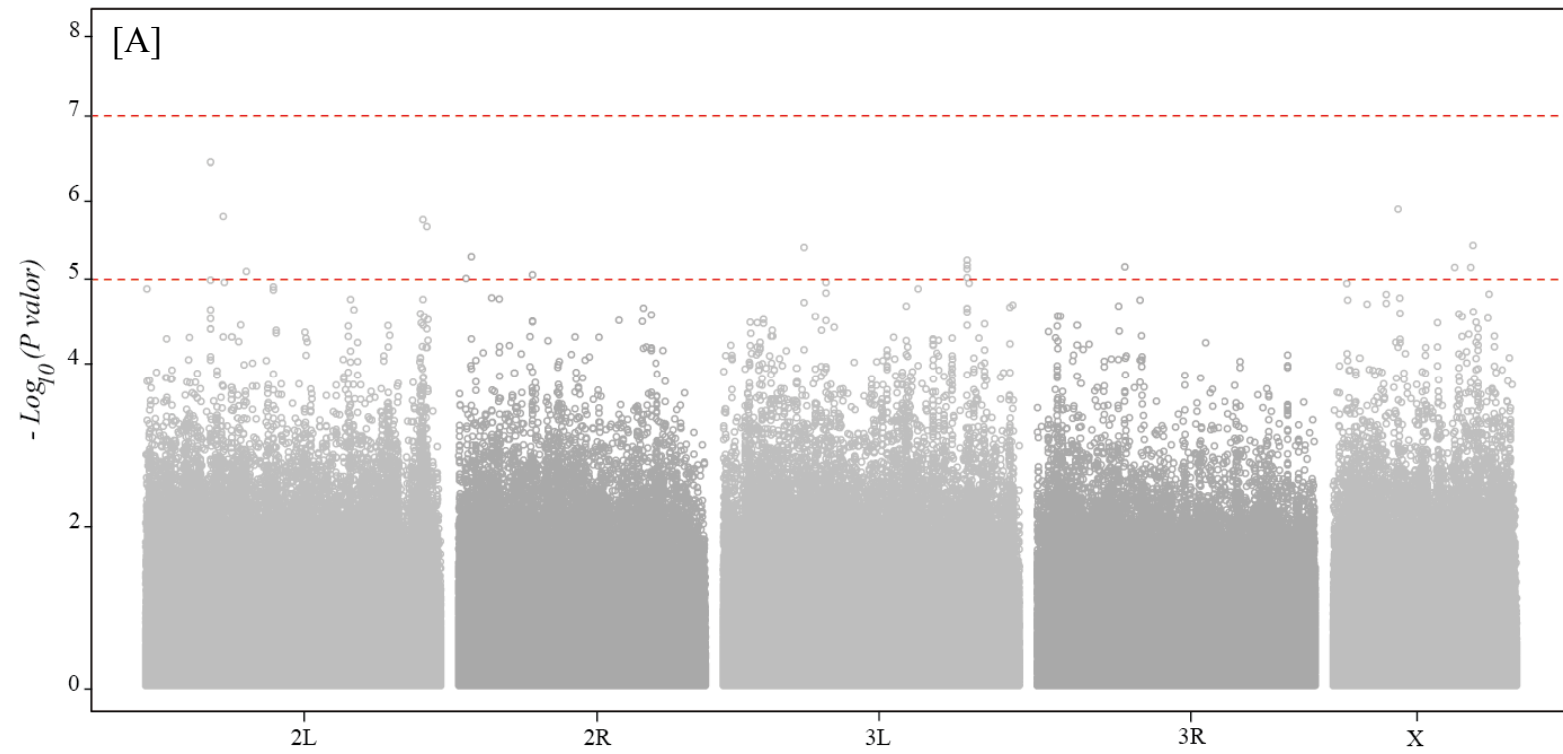
4. Resultados

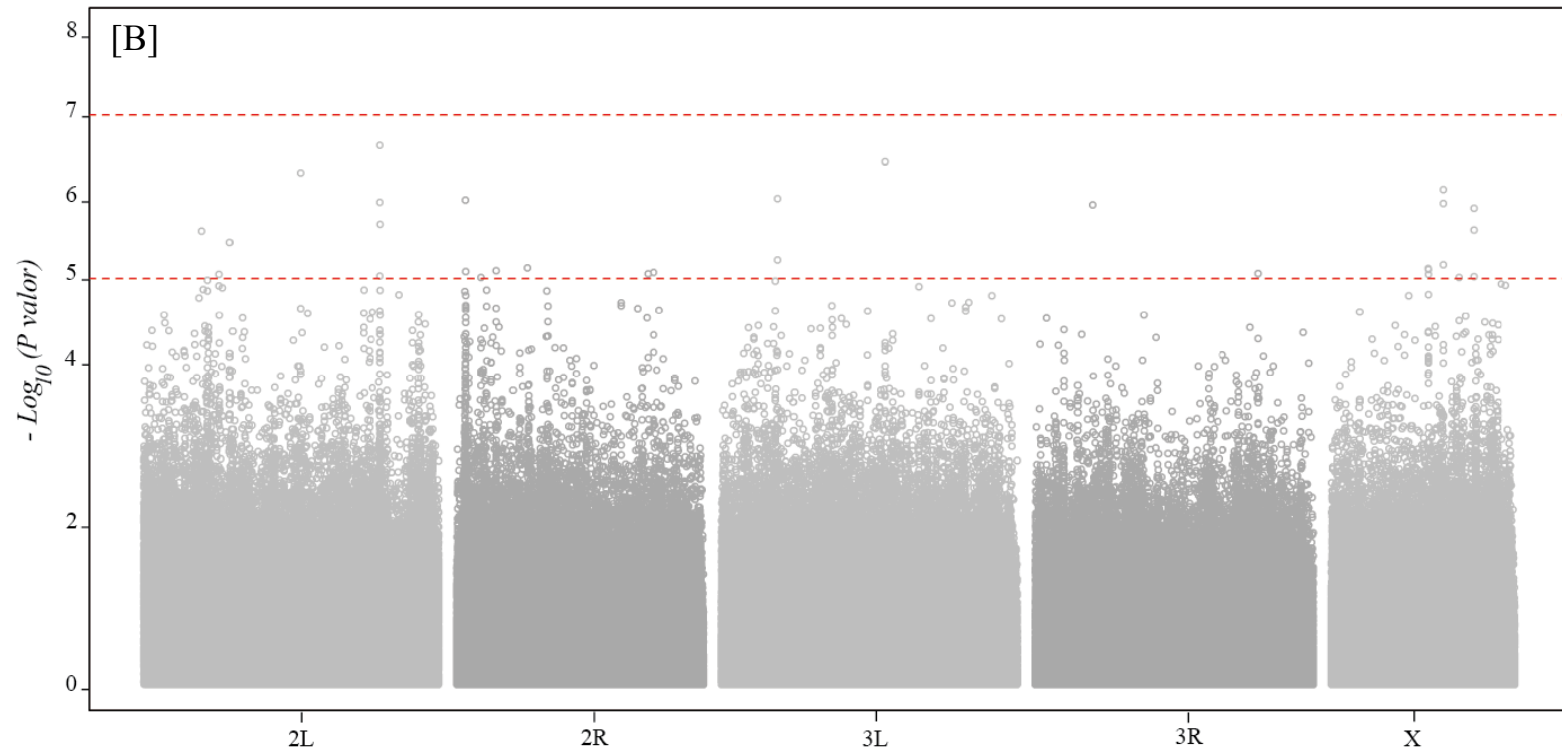
A. Aceptación de recursos de oviposición (AO)

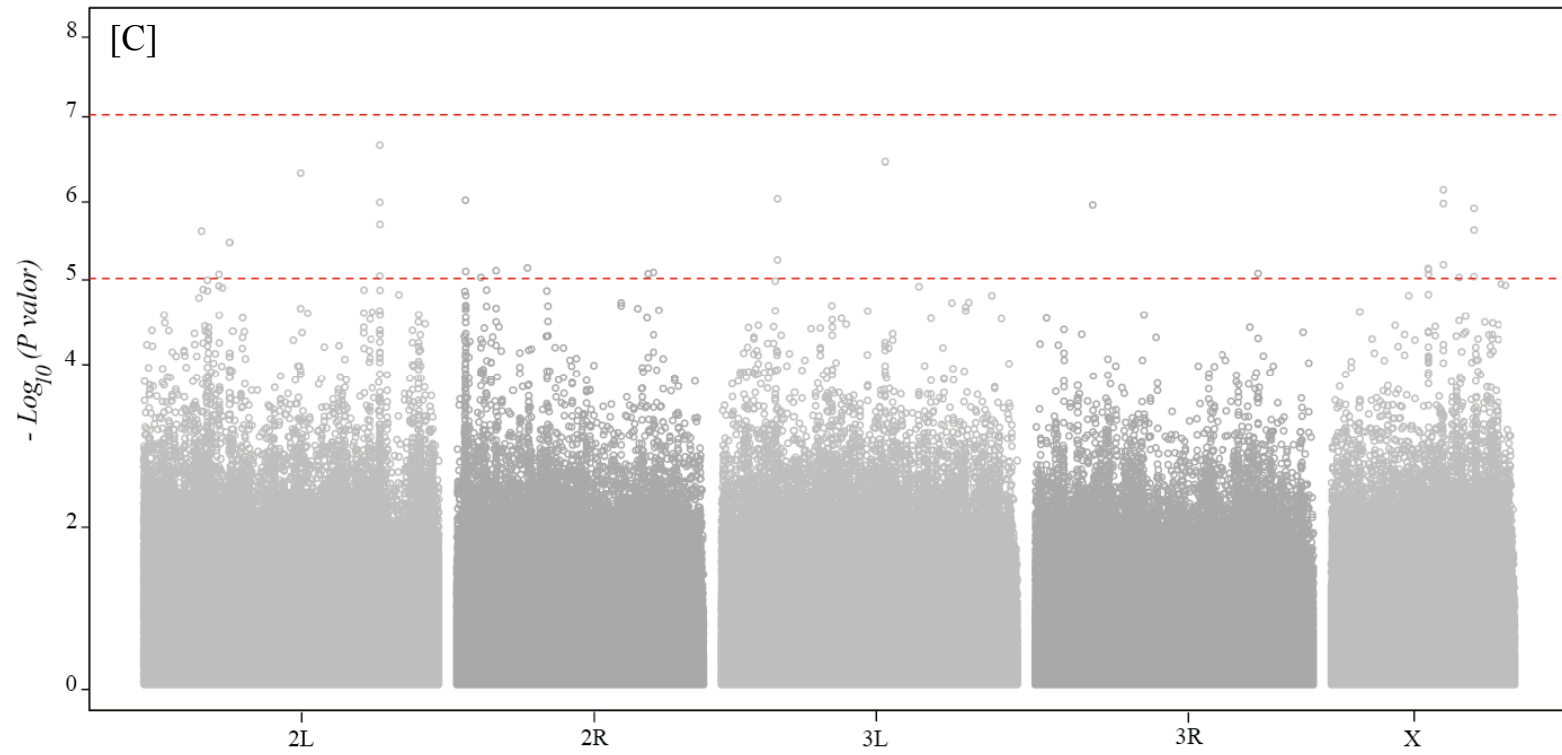
Se realizaron seis *GWAS*, uno por cada recurso ofrecido como medio de oviposición (uva, naranja y tomate) y uno para cada una de las posibles interacciones: uva - naranja, uva - tomate y naranja - tomate.

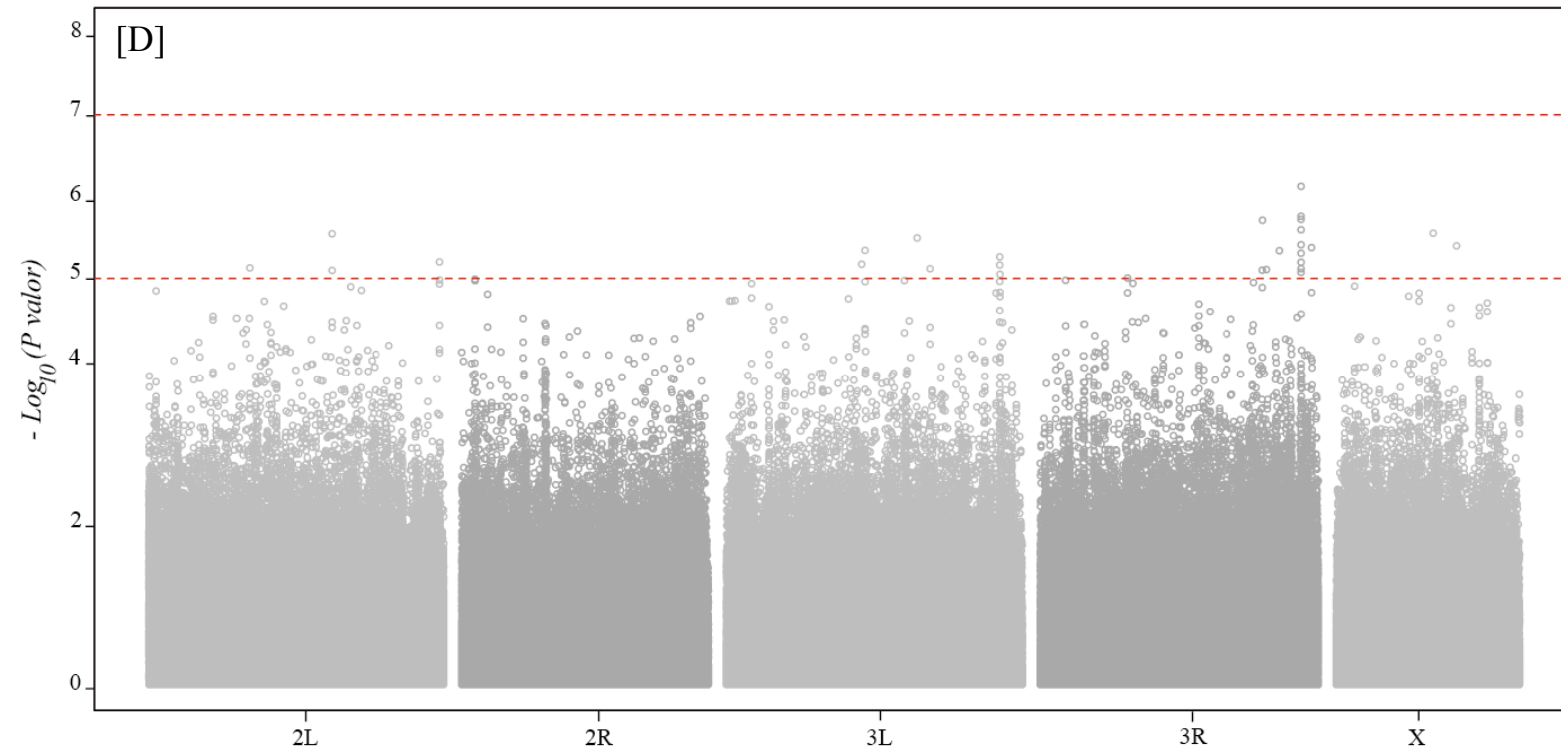
En total se detectaron 179 polimorfismos significativamente asociados con la variación fenotípica de la AO (ver Anexo de resultados, Tabla 3), de los cuales 20 exhibieron asociaciones significativas con la variación en el número de huevos depositados en naranja (Fig. 1[A]), 31 en tomate (Fig. 1[B]) y 25 en uva (Fig. 1[C]). En cuanto a las interacciones, 11 polimorfismos resultaron significativos en los *GWAS* realizados para la interacción naranja-tomate (Fig. 1[D]), 61 para uva-naranja (Fig. 1[F]) y 34 para uva-tomate (Fig. 1[E]).

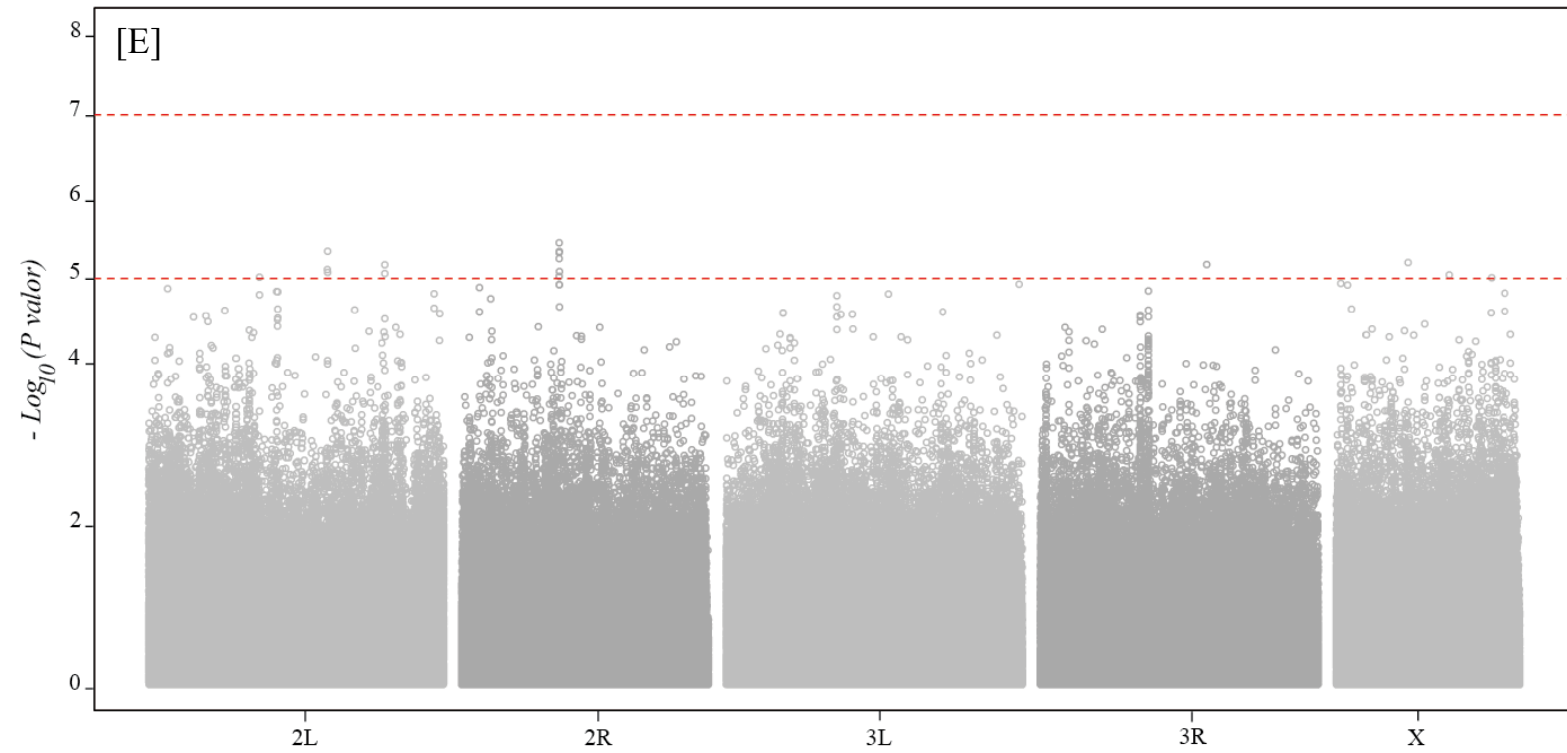
Tal como esperábamos, al aplicar la corrección de *Bonferroni* no encontramos polimorfismos asociados significativamente a la variación en AO que cumplan con el criterio conservativo que implica el valor $P \leq 3.43 \times 10^{-08}$ (Mackay *et al.*, 2012, Harbison *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2014). La corrección de *Bonferroni* considera a cada uno de los polimorfismos puestos a prueba como independientes del resto de los polimorfismos, pero sabemos que a pesar de que el valor de desequilibrio de ligamiento (DL) cae rápidamente con la distancia en las *DGRP* (Huang *et al.*, 2014) algunos polimorfismos no son independientes debido a que se encuentran en DL físico por la cercanía topológica en los cromosomas o por mapear dentro de inversiones cromosómicas o por relaciones de parentesco entre las líneas (Mackay *et al.*, 2012, Harbison *et al.*, 2013, Huang *et al.*, 2014).











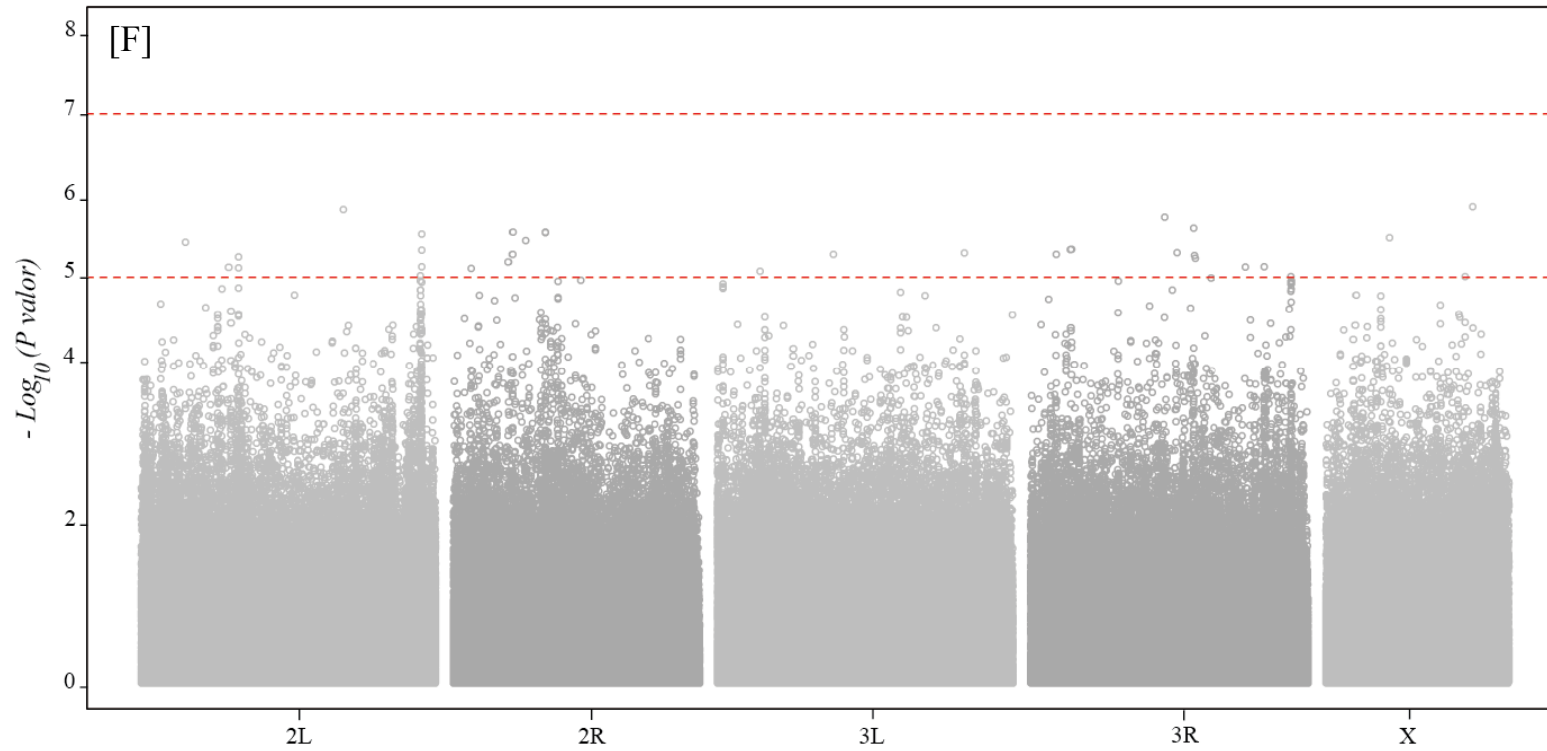


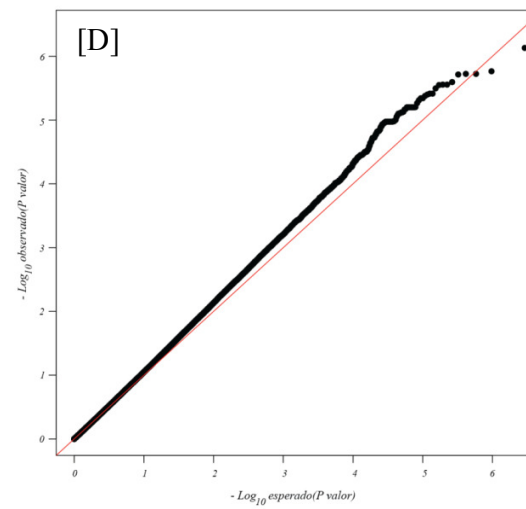
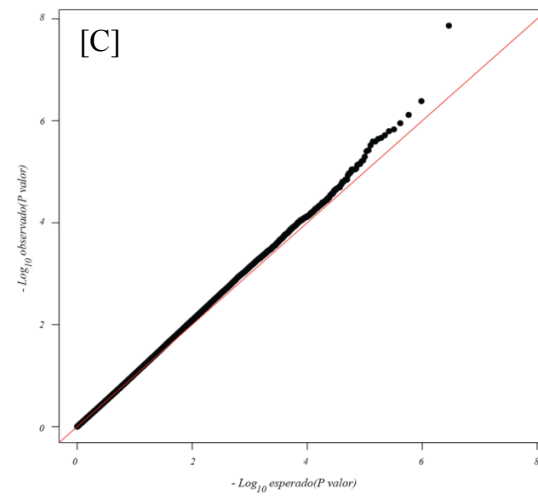
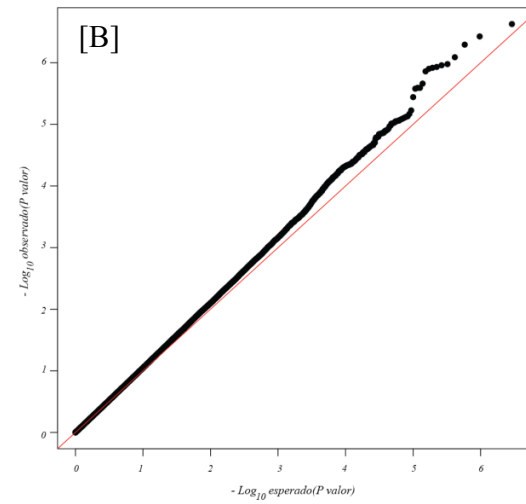
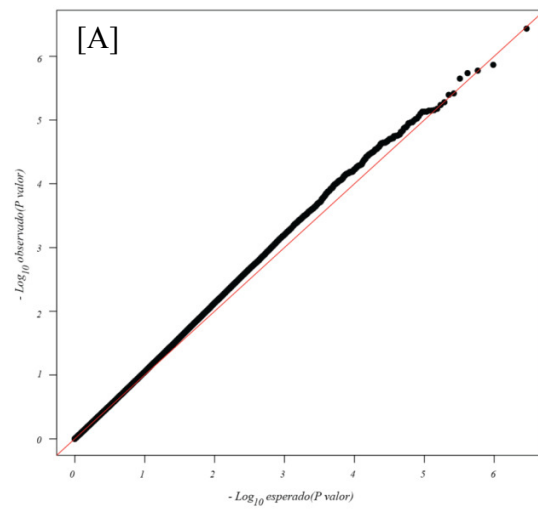
Figura 1. Gráficas Manhattan de los *GWAS* realizados para la AO. La primera línea punteada corresponde al *P* valor de corte consenso de las *DGRP* de 1×10^{-5} . La segunda línea de corte corresponde al *P* valor corregido por el método de *Bonferroni* de 3.43×10^{-8} . Cada punto representa un polimorfismo puesto a prueba durante el análisis de asociación. Se encuentran ordenados según su posición en el genoma. [A] *GWAS* para el recurso de oviposición naranja. [B] *GWAS* para el recurso tomate. [C] *GWAS* para el recurso uva. [D] *GWAS* para la interacción de recursos naranja y tomate. [E] *GWAS* para la interacción uva y tomate. [F] *GWAS* para la interacción uva y naranja.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

Con respecto a la distribución de los P valores observados con respecto a los esperados (Figura 2), encontramos en general un buen ajuste. Sin embargo, se observaron dos patrones de desvíos menores, tanto en la dirección de un exceso de valores significativos (figuras 2B y 2C) como de déficit de valores significativos (figuras 2D, 2E y 2F).

En los análisis genómicos de asociación que involucran cientos de miles de pruebas estadísticas, niveles pequeños de sesgo distorsionan rápidamente la distribución observada de P valores (Mackay *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2013). Una de las posibles causas del exceso de polimorfismos significativos podría ser la estratificación poblacional. La hipótesis de estratificación en el *DGRP* ya ha sido puesta a prueba con anterioridad con resultados negativos (Mackay *et al.*, 2012; Harbison *et al.*, 2013). Por tanto es posible descartar la estratificación como posible explicación de las desviaciones observadas. Una explicación alternativa es la falta de independencia entre los polimorfismos significativos. La dependencia entre polimorfismos puede deberse a DL global o DL local, debido, en este último caso, al ligamiento con alguna de las inversiones cromosómicas. La primer explicación puede ser desestimada ya que se observó que en las *DGRP* el DL global decae rápidamente con la distancia física, ya que basta una distancia de unos 50 pares de bases entre sitios para que los valores de R^2 sean cercanos a cero (Mackay *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014). Con respecto a las inversiones cromosómicas, se ha reportado un total de 16 inversiones polimórficas en el *DGRP*. Algunas líneas son homocigóticas para una inversión o su secuencia de genes no invertida, en tanto que otras son polimórficas, es decir que segregan los ordenamientos invertidos y no invertidos. El problema con las inversiones cromosómicas es que en los segmentos cromosómicos reordenados la recombinación se ve más o menos reducida dependiendo de la proximidad a los puntos de rotura, lo cual puede conllevar a una mayor divergencia genética entre el ordenamiento invertido y su secuencia homóloga dentro del segmento genómico contenido por el reordenamiento, afectando el potencial de evolución de los complejos génicos dentro, próximos e interactuantes con la región en cuestión (Hasson y Eanes, 1996; Navarro *et al.*, 2000; Gomez y Hasson, 2003; Laayouni *et al.*, 2003).

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1



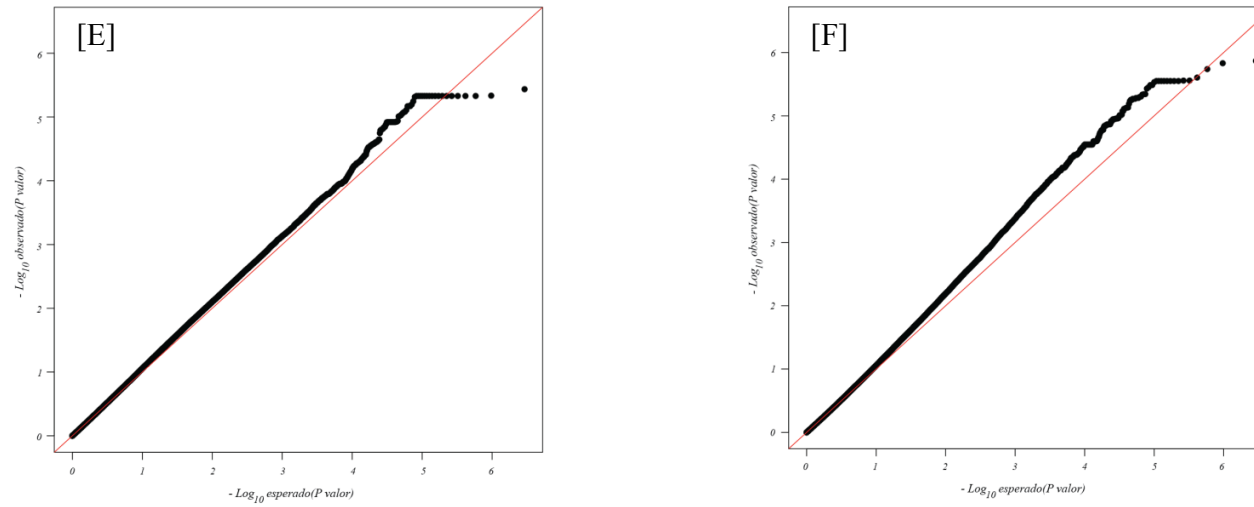


Figura 2. Graficas de los C-C correspondiente a los GWAS realizado para la AO. [A] GWAS para el recurso de oviposición naranja. [B] GWAS para el recurso tomate. [C] GWAS para el recurso uva. [D] GWAS para la interacción de recursos naranja y tomate. [E] GWAS para la interacción uva y tomate. [F] GWAS para la interacción uva y naranja.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

En nuestro caso, solo detectamos 3 inversiones cromosómicas que segregan en la muestra de las 40 líneas del *DGRP* analizadas: *In(2L)t*, *In(2R)NS* y *In(3R)Mo*. A pesar de que antes de realizar los análisis estadísticos de asociación, los valores fenotípicos se corrigieron de manera de independizarnos del efecto que puede tener la presencia/ausencia de inversiones cromosómicas y de que no se observaron diferencias significativas explicables por el ligamiento con las inversiones, pequeñas desviaciones podrían contribuir a conformar el patrón de desviación observado. Una forma de controlar tal desviación es depurar la base de datos de polimorfismos, quedándonos únicamente con el polimorfismo de mayor *P* valor cuando tenemos varios que se encuentran en una región reordenada por una inversión.

En el caso del déficit de polimorfismos significativos, es posible que la desviación se deba a un problema de falta de potencia para detectar asociaciones significativas. En nuestro caso el número de líneas usadas es mucho menor que el número de polimorfismos puestos a prueba, por tanto la falta de potencia para detectar asociaciones significativas es inherente a la técnica. En otras palabras, si aumentáramos el número de líneas deberíamos encontrar un mayor número de polimorfismos significativos. Sin embargo, nunca se podrá llegar a la potencia esperada debido a que sería necesario contar con información fenotípica de todos los genotipos presentes en la población natural, lo cual es prácticamente imposible.

Efecto de las variantes alélicas de los polimorfismos significativos en los *GWAS* sobre los valores fenotípicos de la AO

Uno de los aspectos importantes en el análisis de las bases genéticas de la variación fenotípica es dilucidar el efecto que los diferentes polimorfismos genéticos tienen sobre el carácter estudiado. En este sentido, cuantificamos el efecto medio de los alelos de cada polimorfismo como la diferencia entre la media fenotípica de las líneas portadoras de la variante minoritaria (menos frecuente en la muestra) y la media fenotípica de las líneas portadoras del alelo mayoritario dividido dos (Figura 3).

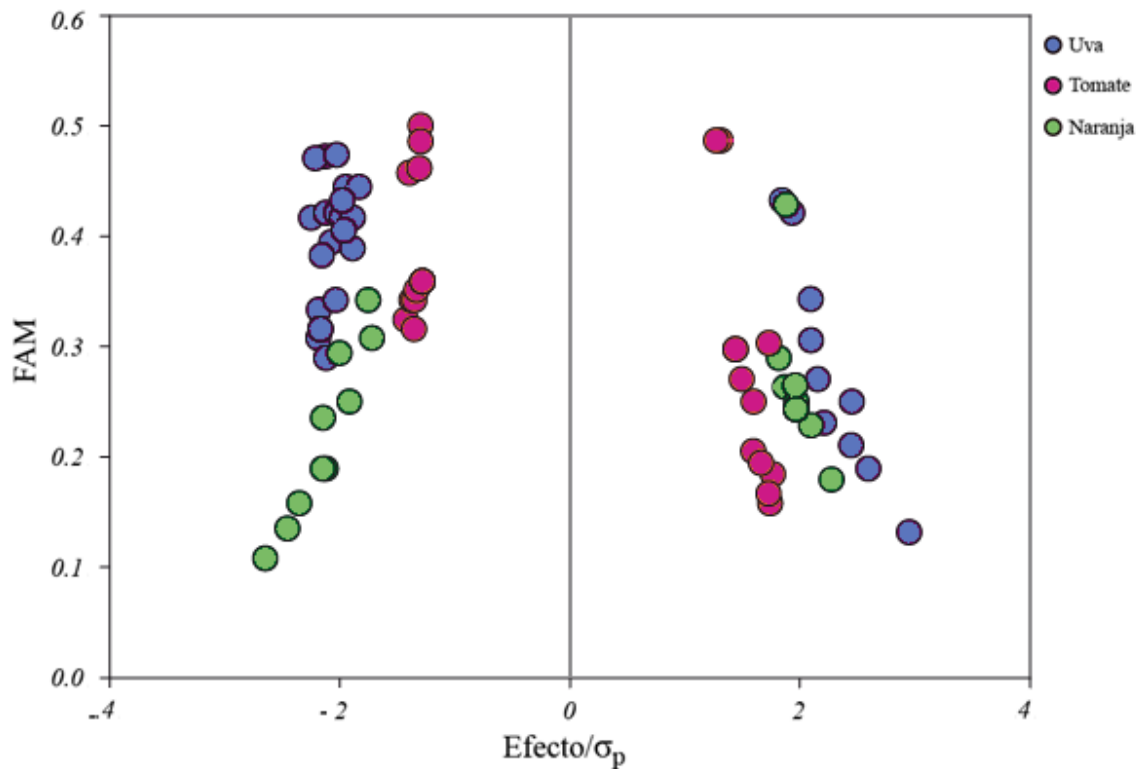


Figura 3. Frecuencia del Alelo Minoritario (FAM) en función del efecto medio del alelo estandarizado para cada recurso ofrecido como sitio de oviposición.

Resulta interesante destacar que un efecto medio negativo significa que las líneas portadoras del alelo minoritario fueron menos fecundas en comparación a las líneas portadoras del alelo mayoritario en el recurso de oviposición considerado. En cambio un efecto medio positivo implica que las líneas portadoras del alelo minoritario depositaron una mayor cantidad de huevos que las líneas con el alelo mayoritario del polimorfismo. El análisis de los resultados reveló que el 57% de los polimorfismos exhibió efecto negativo, es decir, que los polimorfismos significativos estarían provocando una disminución de la fecundidad en el recurso ofrecido como medio de oviposición en consideración. En la Tabla 1 se muestra la distribución de los efectos medios para cada recurso ofrecido. Como se puede observar hay heterogeneidad en el número de polimorfismos con efectos positivo y negativo para los recursos uva y naranja, pero para el tomate encontramos que la diferencia entre los efectos negativo y positivo es de más de un 30% a favor de los primeros. Sin embargo, esta diferencia no resultó significativa ($\chi^2_2 = 3.84$, $p > 0.05$). Por tanto, podemos concluir que el patrón de distribución de los efectos positivos y negativos no exhibió desviaciones significativas a lo esperado por el azar.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

Tabla 1. Distribución de los efectos medios de los alelos de los polimorfismos asociados con la AO entre los distintos recursos ofrecidos. En paréntesis se dan los porcentajes.

RECURSO	EFECTO POSITIVO	EFECTO NEGATIVO
<i>Uva</i>	12 (48%)	13 (52%)
<i>Naranja</i>	10 (50%)	10 (50%)
<i>Tomate</i>	10 (32%)	21 (68%)

Clasificación de los polimorfismos

A continuación clasificaremos los polimorfismos asociados significativamente a la variación en la AO según su clase genómica (Figura 4). El análisis conjunto de los resultados obtenidos en los experimentos con los tres tipos de recursos permite observar que el 67% de los polimorfismos ocurren en regiones cromosómicas que se transcriben. De estos el 47% están en regiones intrónicas y el 16% en exones, de los cuales el 12% resulta en cambios sinónimos y el 4% en cambios no sinónimos. Los restantes polimorfismos (33%) ocurren en las regiones no traducidas de los genes y solo el 14% se localiza en zonas consideradas intergénicas que se sitúan a más de 1000 pares de bases de algún gen descrito.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

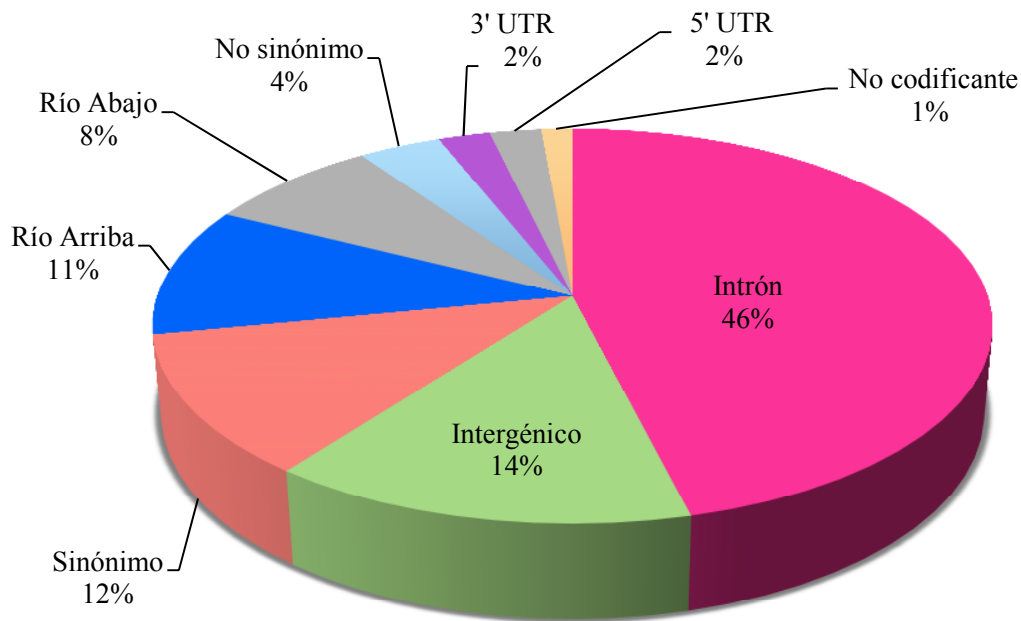


Figura 4. Porcentaje de clases genómicas para los polimorfismos significativos en los *GWAS* realizados para la AO.

Estas tendencias se repiten al analizar los resultados de los *GWAS* obtenidos para cada recurso por separado (Tabla 2). En todos los casos los polimorfismos asociados a la AO más abundantes son los que ocurren en regiones que se transcriben, seguidos por los que se localizan en regiones intergénicas. Dentro de los primeros la mayoría de los polimorfismos se detectan en intrones, en tanto que los menos frecuentes son los que provocan cambios no sinónimos. En este sentido, es interesante mencionar que la distribución de los polimorfismos entre las clases genómicas reconocidas es similar a la reportada en estudios de otros caracteres fenotípicos (Mackay *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014).

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

Tabla 2. Distribución de porcentajes de frecuencia de los polimorfismos asociados a la variación en la AO en cada una de las clases genómicas para cada *GWAS*. UVA-NAR corresponde a la interacción uva-naranja, UVA-TOM a la de uva-tomate y NAR-TOM a la de naranja-tomate.

CLASE GENÓMICA	NAR	TOM	UVA	NAR TOM	UVA NAR	UVA TOM	TOTAL
<i>Intergénico</i>	18%	17.5 %	6%	15%	14%	17	14%
<i>Intrón</i>	50%	25%	38%	23%	57%	61%	46%
<i>Sinónimo</i>	18%	10%	29%	8%	4%	8%	12%
<i>No sinónimo</i>	-	5%	-	-	7%	3%	4%
<i>No codificante</i>	-	5%	-	-	1.3%	-	1%
<i>Río Arriba</i>	0%	20%	24%	8%	4%	8%	11%
<i>Río Abajo</i>	14%	12.5 %	3%	8%	10%	-	8%
<i>3' UTR</i>	-	2.5%	-	23%	1.3 %	-	2%
<i>5' UTR</i>	-	2.5 %	-	15%	1.3 %	3%	2%
<i>TOTAL</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Genes candidatos

A continuación se construyó la lista de genes candidatos asociados a la arquitectura genética de la AO. En la construcción de la lista, consideramos los polimorfismos significativos de todas las clases genómicas con excepción de los polimorfismos intergénicos que se encuentran a más de 1000 pares de bases de algún gen descripto. En los casos en que los polimorfismos ocurren en dos genes al mismo tiempo (casos en los que la secuencia de gen se encuentra superpuesta con la de otro gen), se consideran los dos genes como candidatos.

La Tabla 3 muestra la lista final de 107 genes candidatos, de los cuales 15 están asociados a la variación en la AO por uva, 13 por naranja, 24 por tomate, 10 con la interacción uva-tomate, 37 con la interacción uva-naranja y, finalmente, 8 con la interacción tomate-naranja.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

Tabla 3. Lista de genes candidatos a participar de la arquitectura genética de la AO cuando se le ofrece como sustratos de oviposición a la uva, naranja y tomate. ID corresponde al número de identificación del gen en la base de datos *Flybase*. Nombre (símbolo) se refiere al nombre y símbolo, si corresponde, con el cual se conoce al gen. Ubicación Citológica corresponde a la banda citológica donde se encuentra el gen.

NARANJA

ID	NOMBRE (SÍMBOLO)	UBICACIÓN CITOLÓGICA
FBgn0000163	<i>Bazooka (baz)</i>	15F1-15F1
FBgn0015766	<i>Msr-110 (Msr-110)</i>	64D3-64D3
FBgn0020930	<i>Diacyl glycerol kinase ε (Dgke)</i>	49C2-49C2
FBgn0031725	<i>Dpr-interacting protein (DIP-η)</i>	25F1-25F1
FBgn0033121	<i>Cyp6u1</i>	6U1-6U1
FBgn0038439	<i>Cadherin 89D (Cad89D)</i>	89B18-89B18
FBgn0053158	<i>CG33158</i>	72F1-73A3
FBgn0085414	<i>defective proboscis extension response 12 (dpr12)</i>	42A1-42A1
FBgn0086904	<i>Nascent polypeptide associated complex protein alpha subunit (Naca)</i>	39C2-49C3
FBgn0259998	<i>CG17571</i>	38C3-38C3
FBgn0263257	<i>Cyclic nucleotide-gated ion channel-like (cnlg)</i>	13C1-13C1
FBgn0263873	<i>sickie (sick)</i>	38A8-38A8
FBgn0264818	<i>CR44026</i>	15F1-15F1

TOMATE

ID	NOMBRE (SÍMBOLO)	UBICACIÓN CITOLÓGICA
FBgn0000546	<i>ecdysone receptor (EcR)</i>	42A9-42A12
FBgn0003748	<i>trehalase (Treh)</i>	57B16-57B19
FBgn0003920	<i>small nuclear RNA U2 at 14B (snRNA:U2:14B)</i>	14B6-14B6
FBgn0003933	<i>small nuclear RNA U5 at 14B (snRNA:U5:14B)</i>	14B6-14B6
FBgn0004910	<i>ecdysone-induced protein 63F 1 (Eip63F-1)</i>	63F6-64A1
FBgn0004911	<i>ecdysone-induced protein 63F 2 (Eip63F-2)</i>	63F7-64A1
FBgn0010415	<i>Syndecan (Sdc)</i>	57E1-57E6
FBgn0011592	<i>frazzled (fra)</i>	49A10-49B3
FBgn0011890	<i>transfer RNA:lys2:42Ad (tRNA:K2:42Ad)</i>	42A12-42A12
FBgn0021953	<i>fatty acid (long chain) transport protein (Fatp)</i>	31F4-31F5
FBgn0028899	<i>CG31817</i>	35F1-35F1
FBgn0030418	<i>CG4004</i>	11B14-11B14
FBgn0031585	<i>CG2955</i>	24D6-24D6

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

FBgn0032262	<i>CG7384</i>	31F4-31F4
FBgn0033312	<i>CG8642</i>	44D4-44D4
FBgn0033313	<i>calcium-independent receptor for α-latrotoxin (Cirl)</i>	44D4-44D5
FBgn0035475	<i>CG10866</i>	64A1-64A1
FBgn0045862	<i>barentsz (btz)</i>	98B1-98B2
FBgn0050316	<i>transfer RNA:CR30316 (tRNA:CR30316)</i>	42A12-42A12
FBgn0051641	<i>stathmin (stai)</i>	26B5-26B7
FBgn0052600	<i>defective proboscis extension response 8 (dpr8)</i>	12E8-12E10
FBgn0086346	<i>ALG-2 interacting protein X (ALiX)</i>	98B1-98B1
FBgn0261698	<i>CG42732</i>	47A1-47A7
FBgn0261963	<i>midline (mid)</i>	25E2-25E2

UVA

ID	NOMBRE (SIMBOLO)	UBICACIÓN CITOLÓGICA
FBgn0003475	<i>spire (spir)</i>	38C5-38C5
FBgn0027553	<i>NELF-B (NELF-B)</i>	7B7-7B7
FBgn0028879	<i>CG15270</i>	35C1-35C2
FBgn0029957	<i>CG12155</i>	7B7-7B7
FBgn0031745	<i>rau</i>	26A1-26A1
FBgn0031885	<i>menin 1 (Mnn1)</i>	27D7-27D7
FBgn0031894	<i>CG4496</i>	27E4-27E4
FBgn0032066	<i>lysosomal α-mannosidase III (LManIII)</i>	29F1-29F1
FBgn0034807	<i>CG9897</i>	59C1-59C1
FBgn0035612	<i>CG10625</i>	64D3-64D3
FBgn0050158	<i>CG30158</i>	42D6-42E1
FBgn0261706	<i>CR42742</i>	59C1-59C1
FBgn0261801	<i>CG42747</i>	65B3-65B3
FBgn0263581	<i>CR43606</i>	38C5-38C5
FBgn0264001	<i>bruno-3 (bru-3)</i>	70C1-70C2

INTERACCIÓN NARANJA - UVA

ID	NOMBRE (SÍMBOLO)	UBICACIÓN CITOLÓGICA
FBgn0000479	<i>dunce (dnc)</i>	3C9-3D1
FBgn0000633	<i>faint sausage (fas)</i>	50B6-50C3
FBgn0004374	<i>nebbish (neb)</i>	38B3-38B5

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

FBgn0013733	<i>short stop (shot)</i>	50C6-50C9
FBgn0013810	<i>dynein heavy chain at 36C (dhc36C)</i>	36C10-36C10
FBgn0013995	<i>Na/Ca-exchange protein (calx)</i>	93A4-93B3
FBgn0020245	<i>tout-velu (ttv)</i>	51B1-51B1
FBgn0021768	<i>nudC</i>	73D1-73D1
FBgn0027655	<i>huntingtin (htt)</i>	98E2-98E2
FBgn0028527	<i>CG18507</i>	34C6-34C6
FBgn0029826	<i>CG6041</i>	5C10-5C10
FBgn0029961	<i>ionotropic receptor 7a (Ir7a)</i>	7B8-7B8
FBgn0030758	<i>canA-14F (CanA-14F)</i>	14E3-14F1
FBgn0030913	<i>CG6123</i>	17A5-17A6
FBgn0031530	<i>polypeptide GalNAc transferase 2 (pgant2)</i>	23F1-23F1
FBgn0031865	<i>Na⁺/H⁺ hydrogen antiporter 1 (Nha1)</i>	27C1-27C1
FBgn0031866	<i>nlg (neuroligin)</i>	27C3-27C4
FBgn0032647	<i>CG15143</i>	36C10-36C10
FBgn0032648	<i>CG15144</i>	36C10-36C11
FBgn0033648	<i>ionotropic receptor 48b (Ir48b)</i>	48C2-48C2
FBgn0033649	<i>pyramus (pyr)</i>	48C2-48C2
FBgn0033864	<i>CG18368</i>	50C1-50C1
FBgn0036665	<i>CG13024</i>	73D1-73D1
FBgn0037766	<i>tipE homolog 1 (Teh1)</i>	85E10-85E13
FBgn0038745	<i>CG4538</i>	92B6-92B6
FBgn0038746	<i>surfeit 6 (Surf6)</i>	92B6-92B6
FBgn0038930	<i>CG5778</i>	94A2-94A2
FBgn0038956	<i>CG5379</i>	94A11-94A11
FBgn0042135	<i>CG18812</i>	43E12-43E13
FBgn0052755	<i>CG32755</i>	5C10-5C10
FBgn0053471	<i>ionotropic receptor 48a (Ir48a)</i>	48C2-48C2
FBgn0053489	<i>CG33489</i>	68C13-68C13
FBgn0259998	<i>CG17571</i>	38C3-38C3
FBgn0260943	<i>RNA-binding protein 6 (Rbp6)</i>	73E5-74A1
FBgn0261625	<i>CG42708</i>	49B12-49B12
FBgn0263048	<i>CG43343</i>	94A6-94A11
FBgn0263416	<i>CG43462</i>	85A1-85A2
FBgn0263773	<i>fledgling of Klp38B (fok)</i>	38B4-38B4

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

INTERACCIÓN NARANJA - TOMATE

ID	NOMBRE (SÍMBOLO)	UBICACIÓN CITOLÓGICA
FBgn0000114	<i>arrest (aret)</i>	33D3-33D5
FBgn0014427	<i>CG11899</i>	99A1-99A1
FBgn0015541	<i>slamdance (sda)</i>	97D7-97D9
FBgn0016081	<i>furry (fry)</i>	67C3-67C4
FBgn0030418	<i>CG4004</i>	11B14-11B14
FBgn0036020	<i>CG8336</i>	67C2-67C3
FBgn0039776	<i>prolyl-4-hydroxylase-alpha EFB (PH4alphaEFB)</i>	99F6-99F6
FBgn0264324	<i>sponge (spg)</i>	98E6-99A6
FBgn0265274	<i>innexin 3 (Inx3)</i>	98E6-98F1

INTERACCIÓN UVA - TOMATE

ID	NOMBRE (SÍMBOLO)	UBICACIÓN CITOLÓGICA
FBgn0003435	<i>smooth (sm)</i>	56D15-56E1
FBgn0028327	<i>lethal (1) G0320 (l(1)G0320)</i>	8E7-8E7
FBgn0028899	<i>CG31817</i>	35F1-35F1
FBgn0030286	<i>CG1657</i>	10B3-10B3
FBgn0032839	<i>CG10659</i>	38B1-38B1
FBgn0032880	<i>CG9318</i>	38E4-38E5
FBgn0033403	<i>CG13739</i>	45C6-45D1
FBgn0033405	<i>CG13954</i>	45D1-45D1
FBgn0085410	<i>Trissin receptor (TrissinR)</i>	25F5-26A1
FBgn0262446	<i>mir-137 stem loop (mir-137)</i>	52E1-52E1
FBgn0262743	<i>female sterile (2) Ketel (Fs(2)Ket)</i>	38E5-38E6

Análisis ontológico – funcional

Los genes candidatos fueron distribuidos entre los distintos términos de ontología génica correspondientes a las categorías Proceso Biológico (PB), Función Molecular (FM) y Componente Celular (CC) de acuerdo con sus anotaciones. El número de genes candidatos incluidos en los análisis de enriquecimiento funcional fue 13 en los experimentos usando naranja como recurso de oviposición, 15 en uva, 24 en tomate y 55 en las interacciones entre recursos.

No encontramos enriquecimiento en términos de *GO* en ninguna de las categorías para las listas de genes candidatos asociadas a la oviposición en naranja y uva, ni para los genes asociados a las

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

interacciones. En cambio, sí encontramos enriquecimiento en los genes candidatos asociados a la aceptación del tomate como recurso de oviposición. En este caso los términos de *GO* significativos fueron *GO:0060089* (*P* valor corregido por Benjamini-Hochberg 3.58×10^{-03}) y *GO:0004872* (*P* valor corregido por Benjamini-Hochberg 1.27×10^{-02}) correspondientes a la categoría FM. El primero es un término de nivel general que tiene que ver con la actividad molecular de transducción, es decir, todas las funciones moleculares que aceptan moléculas con una forma determinada y devuelven la molécula con una forma distinta respecto de la original. El segundo término es más específico, término hijo de *GO:0060089*, y tiene que ver con la actividad de recepción molecular. Según la definición, se refiere al inicio de una actividad celular a causa de combinación/unión de una estructura celular con una molécula proveniente del espacio extra o intracelular. Los genes asociados con estos términos son: *Calcium-independent receptor for α -latrotoxin* (*cirl*), *Ecdysone receptor* (*EcR*), *frazzled* (*fra*), *Syndecan* (*sdc*) y *ALG-2 interacting protein X* (*aliX*).

Cirl se definió como gen candidato debido al efecto significativo del *SNP* 2R:4502553 que ocurre en la región UTR 5' del gen. Se han descrito 8 transcritos y 8 polipéptidos de *Cirl*. Tal como su nombre lo indica codifica para el receptor neuronal calcio independiente de α -latrotoxina y está implicado en la regulación de la secreción de neurotransmisores (Krasnopevov *et al.*, 2002).

EcR es un gen con 6 transcritos que codifica para el receptor de la hormona esteroidea ecdisoma (*Ecd*). Se definió como gen candidato por el *SNP* 2R:2015111 localizado en un intrón. Esta hormona junto a la hormona juvenil (*JH*) controlan la formación y desarrollo del huevo durante la ovogénesis, específicamente a través de funciones regulatorias durante la vitologénesis (Postlethwait y Handler, 1979; Jowett y Postlethwaite, 1980).

Del gen *fra* se han descrito 3 transcritos y 3 polipéptidos. Se definió como gen candidato por el *SNP* intrónico 2R:8446682. Este gen codifica proteínas transmembrana con dominios del tipo inmunoglobulínicos C2, los cuales están relacionados con las interacciones proteína - proteína y ligando - proteína. Con respecto a sus funciones se ha postulado que *fra* es un receptor necesario en el establecimiento de las proyecciones axónicas retinales en el sistema visual de *D. melanogaster* (Gong *et al.*, 1999) ya que junto con *netrin-1*, otro gen que codifica proteínas transmembrana, actúan dirigiendo las extensiones axónicas de ciertas neuronas motoras hacia las fibras retinales.

El gen *Sdc* se definió como gen candidato por el efecto del *SNP* intrónico 2R:17307040. De este gen se conocen 8 transcritos y 8 polipéptidos. Johnson *et al.* (2006) propusieron que *Sdc* junto con *Dallylike* (*dlp*) son necesarios para el control de distintos aspectos de la sinapsis. Según los autores *Sdc* promueve el crecimiento de las terminales pre-sinápticas mientras que *dlp* regula la forma y función de las terminales.

Finalmente *aliX* es un gen con un transcrito y un polipéptido descrito. Se definió como gen candidato por el *SNP* 3R:23526606. En este caso el polimorfismo que afecta significativamente la oviposición en tomate no ocurre en la zona del gen que se transcribe sino río arriba, a 774 pares de bases del sitio de inicio de transcripción. *aliX* es una proteína citosólica que parece estar relacionada con la fertilidad en *D. melanogaster* (Steen, 2013). Hembras mutantes de *Drosophila* para *alix* mostraron un número anormal de células germinales y de los puentes intercelulares que existen entre ellas (canales anillos). Más específicamente en moscas mutantes se observó que la abscisión de las células hijas durante la primera división celular es defectuosa, lo cual lleva a anomalías en el número final de células germinales con las sucesivas divisiones.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

Con el fin de comprender cómo los genes asociados a la variación en la AO de los recursos ofrecidos se relacionan entre sí, y, poder generar hipótesis acerca de los caminos o *pathways* biológicos que representan estas redes de interacción, utilizamos el algoritmo *GeneMANIA*. Los análisis revelaron que los genes candidatos asociados a la variación de la AO constituyen una red de interacción génica definida en base a interacciones de co-expresión, interacciones predichas en base a la secuencia de los genes, interacciones genéticas, interacciones de co-localización e interacciones físicas (Figura 5 [A]). La co-expresión se refiere a genes que se expresan en un mismo período de tiempo, mientras que la co-localización se refiere a genes que se expresan en el mismo tejido y/u órgano. Por interacciones genéticas nos referimos a casos en los que dos genes están funcionalmente asociados, ya que al perturbar un gen se altera la función del otro. Finalmente, la interacción física hace referencia a que existe evidencia de interacción proteína-proteína entre los productos génicos de dos genes. Para los genes *CG8642*, *midline (mid)*, *CG42708* y *bruno-3 (bru-3)* no se definieron interacciones de ningún tipo. A modo de conclusión, este análisis nos aporta evidencia de que los genes asociados a la variación de la AO se encuentran relacionados entre sí a través de distintas vías de interacción, además de la evidencia aportada por los análisis de *GWAS*.

Un análisis detallado de la red de interacción nos permitió detectar dos sub-redes de interacciones génicas enriquecidas en términos de *GO* vinculados con la fecundidad y el desarrollo del sistema nervioso (Tabla 4 y Figura 5 [B y C]). En relación con la primera, los términos significativos son: desarrollo del ovocito (*GO: 0048599*), desarrollo de células germinales (*GO:0007281*), formación del ovocito (*GO:0007308*), formación del eje del ovocito (*GO:0007309*), formación del eje antero/posterior del ovocito (*GO:0007314*) y Diferenciación del ovocito (*GO:0009994*). En el caso de la segunda algunos de los términos son: regulación de la neurogénesis (*GO:0050767*), regulación del desarrollo del Sistema nerviosos central (*GO:0051960*), regulación de la organización de las proyecciones celulares (*GO:0031344*).

Finalmente, es interesante destacar que no encontramos enriquecimiento en caminos metabólicos (*Kegg pathway*, por la sigla en inglés de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) en la lista de genes candidatos. En este sentido debemos tener en cuenta que el número de genes de *Drosophila* con anotaciones en caminos metabólicos es muy bajo por lo cual es esperable no encontrar enriquecimiento significativo en estos análisis (Kanehisa *et al.*, 2014).

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

Tabla 4. Lista de términos de *GO* significativos para la red de interacciones genéticas. *P** corresponde al valor de probabilidad luego de la corrección por pruebas múltiples de Benjamini-Hochberg. N° de genes red se refiere al número de genes asociado a ese término de *GO* en la red de interacciones y N° de genes genoma es el número total de genes asociados a ese término de *GO* a lo largo del genoma.

<i>GO</i>	<i>P*</i>	N° DE GENES RED	N° DE GENES GENOMA
<i>Desarrollo del ovocito</i>	8.54×10^{-04}	10	126
<i>Desarrollo de células germinales</i>	9.91×10^{-04}	13	269
<i>Organización citoplasmática</i>	9.91×10^{-04}	7	58
<i>Localización asimétrica de proteínas</i>	1.14×10^{-03}	6	38
<i>Determinación maternal del eje antero/posterior del embrión</i>	2.24×10^{-03}	7	71
<i>Maduración celular</i>	2.24×10^{-03}	9	136
<i>Regulación de la localización del mRNA intracelular</i>	2.24×10^{-03}	7	71
<i>Regulación del desarrollo celular</i>	2.24×10^{-03}	10	173
<i>Regulación de la diferenciación celular</i>	2.24×10^{-03}	12	254
<i>Diferenciación del ovocito</i>	2.24×10^{-03}	9	135
<i>Formación del eje antero/posterior del ovocito</i>	2.24×10^{-03}	7	68
<i>Formación eje ovocito</i>	2.51×10^{-03}	8	104
<i>Formación ovocito</i>	2.73×10^{-03}	8	108
<i>Regulación de la organización de las proyecciones celulares</i>	3.50×10^{-03}	7	80
<i>Regulación del desarrollo del Sistema nervioso central</i>	4.32×10^{-03}	10	195
<i>Regulación de la neurogénesis</i>	7.65×10^{-03}	8	127

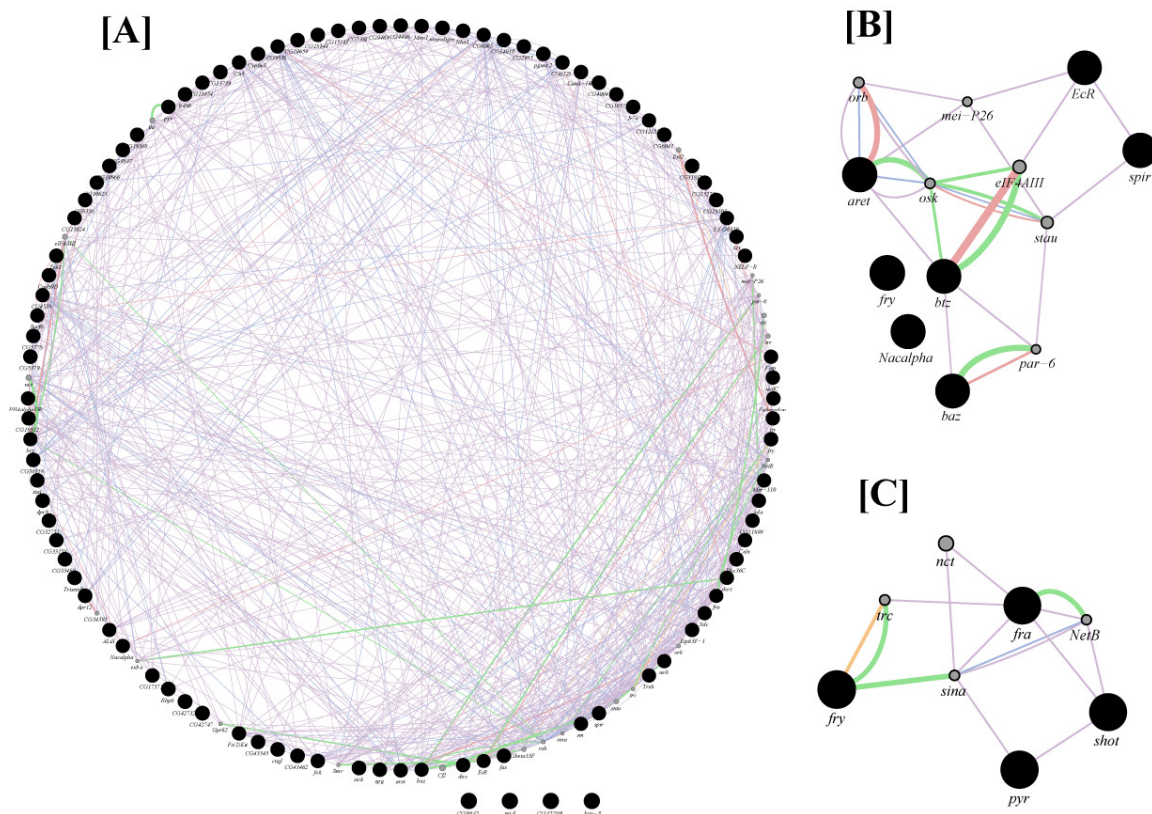


Figura 5. [A] Esquema de la red de interacción génica. Las líneas violetas representan las interacciones de co-expresión, las líneas naranjas las de interacciones predichas en base a la secuencia, las líneas verdes son las interacciones genéticas, las líneas azules corresponden a las interacciones de co-localización y las líneas rosas a las interacciones físicas. [B] sub red de interacción génica enriquecida en términos de *GO* asociados a la fecundidad. [C] sub red de interacción génica enriquecida en términos de *GO* asociados al desarrollo del sistema nervioso. En negro se representan los gene candidatos y en gris los genes que interactúan con los genes candidatos pero no resultaron significativos en los análisis de asociación.

Superposición de polimorfismos y genes candidatos entre ensayos de AO en distintos recursos

Si recordamos los resultados de los análisis de correlaciones genéticas entre la aceptación de recursos tomados de a pares (ver sección 2.4.1), es esperable encontrar cierto grado de solapamiento entre las arquitecturas genéticas subyacentes a la AO por los distintos recursos. A fin de corroborar esta hipótesis *ad hoc* compararemos los listados de polimorfismos y genes candidatos involucrados en la variación fenotípica en cada uno de los recursos de oviposición. Los resultados de estas pruebas fueron negativos, es decir, no se detectaron polimorfismos o genes candidatos compartidos entre los listados obtenidos con los *GWAS* entre pares de recursos. Esto sugiere que la arquitectura genética de las AOs sería específica del recurso que se ofrece como medio de oviposición. Sin embargo,

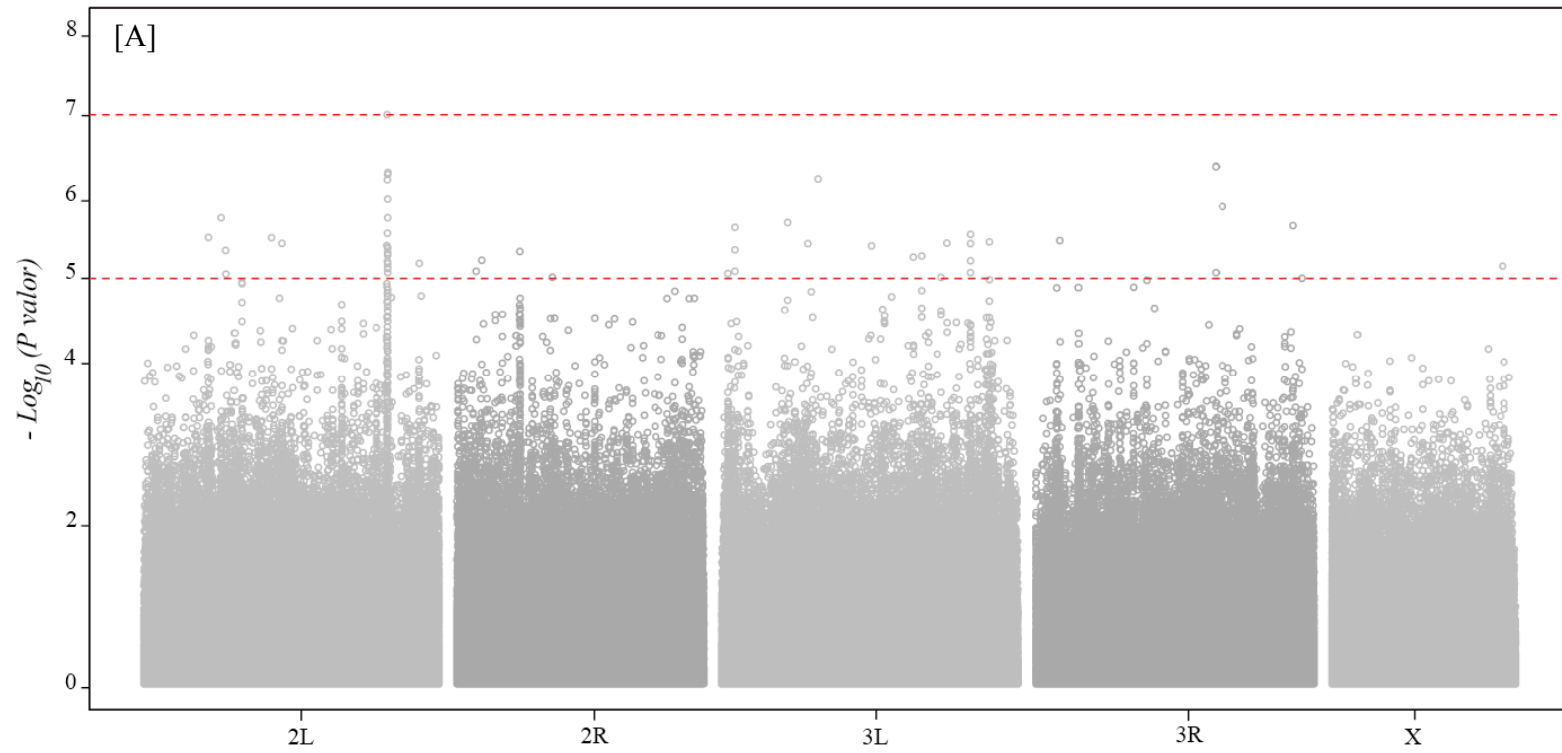
CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

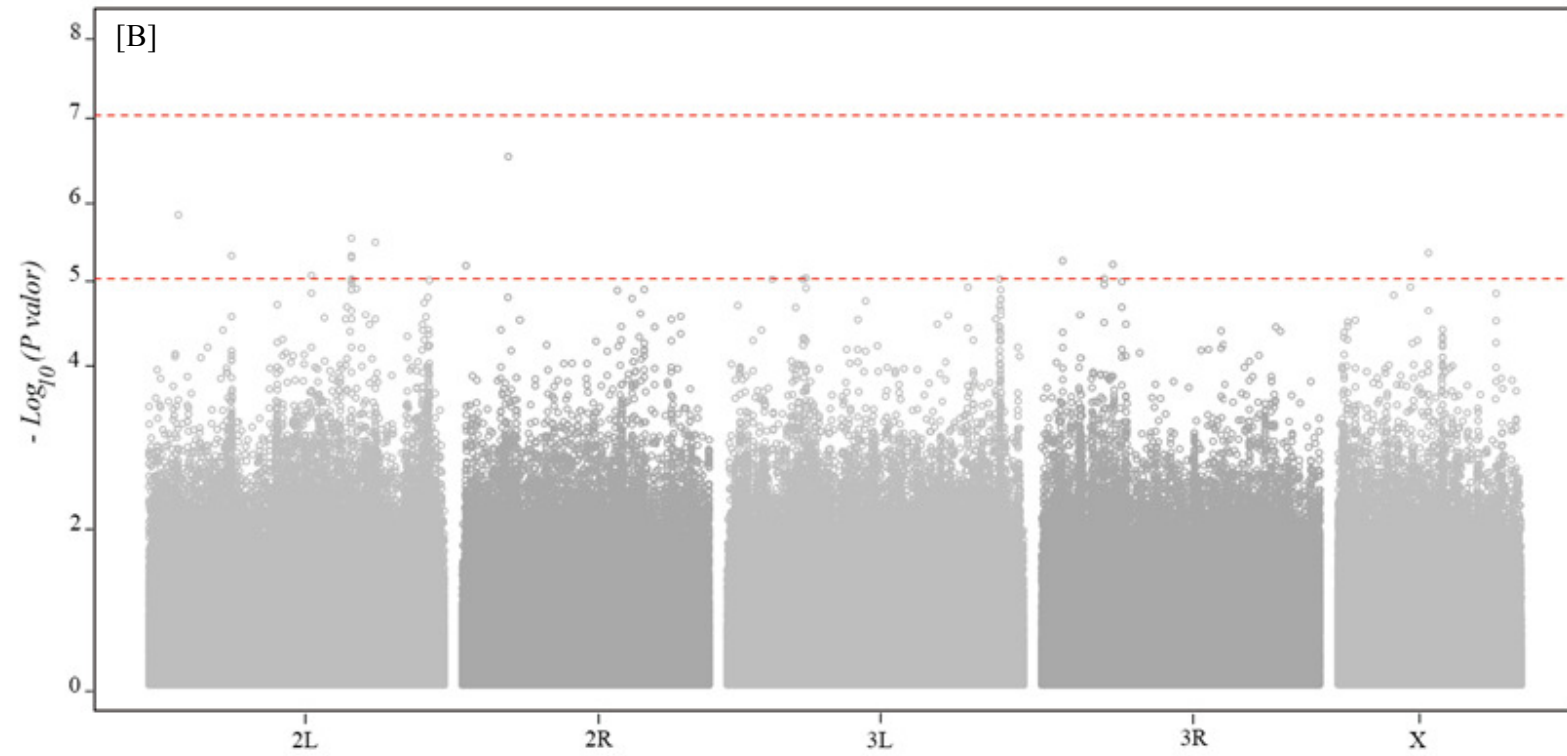
debe tenerse en consideración que las listas de genes incluyen solo aquellos que contienen polimorfismos que según los análisis de asociación están involucrados en la variación fenotípica del carácter. Esto implica que no estamos considerando los genes que no afectan la variación fenotípica pero que sí están involucrados en la manifestación del carácter y que podrían explicar las débiles correlaciones observadas.

B. Preferencia de oviposición (PO)

Para el análisis de los resultados de la PO realizamos 3 *GWAS*, uno para cada combinación de recursos ofrecida como sitios de oviposición, uva - naranja (UN) y uva - tomate (UT) y el restante para la interacción entre las dos combinaciones de recursos.

Del total de 149 polimorfismos significativamente asociados con la variación fenotípica de la PO (ver Anexo de resultados, tabla 4) 65 resultaron significativos para la combinación de recursos UN (Fig. 6 [A]), 13 para UT (Fig. 6 [B]) y los restantes 71 para la interacción entre las combinaciones de recursos (Fig. 6 [C]). Recordemos que en todos los casos se consideraron solo los polimorfismos con valor de $P \leq 1 \times 10^{-05}$ que contempla una FDR del 10% (Huang *et al.*, 2014). Cuando aplicamos la corrección de *Bonferroni*, encontramos P valores menores a 3.43×10^{-08} solamente para el *SNPs* 3R_4800216 (figura 6 [C]).





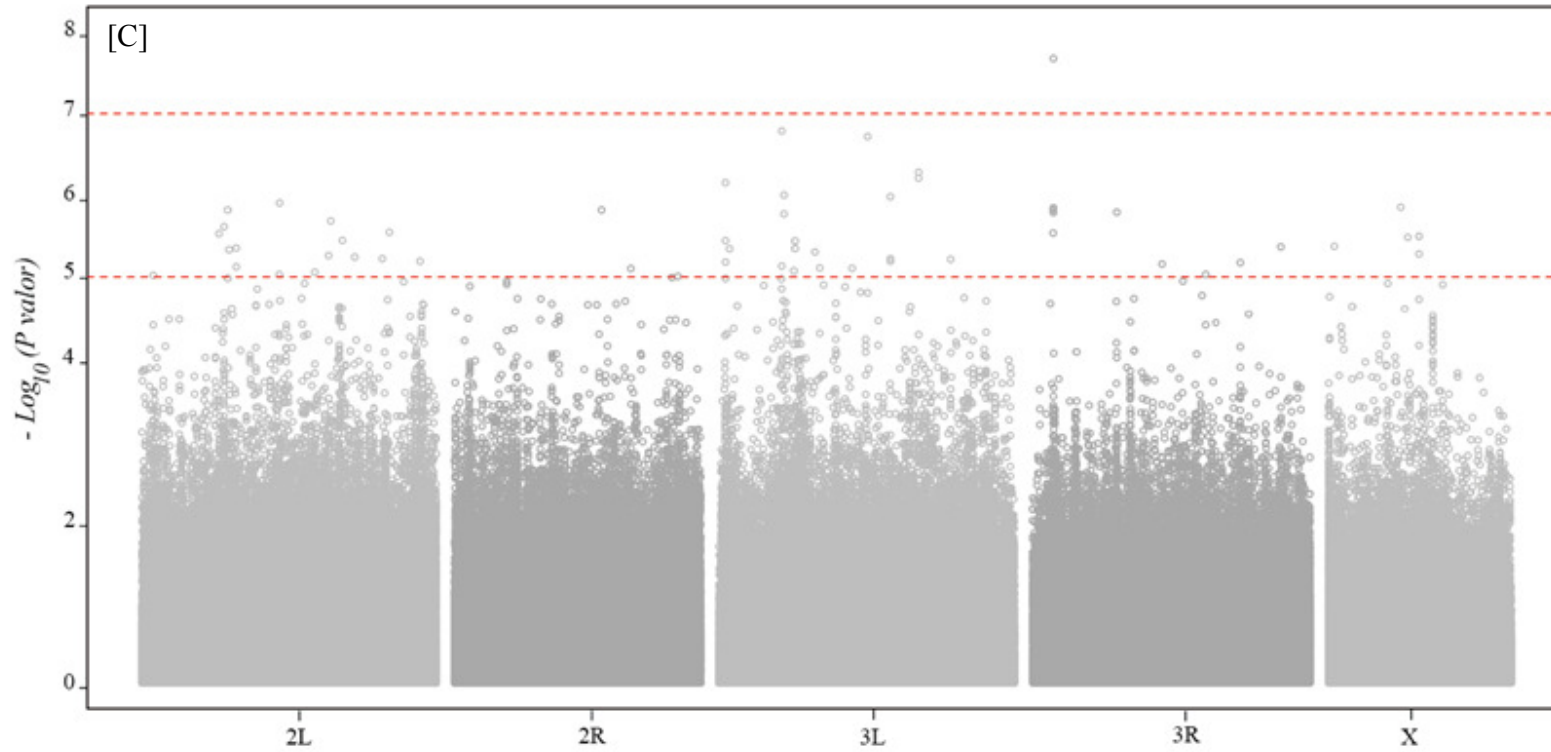


Figura 6. Gráficas Manhattan de los *GWAS* realizados para la PO. La primera línea punteada corresponde al *P* valor de corte consenso de las *DGRP* de 1×10^{-5} . La segunda línea de corte corresponde al *P* valor corregido por el método de *Bonferroni* de 3.43×10^{-8} . Cada punto representa un polimorfismo puesto a prueba durante el análisis de asociación. Se encuentran ordenados según su posición en el genoma. [A] *GWAS* para la combinación de recursos UN. [B] *GWAS* para UT. [C] *GWAS* para la interacción en las combinaciones UN y UT.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

Los gráficos *C-C* (figuras 7) muestran un buen ajuste entre las distribuciones de *P* valores observados y esperados. Por tanto, al igual que en los análisis de la AO, podemos considerar que las desviaciones observadas se encuentran dentro de los rangos normales esperados en este tipo de pruebas estadísticas (Mackay *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014). No obstante, en los casos que indican un exceso de *P* valores significativos (figura 7 [A] y figura 7 [C]) cabría esperar un enriquecimiento en falsos positivos, mientras que en los casos de deficiencia de *P* valores significativos (figura 7 [B]), la subestimación de asociaciones significativas podría deberse a la falta de potencia de la prueba.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

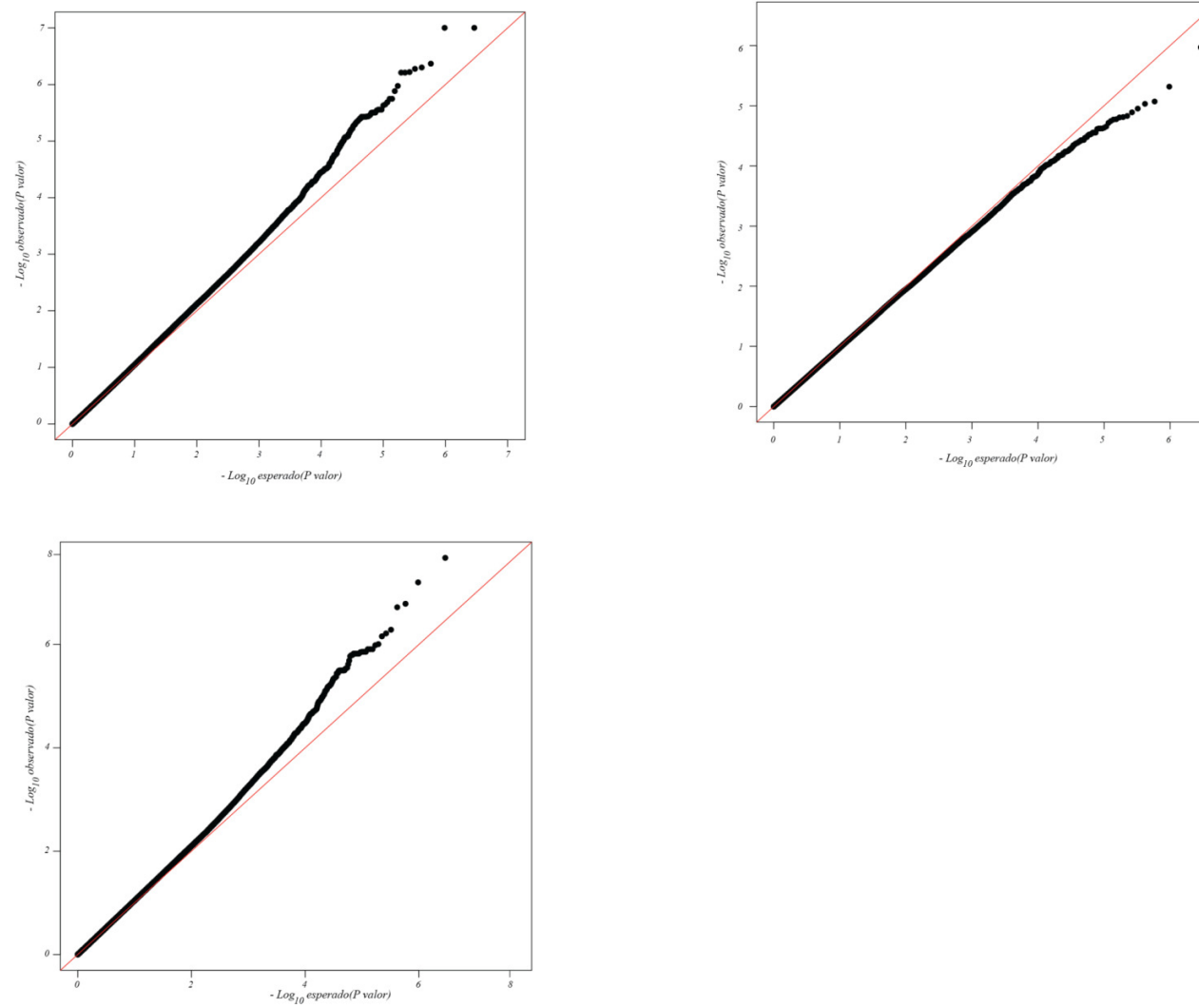


Figura 7. Graficas de los C-C correspondiente a los GWAS realizado para la PO. [A] GWAS para la combinación de recursos UN. [B] GWAS para UT. [C] GWAS para la interacción en las combinaciones UN y UT.

Efecto de los alelos de los polimorfismos sobre los valores fenotípicos de la PO

Con el fin de visualizar gráficamente el efecto de los distintos polimorfismos sobre el carácter estudiado, representamos la frecuencia del alelo minoritario (FAM) en función de su efecto medio para cada polimorfismo significativo en los *GWAS* para las dos combinaciones de recursos. El efecto medio se calculó como la diferencia entre las medias fenotípicas del IP de las líneas portadoras del alelo minoritario y del alelo mayoritario. Así un valor negativo del efecto medio indica que el IP de las líneas portadoras del alelo mayoritario es mayor que el de las líneas portadoras del alelo minoritario, mientras que si el efecto medio es positivo, el IP de las líneas portadoras de los alelos mayoritarios es mayor que el de las portadoras del minoritario. En este punto es necesario recordar que cuando el IP es positivo, el recurso de oviposición preferido es la uva, mientras que cuando es negativo la preferencia es mayor por el recurso alternativo. Entonces, un efecto medio positivo indica que las líneas portadoras del alelo minoritario tienen preferencia por la uva, mientras que un efecto medio negativo indica preferencias por el recurso alternativo.

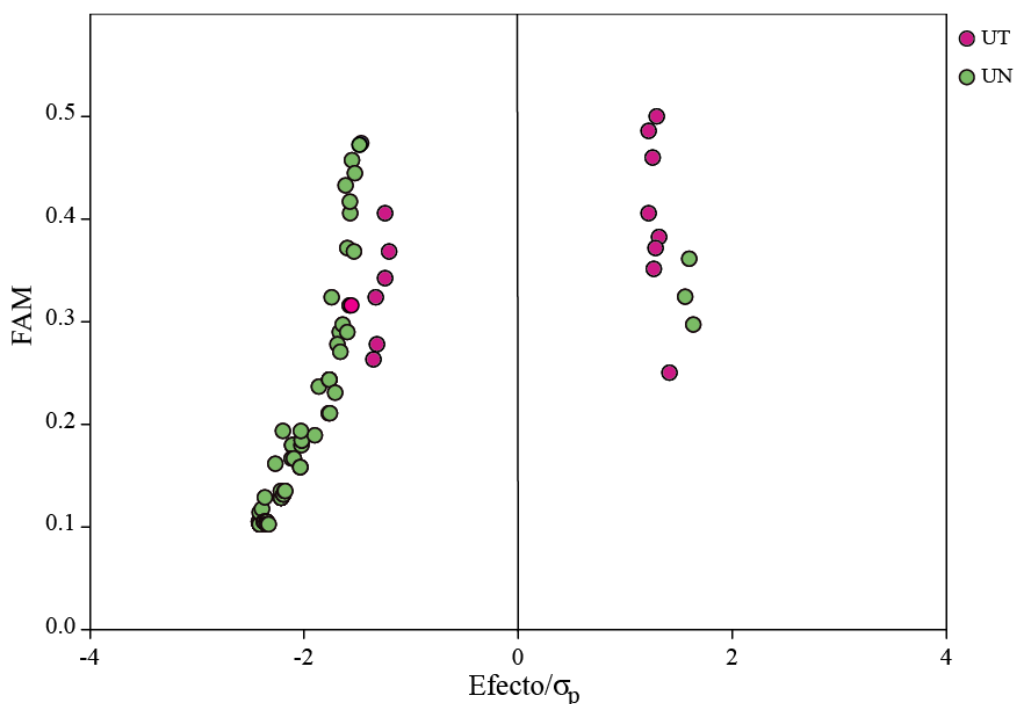


Figura 8. Frecuencia del Alelo Minoritario (FAM) en función del efecto medio del alelo minoritario estandarizado para la PO.

Encontramos alelos minoritarios con efecto medio negativo para 68 polimorfismos y solo 11 con efecto medio positivo. En la Tabla 5 se detalla la distribución de los efectos medios para las distintas combinaciones de recursos. Se observa que para la combinación UT, el porcentaje de alelos minoritarios con efecto positivo es aproximadamente igual que los de efecto medio negativo.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

En cambio, para la combinación de recursos UN encontramos que el 95% de los alelos minoritarios presentan un efecto medio negativo. El análisis estadístico reveló que estas diferencias son significativas ($\chi^2_1 = 25.64$, $P < 0.05$). Por tanto, podemos concluir que las líneas portadoras de los alelos minoritarios de los polimorfismos asociados a la PO exhibieron, en promedio, mayor preferencia por naranja mientras que las portadoras de los alelos mayoritarios prefirieron uva.

Tabla 5. Distribución de los efectos medios de los alelos sobre los fenotipos de los polimorfismos asociados con la PO para las distintas combinaciones de recursos ofrecidas. En paréntesis se dan los porcentajes.

COMBINACIÓN DE RECURSOS	EFEECTO POSITIVO	EFEECTO NEGATIVO
UN	3 (4.6%)	62 (95.4%)
UT	8 (57%)	6 (43%)

Clasificación de polimorfismos

En la figura 9 se representa en forma gráfica la distribución de los polimorfismos en las clases genómicas tomando los resultados de todos los 3 *GWAS* en conjunto. El 50 % de los polimorfismos ocurren en regiones genómicas que se transcriben, de los cuales el 36% en intrones mientras que el restante 14% en exones. De estos últimos solamente el 4% produce cambios no sinónimos en las proteínas que codifican. El 50% restante se distribuye entre regiones intergénicas, en regiones río arriba o río abajo de un gen conocido y en las regiones UTR.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

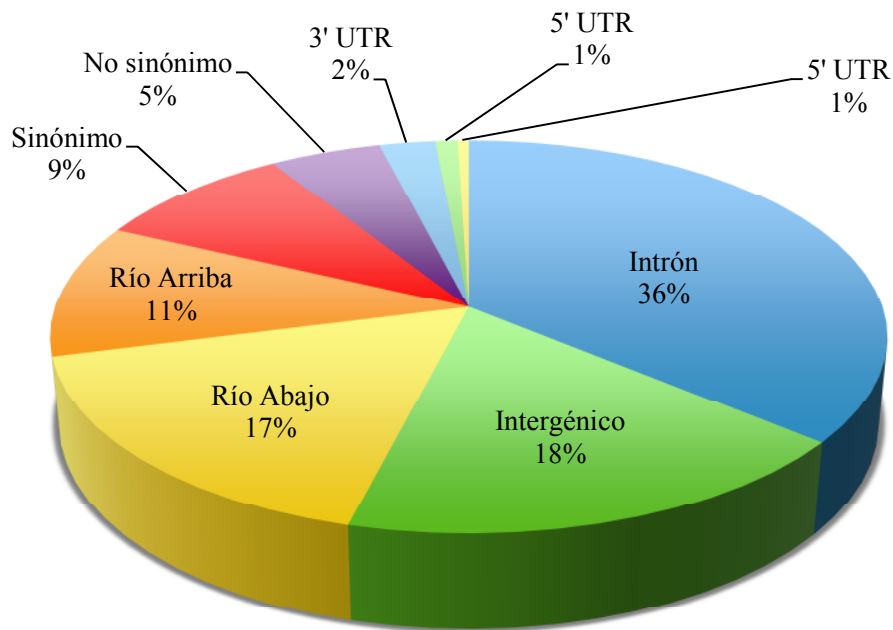


Figura 9. Porcentaje de clases genómicas para los polimorfismos significativos en los *GWAS* realizados para la PO.

También, analizamos el patrón de distribución de los polimorfismos significativos entre las clases genómicas para cada *GWAS* (Tabla 6). Para UN encontramos que la mayoría de los polimorfismos ocurren en intrones, seguido por las clases río arriba y río abajo del gen correspondiente. El porcentaje de polimorfismos en zonas codificantes y que provocan un cambio de aminoácido es de solo el 2%. En el caso de la combinación UT, nuevamente el mayor porcentaje de polimorfismos ocurre en intrones, seguido de los polimorfismos en zonas que se transcriben provocando un cambio sinónimo en el codón (14%). Debemos destacar que el porcentaje de cambios no sinónimos para este *GWAS* fue 8%, que representa una proporción considerable del total. Para los polimorfismos asociados a la interacción de recursos el mayor porcentaje se da en las clases intrónicas e intergénicas, con solo un 1% provocando cambios no sinónimos.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

Tabla 6. Distribución de porcentajes de frecuencia de los polimorfismos asociados a la variación en la *PO* en cada una de las clases genómicas para cada *GWAS*. UN corresponde a la combinación uva - naranja, UT a la combinación uva - tomate y UN-UT a la interacción de las combinaciones UN-UT.

CLASE GÉNOMICA	UN	UT	UN-UT	TOTAL
<i>Intergénico</i>	9%	8%	32%	18%
<i>Intrón</i>	29%	54%	42%	36%
<i>Sinónimo</i>	7%	14%	12%	9%
<i>No sinónimo</i>	8%	8%	1%	5%
<i>No codificante</i>	2%	-	-	1%
<i>Río Arriba</i>	18%	-	4%	11%
<i>Río Abajo</i>	26%	-	5%	17%
<i>3' UTR</i>	1%	8%	4%	2.5 %
<i>5' UTR</i>	-	8%	-	0.5 %
<i>TOTAL</i>	100%	100%	100%	100%

Genes Candidatos

A continuación, se presenta la lista de genes candidatos a participar de la arquitectura genética de la *PO* (Tabla 7) utilizando los mismos criterios que delineamos para la *AO*. De los 81 genes candidatos resultantes de nuestros análisis, 11 están asociados a la variación en la *PO* cuando la combinación de recursos es UT, 42 cuando la combinación de recursos es UN y 27 a la interacción de combinaciones de recursos.

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

Tabla 7. Lista de genes candidatos a participar de la arquitectura genética de la *PO* cuando se le ofrece como sustratos de oviposición a las combinaciones de recursos UN y UT. ID corresponde al número de identificación del gen en la base de datos *Flybase*. Nombre (símbolo) se refiere al nombre y símbolo, si corresponde, con el cual se conoce al gen. Ubicación Citológica corresponde a la banda citológica donde se encuentra el gen.

UT		
ID	NOMBRE (SÍMBOLO)	UBICACIÓN CITOLÓGICA
FBgn0027363	<i>Signal transducing adaptor molecule (Stam)</i>	32B2-32B3
FBgn0028546	<i>icarus (ics)</i>	34C6-34C6
FBgn0030367	<i>Cyp311a1 (Cyp311a1)</i>	11A2-11A2
FBgn0031424	<i>Vesicular glutamate transporter (VGlut)</i>	22E1-22E1
FBgn0031426	<i>CG18641</i>	22E1-22E1
FBgn0037655	<i>CG11984</i>	85C2-85C2
FBgn0043362	<i>blue cheese (bchs)</i>	26A1-26A1
FBgn0050015	<i>(CG30015)</i>	47C3-47C5
FBgn0053554	<i>Nipped-A (Nipped-A)</i>	41E1-41E3
FBgn0085420	<i>Dpr-interacting protein δ (DIP-δ)</i>	64D1-64D1
FBgn0263929	<i>javelin-like (jvl)</i>	88D3-88E3

UN		
ID	NOMBRE (SÍMBOLO)	UBICACIÓN CITOLÓGICA
FBgn0003134	<i>Protein phosphatase 1a at 96A (Pp1a-96A)</i>	96A5-96A5
FBgn0004426	<i>Lysozyme C (LysC)</i>	61F3-61F3
FBgn0004427	<i>Lysozyme D (LysD)</i>	61F3-61F3
FBgn0004797	<i>midway (mdy)</i>	36B1-36B2
FBgn0011569	<i>cannonball (can)</i>	67D12-67D12
FBgn0026439	<i>Excitatory amino acid transporter 1 (Eaat1)</i>	30A8-30A8
FBgn0031150	<i>bves</i>	19E7-19E8
FBgn0031746	<i>CG9029</i>	26A1-26A1
FBgn0032068	<i>Lysosomal α-mannosidase V (LManV)</i>	29F1-29F1
FBgn0032609	<i>CG13280</i>	36B1-36B1
FBgn0032614	<i>CG13284</i>	36B2-36B2
FBgn0032615	<i>CG6012</i>	36B2-36B2
FBgn0032819	<i>CG10463</i>	38A2-38A2
FBgn0032820	<i>fructose-1,6-bisphosphatase (fbp)</i>	38A2-38A3
FBgn0033236	<i>CG14764</i>	43F4-43F7
FBgn0033238	<i>ahuitzotl (azot)</i>	43F6-43F6
FBgn0033327	<i>PGRP-SC1b (PGRP-SC1b)</i>	44E2-44E2
FBgn0033668	<i>Expansion (exp) CG13188</i>	48D3-48D5
FBgn0035656	<i>CG10479</i>	65A1-65A2

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

FBgn0036287	<i>CG10663</i>	69C2-69C2
FBgn0036454	<i>CG17839</i>	70F7-71A1
FBgn0036789	<i>Allatostatin C receptor 2 (AstC-R2)</i>	75D1-75D1
FBgn0037698	<i>CG16779</i>	85D17-85D18
FBgn0039117	<i>twister (tst)</i>	95B1-95B1
FBgn0039118	<i>CG10208</i>	95B1-95B1
FBgn0039202	<i>CG13622</i>	96A5-96A5
FBgn0039758	<i>CG9737</i>	99E3-99E3
FBgn0039759	<i>CG9733</i>	99E3-99E3
FBgn0040261	<i>Ugt36Bb</i>	36B1-36B1
FBgn0047133	<i>Sarcolamban A (SclA)</i>	36B2-36B2
FBgn0051809	<i>CG31809</i>	36B2-36B2
FBgn0051810	<i>CG31810</i>	36B2-36B2
FBgn0053725	<i>CG33725</i>	69C2-69C2
FBgn0086673	<i>CG13272</i>	36B1-36B1
FBgn0259959	<i>Seminal fluid protein 26Ac (Sfp26Ac)</i>	26A1-26A1
FBgn0261565	<i>Limpet (Lmpt)</i>	73D5-73D6
FBgn0262580	<i>CG43120</i>	70D6-70D6
FBgn0262733	<i>Src oncogene at 64B (Src64B)</i>	64B11-64B12
FBgn0262814	<i>CG43185</i>	26A1-26A1
FBgn0264272	<i>multiple wing hairs (mwh)</i>	61F4-61F4
FBgn0264440	<i>CR43858</i>	36B2-36B2
FBgn0264695	<i>Myosin heavy chain (Mhc)</i>	36A8-36B2

INTERACCIÓN UN - UT

ID	NOMBRE (SÍMBOLO)	UBICACIÓN CITOLÓGICA
FBgn0004870	<i>bric a brac 1 (bab1)</i>	61E2-61F1
FBgn0023407	<i>B4</i>	34C3-34C4
FBgn0025777	<i>homer</i>	27A1-27A1
FBgn0026059	<i>Myosin heavy chain-like (Mhcl)</i>	89B2-89B3
FBgn0027084	<i>Lysyl-tRNA synthetase (Aats-lys)</i>	8F1-8F1
FBgn0031322	<i>CG5001</i>	21F2-21F2
FBgn0031725	<i>Dpr-interacting protein η (DIP-η)</i>	25F1-25F1
FBgn0032629	<i>beat-IIIc (beat-IIIc)</i>	36C2-36C4
FBgn0034817	<i>Arginine methyltransferase 7 (Art7)</i>	59C3-59C3
FBgn0035539	<i>slowdown (slow)</i>	64B3-64B4
FBgn0035558	<i>CG11357</i>	64B9-64B9
FBgn0037645	<i>CG11966</i>	85B8-85B9
FBgn0052423	<i>alan shepard (shep)</i>	64C8-64C11
FBgn0052683	<i>CG32683</i>	9C1-9C4

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

FBgn0085424	<i>nubbin (nub)</i>	33F1-33F1
FBgn0259176	<i>bunched (bun)</i>	33E5-33E9
FBgn0259735	<i>CG42389</i>	36A7-36A9
FBgn0260003	<i>Dystrophin (Dys)</i>	92A5-92A10
FBgn0261683	<i>CG42730</i>	26B7-26B8
FBgn0261697	<i>tectonic (tectonic)</i>	26B7-26B8
FBgn0262614	<i>polychaetoid (pyd)</i>	85B3-85B7
FBgn0262975	<i>cap-n-collar (cnc)</i>	94E4-94E7
FBgn0263707	<i>CG43659</i>	59C3-59C3
FBgn0264443	<i>CG43861</i>	38A8-38B1
FBgn0264475	<i>CR43883</i>	61D2-61D2
FBgn0264675	<i>CR43960</i>	11A2-11A4
FBgn0264691	<i>Lst8</i>	8F1-8F1

Análisis ontológico – funcional

Se analizó la distribución de los genes candidatos (11 para UT, 42 para UN y 27 para la interacción) entre los distintos términos de *GO* correspondientes a las categorías Proceso biológico (PB), Función molecular (FM) y Componente celular (CC) de acuerdo con sus anotaciones.

En el caso de la lista asociada a la combinación de recursos UT encontramos enriquecimiento en términos de *GO* para las categorías de PB y CC. Para la categoría PB encontramos enriquecimiento para el término *GO: 0023052* (*P* valor corregido por Benjamini-Hochberg $2,2 \times 10^{-02}$). Este término pertenece a un nivel general, y está relacionado con los procesos de señalización, es decir, todos procesos en los cuales se transmite información dentro de un sistema biológico. Los procesos de señalización empiezan con una señal activa y terminan cuando se produce la respuesta celular. Los genes involucrados son *icarus (ics)*, *blue cheese (bchs)*, *Nipped-A (Nipped-A)*, *Signal transducing adaptor molecule (Stam)* y *Vesicular glutamate transporter (VGlut)*.

Con respecto a la categoría CC encontramos enriquecimiento para dos términos emparentados: *GO:0045202* (*P* valor corregido por Benjamini-Hochberg 1.5×10^{-02}) y el término hijo *GO:0044456* (*P* valor corregido por Benjamini-Hochberg 1.84×10^{-02}). El primer término hace referencia a todos los procesos sinápticos, mientras que el segundo, se relaciona con los distintos componentes de los procesos sinápticos. Los genes asociados a ambos términos son *bchs* y *VGlut*.

bchs es un gen para el cual se ha descrito un transcripto con un solo polipéptido.. Resulto significativo en el *GWAS* para la combinación UT por el *SNP* sinónimo localizado en 2L:5918357. Este gen ha sido relacionado con la degeneración neuronal. Finley *et al* (2003) encontraron que moscas mutantes para *bchs* experimentan procesos neurodegenerativos debido a la acumulación de ubiquitina en sus neuronas.

VGlut se definió como gen candidato por el *SNP* 2L_2409741, que ocurre en la región 3' UTR. Para este gen se han definido 3 transcriptos y 3 polipéptidos. Sus productos génicos se han definido como neurotransmisores responsables de empaquetar el glutamato en las vesículas sinápticas. Se han encontrado ejemplos, de que la sobreexpresión de *VGlut* produce un aumento

CAPÍTULO III: SECCIÓN 1

en el tamaño de las vesículas sinápticas, lo cual desencadena procesos neurodegenerativos (Daniels *et al.*, 2004)

En el caso de la lista de genes asociada a la combinación de recursos UN, solo encontramos enriquecimiento de *GO* en la categoría de FM. El término de *GO* significativo fue Actividad catalítica (*GO:0003824*) con un *P* valor corregido por Benjamini-Hochberg de 1.53×10^{-02} . Este término se define como la catálisis de una reacción bioquímica a temperatura fisiológica. Por lo general las enzimas son proteínas encargadas de llevar a cabo la reacción, sin embargo, los ribosomas también pueden llegar a cumplir función enzimática. Dieciocho genes son los involucrados en este proceso (Tabla 8).

Tabla 8. Genes asociados al término de *GO* función enzimática. ID corresponde al número identificador de la base de datos *Flybase*. Funciones se refiere a los términos de *GO* de la categoría PB que tiene asociado el gen.

ID	SÍMBOLO	FUNCIONES
FBgn0004426	<i>LysC</i>	Respuesta humoral anti-microbial; Reproducción.
FBgn0004427	<i>LysD</i>	Respuesta humoral anti-microbial
FBgn0004797	<i>mdy</i>	Regulación apoptosis células nodrizas; Regulación negativa del almacenamiento de lípidos; Procesos de biosíntesis de triglicéridos; ovogénesis
FBgn0033327	<i>PGRP-SC1b</i>	Detección de bacterias; Procesos catabólicos peptidoglicanos; respuesta innata inmune; Respuesta de defensa.
FBgn0032615	<i>CG6012</i>	Procesos metabólicos
FBgn0032614	<i>CG13284</i>	Organización del ap. de Golgi; Procesos metabólicos; Fagocitosis; Regulación negativa de la proliferación celular.
FBgn0051810	<i>CG31810</i>	Procesos metabólicos de esteroides
FBgn0003134	<i>Pplalpha-96A</i>	Respuesta de defensa bacterias Gram negativas; desfosforilización; Regulación positiva de la respuesta inmune innata.
FBgn0040261	<i>Ugt36Bb</i>	Procesos metabólicos
FBgn0039758	<i>CG9737</i>	Fagocitosis; Proteólisis;
FBgn0032820	<i>fbp</i>	Procesos metabólicos
FBgn0036287	<i>CG10663</i>	Proteólisis
FBgn0039759	<i>CG9733</i>	Respuesta de defensa; Proteólisis
FBgn0032609	<i>CG13280</i>	-
FBgn0032819	<i>CG10463</i>	Procesamiento ARNt; Procesos de oxidación- reducción
FBgn0039117	<i>tst</i>	Regulación del splicing alternative del ARNm
FBgn0032068	<i>CG9466</i>	Procesos metabólicos de la manosa
FBgn0051809	<i>CG31809</i>	Procesos metabólicos de esteroides

Para la lista de genes asociados a la interacción entre la combinación de recursos UN-UT no encontramos enriquecimiento en términos de *GO*.

A continuación, analizamos como se conforma la red de interacción génica con el algoritmo *GeneMANIA*. Encontramos que los genes candidatos se encuentran interactuando entre sí por medio de interacciones de co-expresión, interacciones físicas e interacciones predichas en base a

la secuencia de los genes (Figura 10). Para los genes *CG343991*, *CG11966*, *tectonic*, *CG42730*, *Lmpt*, *Sfp26Ac*, *CG11165*, *jvl*, *CG9737*, *CG436559*, *CG6012*, *CG43185*, *PGRP-SC1b*, *mwh*, *LysC*, *AlCR2*, *beat-Il1c*, *LysD*, *CG42389*, *B4* y *CG43120* no se pudieron definir interacciones génicas de ningún tipo. No se encontraron subredes enriquecidas en términos de *GO* en este caso.

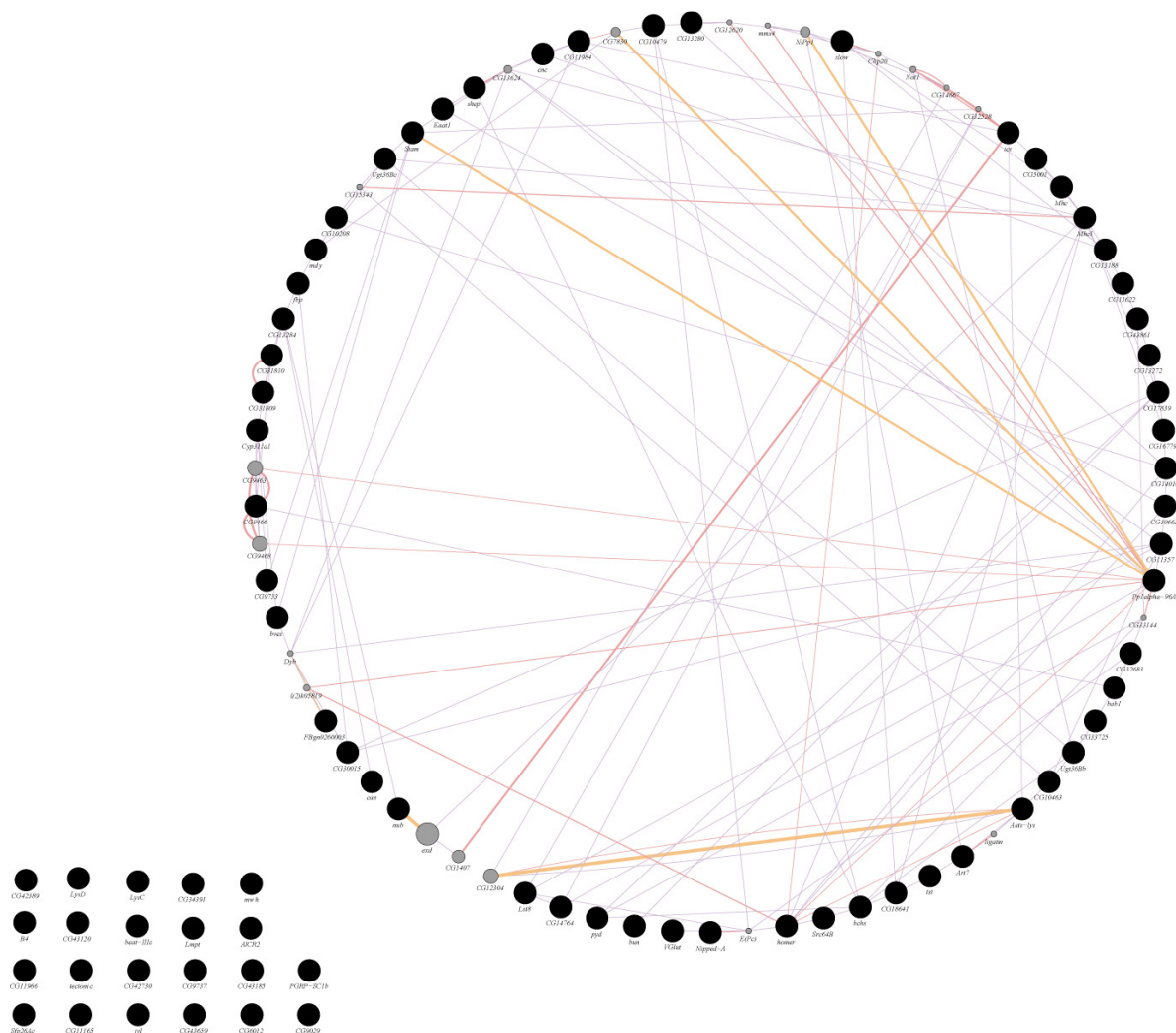


Figura 10. Esquema de la red de interacción génica. Las líneas violetas representan las interacciones de co-expresión, las líneas naranjas las de interacciones predichas en base a la secuencia y las líneas rosas a las interacciones físicas. En negro se representan los genes candidatos y en gris los genes que interactúan con los genes candidatos pero no resultaron significativos en los análisis de asociación.

Finalmente, realizamos el análisis de enriquecimiento en caminos metabólicos (*Kegg pathways*). Encontramos que la lista de genes candidatos está enriquecida en genes involucrados en el camino metabólico de síntesis del Retinol (*KEGG: 00830*) con un *P* valor corregido de 0.005 (Figura 11).

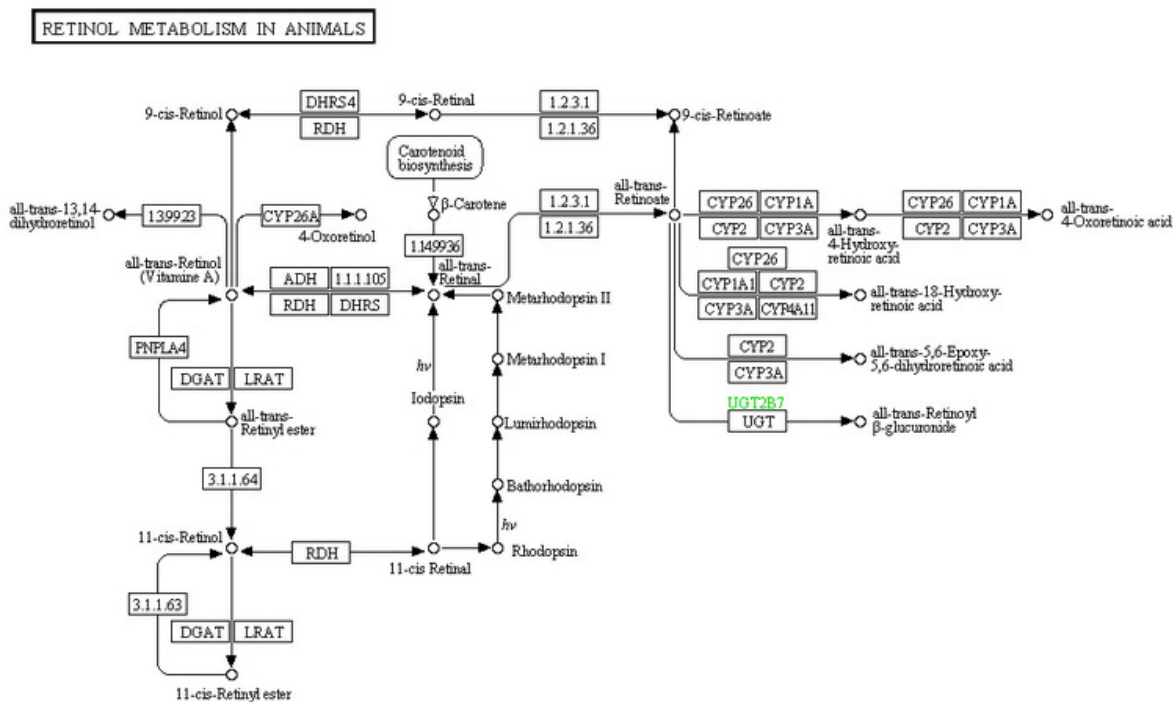


Figura 11. Esquema del camino metabólico del Retinol. Extraído de la página web del Kegg: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*.

Los genes asociados con este camino metabólico son *midway (mdy)* y *Ugt36Bb*, los cuales resultaron significativos en el *GWAS* realizado para la combinación de recursos UN.

mdy es un gen con 4 transcriptos y 4 proteínas descritas. Los *SNPs* 2L:16815760 y 2L:16815770 que ocurren río arriba (900 y 800 pares de bases respectivamente) del codón de iniciación de la transcripción son los que fueron significativos en el *GWAS*. Las funciones biológicas asociadas a este gen son regulación de la apoptosis de las células nodrizas; regulación negativa del almacenamiento de lípidos; procesos de biosíntesis de triglicéridos y ovogénesis. Las células nodrizas son importantes durante la ovogénesis, ya que estas son reservorio de los lípidos que luego van a ser transferidos a los ovocitos para proveerles la energía necesaria para su ulterior desarrollo (Kühnlein, 2012).

Lo que concierne a *Ugt36Bb* lo vamos a desarrollar más adelante en la sección II ya que este es uno de los genes elegidos para realizar las pruebas de validación funcional.

Superposición de polimorfismos y genes candidatos entre experimentos con diferentes combinaciones de recursos

Para finalizar, nos preguntamos al igual que para AO, si se encuentran polimorfismos y/o genes candidatos compartidos entre las distintas combinaciones de recursos ofrecidas. Al igual que para la AO no encontramos ni polimorfismos ni genes compartidos, que en este caso está en concordancia con lo esperado en base a los resultados de los análisis de correlaciones genéticas que se presentaron en la Sección II 2.4.2. Todo parecería indicar que las arquitecturas genéticas de las preferencias PO estimadas en los experimentos de doble elección UT y UN parecería ser independientes.

4. Conclusiones

En principio, los resultados de esta sección reflejan la complejidad de la arquitectura genética de los dos caracteres comportamentales estudiados. Tanto la AO como la PO son caracteres complejos y por definición se espera que su expresión se deba a la acción de muchos genes, que interactúan entre sí y que tienen un cierto grado de sensibilidad ambiental. Los *GWAS* revelaron 179 y 149 polimorfismos significativamente asociados con la variación fenotípica de la AO y la PO, respectivamente. Teniendo en cuenta solamente los polimorfismos que ocurren en regiones codificantes del genoma identificamos 187 genes candidatos implicados en el comportamiento de elección del sitio de oviposición.

Al analizar la anotación funcional de los genes candidatos encontramos en todos los casos, evidencia de alguna clase de relación entre los genes con aspectos directa o indirectamente relacionados con los caracteres en estudio. En el caso de la AO encontramos que la lista de genes candidatos se encuentra enriquecida en términos de *GO* relacionados con la fecundidad y con el desarrollo neuronal. Genes como *EcR* y *aliX* se encuentran involucrados en procesos relacionados con la fecundidad. *EcR* es receptor de la hormona *EcD* la cual junto con la hormona *JH* controla la formación y desarrollo del huevo, específicamente a través de la regulación de la vitelogénesis (Postlethwait y Handler, 1979; Jowett y Postlethwait, 1980), mientras que *aliX* es una proteína citosólica que interviene en la regulación del número de células germinales (Steen, 2013). Estos resultados son importantes, ya que el adecuado desarrollo de las células germinales, tiene implicancia directa en el desarrollo y supervivencia larval.

Por otro lado, los genes *cirl*, *fra* y *sdc* participan en procesos relacionados con el desarrollo neuronal. *Cirl* por ejemplo regula la secreción de neurotransmisores (Krasnopevov *et al.*, 2002), mientras que *Sdc* promueve el crecimiento de las terminales presinápticas (Johnson *et al.*, 2006). Finalmente *fra*, está involucrado en el establecimiento de las proyecciones axónicas retinales (Gong *et al.*, 1999). El desarrollo neuronal y el establecimiento de nuevas conexiones neuronales durante la elección y aceptación de un recurso de oviposición es un reflejo de la complejidad que subyace este comportamiento.

Para la PO encontramos que la lista de genes candidatos se encuentra enriquecida en funciones del camino metabólico del retinol. Para los insectos, el retinol o vitamina A es un compuesto molecular importante en la formación de los pigmentos visuales (Arikawa y Stavenga, 2014). En la literatura es posible encontrar ejemplos de la importancia que cobran los pigmentos visuales durante la fase de búsqueda y elección de los recursos en *Drosophila* (Paulk *et al.*, 2013; Lunau, 2014). El ojo compuesto de la mosca de la fruta se compone de aproximadamente unas 800 subunidades sensibles a la luz llamadas omatidios que se disponen espacialmente siguiendo en un patrón hexagonal. Cada omatidio se compone de 8 células fotoreceptoras y de 11 células accesorias. Las células fotoreceptoras se pueden clasificar en dos tipos: periféricas y centrales (Ver figura 12).

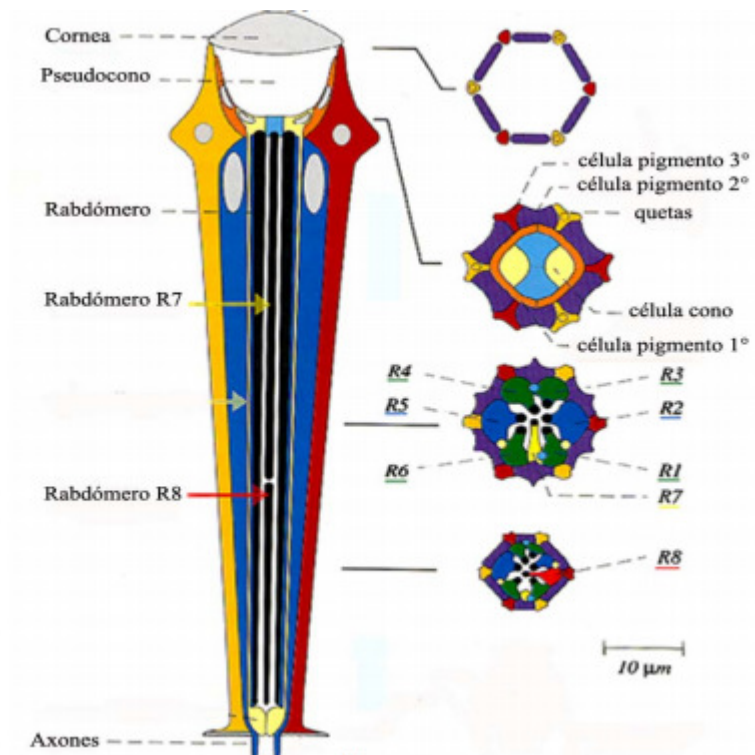


Figura 12. Ojo compuesto de *Drosophila*. Esquema de un omatidio. De distal a proximal se ubican la córnea y el pseudocono, las células de pigmento (1°, 2° y 3°), las quetas mecanosensoras y las células fotoreceptoras o rabdimeros (R1-R8). El R7 se encuentra en un plano más distal que el R8.

Las 6 células periféricas (R1 – R6) expresan un solo tipo de rodopsina (Rh1) y se encuentran involucradas en la detección del movimiento y la visión nocturna. En cambio, las 2 células centrales (R7 y R8) expresan más de un tipo de rodopsina (rh3, Rh4, Rh5 y Rh6) y se relacionan con la discriminación del color y de la visión diurna (Bate y Martinez, 1993; Lunau, 2014).

En la próxima sección, vamos a profundizar el estudio de los genes candidatos a partir de pruebas de validación funcional.

CAPÍTULO III

Sección 2

Pruebas de validación funcional

CAPÍTULO III: SECCIÓN 2

1. Materiales y métodos

El objetivo de los experimentos que se presentan en esta sección es aportar evidencia de la participación de los genes candidatos identificados en la sección anterior en la expresión fenotípica del comportamiento de oviposición a través de pruebas de validación funcional. Básicamente los ensayos consisten en comparar el fenotipo que presentan moscas mutantes para un determinado gen candidato con el fenotipo de moscas portadoras de una copia no mutada del gen (ver por ejemplo Mackay *et al.*, 2012, Jumbo - Lucioni *et al.*, 2012, Chow *et al.*, 2013).

Para llevar a cabo los ensayos se utilizaron por cada gen candidato puesto a prueba dos tipos de líneas de *D. melanogaster*, ambas isogénicas, es decir, homocigóticas para todos sus *loci* excepto para el gen en estudio. Una de las cepas es portadora de una inserción de un elemento transponible en el gen que se pone a prueba (línea mutante) en tanto que en la otra línea el gen candidato está libre de la inserción (línea control). La inserción del elemento transponible modifica la expresión y funcionalidad del gen en el cual ocurre (Figura 6 del Anexo metodológico). Las líneas mutantes y sus respectivos controles se obtuvieron del Bloomington *Drosophila* Stock Center (University of Indiana, EEUU) y forman parte del *Drosophila Gene Disruption Project* (Bellen *et al.*, 2011).

En las pruebas de validación la caracterización fenotípica de las líneas mutantes y sus controles se realizó utilizando la misma metodología y las mismas combinaciones de recursos que se usaron en los ensayos originales de PO (ver sección II y Anexo metodológico). Las pruebas de validación funcional se realizaron para cinco de los genes candidatos: *CG7112*, *Ugt36Bb*, *CG13188*, *CG31158* y *Vrp1*.

En total utilizamos 5 líneas mutantes y 2 tipos de líneas control (A y B). Por un lado, la línea control A se utilizó en los experimentos de validación de *Ugt36Bb*, *CG13188* y *Vrp1* dado que comparte con las líneas mutantes el mismo *background* genético. Las líneas mutantes para los genes *CG7112* y *CG31158* comparten también el mismo *background* con la otra línea control, que denominaremos control B. Se realizaron 5 réplicas por cada gen investigado y para cada combinación de recursos (UN y UT).

Los resultados se analizaron por medio de los contrastes de *Dunnnett* para identificar cuáles fueron las líneas mutantes que difirieron significativamente de su respectivo control. En estas pruebas si el fenotipo de la línea mutante se diferencia significativamente del fenotipo de la línea control permite concluir que el gen en cuestión, está participando de la expresión del carácter fenotípico, confirmando el resultado del *GWAS*.

2. Resultados

Los resultados de los contrastes de *Dunnnett* mostraron que existen diferencias significativas entre la línea control y las líneas mutantes de los siguientes genes candidatos: *Vrp1* ($P < 0.000009$), *Ugt36Bb* ($P < 0.046$) (Figura 12) y *CG7112* ($P < 0.000009$) (Figura 13).

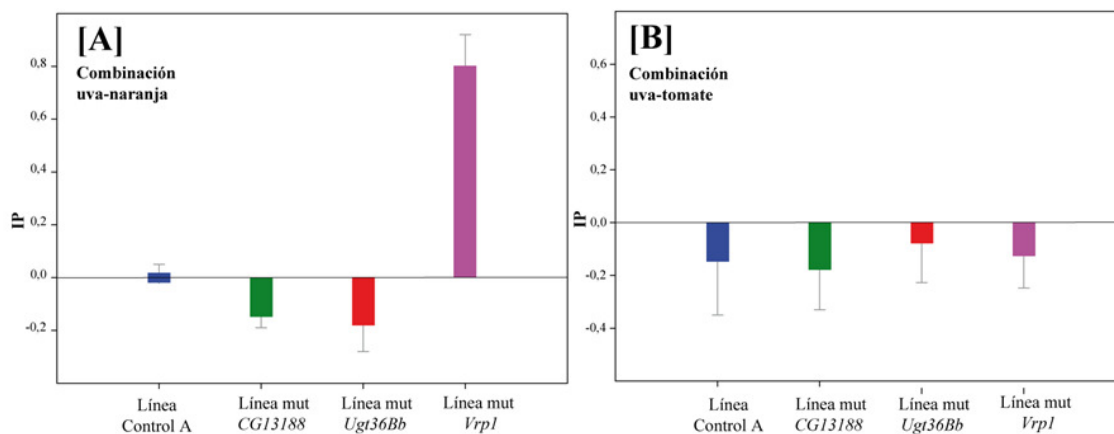


Figura 12. Valores medios y desvíos estándar del índice de preferencia (IP) para las líneas mutantes que comparten el control A en las combinaciones de recursos UN [A] y UT [B].

Dado que las líneas difieren únicamente en la presencia y localización del elemento transponible, estos resultados sugieren que *Vrp1*, *Ugt36Bb* y *CG7112* intervienen en la expresión de la PO, al menos para la combinación de recursos UN.

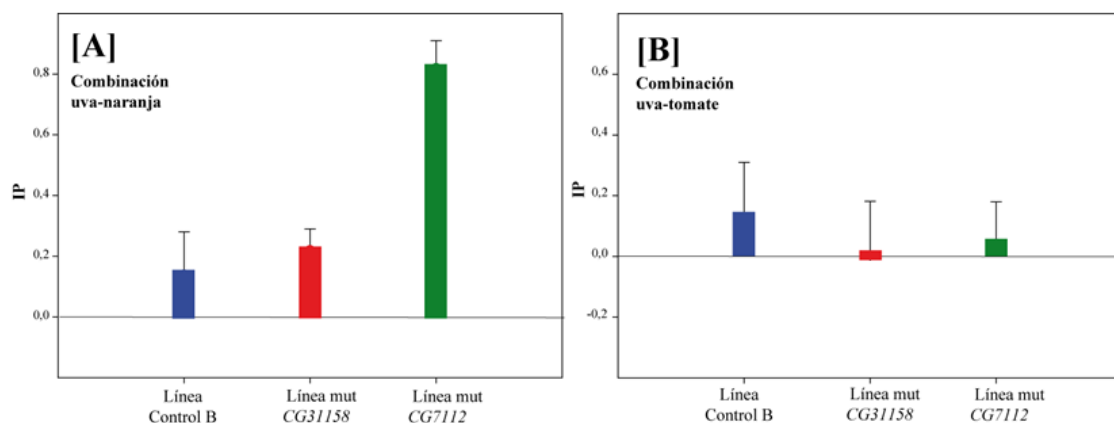


Figura 13. Valores medios y con sus desvíos estándar para el índice de preferencia (IP) para las líneas mutantes que comparten el control B en las combinaciones de recursos UN [A] y UT [B].

CAPÍTULO III: SECCIÓN 2

En cambio, el análisis de los resultados obtenidos en las pruebas de validación de *CG13188* y *CG31158* muestra que las diferencias con los respectivos controles (A y B, respectivamente) no son significativas para ninguna de las combinaciones de recursos. Sin embargo, no podemos afirmar que estos dos genes no participen de la expresión de la PO ya que el fondo genético de las líneas mutantes y las líneas control es el mismo que el de la cepa *Canton S* que es diferente al fondo genético de las líneas del *DGRP* que provienen de la población natural. Se sabe que las relaciones genéticas de dominancia y epistasia ejercen sus efectos sobre los fenotipos y son dependientes del fondo genético (Fox y Wolf, 2006; Hansen, 2006, Mackay, 2014). Idealmente, las pruebas de validación funcional deberían realizarse con mutantes de las líneas del *DGRP*, con el fin de poner a prueba la funcionalidad del gen candidato pero sabiendo que estamos conservando las mismas relaciones epistáticas y de dominancia que ocurren en las líneas no mutadas.

3. Conclusiones

En esta sección logramos obtener evidencia que apoya los resultados de las pruebas de *GWAS*. Mediante pruebas de validación funcional confirmamos que 3 de los 5 genes seleccionados de la lista de genes candidatos están involucrados en la arquitectura genética de la PO. Es importante destacar que es la primera vez que estos genes se relacionan con el comportamiento de oviposición en *Drosophila*.

Ugt36Bb es un gen de la familia enzimática *UGT* (uridinadifosfato glucuroniltransferasa) que previamente habíamos mencionado sin entrar en detalle debido a que forma parte del camino metabólico del retinol (sección 1). Las *UGTs* son una superfamilia de enzimas relacionadas con la inactivación y excreción de una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos (Huang *et al.*, 2008). Miembros de esta familia de enzimas se encuentran en animales, plantas, bacterias y virus. Particularmente en *D. melanogaster* se encuentran más de 30 genes de esta familia distribuidos a lo largo de los cromosomas 2 y 3 (Luque y O'Reilly, 2002). Las enzimas *UGT* catalizan la transferencia de un grupo *glicosil* hacia a una gran variedad de moléculas. Básicamente el mecanismo convierte moléculas hidrofóbicas en hidrofílicas, lo cual facilita su excreción. En insectos, las *UGTs* se encuentran involucradas, además de las vías metabólicas del retinol, en las vías de detoxificación de aleloquímicos, sustancias tóxicas de defensa producidas por las plantas y que los herbívoros incorporan a través de su dieta (Ahn *et al.*, 2012). Cuando la hembra de *Drosophila* elige un sitio de oviposición, además se alimenta de los microorganismos presentes en el sustrato y de los tejidos del fruto. Estos pueden contener una o varias sustancias tóxicas en distintas concentraciones. Por tanto podemos suponer que *Ugt36Bb* podría ser importante en el proceso de eliminación de sustancias tóxicas ingeridas durante su alimentación en los recursos elegidos por las hembras para oviponer. Asimismo, *Ugt36Bb* juega un papel importante en el proceso de formación de los pigmentos visuales, los cuales cobran importancia en el momento de la elección propiamente dicha del recurso de alimentación y oviposición, tal como explicamos en la sección anterior.

CG7112 o *GAPcenA* es un gen con dos transcriptos que forma parte de la familia de proteínas regulatorias *GAP* que son proteínas aceleradoras de la actividad *GTPasa* (Cuif *et al.*, 1999). Estas regulan la actividad de las proteínas *G*, las cuales actúan como transductores de señales en una gran variedad de procesos celulares como por ejemplo las señales de transducción transmembrana, los arreglos citoesqueléticos, el tráfico vesicular, el transporte núcleo – citoplasma, etc. Particularmente la función de las *GAP* es silenciar la actividad de las proteínas *G* por medio de la hidrólisis del *GTP* unido a la proteína *G* (forma activa), dando como resultado un *GDP* unido a la proteína *G* (forma inactiva). En base a esta información, podemos suponer que *GAPcenA* cumpliría un papel regulador dentro de la arquitectura genética de la PO, silenciando a las proteínas *G*.

Finalmente *Vrp1* es un gen con 12 transcriptos que forma parte de la familia de proteínas de unión a los filamentos de actina llamada *verprolin*. Se ha relacionado a *Vrp1* con una gran variedad de procesos biológicos como la regulación de la forma celular, la fusión de los mioblastos, el desarrollo del músculo visceral, el desarrollo de la espermatina, la organización de los filamentos de actina, regulación de la polarización de los filamentos de actina, la respuesta comportamental al etanol, etc (Kong *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta, que el etanol es uno de los compuestos que se generan en los sustratos en descomposición por acción de las bacterias y levaduras, podemos

CAPÍTULO III: SECCIÓN 2

suponer que *Vrp1* podría estar involucrado en la toma de decisiones durante la oviposición a través del censado de la cantidad de alcohol presente en el recurso

No podemos finalizar esta sección sin antes discutir la elección de los genes puestos a prueba en estas pruebas de validación. En la Tabla 9 se listan los valores de *P* obtenidos para cada uno de los polimorfismos asociados a los genes candidatos.

Tabla 9. Genes y polimorfismos candidatos con sus respectivos *P* valores de asociación en el *Freeze 1.0* y *Freeze 2.0*. Los *P* valores que se informan para *CG7112* y *Vrp1* corresponden a la combinación UT mientras que para el resto de los genes los *P* valores corresponden a la combinación UN.

GEN	POLIMORFISMO	<i>P</i> <i>freeze 1.0</i>	<i>P</i> <i>freeze 2.0</i>
<i>CG31158</i>	3R_18423939	5.07×10^{-06}	1.61×10^{-04}
<i>Ugt36Bb</i>	2L_16797835	1.95×10^{-08}	9.96×10^{-08}
<i>Ugt36Bb</i>	2L_16798087	2.60×10^{-09}	9.96×10^{-08}
<i>CG7112</i>	3L_8342981	3.93×10^{-06}	3.97×10^{-04}
<i>CG7112</i>	3L_8344736	5.07×10^{-06}	7.53×10^{-05}
<i>CG13188</i>	2R_7847821	5.89×10^{-06}	4.67×10^{-06}
<i>CG13188</i>	2R_7851846	9.40×10^{-07}	3.46×10^{-05}
<i>CG13188</i>	2R_7851863	5.38×10^{-06}	3.46×10^{-05}
<i>Vrp1</i>	2R_18002648	5.23×10^{-05}	1.25×10^{-04}
<i>Vrp1</i>	2R_18002653	5.23×10^{-05}	1.25×10^{-04}

Recordemos que en la sección I de este capítulo, hemos utilizado la base de datos correspondiente al *freeze 2.0* para correr los GWAS y hemos usado un *P* de 1×10^{-05} como valor de corte. Si observamos en la Tabla 9 los *P* valores de los polimorfismos asociados a los genes *CG31158*, *CG7112* y *Vrp1* son mayores que el *P* valor de corte usado. Sin embargo, estos genes fueron incluidos en las pruebas de validación funcional debido a que fueron significativos en los GWAS realizados utilizando la primer versión de la base de datos del DGRP denominada *Freeze 1.0*. En aquella corrida los *P* valores de los polimorfismos sí estuvieron por encima de la línea de corte, por tanto los consideramos como polimorfismos significativos y a los genes asociados a ellos como candidatos. Sin embargo, al correr los datos con la versión *Freeze 2.0* nos encontramos con que los polimorfismos asociados a *CG31158* y *CG7112* exhibieron valores de *P* levemente mayores a los registrados con el *freeze 1.0*. La diferencia entre las dos bases de datos, es que en la segunda se tienen en cuenta los efectos del genotipo para las inversiones cromosómicas que segregan en la población natural y el status de infección por *Wolbachia* sp. de las líneas del DGRP. Por lo cual, al tener en cuenta estos efectos, los análisis de asociación se volvieron más conservativos (Huang et al. 2014) y algunos de los polimorfismos que considerábamos significativos dejaron de serlo.

Con respecto al gen *Vrp1*, este gen tomó valores de *P* mayores al valor de corte consenso tanto en el *Freeze 1.0* como en el *Freeze 2.0*. En este caso su elección se debió a que además de poner a

CAPÍTULO III: SECCIÓN 2

prueba la funcionalidad de los genes en el carácter, nos interesó también investigar el enriquecimiento de asociaciones reales sobre y por encima del valor de corte consenso.

CAPÍTULO III

Sección 3

Pruebas de complementariedad

1. Materiales y métodos

Las pruebas de complementación génica son ensayos fenotípicos independientes en los cuales además de poner a prueba la participación del gen candidato en la expresión del carácter cuantitativo, se pone a prueba el efecto de las distintas variantes alélicas del gen sobre el fenotipo.

Realizamos pruebas de complementación génica para el gen candidato *Twister* (*tst*). En este gen se detectaron 3 *SNPs* en las posiciones 3R:19596643, 3R:19598056 y 3R:19598278 que mostraron asociaciones significativas con la variación en la PO para la combinación de recursos uva-naranja. De las ocho combinaciones haplotípicas posibles (no olvidar que se trata de líneas altamente homocigóticas) entre las variantes mayoritarias y minoritarias de estos *SNP* se detectaron, entre las líneas analizadas, solo 3 combinaciones: CAA/CAA, AGC/AGC y CGC/CGC (agrupados según orden creciente en la ubicación en el genoma). En el primer genotipo (CAA/CAA) todas las bases corresponden a las variantes minoritarias de los tres *SNPs*, en el segundo (AGC/AGC) las variantes mayoritarias están presentes en las tres posiciones y en el último (CGC/CGC), la primera base corresponde al alelo minoritario mientras que las restantes a los mayoritarios de cada sitio polimórfico.

La metodología de los ensayos de complementación se basó en tomar a la línea mutante para el gen candidato *tst* y realizar cruzamientos independientes con 3 líneas del *DGRP* portadoras de las tres combinaciones genotípicas de los *SNPs* de interés (ver esquema de cruzamientos, figura 14). La línea mutante utilizada es hemicigótica para la inserción del elemento *P* Mi{ET1} que interrumpe la secuencia de *tst* (Nº de stock 19100 en Bloomington *Drosophila* Stock Center) y forma parte del *Drosophila Gene Disruption Project* (Bellen *et al.*, 2011). Por convención al alelo de *tst* que lleva el elemento *P* lo denominamos *mutante* (*m*) y al alelo sin elemento *P* *salvaje* (*s*) cuyo efecto se considera dominante respecto de *m*. Las 3 líneas del *DGRP* elegidas para realizar los cruzamientos y sus genotipos para los *SNPs* implicados son: RA517: CAA/CAA, RA799: AGC/AGC y RA208: CGC/CGC.

CAPÍTULO 3: SECCIÓN 3

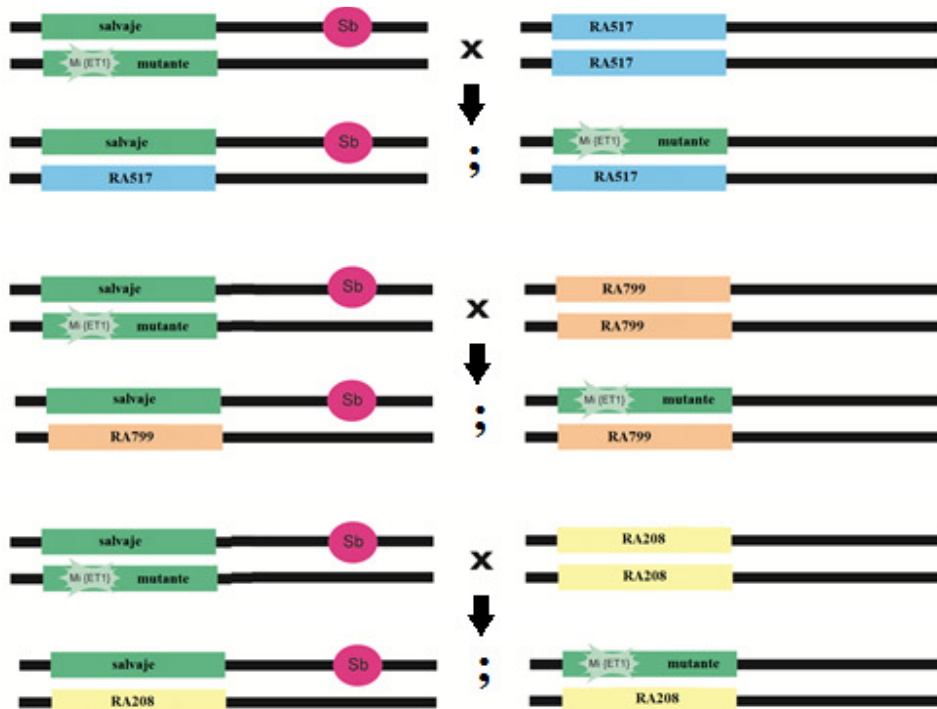


Figura 14. Esquema cruzamientos entre la línea mutante para el gen *tst* y las líneas del *DGRP*. Sb indica al marcador fenotípico dominante *Stubble*. Mi {ET1} corresponde al tipo de elemento *P*. salvaje hace referencia al alelo del gen *tst* sin elemento *P* y mutante al alelo del gen *tst* con elemento *P*. RA517, RA799 y RA208 corresponden a las líneas del DGRP utilizadas. Cada una de ellas posee un genotipo distinto para el gen *tst*. Genotipo línea mutante *w*[1118]; Mi{ET1}*tst*[MB10212]/TM6C, Sb[1].

Como resultado de los tres cruzamientos se obtienen 6 tipos de descendientes heterocigóticos con los siguientes genotipos: *s*/RA517, *m*/RA517, *s*/RA799, *m*/RA799, *s*/RA208, *m*/RA208. Como lo muestra la figura 14, en la progenie es posible diferenciar las moscas portadoras del alelo *m* de las portadoras de *s*, ya que el marcador fenotípico dominante *Stubble* (*Sb*) co-segrega con el cromosoma portador de *s*. Es decir que todos los descendientes con haplotipo *s*/RAxxx tienen fenotipo *Sb* y los descendientes con haplotipo *m*/RAxxx tienen fenotipo *salvaje* para la forma de las quetas. Las quetas de las moscas con fenotipo *Sb* tienen forma de maza y son de menor tamaño que las quetas de las moscas salvajes (Figura 15).

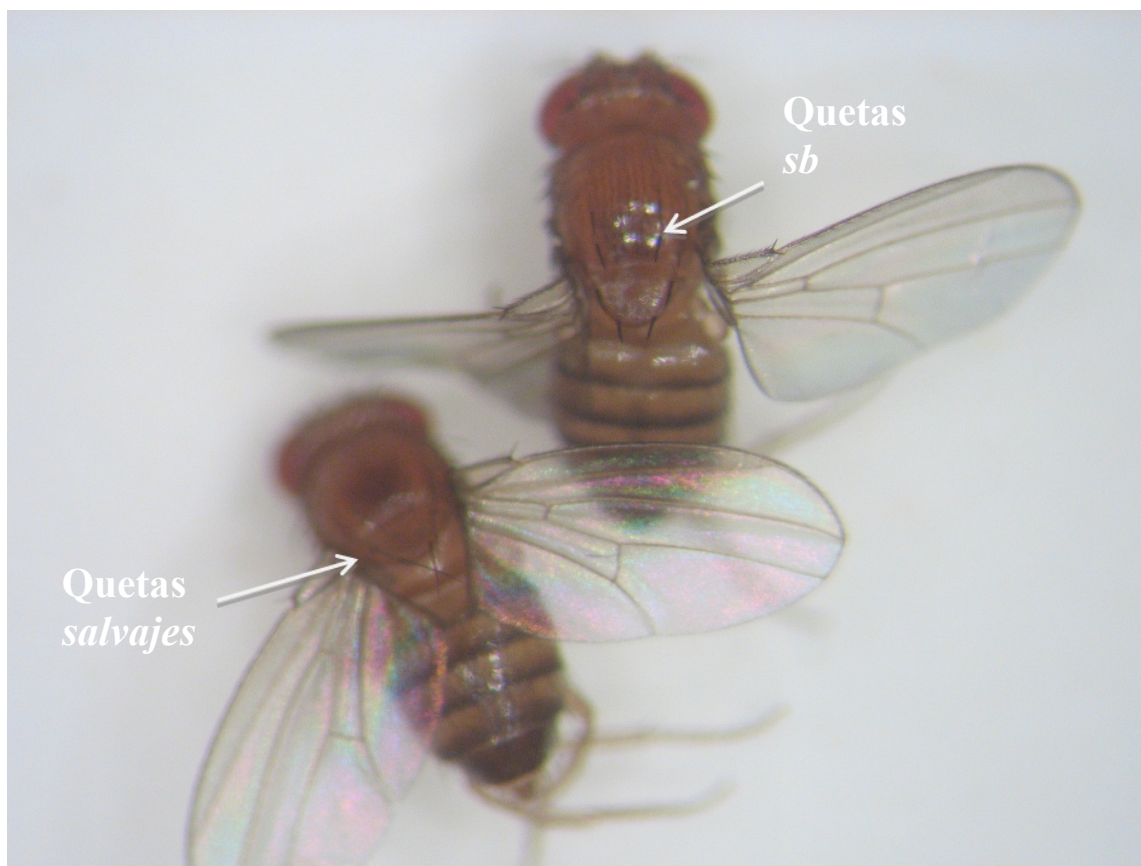


Figura 15. A la izquierda mosca F1 con fenotipo *salvaje* para la forma de las quetas. A la derecha mosca F1 con fenotipo *sb*. Las flechas señalan la posición de las quetas.

Una vez alcanzada la cantidad de descendientes necesaria de los 6 tipos posibles de descendientes, se procedió a medir la PO para la combinación de recursos UN siguiendo el mismo protocolo descrito en la Sección II (Anexo metodológico). Las moscas utilizadas fueron hembras y machos de 4 o 5 días de edad y hasta el momento del inicio de los ensayos fenotípicos, se mantuvieron en medio standard en una cámara de cría bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 1 °C), humedad (60 - 70%) y fotoperiodo (12:12 hs. luz/oscuridad).

Los resultados se analizaron por medio de un ANOVA de dos factores según el siguiente modelo:

$$y = \mu + L + G + LxG + e,$$

donde Y es el índice de preferencia, μ la media poblacional, L el factor fijo línea con 3 niveles (RA517, RA799 y RA208), G el factor fijo genotipo con 2 niveles (s y m), LxG la interacción Línea x Genotipo y e el error. Una interacción LxG significativa sería indicativa de una falla en la complementación genética, la cual se podría explicar por *i)* alelismo, es decir, la mutación deja al descubierto los alelos con diferentes efectos en el carácter de interés o *ii)* interacciones entre el gen candidato y otros genes que también afectan al carácter, es decir, por cambio en las relaciones

CAPÍTULO 3: SECCIÓN 3

epistáticas (Mackay, 2001a, 2004, 2009, Fanara *et al.*, 2002, Anholt y Mackay, 2004). Es fundamental resaltar que en ambos casos la conclusión es la misma: se confirma que el gen está involucrado en la variación natural del carácter y actúa de forma directa por alelismo o indirecta por epistasis.

Las diferencias entre los niveles del factor L se pusieron a prueba a través de contrastes *a posteriori* utilizando el método de *Tukey*.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas *InfoStat* versión 2013 (Di Rienzo et al. 2013) y *Statistica* versión 8.0 (StatSoft Inc. 2007).

CAPÍTULO 3: SECCIÓN 3

2. Resultados

Los resultados del ANOVA utilizado para evaluar las pruebas de complementación génica para el gen candidato *tst* muestran que los factores principales (*L* y *G*) y la interacción *LxG* fueron significativos (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados del ANOVA de dos factores para la prueba de complementación génica del gen candidato *tst*. *** *p* valor < 0.000, ** *p* valor < 0.03, * *p* valor < 0.01

FV	GL	SC	CM	F
<i>L</i>	2	0.575	0.288	12.043 ***
<i>G</i>	1	0.121	0.121	5.072 **
<i>LxG</i>	2	0.247	0.124	5.183 *
<i>error</i>	24	0.573	0.024	

Estos resultados indican que existen diferencias en la preferencias por los sitios de oviposición entre: *i*) las 3 líneas portadoras de haplotipos diferentes a nivel de los SNPs de *tst* (factor *L*) y *ii*) entre los genotipos *m/RAXXX* y *s/RAXXX* (factor *G*). A su vez, la interacción *LxG* indica que las diferencias en la preferencia por uva o naranja entre los genotipos no fueron independientes del haplotipo de *tst* (las diferentes líneas).

En la figura 16 se presentan los valores del IP obtenidos para cada uno de los 6 genotipos en los tres cruzamientos realizados.

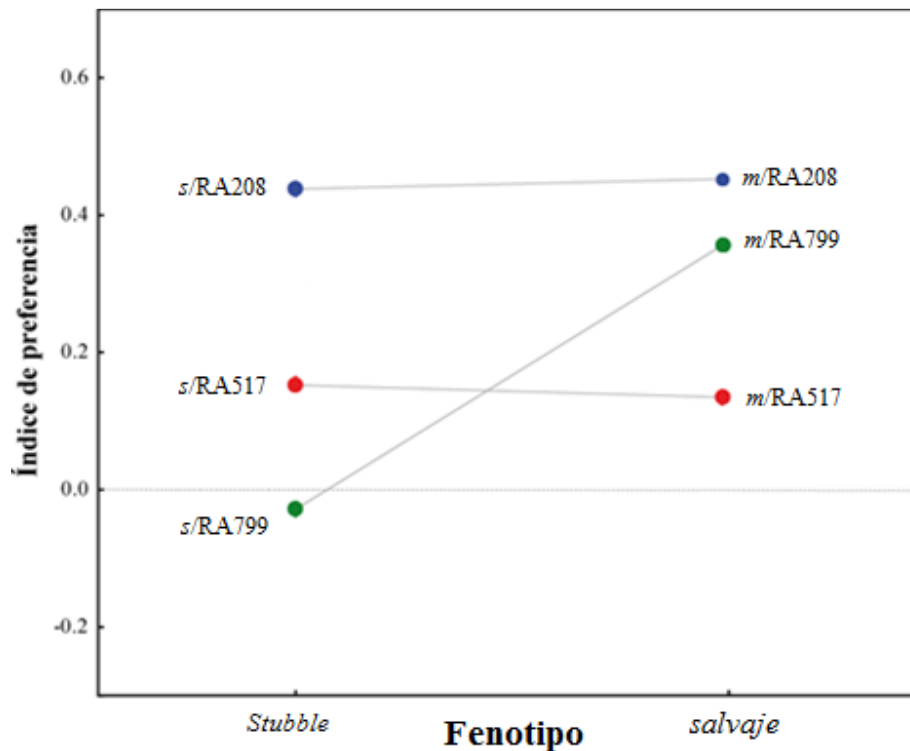


Figura 16. Normas de reacción para los resultados de la prueba de complementación génica para el gen candidato *tst*. Cada línea representa la F1 del cruzamiento entre una línea perteneciente al *DGRP* y la línea mutante para *tst*.

En el caso de las líneas RA208 y RA517 (figura 16) no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos *s*/RA208 vs. *m*/RA208 y *s*/RA517 vs. *m*/RA517 (Comparaciones de *Tukey*, $P > 0.05$). Recordemos que en los genotipos *m*/RAxxx solo se expresa el alelo de *tst* de las líneas RAxxx ya que la inserción del elemento *P* en el gen afecta su normal expresión. De este modo, la ausencia de diferencias fenotípicas entre los genotipos salvaje y mutante en las líneas RA208 y RA517 sugiere que el efecto del alelo de *tst* proveniente de las líneas *DRGP* (208 y 517) es dominante respecto al alelo libre de inserciones aportado por la línea 19100 del *Bloomington Drosophila Stock Center*. En cambio, las hembras resultantes del cruzamiento en el que se utilizó como parental a la línea RA799 sí presentaron diferencias para el valor del IP (Figura 16). En efecto, el valor del IP de las hembras *s*/RA799 (-0.03 ± 0.06) fue significativamente menor que el de las hembras *m*/RA799 (0.36 ± 0.04). Estos resultados apuntan a que el efecto del alelo aportado por RA799 no es independiente del alelo homólogo, *m* o *s* con el cual está combinado en cada uno de los genotipos analizados. Recordemos que el haplotipo de *tst* de la línea RA799 para los *SNPs* significativos es AGC/AGC. Este genotipo es la combinación de todas las variantes mayoritarias de los *SNPs* significativos y se diferencia de los otros 2 genotipos en que es el único que posee la variante mayoritaria (A) para el primer *SNP*. Esto nos sugiere que las diferencias en la preferencia de oviposición para la línea con parental RA799 podrían ser explicadas por la diferencia en un único *SNP*.

3. Conclusión

Los resultados de esta sección, además de confirmar que *tst* participa de la expresión de la PO, nos permiten verificar y cuantificar el efecto de las variantes alélicas sobre el fenotipo. Encontramos que las distintas combinaciones de las variantes alélicas tienen un efecto medible sobre el fenotipo. *twister* (*tst*) es un gen con un solo transcripto descrito que ha sido asociado con la regulación del *splicing* alternativo del ARN (Seago *et al.*, 2001). *tst* se consideró como gen candidato a participar de la expresión de la PO debido a tres *SNPs* que mostraron efectos significativos en el *GWAS* para la combinación de recursos UN. Con respecto a los polimorfismos, el primer *SNP* ocurre en la posición 3R:19596643 y provoca un cambio sinónimo en la tercer base de un codón que codifica treonina, que es un aminoácido neutral y polar. El segundo *SNP* ocurre en 3R:19598056 y provoca al igual que el anterior, un cambio sinónimo en la tercer base de un codón que codifica fenilalanina, que también es no polar y neutral. Finalmente, el tercer *SNP* que es el único que implica un cambio no sinónimo ocurre en el sitio 3R: 19598278. En este caso la variante mayoritaria (C) es la tercera base de un codón que codifica leucina mientras que la minoritaria (A) implica una sustitución por un codón que codifica fenilalanina.

Los resultados de las pruebas de complementación nos indican que el *SNP* en 3R:19596643 es el único que explicaría los efectos fenotípicos observados. Que sea este polimorfismo, que implica una sustitución sinónima, el único que nos permite confirmar el papel de *tst* en la PO es llamativo ya que su efecto fenotípico no podría explicarse por un cambio en la estructura primaria de la proteína que codifica. Sin embargo, resultados recientes podrían ayudarnos a explicar este aparente dilema. Recientemente, se reportó que los codones además de codificar para un cierto aminoácido pueden especificar sitios de regulación de los factores de transcripción. En efecto, en humanos se ha reportado que un 17% de los *SNPs* que provocan cambios sinónimos ocurren en codones que se han dado en llamar duones por su doble funcionalidad (Stergachis *et al.*, 2013). Por lo tanto, los polimorfismos sinónimos, que no tienen efecto sobre la estructura primaria de las proteínas, podrían adquirir importancia funcional en la regulación de la expresión de los genes a los cuales codifican.

4. Conclusiones Generales

En este capítulo hemos presentado los resultados de los análisis de asociación fenotipo – genotipo (*GWAS*) para la aceptación (AO) y la preferencia por los sitios de oviposición (PO) en las líneas del *DGRP*. Se detectaron polimorfismos que afectan significativamente la AO y la PO. La mayoría de estos polimorfismos ocurren en regiones intergénicas o en intrones de genes, mientras que los que ocurren en exones y, además, producen cambios a nivel de la secuencia de aminoácidos en los transcriptos que codifican son solo una pequeña minoría. Identificamos varios genes candidatos a participar de la arquitectura genética de la AO y la PO y realizamos la validación funcional de 5 de estos genes candidatos y, finalmente, pusimos a prueba el efecto sobre el fenotipo de tres *SNPs* que segregan para uno de los genes candidatos. Encontramos evidencia que indica que tres de los cinco genes evaluados mediante las pruebas de validación participan de la expresión fenotípica de la PO. Asimismo, mediante pruebas de complementación no solo confirmamos el efecto de la variación a nivel de un gen (*tst*) sobre la PO, sino que también pudimos establecer que solo uno de los tres *SNPs* de *tst* significativos en el *GWAS* permite explicar una porción importante de la variación en la preferencia de oviposición.

Finalmente, en el próximo capítulo de la tesis vamos a completar el estudio de la AO y la PO a través de los análisis de asociación entre la variación fenotípica y la variación en los niveles de transcripción.

CAPÍTULO IV

*Arquitectura genética de la Aceptación y
Preferencia de sitios de oviposición:
Asociación entre la variación fenotípica y
los niveles de transcripción*

1 Introducción

Los caracteres comportamentales, como la preferencia por el sitio de oviposición (PO) y la aceptación de recursos de oviposición (AO), son caracteres cuantitativos influenciados por numerosos genes, por el ambiente y la interacción entre ellos. La variación natural que observamos en las respuestas comportamentales se atribuye a la segregación de variantes genéticas en múltiple loci que interactúan entre sí, y cuyos efectos son sensibles al ambiente al cual los individuos están expuestos (Falconer y Mackay, 1996). La asociación entre la variación genómica (*SNPs* o *INDELs*) y la variación fenotípica usando la metodología de *GWAS* nos permite identificar las bases genéticas (polimorfismos y genes candidatos) y aportar información sobre la arquitectura genética que subyace la variación fenotípica (Mackay, 2010, Mackay *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2014). Sin embargo, no nos dice cómo la variación a nivel de la secuencia de ADN se traduce en variación fenotípica, ni cuáles son los procesos involucrados en la producción de la variación (Mackay *et al.*, 2009, Houle *et al.*, 2010). Por lo tanto, para estudiar caracteres complejos en forma holística es necesario utilizar un enfoque que, además de considerar la asociación entre la variación a nivel de la secuencia de ADN y la variación fenotípica, tenga en cuenta la variación en la expresión de los genes (Sieberts y Schadt, 2007).

El panel de referencia genética de *Drosophila* (*DGRP*) nos permite un acercamiento holístico al problema, ya que además de la información sobre la variación genómica estructural de las líneas que lo componen, cuenta, además, con datos de los transcriptomas de adulto de cada una de las líneas criadas en condiciones estándar de laboratorio. Asimismo, se sabe que el nivel de expresión de cada transcripto es dependiente del resto de los transcriptos con los cuales interactúa, por tanto, es esperable encontrar cierto grado de co-variación en los niveles de expresión (Rockman y Kruglyak, 2006; Sieberts y Schadt, 2007; Ayroles *et al.*, 2009).

Existen métodos estadísticos que permiten agrupar transcriptos cuya abundancia co-varía conformando módulos de transcripción, de forma tal que cada módulo contiene grupos de transcriptos que se encuentran más correlacionados entre sí que con respecto al resto (Stone y Ayroles, 2009). En este contexto, Mackay *et al.* (2009) llamaron *QTT* (por sus siglas en inglés *Quantitative Trait Transcript*) a transcriptos que varían en sus niveles de expresión entre genotipos y que dicha variación se encuentra asociada con la variación de un carácter cuantitativo. La identificación de *QTTs* permite no solo conocer los genes cuya expresión afecta un dado carácter, sino también nos permite construir módulos integrados por *QTTs* que exhiben patrones de expresión correlacionados. En conjunto la identificación de *QTTs* y módulos de expresión, nos ayuda a identificar procesos y caminos metabólicos que podrían ser causales de la variación del carácter (Ayroles *et al.*, 2009; Harbison *et al.*, 2009).

Finalmente, la unión de la información obtenida en los análisis de asociación genotipo – fenotipo - transcriptoma nos permitirá identificar lo que se ha dado en llamar *eQTLs* (por sus siglas en inglés *expression Quantitative Trait Loci*) que son regiones del genoma cuya variación en la expresión subyace la variación del carácter en estudio. De forma general un *eQTL* es una variante genómica para la cual se conocen su naturaleza estructural (*SNP* o *INDEL*), el patrón de expresión y el modo en que afecta la expresión de otras regiones con las cuales interactúa (Gilad *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2008). En nuestro caso particular, un *eQTL* va a contener un gen para el cual se hayan descripto

polimorfismos asociados a la variación fenotípica del carácter en estudio y además exhibe variación en el nivel de expresión, es decir, que es un *QTL* asociado al carácter.

Los *eQTL* pueden afectar la expresión de un gen en *cis* o en *trans*. Un *cis eQTL* es una variante molecular que está localizada dentro del mismo gen cuya expresión regula, es decir, el efecto es local y directo. En cambio, un *trans eQTL* es una variante molecular alojada en un gen que regula la expresión de otro gen, en otras palabras, su efecto es indirecto (Rockman y Kruglyak, 2006). Conocer si la acción del *eQTL* es *cis* o *trans* nos permite determinar la dirección del flujo de información dentro de las redes de transcritos correlacionados e inferir qué transcritos están afectados directamente y cuáles están afectados indirectamente por las perturbaciones genéticas (Mackay *et al.*, 2009).

En este capítulo nos proponemos identificar los *QTL*s asociados a la variación fenotípica para la PO y la AO y los módulos de transcripción que integran. Analizaremos, además, de manera conjunta los resultados obtenidos en este capítulo con los análisis de asociación genotipo - fenotipo que se presentaron en el capítulo 3, con el fin de identificar *eQTL*.

2 Objetivos

El objetivo general de esta sección es profundizar el conocimiento de la arquitectura genética del comportamiento de oviposición a través del estudio de la asociación entre la variación fenotípica y la variación a nivel del transcriptoma para la aceptación de recursos de oviposición (AO) y la preferencia por el sitio de oviposición (PO).

3 Materiales y Métodos

Los datos de expresión génica utilizados en los estudios de asociación fenotipo-transcriptoma son los reportados por Ayroles *et al.* (2009) para las mismas 40 líneas que se utilizaron en las secciones anteriores. Los autores obtuvieron los transcriptomas usando los *microarrays Drosophila 2.0* de Affymetrix. A modo de resumen, un *microarray* es una superficie sólida (plástico, vidrio o silicio) a la cual se le une una colección de fragmentos de ADN llamados sondas que se expone a moléculas dianas (las muestras). En el caso particular de los *microarrays* de expresión, estos proveen una instantánea de toda la actividad transcripcional que ocurre en ese momento en la muestra biológica. Para realizarlos necesitamos contar con cADN construido a partir del ARN extraído de una muestra. Una vez hibridado el cADN con el *microarray*, se cuantifica e identifican las sondas hibridadas, lo cual nos permite conocer qué genes se estaban expresando al momento de tomar la muestra y su nivel de expresión. Se obtuvieron los transcriptomas de cada línea del *DGRP* para cada sexo por separado. De cada muestra se realizaron 2 réplicas, que constaron de 25 hembras o 40 machos de 3 a 5 días de edad. Hasta el momento de la extracción del ARN, las líneas se mantuvieron en medio estándar de *Drosophila* en condiciones controladas de luz (12:12 hs.), temperatura (25°C) y humedad (60/75%) (ver Ayroles *et al.* 2009 para detalles específicos de las técnicas utilizadas). Como resultado de los experimentos usando los *microarrays*, se observó que 10.096 transcripts presentaron variación en sus niveles de expresión entre las 40 líneas (Ayroles *et al.*, 2009). Cada transcripto se identificó a través de un ID (número de identificación) compuesto por números y letras. El número corresponde a la identificación de la sonda mientras que las letras corresponden al sentido de la sonda, es decir, si es 3' a 5' o 5' a 3'.

Posteriormente, se realizó la identificación de los *QTTs* asociados con la variación fenotípica tanto para la AO como para la PO. Para realizar los análisis de asociación se utilizaron los 10.096 transcripts que presentaron variación en sus niveles de expresión y las medias fenotípicas para la AO y la PO (ver resultados de la sección 2). El análisis de asociación se realizó ajustando los datos según el modelo de regresión:

$$Y = \mu + E + e,$$

donde Y es la variable de asociación, E es la covarianza del $\log_2$ de la media del nivel de expresión del transcripto y e el error.

Como variable de asociación utilizamos la media transformada del número total de huevos puestos en cada recurso ofrecido (uva, naranja y tomate) para la AO mientras que para la PO utilizamos como variable la media del índice de preferencia (IP) en cada combinación de recursos [uva y naranja (UN); uva y tomate (UT)]. Consideramos *QTTs* a cada transcripto para el cual el valor de P de la regresión haya sido < 0.03 .

Finalmente, se realizó un análisis MMC (por sus siglas en inglés *Modulated Modularity Clustering*) que permite agrupar los *QTTs* identificados en módulos de transcripción. Este análisis se realizó de forma automática con la plataforma informática <http://mmc.gnets.ncsu.edu/>.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa SAS software (SAS, Cary, NC, USA).

Para los análisis de enriquecimiento en términos de *GO* se utilizó el servidor online *GeneCoDis3* (Tabas-Madrid *et al.*, 2012).

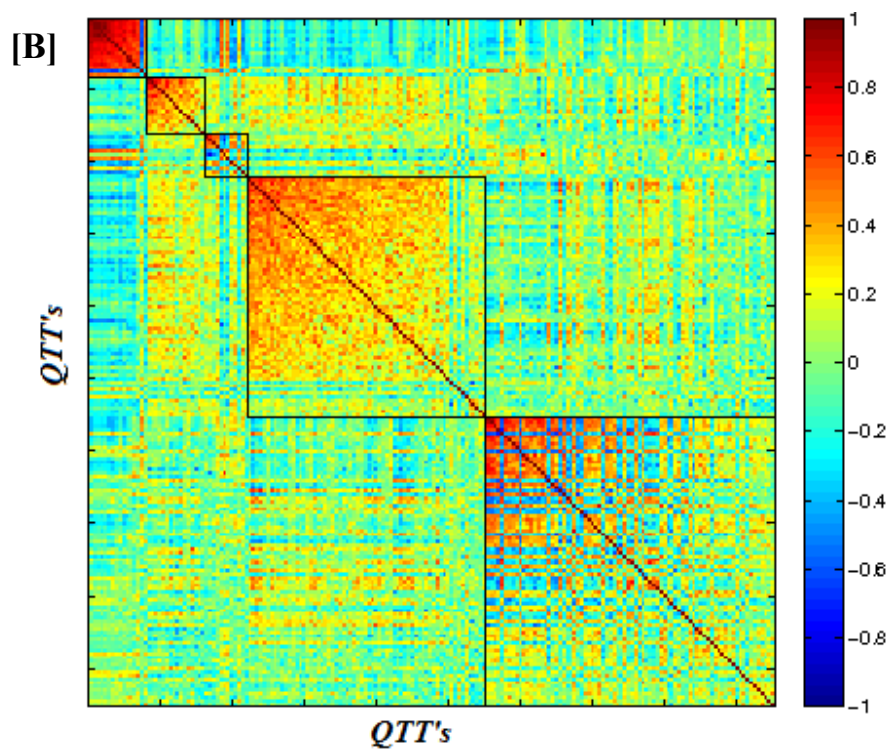
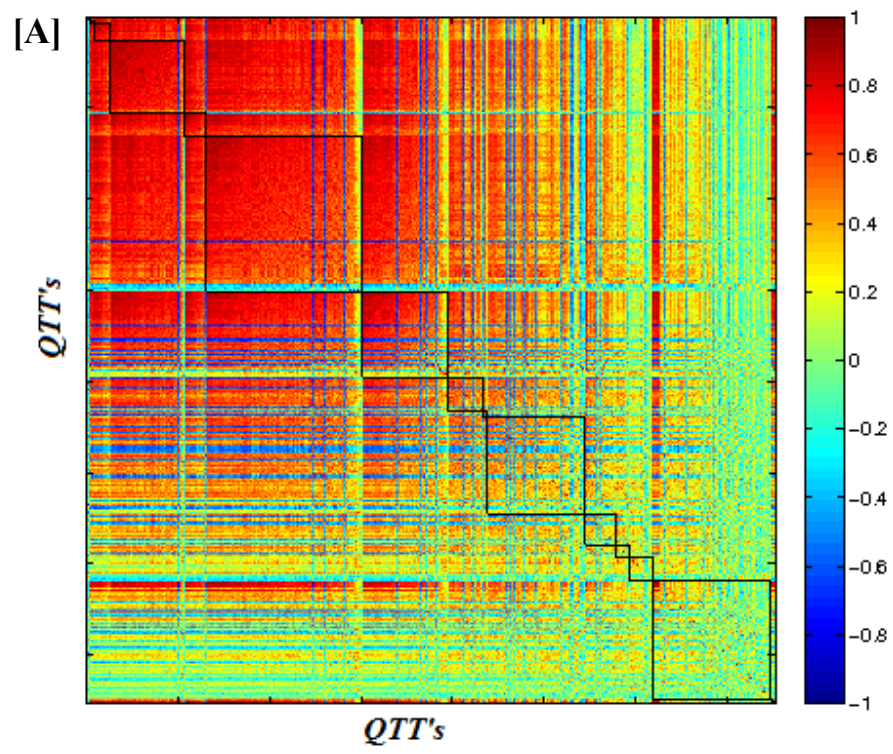
4 Resultados

A. Aceptación de los recursos de oviposición (AO)

Las pruebas de asociación fenotipo-transcriptoma permitieron identificar 609 *QTTs* significativamente asociados a la variación fenotípica de la AO (P valor ≤ 0.03), de los cuales 425 *QTTs* mostraron asociaciones significativas en los ensayos en los que se ofreció la uva como sustrato de oviposición, 85 con la variación en la aceptación de naranja y 99 *QTTs* cuando el recurso ofrecido fue tomate (Tablas 5 del Anexo de resultados).

Debido a la naturaleza de las sondas de expresión utilizadas, cada *QTTs* puede mapear en uno, dos o más genes (Flicek *et al.*, 2008; Ayroles *et al.*, 2009). Por tanto, cuando identificamos los genes que mapean con cada *QTTs* encontramos que los *QTTs* detectados en los experimentos de aceptación por uva mapean en 546 genes, en tanto que los *QTTs* detectados en los experimentos con naranja y tomate mapean en 115 y 117 genes respectivamente (ver Tabla 5 del Anexo de resultados).

Los resultados del análisis *MMC* se muestran en la figura 1. Encontramos que los *QTTs* asociados con la aceptación por uva se agruparon en 14 módulos de transcripción (Figura 1 [A]), en 5 módulos los detectados en los experimentos que utilizaron naranja como sustrato de oviposición (Figura 1 [B]) y en 6 módulos en los de tomate (Figura 1 [C]).



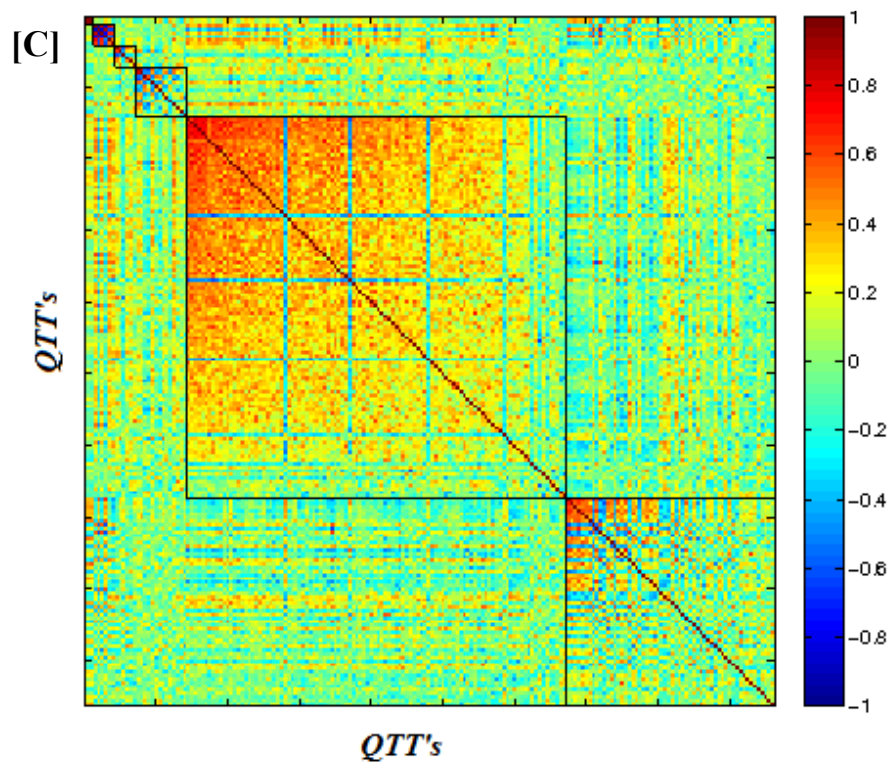


Figura 1. Módulos de transcripción asociados con la AO en uva [A], naranja [B] y tomate [C]. La escala de color representa el valor R^2 para la correlación entre los transcritos. En recuadros (líneas negras) se representan los módulos de expresión en cada caso.

Seguidamente investigamos si existe solapamiento entre los *QTTs* detectados en los experimentos de aceptación por los diferentes recursos. Detectamos 13 *QTTs* compartidos entre los *QTTs* identificados en los experimentos de aceptación de naranja y tomate, 4 *QTTs* entre uva y naranja, 9 *QTTs* entre uva y tomate y solo uno entre los tres recursos (Tabla 1).

Tabla 1. Listado de *QTTs* compartidos entre los recursos uva, naranja y tomate. ID corresponde a la identificación única del *QTT*, Recursos corresponde a los recursos en los cuales resulto significativo el *QTT* y Gen (símbolo) corresponde al nombre y símbolo de los genes en los cuales mapea el *QTTs*.

ID	RECURSOS	GEN (SÍMBOLO)
1623304_at	naranja y tomate	<i>CG9107</i>
1625053_at	naranja y tomate	<i>CG16898</i>
1630897_at	naranja y tomate	<i>GluCla (GluCla)</i>
1631606_at	naranja y tomate	<i>CG14285</i>
1632498_at	naranja y tomate	<i>CG15629; CG3225</i>
1633039_at	naranja y tomate	<i>CG5646</i>
1635349_a_at	naranja y tomate	<i>nicotinic Acetylcholine Receptor $\beta 2$ (nAcRbeta-96A)</i>
1635952_at	naranja y tomate	<i>lethal (2) essential for life (l(2)efl)</i>
1637393_at	naranja y tomate	<i>Vesicular monoamine transporter (Vmat)</i>
1638182_at	naranja y tomate	<i>CG5999</i>
1638282_at	naranja y tomate	<i>CG14196</i>
1638496_at	naranja y tomate	<i>CG42521</i>
1638636_at	naranja y tomate	<i>CG12512</i>
1624371_a_at	uva y tomate	<i>Transglutaminase (Tg); CG7367</i>
1624448_at	uva y tomate	<i>CG6356</i>
1624721_at	uva y tomate	<i>visceral mesodermal armadillo-repeats (vimar)</i>
1625341_at	uva y tomate	<i>FucTC (FucTC)</i>
1631763_at	uva y tomate	<i>CG31793</i>
1632959_at	uva y tomate	<i>CG8854</i>
1634619_at	uva y tomate	<i>Inositol 1,4,5-triphosphate kinase 1 (IP3K1); CRI8854</i>
1637301_a_at	uva y tomate	<i>slowpoke (slo)</i>
1639229_at	uva y tomate	<i>viking (Vkg); CG3887</i>
1626473_a_at	uva y naranja	<i>CG17350; fondu (fon)</i>
1632655_at	uva y naranja	<i>Hsc70Cb (Hsc70Cb); bluestreak (blue)</i>
1632839_a_at	uva y naranja	<i>CG8312</i>
1633089_a_at	uva y naranja	<i>longitudinals lacking (lola)</i>
1628190_at	uva, naranja y tomate	<i>fab1 (fab1); CG33981</i>

El hecho de que existan *QTTs* compartidos indica un cierto nivel de superposición entre los conjuntos de genes cuya variación en los niveles de expresión está correlacionada con la aceptación

de diferentes sustratos de oviposición. Más aun, estos resultados se encuentran en concordancia con los de los análisis de correlación reseñados en el Capítulo 2 (sección 2.4.1), en donde habíamos concluido que cabría esperar algún solapamiento entre las arquitecturas genéticas que gobiernan la expresión del carácter en cada recurso ofrecido.

A continuación, realizamos un análisis de enriquecimiento de términos de *GO* con los genes que contienen los *QTTs* compartidos (34 genes, Tabla 5 en el Anexo de resultados). Sin embargo, antes de presentar los resultados es importante señalar que debemos ser cautelosos al interpretarlos ya que podríamos estar sobreestimando el número de genes dado que algunas sondas pueden mapear en más de un gen (hasta un máximo de tres genes debido a la naturaleza de la sondas de expresión), lo que podría incrementar el número de falsos positivos pudiendo llevar a una sobreestimación del enriquecimiento en términos de *GO*. Una forma de controlar esta sobreestimación es utilizar un valor de *P* menor o igual a 0.01, que es el valor obtenido luego de aplicar la corrección por pruebas múltiples usando el método de Benjamini-Hochberg (B-H).

Los resultados mostraron un enriquecimiento de términos relacionados con el transporte transmembrana (PB, GO:0055085, *P* corregido por B-H < 0.002). Más específicamente con la actividad de transporte hacia ambos lados de iones de sodio e iodo (FM, GO:0008507, *P* corregido por B-H < 0.0008) en la membrana post sináptica (CC, GO:0045211, *P* corregido por B-H < 0.011). En este punto es relevante mencionar que todos los términos de *GO* encontrados son coherentes con los resultados de los análisis funcionales de los genes candidatos para la AO (ver Capítulo 3 sección 3.3.2. A). Nuevamente encontramos, un enriquecimiento de términos relacionados con la comunicación celular, sobre todo a nivel del sistema nervioso, lo cual apunta hacia el relevante papel que este juega en la toma de decisiones durante la oviposición.

A fin de evaluar la correspondencia entre los factores genéticos asociados a la variación fenotípica identificados con los *GWAS* y con las pruebas de asociación fenotipo-transcriptoma comparamos ambas listas de genes (la de genes en los que mapean los *QTTs* y las listas de genes candidatos obtenidas en los *GWAS*). Encontramos que los genes *CG12155*, *CG9897*, *frazzled (fra)*, *spire (spir)* y *stathmin (stai)* aparecen en ambas listas. Por lo tanto, estos genes pueden ser considerados como *eQTL*.

CG12155 fue identificado como gen candidato en los experimentos de aceptación que utilizaron uva como sustrato por las asociaciones detectadas en 8 *SNPs* (X:7621807, X:7621822, X:7621816, X:7622091, X:7622092, X:7622118, X:7622125) que se encuentran entre 700 y 500 pares de bases río arriba del inicio de transcripción del gen. Por otra parte, en los análisis de asociación con el transcriptoma para el recurso uva se lo identificó por el *QTTs* 1629629_at. Se ha reportado un solo transcripto de este gen que codifica un solo polipéptido. No se encontró información sobre los términos de *GO* asociados a este gen, por tanto, no tenemos información sobre su funcionalidad. Sin embargo, por inferencia computacional (comparaciones de secuencias) se observó que la proteína codificada por *CG12155* tiene un dominio MADF (por sus siglas en inglés *myb/SANT-like domain in Adf-1*) cuya función es la de unión con ADN. Otras proteínas encontradas en *D. melanogaster* que comparten el dominio MADF, son factores de transcripción como *Adf-1* (England *et al.*, 1992) y *stwl* que están relacionadas con el mantenimiento de las células germinales y en la diferenciación del oocito (Bhaskar y Courey, 2002).

CG9897 también fue identificado como gen candidato en los experimentos de aceptación que utilizaron uva como sustrato. En este caso se detectó asociación entre la aceptación y el *SNP*

2R:18874786 localizado 935 bases río arriba del sitio de inicio de transcripción del gen. El *QTT* asociado al gen fue 1640407_at que resultó significativo cuando se utilizaron las medias fenotípicas obtenidas usando la naranja como medio de oviposición. Se han descrito dos transcritos de *CG9897* que codifican dos polipéptidos diferentes. No se le conocen términos de *GO* asociados. Sin embargo, *CG9897* tiene un dominio proteico serin proteasa tripsina de 232 aminoácidos que realiza cortes en las cadenas polipeptídicas en el extremo carboxilo de residuos básicos (lisina o arginina) (Arbeitman *et al.*, 2004). Es importante mencionar que este gen se expresa en el tracto reproductivo de la hembra (Swanson *et al.*, 2004) y en los órganos responsables del almacenamiento del esperma (espermateca y receptáculo seminal) (Prokupek *et al.*, 2009). Además, existe evidencia de que se encuentra bajo selección positiva (Panhuis y Swanson, 2006). La expresión de *CG9897* en los órganos de almacenamiento de esperma sugiere no solo que este gen podría estar involucrado en el llamado “efecto esperma” el cual predice que las hembras con un almacenamiento de esperma apropiado son más propensas al re-apareamiento (Mannig, 1967; Prokupek *et al.*, 2009). Por tanto, evaluar la dinámica de expresión de *CG9897* y los procesos en los cuales está involucrado es fundamental para entender aspectos importantes de la reproducción, ya que es posible que este gen juegue un rol importante en los procesos evolutivos de selección sexual post-apareamiento.

frazzled (fra) es un gen que ya hemos descritos en el capítulo 3 (sección 3.3.2. A.), como gen candidato en los *GWAS* para el recurso tomate por el *SNP* intrónico 2R:8446682, y en los análisis de asociación fenotipo-transcriptoma por el *QTTs* 1623827_a_at que fue significativo en los ensayos en los que se utilizó uva como sustrato. Resumiendo la información del capítulo anterior, este gen se ha asociado con las proyecciones axónicas retínicas del sistema visual en *D. melanogaster*.

spire (spir) fue identificado como candidato en el *GWAS* por el *SNP* 2L:2031728 y en la prueba de asociación transcriptoma-aceptación por el *QTTs* 1637962_at en ambos casos en los ensayos con uva. Se han descrito 10 transcritos y 10 polipéptidos para este gen y se lo ha asociado con varios procesos biológicos, entre los cuales destacan la formación de la capa externa del huevo (corión). Específicamente, se ha relacionado con la formación y organización de los filamentos de actina durante la ovogénesis (Quinlan, 2013).

stathmin (stai) se identificó por el *QTTs* 1626294_a_at (significativo en el análisis de asociación aceptación de uva- transcriptoma) y por el *SNP* intrónico 2L_6114772_SNP (significativo en el *GWAS* de aceptación de tomate). Se han descrito 5 transcritos y 5 polipeptidos para este gen. Las proteínas que codifica se han relacionado con la polimerización y despolimerización de los microtúbulos en el mantenimiento de la estabilidad de las uniones neuro-musculares (Graf *et al.*, 2011). Se ha demostrado que las hembras de *D. melanogaster* transmiten transcritos de *stai* a los ovocitos, los cuales son posteriormente utilizados durante la formación del sistema nervioso del embrión (Ozon *et al.*, 2002).

Dado que los polimorfismos significativos asociados a *CG12155* y *CG9897* ocurren río arriba del inicio de transcripción podríamos inferir que serían *cis eQTL* ya que, la regulación de la expresión ocurre en la zona de unión de los factores de transcripción. En cambio, para los genes *fra*, *spir* y *stai* el modo de acción sería *trans eQTL*, ya que los polimorfismos significativos ocurren en el intrón, por lo cual la regulación de la transcripción podría estar ocurriendo por ejemplo por *splicing* alternativo.

Seguidamente evaluamos si los módulos de transcriptos (aquellos que co-varían) en los cuales encontramos *eQTLs* presentan enriquecimiento en alguno de los términos de *GO*. Cabe recordar que los transcriptos que conforman cada módulo se encuentran más relacionados entre sí para los términos ontogénicos que con el resto de los transcriptos del genoma (Ayroles *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2009; Jumbo-Lucioni *et al.*, 2012). Es importante aclarar que en este análisis no vemos el enriquecimiento de todos los términos de *GO* asociados a los genes, sino que evaluamos solamente el enriquecimiento de términos compartidos entre los genes. Los *eQTL fra*, *CG12155*, *spir* y *stai*, identificados en el análisis realizado con los datos de aceptación por uva, formaron parte de los módulos de transcripción 5, 9 y 10, respectivamente (Figura 1 [A]). El *eQTL CG9897*, identificado en el análisis realizado con los datos de aceptación por naranja formó parte del módulo de transcripción 4 (Figura 1 [B]). Los resultados de los análisis de enriquecimiento en términos de *GO* específicos para cada módulo de transcripción se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de términos de *GO* significativos para los módulos de transcripción. *P** corresponde al valor de probabilidad luego de la corrección por pruebas múltiples de Benjamini-Hochberg (valor de corte ≤ 0.01). Módulo se refiere al número de módulo de transcripción, entre paréntesis se especifica el recurso para el cual se obtuvo ese modulo. N° de genes módulo se refiere al número de genes asociado a ese término de *GO* en el módulo, N° de genes genoma es el número total de genes asociados a ese término de *GO* a lo largo del genoma, *GO* es el código de identificación del término significativo y su nombre. Entre paréntesis se especifica la categoría a la cual pertenece el término.

MÓDULO	N° DE GENES MÓDULO	N° DE GENES GENOMA	<i>P*</i>	<i>GO</i>
3 (uva)	5	40	3.51×10^{-04}	<i>GO:0006412</i> : Traducción (PB) <i>GO:0003735</i> : Constituyente estructural del ribosoma (FM) <i>GO:0005762</i> : Subunidad mitocondrial grande del ribosoma (CC)
3 (uva)	8	170	6.23×10^{-04}	<i>GO:0006412</i> : Traducción (PB) <i>GO:0003735</i> : Constituyente estructural del ribosoma (FM)
5 (uva)	4	17	6.45×10^{-03}	<i>GO:0006508</i> : Proteólisis (PB) <i>GO:0000502</i> : Complejo proteosómico (CC)
5 (uva)	14	314	6.59×10^{-03}	<i>GO:0005875</i> : Complejo de asociación de microtúbulos (CC)
5 (uva)	3	12	7.43×10^{-03}	<i>GO:0005886</i> : membrana plasmática (CC) <i>GO:0005524</i> : unión ATP (FM) <i>GO:0006468</i> : Fosforilación de proteínas (BP) <i>GO:0004672</i> : Act. Proteica de quinasa (FM)
5 (uva)	3	12	7.43×10^{-03}	<i>GO:0042078</i> : División de células germinales (PB) <i>GO:0030718</i> : Mantenimiento de células germinales (PB)
9 (uva)	3	3	3.10×10^{-03}	<i>GO:0003700</i> : Actividad de factor de transcripción secuencia específico (FM) <i>GO:0005634</i> : núcleo (CC) <i>GO:0003677</i> : unión al ADN (FM) <i>GO:0005737</i> : citoplasma (CC) <i>GO:0006952</i> : respuesta de defensa (PB)
9 (uva)	5	47	1.57×10^{-03}	<i>GO:0005634</i> : núcleo (CC) <i>GO:0003677</i> : unión ADN (FM) <i>GO:0005515</i> : unión proteica (FM)
9 (uva)	3	11	1.95×10^{-03}	<i>GO:0003700</i> : Actividad de factor de transcripción secuencia específico (FM)

				GO:0043565: Unión al ADN secuencia específico (FM) GO:0005634: núcleo (CC) GO:0003677: unión al ADN (FM) GO:0045944: regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN Pol II (PB)
9 (uva)	10	294	3.85 x10 ⁻⁰³	GO:0005634: núcleo (CC) GO:0003677: unión al ADN (FM)
9 (uva)	3	16	3.85 x10 ⁻⁰³	GO:0042059: regulación negativa del receptor del factor de crecimiento epidermial (PB)
9 (uva)	3	20	5.46 x10 ⁻⁰³	GO:0005634: núcleo (CC) GO:0003677: unión al ADN (FM) GO:0045892: regulación negativa de la transcripción ADN dependiente (PB)
9 (uva)	3	20	5.46 x10 ⁻⁰³	GO:0005737: citoplasma (CC) GO:0005515: unión proteica (FM) GO:0048477: ovogénesis (PB)
9 (uva)	3	21	5.54 x10 ⁻⁰³	GO:0006355: regulación de la transcripción ADN dependiente (PB) GO:0003700: Actividad de factor de transcripción secuencia ADN dependiente (FM) GO:0005634: núcleo (CC) GO:0003677: unión al ADN (FM) GO:0005515: unión proteica (FM)
9 (uva)	4	57	8.06 x10 ⁻⁰³	GO:0005634: núcleo (CC) GO:0045893: regulación positiva de la transcripción, ADN dependiente (PB)
9 (uva)	15	703	8.25 x10 ⁻⁰³	GO:0005737: citoplasma (CC)
9 (uva)	5	96	8.87 x10 ⁻⁰³	GO:0006974: respuesta frente al daño de ADN (PB)
9 (uva)	4	60	8.94 x10 ⁻⁰³	GO:0005737: citoplasma (CC) GO:0048477: ovogénesis (BP)
9 (uva)	3	30	9.82 x10 ⁻⁰³	GO:0003700: actividad de factor de transcripción secuencia de AND específico (FM) GO:0005634: núcleo (CC) GO:0000122: regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN Pol II (PB)

No encontramos enriquecimiento modular de términos de *GO* para el módulo 10 detectado en los análisis de aceptación por uva ni para el módulo 4 para la aceptación por naranja.

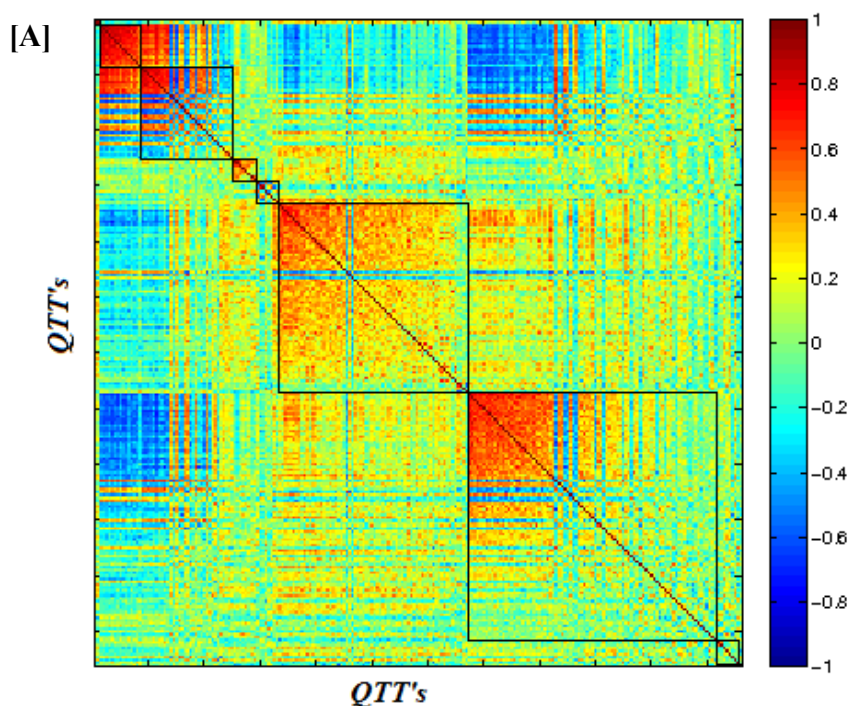
Como se observa en la Tabla 2, algunos de los términos de *GO* significativos están relacionados con la oviposición. Por ejemplo en el módulo 5 los términos GO:0042078 y GO:0030718 se refieren a las divisiones iniciales que ocurren en las células germinales y a los procesos involucrados en el mantenimiento de estas mismas células germinales. En este módulo también encontramos términos de *GO* relacionados con la formación de los microtúbulos, los cuales son fundamentales durante la división celular, tanto mitótica como meiótica. En el módulo 9 encontramos el término GO:0048477 que se refiere al proceso de formación y maduración de la gameta femenina durante la ovogénesis y otros términos (GO:0000122, GO:0003700, GO:0045893, GO:0003677, etc.) relacionados con la regulación de la transcripción del ADN a nivel general y a nivel secuencia específica.

Los resultados de estos análisis nos indican que los módulos de transcripción en los que se agrupan los genes asociados a los *QTTs* relacionados con la variación fenotípica de la AO se encuentran enriquecidos en términos biológicos conectados con la oviposición, aportando evidencia sobre nuevos genes relacionados con el comportamiento de oviposición.

B. Preferencia de oviposición (PO)

Los análisis de asociación entre la preferencia y el transcriptoma permitieron detectar un total de 475 *QTTs* significativamente asociados con la variación fenotípica para la PO (P valor de corte ≤ 0.03) (Tabla 6 en el Anexo de resultados). Del total, 117 *QTTs* resultaron significativos en los experimentos en los que a las moscas se les ofreció la combinación de recursos UN y 358 *QTTs* para la combinación de recursos UT. Los 475 *QTTs* mapearon en 566 genes, 138 asociados con la variación en la preferencia por UN y 429 genes a la combinación UT.

Los *QTTs* asociados a la combinación UN se agruparon en 7 módulos (Figura 2 [A]) mientras que los asociados a la combinación UT se agruparon en 17 módulos (Figura 2 [B]).



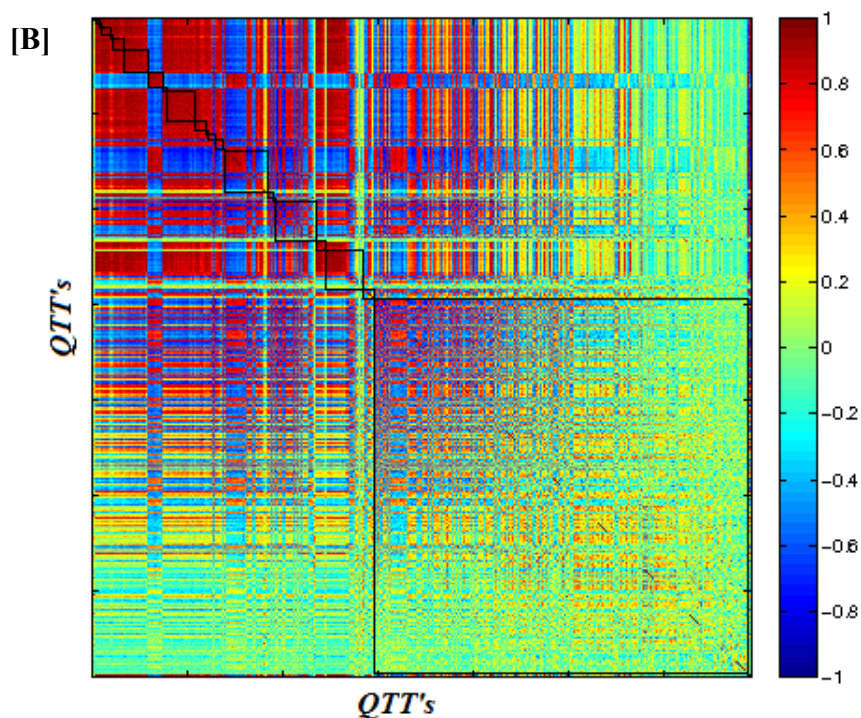


Figura 2. Módulos de transcripción de los *QTTs* para el análisis de asociación realizado para la PO para las combinaciones de recursos UN **[A]** y UT **[B]**. La escala de color representa el valor R^2 para la correlación entre los transcritos.

Cuando buscamos si hay *QTTs* compartidos entre las dos combinaciones de recursos, encontramos 4 *QTTs* que mapean en 6 genes que se comparten entre ambas combinaciones de recursos (Tabla 3).

Tabla 3. Listado de *QTTs* compartidos entre las combinaciones de recursos UT y UN. ID corresponde a la identificación única del *QTT* y Gen (símbolo) corresponde al nombre y símbolo de los genes en los cuales mapea el *QTTs*.

ID	GEN (SÍMBOLO)
1625617_at	<i>Regulator of cullins 2 (Roc2)</i>
1628496_at	<i>defective proboscis extension response 16 (dpr16)</i>
1629385_s_at	<i>Cellular retinaldehyde binding protein (Cralbp); Pmi (Pmi); Peptidoglycan recognition protein LD (PGRP-LD)</i>
1641241_at	<i>CG17698</i>

El análisis de *GO* de los genes en los que mapean los *QTTs* no permitió detectar términos enriquecidos significativamente. Este resultado es esperable, ya que el número de genes que mapean en los *QTTs* es muy bajo. Igualmente podemos analizar los términos de *GO* a los que están

asociados estos genes, para tener una idea de su funcionalidad. Encontramos por ejemplo los términos de respuesta inmune (GO:0006955), percepción de estímulos químicos (GO:0007606) y transporte (GO:0006810) en la categoría de procesos biológicos (PB). En la categoría función molecular (FM) encontramos el término GO:0016918 que se refiere a la unión de moléculas al retinol. Es interesante este último término de GO, ya que nuevamente encontramos enriquecimiento de genes relacionados con el camino metabólico del Retinol para la preferencia (Capítulo 3). Por tanto, este resultado suma evidencia a nivel transcripcional de la asociación entre el camino metabólico del retinol en la preferencia.

Posteriormente, nos preguntamos si es posible encontrar *eQTL* asociados a la PO. Al comparar la lista de genes candidatos de los *GWAS* con la lista de genes que mapean en los *QTTs* encontramos que los genes *CG13284* y *Multiple wing hairs (Mwh)* se encuentran en ambas listas.

CG13284 se consideró gen candidato por la asociación detectada en el *GWAS* de la preferencia en la combinación UN y 5 *SNPs* (2L_16842209, 2L_16843030, 2L_16843057, 2L_16842795, y 2L_16842796) que se encuentran entre 138 y 414 pares de bases río abajo del final de transcripción del gen. El *QTT* significativo que mapea en *CG13284* es 1629716_a_at. Se han descrito 5 transcritos y 5 péptidos de *CG13284* que han sido asociado a procesos biológicos de fagocitosis, organización del aparato de Golgi, procesos metabólicos y regulación negativa de la proliferación celular entre otros. Recientemente Durham *et al* (2014) han definido a *CG13284* como candidato a participar de la expresión fenotípica de caracteres de historia de vida dependientes de la edad (tamaño del cuerpo, fecundidad y supervivencia). Los autores, que también usaron al *DGRP* en sus experimentos, midieron la fecundidad semanal de las hembras y encontraron una disminución sustancial de la fecundidad a medida que aumenta la edad de la hembra de *Drosophila*. *CG13284* resultó gen candidato asociado con la variación en la fecundidad en la séptima semana de vida de las hembras.

Multiple wing hairs (Mwh) se consideró gen candidato en base a las asociaciones detectadas entre 4 *SNPs* intrónicos (3L_12100198, 3L_1210204, 3L_1210299 y 3L_1210458) y la preferencia en la combinación UN y el *QTT* 1634493_at. Específicamente, para *mwh* se hay descritos 3 transcritos y 3 polipéptidos que tienen dominios GBD-FH3 (por sus siglas en inglés *GTPase binding domain - formin homology 3*). Ha sido clasificado como un gen *PCP* (*PCP* por sus siglas en inglés de *planar cell polarity*). Los genes *PCP* son los encargados de regular la polarización de las células dentro del plano del epitelio (Maung y Jenny, 2011). La polaridad de las células es importante, ya que permite organizar y mantener los tejidos dando la posibilidad de elaborar estructuras más complejas como por ejemplo los tricomas del ala y abdomen y el alineamiento de las cerdas sensoriales en *Drosophila* (Lu y Adler, 2015).

Con respecto al modo de acción, *Mwh* sería un *cis-eQTL* ya que los polimorfismos ocurren en la zona intrónica del gen. En cambio, *CG13284* actuaría como *trans-eQTL*, ya que los *SNPs* no ocurren dentro del gen sino que ocurren río abajo del final de transcripción del gen.

Finalmente y al igual que para la AO, realizamos el análisis de enriquecimiento de términos de *GO* para los módulos de transcripción en donde encontramos *eQTLs*. Los dos *eQTL* se encuentran en los módulos de transcripción de la combinación de recursos UN, *CG13284* se encuentra en el módulo 4 y *mwh* en el módulo 5.

En la Tabla 4 se muestran los términos que resultaron enriquecidos en cada módulo. A diferencia con los resultados encontrados para la AO, para la PO encontramos solamente dos términos de *GO* significativos.

Tabla 4. Lista de términos de *GO* significativos para los módulos de transcripción. *P** corresponde al valor de probabilidad luego de la corrección por pruebas múltiples de Benjamini-Hochberg (valor de corte ≤ 0.01). Módulo se refiere al número de módulo de transcripción, entre paréntesis se especifica la combinación de recursos para el cual se obtuvo ese módulo. N° de genes módulo se refiere al número de genes asociado a ese término de *GO* en el módulo, N° de genes genoma es el número total de genes asociados a ese término de *GO* a lo largo del genoma, *GO* es el código de identificación del término significativo y su nombre. Entre paréntesis se especifica la categoría a la cual pertenece el término.

MÓDULO	N° DE GENES MÓDULO	N° DE GENES GENOMA	<i>P*</i>	<i>GO</i>
6 (UN)	3	9	0.003	<i>GO:0006508</i> : proteólisis (PB)
7 (UN)	3	20	0.001	<i>GO:0035317</i> : organización de los pelos del ala derivados del disco marginal del ala (PB)

El primero de ellos, es un término general que se refiere a la hidrólisis de proteínas en polipéptidos más pequeños o en la escisión de aminoácidos específicos de la proteína. Aunque el término por si solo pareciera no brindarnos información relacionada con el carácter estudiado, la hidrólisis de las proteínas juega un rol importante en la regulación espacial y temporal de la expresión y funcionalidad de las proteínas en general (Gottesman y Maurizi, 1992).

El segundo término (*GO:0035317*) se refiere a los procesos relacionados con el montaje, disposición de las partes constituyentes o el desmontaje de los pelos de las alas (derivados del disco imaginal del ala). Los pelos de las alas de *Drosophila* son proyecciones apicales polarizadas de actina que sobresalen de cada una de las aproximadamente 30000 células del epitelio del ala. Se cree que los pelos o tricomas del ala son importantes para el direccionamiento del flujo del aire sobre el ala durante el vuelo (Guild *et al.*, 2005).

5. Conclusiones

En este capítulo hemos mostrado una asociación entre la variación fenotípica en dos caracteres complejos (AO y PO) con la variación a nivel del transcriptoma. Tanto para la AO como para la PO detectamos transcriptos que afectan caracteres cuantitativos (*QTTs*) a través de pruebas de asociación entre la variación fenotípica para AO por cada uno de los recursos y la PO para las dos combinaciones de recursos ofrecidas. Además encontramos solapamiento entre los transcriptos asociados con la variación en la AO en los tres recursos ofrecidos como sustratos y con la variación detectada en los experimentos de preferencia con ambas combinaciones de sustratos. Al analizar los genes en los que mapean los *QTT* compartidos, encontramos que estos se encuentran asociados con procesos relacionados con diferentes aspectos de la oviposición. Por ejemplo genes que juegan un rol importante en el desarrollo de interacciones en el sistema nervioso, que como sería de esperar tiene un papel importante en la expresión del carácter comportamental estudiado, independientemente del recurso ofrecido como medio de oviposición.

En el caso de la PO, encontramos que los *QTTs* compartidos entre las dos combinaciones de recursos probadas mapean en genes que están relacionados con el camino metabólico (*pathway*) del retinol, el mismo que encontramos enriquecido en la lista de genes candidatos detectados en los *GWAS* para la PO (ver Capítulo III Sección 1). Nuevamente encontramos evidencia que apoya la importancia de los pigmentos visuales durante la fase de búsqueda y elección de los recursos de oviposición.

Al unir la información obtenida en los análisis de asociación genotipo – fenotipo con los de asociación entre la variación fenotípica y la abundancia de transcriptos (transcriptoma), pudimos identificar siete *eQTLs*, 5 para la AO y 2 para la PO. Los *eQTL* son genes que están asociados a la variación fenotípica, tanto por su variación genética como por la variación a nivel de la abundancia de sus transcriptos. De los *eQTL* encontrados para la AO, *CG12155*, *CG9897*, *spir* y *stai* están relacionados de una forma u otra con la formación de huevos en *D. melanogaster*. Por ejemplo *spir* se ha relacionado con la formación y organización de los filamentos de actina requeridos durante la ovogénesis (Quinlan, 2013). Con respecto a *stai* hay evidencia que indica que las hembras de *Drosophila* transmiten transcriptos de *stai* a los ovocitos en formación, los cuales son posteriormente utilizados durante la formación del sistema nervioso del embrión (Ozon *et al.*, 2002). En el caso de *CG12155*, se sabe que su dominio proteico está involucrado en los procesos de mantenimiento de células germinales y en la diferenciación de los ovocitos (Bhaskar y Courey, 2002). Por último, *CG9897* sería un gen relacionado con el llamado “efecto esperma” el cual predice que las hembras con un adecuado almacenamiento de esperma son más propensas al re-apareamiento (Mannig, 1967; Prokupek *et al.*, 2009), lo cual podría indicar un rol de *CG9897* en los procesos evolutivos de selección sexual post-apareamiento.

El último *eQTL* encontrado para la AO, *fra*, es un gen que no está relacionado con los procesos de formación del huevo, pero es interesante, ya que está vinculado con la formación de las proyecciones axónicas retinales del sistema visual en *D. melanogaster*. En este punto es interesante destacar que los análisis de asociación entre AO y el transcriptoma apuntan, nuevamente, y, por tanto, dan apoyo a los resultados de los *GWAS* (ver capítulo 3) que sugieren la importancia del sistema visual durante el comportamiento de oviposición.

En relación a los *eQTL* asociados con la PO, encontramos que *CG13284* está vinculado con la fecundidad (Durham *et al.*, 2014) y *mhw* tiene un rol importante en la regulación de la polarización celular dentro del plano epitelial (Maung y Jenny, 2011), incluyendo la disposición de las cerdas sensoriales a lo largo del cuerpo (Lu y Adler, 2015). Por tanto, los dos genes definidos como *eQTL* para la PO están relacionados de alguna forma más o menos directa con los procesos de expresión del carácter. En este sentido podemos avanzar la hipótesis de que *CG13284* está involucrado en el mecanismo que hace que frente a dos recursos aceptables la hembra elija uno de los recursos como sustrato de oviposición. Con respecto a *mhw*, podemos proponer que la disposición de las cerdas sensoriales podría influir en el momento de testear cada uno de los recursos antes de que se produzca la oviposición.

Finalmente, los análisis de enriquecimiento en términos de GO para los módulos de transcripción en los cuales encontramos *eQTL* mostraron que un enriquecimiento en procesos que ocurren durante la ovogénesis, más precisamente con la división celular, unión al ADN, regulación positiva o negativa de la transcripción, transporte molecular intra e inter celular, etc. Para los módulos asociados con la PO encontramos términos de GO relacionados con la organización de los pelos del ala y la hidrólisis de proteínas. Estos resultados son congruentes, con la funcionalidad de los *eQTL* que forman parte de cada módulo y con el resto de los resultados presentado en esta tesis.

Los resultados de este capítulo contribuyen a demostrar que es posible asociar exitosamente diversos aspectos relacionados con la variación del fenómeno (Houle *et al.* 2010) de caracteres adaptativos que en nuestro caso constituyeron al análisis y vinculación de la variación fenotípica, las bases genéticas involucradas en la variación fenotípica (genómica) y la variación a nivel de transcriptos (transcriptoma) que permite tanto una descripción holística como una mejor comprensión de la arquitectura genética de la AO y de la PO.

CAPÍTULO V

Conclusiones finales

CAPÍTULO V

En la presente tesis hemos presentado resultados que contribuyen al conocimiento de la arquitectura genética del comportamiento de oviposición en la especie modelo *Drosophila melanogaster*.

La arquitectura genética es el conjunto de factores genéticos y sus interacciones mutuas y con el ambiente, que determinan y controlan un fenotipo y su variación (Hansen, 2006). El estudio de la misma implica:

- Identificar los genes que contribuyen a la manifestación del carácter
- Conocer las interacciones entre estos genes como ensambles funcionales.
- También interesa saber si hay pleiotropía, es decir si los genes que afectan un carácter participan en la expresión de otros fenotipos.
- Identificar cuáles de estos genes contribuyen a la variabilidad fenotípica natural y entender las bases moleculares de la variación alélica.
- Conocer la relación de los aspectos genéticos con el ambiente

Hasta aquí solamente se han enumerado aspectos que permiten caracterizar y comprender la arquitectura genética a nivel genético-molecular; ahora, si entendemos a la arquitectura genética no como un conjunto de parámetros estancos sino como una serie de variables dinámicas, describir la arquitectura genética de un carácter también implica conocer los aspectos variacionales de las bases genéticas del carácter a otros niveles de organización biológica como por ejemplo: interindividuales, interpoblacionales e interespecíficos (Nosil, 2008; Berner y Salzburger, 2015).

En este contexto, presentaremos los principales aportes que este trabajo hace al tema de estudio. Con el objeto de comprender el comportamiento de oviposición, estudiamos dos caracteres interdependientes, la Preferencia por los sitios de oviposición (PO) y la Aceptación de recursos de oviposición (AO). En la primer parte de la Tesis, nos focalizamos en la caracterización del fenotipo comportamental asociado a la oviposición en el Panel de Referencia Genético de *Drosophila* (*DGRP*), ofreciendo a las moscas tres recursos de oviposición que suelen encontrar en los hábitats de su amplia área de distribución: uva, tomate y naranja. Luego, caracterizamos la variación genética (Sección III) y la variación a nivel de los transcritos (Sección IV) asociada a la variación fenotípica para los dos caracteres por medio del uso de herramientas bioinformáticas.

Los principales resultados fueron:

- Las moscas del *DGRP* presentan abundante variación tanto fenotípica como genética para la AO en los tres recursos y para la PO en las dos combinaciones de recursos ofrecidas.
- La interacción Genotipo x Ambiente (IGA) significativa para la AO y PO sugiere no solo un cierto grado de plasticidad fenotípica, sino también que esta tiene, en ambos casos, base genética.
- Mediante los análisis de asociación de genoma completo fue posible identificar genes candidatos que contribuyen a la variación genética natural de la AO y la PO.
- Tal como se esperaba, la AO y la PO son caracteres complejos y su expresión está dada por la acción de muchos genes que interactúan entre sí.

CAPÍTULO V

- Los genes identificados para la AO se encuentran enriquecidos en funciones relacionadas con la fecundidad (genes vinculados a la ovogénesis y el desarrollo del sistema nervioso).
- Varios de los genes asociados con la variación en la PO forman parte de la vía de síntesis del Retinol y también, encontramos genes asociados al desarrollo del sistema nervioso.
- Los resultados de pruebas de validación funcional, que aportan evidencia independiente, permitieron aportar evidencia de la participación de 4 de los 6 genes estudiados (*Ugt36Bb*, *GAPcenA*, *Vrpl* y *tst*) en la arquitectura genética de la PO.
- En el caso de *tst*, además de aportar pruebas de su participación en la expresión de la preferencia de oviposición, encontramos indicios de que su efecto sobre el fenotipo puede ser mayormente explicado por la variación en un nucleótido.
- Las pruebas de asociación entre la variación en el nivel de transcripción con la variación en la AO y la PO, permitieron identificar módulos de transcripción asociados a la variación fenotípica. Los genes que conforman estos módulos de transcripción se encuentran relacionados entre sí a través de procesos y redes génicas.
- El análisis conjunto de los resultados de los experimentos de asociación fenotípica con la variación a nivel estructural (secuencia genómica) y la variación a nivel de la transcripción permitieron identificar un total de 7 *eQTL*: *CG12155*, *CG989*, *fra*, *spir*, *stai*, *CG13284* y *Mwh*. Estos genes son importantes, ya que fue posible asociarlos a la variación fenotípica, tanto por su variación genética como por la variación a nivel de la abundancia de sus transcriptos.

Los resultados obtenidos en los diferentes capítulos de la presente tesis nos aportan evidencia de como la expresión del comportamiento de oviposición, es reflejo de las interacciones dinámicas entre los organismos y su ambiente.

Hemos encontrado, que la arquitectura genética del comportamiento de oviposición presenta aspectos esperados para un carácter complejo como el gran número de genes que la componen, las redes genéticas interconectadas y la dependencia con el ambiente.

Nuestro estudio revela que el sistema nervioso juega un papel importante en la expresión de ambos caracteres. El enriquecimiento en genes cuyas funciones están relacionadas con el desarrollo neuronal y sobre todo, con la formación de nuevas conexiones neuronales, es un resultado recurrente a lo largo de las distintas secciones de esta tesis. Existe evidencia de la importancia del sistema nervioso en la expresión de diversos comportamientos, algunos de los cuales están estrechamente relacionados con la oviposición como por ejemplo el Cortejo (Pavlou y Goodwin 2013). La expresión de los factores de transcripción *fruitless* (*fru*) y *doublesex* (*dsx*) en las neuronas sensoriales, inter neuronas y neuronas motoras sugiere la existencia de una red capaz de recibir, procesar y transferir información que controla el cortejo tanto en machos como en hembras en *Drosophila* (Pavlou y Goodwin 2013). Una de las derivaciones que surgen de esta Tesis es investigar, específicamente, cómo regula el sistema nervioso las diferentes etapas de la oviposición y los genes involucrados en dicho proceso.

CAPÍTULO V

Por otro lado, encontramos evidencia del rol del sistema visual en el comportamiento de oviposición. Específicamente, encontramos que la arquitectura genética de la preferencia de oviposición esta enriquecida en genes que participan del camino metabólico del retinol. Este resultado se dio tanto en la asociación del fenotipo con la variación genética como en la asociación del fenotipo con la variación a nivel de los transcriptos. Esta es la primera vez, a nuestro entender, que se presenta evidencia del rol que cumple el sistema visual en la elección del recurso de oviposición. Uno de los genes que participan de este camino metabólico, es *Ugt36Bb*. Además, su participación en la preferencia de oviposición fue confirmada mediante pruebas de validación funcional. Un estudio que investigue con mayor profundidad la relación del sistema visual con el comportamiento de oviposición resultaría muy interesante a fin de establecer relaciones causales entre ambos caracteres. Asimismo, identificar el mecanismo de acción de *Ugt36Bb* en los diferentes caminos metabólicos asociados al sistema visual y la oviposición permitirá establecer nexos entre ambos caracteres.

En la última parte de la tesis, realizamos un análisis integral (asociación fenotipo-genómico-transcriptómico) de los resultados obtenidos. Específicamente identificamos que la variación genómica y transcriptómica de: *CG12155*, *CG9897*, *fra*, *spir*, *stai*, *CG13284* y *Mwh* se asocian significativamente con la variación fenotípica de los caracteres que hemos estudiado. *Spir*, *stai*, *fra* y *CG12155* participan de los procesos de formación, diferenciación y mantenimiento de los ovocitos. *CG9897* está relacionado con el almacenamiento de esperma y *CG13284* con la fecundidad. *Mwh*, está asociado con la disposición corporal de las cerdas sensoriales. Estos resultados, por un lado validan las metodologías que utilizamos, ya que análisis distintos llegan a un mismo resultado, y por el otro aportan nueva información sobre los procesos que regulan el comportamiento de oviposición. La formación de los oocitos, el almacenamiento del esperma y el sistema sensitivo parecen ser elementos claves en el comportamiento de oviposición.

Finalmente, un aspecto que destacamos del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral es la utilización de diferentes metodologías experimentales y de análisis bioinformáticos a fin de aportar al conocimiento de la arquitectura genética de este complejo carácter adaptativo. En este sentido, el trabajo realizado permitió dilucidar los factores que operan a nivel genómico y de la expresión génica, los factores ambientales (plasticidad fenotípica) y la interrelación entre todos estos componentes involucrados en la variación fenotípica del carácter y, consecuentemente, que orquestan su expresión fenotípica.

Lic. María I L Betti
Doctoranda

Dr. Esteban Hasson
Director de Tesis

Dr. Juan José Fanara
Director Asistente

BIBLIOGRAFÍA

- Abed-Vieillard, D., Cortot, J., Everaerts, C., & Ferveur, J. F. (2013).** Choice alters *Drosophila* oviposition site preference on menthol. *Biology open*, BIO20136973.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., ... & Brokstein, P. (2000).** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.
- Ahn, Seung-Joon, Heiko Vogel, and David G. Heckel (2012).** "Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects." *Insect biochemistry and molecular biology* 42.2 : 133-147.
- Alberch, P. (1991).** From genes to phenotype: dynamical systems and evolvability. *Genetica*, 84(1), 5-11.
- Amlou, M., Moreteau, B., & David, J. R. (1998).** Genetic Analysis of *Drosophila sechellia* Specialization: Oviposition Behavior Toward the Major Aliphatic Acids of Its Host Plant. *Behavior genetics*, 28(6), 455-464.
- Anholt, R. R., & Mackay, T. F. (2015).** Dissecting the genetic architecture of behavior in *Drosophila melanogaster*. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 2, 1-7.
- Anholt, R. R., & Mackay, T. F. (2004).** Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics*, 5(11), 838-849.
- Arbeitman, M. N., Fleming, A. A., Siegal, M. L., Null, B. H., & Baker, B. S. (2004).** A genomic analysis of *Drosophila* somatic sexual differentiation and its regulation. *Development*, 131(9), 2007-2021.
- Arikawa, K., & Stavenga, D. G. (2014).** Insect Photopigments: Photoreceptor Spectral Sensitivities and Visual Adaptations. In *Evolution of Visual and Non-visual Pigments* (pp. 137-162). Springer US.
- Ashburner, M. (1989).** *Drosophila*. A laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., ... & Sherlock, G. (2000).** Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25(1), 25-29.
- Atwell, S., Huang, Y. S., Vilhjálmsson, B. J., Willems, G., Horton, M., Li, Y., ... & Nordborg, M. (2010).** Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature*, 465(7298), 627-631.
- Ayroles, J. F., Carbone, M. A., Stone, E. A., Jordan, K. W., Lyman, R. F., Magwire, M. M., ... & Mackay, T. F. (2009).** Systems genetics of complex traits in *Drosophila melanogaster*. *Nature genetics*, 41(3), 299-307.
- Bakula, M. (1969).** The persistence of a microbial flora during postembryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of invertebrate pathology*, 14(3), 365-374.

BIBLIOGRAFÍA

- Barker J.S.F. & W.T. Starmer (1999).** Environmental effects and the genetics of oviposition site preference for natural yeast substrates in *Drosophila buzzatii*. *Hereditas* 130: 145–175.
- Barrozo RB, Lazzari CR (2004).** Orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. *Chemical Senses* 29: 833–841.
- Bartelt, R. J., Schaner, A. M., & Jackson, L. L. (1985).** cis-Vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Chemical Ecology*, 11(12), 1747-1756.
- Bastide, H., Betancourt, A., Nolte, V., Tobler, R., Stöbe, P., Futschik, A., & Schlötterer, C. (2013).** A genome-wide, fine-scale map of natural pigmentation variation in *Drosophila melanogaster*.
- Bate, M., & Arias, A. M. (Eds.). (1993).** The development of *Drosophila melanogaster* (Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Beaver, L. M., Rush, B. L., Gvakharia, B. O., & Giebultowicz, J. M. (2003).** Noncircadian regulation and function of clock genes period and timeless in oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of biological rhythms*, 18(6), 463-472.
- Becher, P. G., Flick, G., Rozpędowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., ... & Bengtsson, M. (2012).** Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology*, 26(4), 822-828.
- Begon, M. (1982).** Yeasts and *Drosophila*. The genetics and biology of *Drosophila*, 3, 345-384.
- Bellen, H. J., Levis, R. W., He, Y., Carlson, J. W., Evans-Holm, M., Bae, E., ... & Spradling, A. C. (2011).** The *Drosophila* gene disruption project: progress using transposons with distinctive site specificities. *Genetics*, 188(3), 731-743.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995).** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289-300.
- Berner, D., & Salzburger, W. (2015).** The genomics of organismal diversification illuminated by adaptive radiations. *Trends in Genetics*, 31(9), 491-499.
- Betti, M. I., Soto, E. M., & Hasson, E. (2014).** Oviposition site preference for natural breeding sites in *Drosophila melanogaster* (Diptera: *Drosophilidae*) populations from Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*, 107(5), 944-953.
- Bhaskar, V., & Courey, A. J. (2002).** The MADF-BESS domain factor Dip3 potentiates synergistic activation by Dorsal and Twist. *Gene*, 299(1), 173-184.

BIBLIOGRAFÍA

- Bodenreider, O. (2008).** Biomedical ontologies in action: role in knowledge management, data integration and decision support. *Yearbook of medical informatics*, 67.
- Brown, E. B., Layne, J. E., Zhu, C., Jegga, A. G., & Rollmann, S. M. (2013).** Genome wide association mapping of natural variation in odour guided behaviour in *Drosophila*. *Genes, Brain and Behavior*, 12(5), 503-515.
- Brummel, T., Ching, A., Seroude, L., Simon, A. F., & Benzer, S. (2004).** *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), 12974-12979.
- Bush G.L. (1975).** Sympatric speciation in phytophagous parasitic insects. In: Price PW (ed) *Evolutionary Strategies of Parasitic Insects and Mites*. Plenum Press, New York, pp 187–206.
- Carney, G. E., & Taylor, B. J. (2003).** logjam encodes a predicted EMP24/GP25 protein that is required for *Drosophila* oviposition behavior. *Genetics*, 164(1), 173-186.
- Chess, K. F., & Ringo, J. M. (1985).** Oviposition site selection by *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Evolution*, 869-877.
- Cheverud, J. M., & Routman, E. J. (1995).** Epistasis and its contribution to genetic variance components. *Genetics*, 139(3), 1455-1461.
- Chow, C. Y., Wolfner, M. F., & Clark, A. G. (2013).** Using natural variation in *Drosophila* to discover previously unknown endoplasmic reticulum stress genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 9013-9018.
- Clark, A. G., Eisen, M. B., Smith, D. R., Bergman, C. M., Oliver, B., Markow, T. A., ... & Civetta, A. (2007).** Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, 450(7167), 203-218.
- Conner, J. K., & Hartl, D. L. (2004).** *A primer of ecological genetics*. Sinauer Associates Incorporated.
- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (2004).** *Speciation* (Vol. 37). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Craig, T. P., Horner, J. D., & Itami, J. K. (2001).** Genetics, experience, and host- plant preference in *Eurosta Solidaginis*: Implications for host shifts and speciation. *Evolution*, 55(4), 773-782.
- Cuif, M. H., Possmayer, F., Zander, H., Bordes, N., Jollivet, F., Couedel-Courteille, A., ... & Goud, B. (1999).** Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome. *The EMBO journal*, 18(7), 1772-1782.

BIBLIOGRAFÍA

- Daniels, R. W., Collins, C. A., Gelfand, M. V., Dant, J., Brooks, E. S., Krantz, D. E., & DiAntonio, A. (2004).** Increased expression of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decrease in quantal content. *The Journal of neuroscience*, 24(46), 10466-10474.
- Darvasi, A. (1998).** Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nature genetics*, 18(1), 19-24.
- David, J. R., Gibert, P., Legout, H., Petavy, G., Capy, P., & Moreteau, B. (2005).** Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity*, 94(1), 3-12.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., (2013).** InfoStat Version 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available on-line: <http://www.infostat.com.ar>.
- Dobzhansky, T., & Pavan, C. (1950).** Local and seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. *The Journal of Animal Ecology*, 1-14.
- Duncan, J. E., Lytle, N. K., Zuniga, A., & Goldstein, L. S. (2013).** The microtubule regulatory protein *Stathmin* is required to maintain the integrity of axonal microtubules in *Drosophila*. *PloS one*, 8(6), e68324.
- Durham, M. F., Magwire, M. M., Stone, E. A., & Leips, J. (2014).** Genome-wide analysis in *Drosophila* reveals age-specific effects of SNPs on fitness traits. *Nature communications*, 5.
- Dweck, H.K., Ebrahim, S.A., Kromann, S., Bown, D., Hillbur, Y., Sachse, S., Hansson, B.S., Stensmyr, M.C. (2013).** Olfactory Preference for Egg Laying on Citrus Substrates in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 23(24): 2472-2480.
- Edwards, A. C., Zwarts, L., Yamamoto, A., Callaerts, P., & Mackay, T. F. (2009).** Mutations in many genes affect aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*. *BMC biology*, 7(1), 29.
- Eilbeck, K., Lewis, S. E., Mungall, C. J., Yandell, M., Stein, L., Durbin, R., & Ashburner, M. (2005).** The Sequence Ontology: a tool for the unification of genome annotations. *Genome biology*, 6(5), R44.
- Endler, J.A. (1986).** *Natural Selection in the wild*. Princeton University Press Princeton, New Jersey
- England, B. P., Admon, A., & Tjian, R. (1992).** Cloning of *Drosophila* transcription factor Adf-1 reveals homology to Myb oncoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(2), 683-687.
- Falconer, D. S. (1952).** The problem of environment and selection. *American Naturalist*, 293-298.

BIBLIOGRAFÍA

- Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C. (1996).** Introduction to Quantitative Genetics. Longman, 19(8), 1.
- Fanara J.J., Fontdevila A. & E.R. Hasson (1999).** Oviposition preference and life history traits in the cactophilic sibling species *Drosophila koepferae* and *Drosophila buzzatii* in association to their natural host. *Evol. Ecol.* 13:173-190.
- Fanara J.J. & E.R. Hasson (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. J., Robinson, K. O., Rollmann, S. M., Anholt, R. R., & Mackay, T. F. (2002).** Vanaso is a candidate quantitative trait gene for *Drosophila* olfactory behavior. *Genetics*, 162(3), 1321-1328.
- Fanara, J. J., Folguera, G., Iriarte, P. F., Mensch, J., & Hasson, E. (2006).** Genotype by environment interactions in viability and developmental time in populations of cactophilic *Drosophila*. *Journal of evolutionary biology*, 19(3), 900-908.
- Fernández Iriarte, P., & Hasson, E. (2000).** The role of the use of different host plants in the maintenance of the inversion polymorphism in the cactophilic *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, 54(4), 1295-1302.
- Finley, K. D., P. T. Edeen, R. C. Cumming, M. D. Mardahl-Dumesnil, B. J. Taylor et al. (2003).** blue cheese mutations define a novel, conserved gene involved in progressive neural degeneration. *J. Neurosci.* 23: 1254–1264.
- Fisher, R. A. (1930).** The genetical theory of natural selection: a complete variorum edition. Oxford University Press.
- Flaven-Pouchon, J., Garcia, T., Abed-Vieillard, D., Farine, J. P., Ferveur, J. F., & Everaerts, C. (2014).** Transient and permanent experience with fatty acids changes *Drosophila melanogaster* preference and fitness. *PloS one*, 9(3).
- Flicek P, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, Cunningham F, Cutts T, et al. Ensembl (2008).** *Nucleic Acids Res.* 2008;36:D707–D714.
- Flicek, P., Aken, B. L., Ballester, B., Beal, K., Bragin, E., Brent, S., ... & Durbin, R. (2010).** Ensembl's 10th year. *Nucleic acids research*, 38(suppl 1), D557-D562.
- Flint, J., & Eskin, E. (2012).** Genome-wide association studies in mice. *Nature Reviews Genetics*, 13(11), 807-817.
- Fogleman, J. C. (1979).** Oviposition site preference for substrate temperature in *Drosophila melanogaster*. *Behavior genetics*, 9(5), 407-412.

BIBLIOGRAFÍA

- Fougeron A, Farine J, Flaven-Pouchon J, Everaerts C, Ferveur J (2011).** Fatty-acid preference changes during development in *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE 6(10): e26899. doi: 10.1371/journal.pone.0026899
- Fox C.W. (1993) .** A quantitative analysis of oviposition preference and larval performance on two hosts in the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. Evolution 47 1 :166-175.
- Fox, C. W., & Wolf, J. B. (2006).** Evolutionary genetics. Oxford etc.: Oxford univ. press.
- Futuyma D.J. & S.C. Peterson. (1985).** Genetic variation in the use of resources by insects. Annual Review of entomology 30:217-238.
- Futuyma, D. J. (1991).** Evolution of host specificity in herbivorous insects: genetic, ecological, and phylogenetic aspects. Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions. John Wiley and Sons, New York, 431-454.
- Gilad, Y., Rifkin, S. A., & Pritchard, J. K. (2008).** Revealing the architecture of gene regulation: the promise of *eQTL* studies. Trends in genetics, 24(8), 408-415.
- Gilbert, S. F., & Bolker, J. A. (2003).** Ecological developmental biology: preface to the symposium. Evolution & Development, 5(1), 3-8.
- Gillespie, J. H., & Turelli, M. (1989).** Genotype-environment interactions and the maintenance of polygenic variation. Genetics, 121(1), 129-138.
- Graf, S. A., & Sokolowski, M. B. (1989).** Rover/sitter *Drosophila melanogaster* larval foraging polymorphism as a function of larval development, food-patch quality, and starvation. Journal of insect behavior, 2(3), 301-313.
- Graf, E. R., Heerssen, H. M., Wright, C. M., Davis, G. W., & DiAntonio, A. (2011).** Stathmin is required for stability of the *Drosophila* neuromuscular junction. The Journal of Neuroscience, 31(42), 15026-15034.
- Grimaldi, D., & Engel, M. S. (2006).** Fossil *Liposcelididae* and the lice ages (Insecta: *Psocodea*). Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 273(1586), 625-633.
- Gripenberg, S., Mayhew, P. J., Parnell, M., & Roslin, T. (2010).** A meta-analysis of preference–performance relationships in phytophagous insects. Ecology letters, 13(3), 383-393.
- Gómez, G. A., & Hasson, E. (2003).** Transpecific polymorphisms in an inversion linked esterase locus in *Drosophila buzzatii*. Molecular biology and evolution, 20(3), 410-423.
- Gong, J., Costanzo, A., Yang, H. Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Levrero, M., & Wang, J. Y. (1999).** The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. Nature, 399(6738), 806-809.

BIBLIOGRAFÍA

- Gorur, G., Lomonaco, C., & Mackenzie, A. (2005).** Phenotypic plasticity in host-plant specialisation in *Aphis fabae*. *Ecological Entomology*, 30(6), 657-664.
- Gorur, G., Lomonaco, C., & Mackenzie, A. (2007).** Phenotypic plasticity in host choice behavior in black bean aphid, *Aphis fabae* (Homoptera: *Aphididae*). *Arthropod-Plant Interactions*, 1(3), 187-194.
- Gottesman, S., & Maurizi, M. R. (1992).** Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiological reviews*, 56(4), 592.
- Guild, G. M., Connelly, P. S., Ruggiero, L., Vranich, K. A., & Tilney, L. G. (2005).** Actin filament bundles in *Drosophila* wing hairs: hairs and bristles use different strategies for assembly. *Molecular biology of the cell*, 16(8), 3620-3631.
- Guiraudie-Capraz G. & Jallon J.M. (2007).** Role of the ejaculatory bulb in biosynthesis of the male pheromone cis-vaccenyl acetate in *Drosophila melanogaster*. *Integrative zoology* 2(2), 89-99.
- Gurganus, M. C., Fry, J. D., Nuzhdin, S. V., Pasyukova, E. G., Lyman, R. F., & Mackay, T. F. (1998).** Genotype-environment interaction at quantitative trait loci affecting sensory bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 149(4), 1883-1898.
- Hansen, T. F. (2006).** The evolution of genetic architecture. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 123-157.
- Hansen, B. G., Halkier, B. A., & Kliebenstein, D. J. (2008).** Identifying the molecular basis of *QTLs*: *eQTLs* add a new dimension. *Trends in plant science*, 13(2), 72-77.
- Harbison, S. T., Carbone, M. A., Ayroles, J. F., Stone, E. A., Lyman, R. F., & Mackay, T. F. (2009).** Co-regulated transcriptional networks contribute to natural genetic variation in *Drosophila* sleep. *Nature genetics*, 41(3), 371-375.
- Harbison, S. T., McCoy, L. J., & Mackay, T. F. (2013).** Genome-wide association study of sleep in *Drosophila melanogaster*. *BMC genomics*, 14(1), 281.
- Hardin, P. E. (2005).** The circadian timekeeping system of *Drosophila*. *Current Biology*, 15(17), R714-R722.
- Hasson, E., & Eanes, W. F. (1996).** Contrasting histories of three gene regions associated with In (3L) Payne of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 144(4), 1565-1575.
- Hasson, E., Soto, I. M., Carreira, V. P., Corio, C., Soto, E. M., & Betti, M. (2009).** Host plants, fitness and developmental instability in a guild of cactophilic species of the genus *Drosophila*. *Ecotoxicology research developments*, 89-109.

BIBLIOGRAFÍA

- Hasson, E. R., Fanara, J. J., & Frankel, N. (2014).** Selection and Complex Multigene Traits. eLS.
- Hedrick, P. W. (2005).** A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59(8), 1633-1638.
- Hennig, W. (1965).** Phylogenetic systematics. *Annual review of entomology*, 10(1), 97-116.
- Hoffmann, A. A., & Harshman, L. G. (1985).** Male effects on fecundity in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 638-644.
- Hoffman, J. M., Soltow, Q. A., Li, S., Sidik, A., Jones, D. P., & Promislow, D. E. (2014).** Effects of age, sex, and genotype on high-sensitivity metabolomic profiles in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Aging cell*, 13(4), 596-604.
- Houle, D., Govindaraju, D. R., & Omholt, S. (2010).** Phenomics: the next challenge. *Nature Reviews Genetics*, 11(12), 855-866.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2008).** Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1), 44-57.
- Huang, W., Massouras, A., Inoue, Y., Peiffer, J., Ràmia, M., Tarone, A. M., ... & Deplancke, B. (2014).** Natural variation in genome architecture among 205 *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel lines. *Genome research*, 24(7), 1193-1208.
- Jaenike, J. (1978).** On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. *Theoretical population biology*, 14(3), 350-356.
- Jaenike, J., & Selander, R. K. (1979).** Ecological generalism in *Drosophila falleni*: genetic evidence. *Evolution*, 741-748.
- Jaenike, J. (1983).** Induction of host preference in *Drosophila melanogaster*. *Oecologia*, 58(3), 320-325.
- Jaenike, J., & Grimaldi, D. (1983).** Genetic variation for host preference within and among populations of *Drosophila tripunctata*. *Evolution*, 1023-1033.
- Jaenike, J. (1986).** Genetic complexity of host-selection behavior in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(7), 2148-2151.
- Jaenike, J. (1990).** Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 243-273.
- Jaenike J. & R.D. Holt (1991).** Genetic variation for habitat preference: evidence and explanations. *The American Naturalist* 131: 67-97

BIBLIOGRAFÍA

- Janz, N. (2002).** Evolutionary ecology of oviposition strategies. Chemoecology of insect eggs and egg deposition, 349-376.
- Jermý, T. (1987).** The role of experience in the host selection of phytophagous insects. In Perspectives in chemoreception and behavior (pp. 143-157). Springer New York.
- Johnson, K. G., Tenney, A. P., Ghose, A., Duckworth, A. M., Higashi, M. E., Parfitt, K., ... & Van Vactor, D. (2006).** The HSPGs Syndecan and Dallylike bind the receptor phosphatase LAR and exert distinct effects on synaptic development. *Neuron*, 49(4), 517-531.
- Joshi, A., & Thompson, J. N. (1997).** Adaptation and specialization in a two-resource environment in *Drosophila* species. *Evolution*, 846-855.
- Joseph, R. M., Devineni, A. V., King, I. F., & Heberlein, U. (2009).** Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), 11352-11357.
- Jordan, K. W., Craver, K. L., Magwire, M. M., Cubilla, C. E., Mackay, T. F., & Anholt, R. R. (2012).** Genome-wide association for sensitivity to chronic oxidative stress in *Drosophila melanogaster*.
- Jowett, T., & Postlethwait, J. H. (1980).** The regulation of yolk polypeptide synthesis in *Drosophila* ovaries and fat body by 20-hydroxyecdysone and a juvenile hormone analog. *Developmental biology*, 80(1), 225-234.
- Jumbo-Lucioni, P., Bu, S., Harbison, S. T., Slaughter, J. C., Mackay, T. F., Moellering, D. R., & De Luca, M. (2012).** Nuclear genomic control of naturally occurring variation in mitochondrial function in *Drosophila melanogaster*. *BMC genomics*, 13(1), 659.
- Kacsoh, B. Z., Lynch, Z. R., Mortimer, N. T., & Schlenke, T. A. (2013).** Fruit flies medicate offspring after seeing parasites. *Science*, 339(6122), 947-950.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2014).** Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic acids research*, 42(D1), D199-D205.
- Keller, A. (2007).** *Drosophila melanogaster's* history as a human commensal. *Current Biology*, 17(3), R77-R81.
- Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Tsai, J. Y., Sackler, R. S., Haynes, C., ... & Hoh, J. (2005).** Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*, 308(5720), 385-389.

BIBLIOGRAFÍA

- Kong, E. C., Allouche, L., Chapot, P. A., Vranizan, K., Moore, M. S., Heberlein, U., & Wolf, F. W. (2010).** Ethanol-Regulated Genes That Contribute to Ethanol Sensitivity and Rapid Tolerance in *Drosophila*. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(2), 302-316.
- Krasnoperov, V., Lu, Y., Buryanovsky, L., Neubert, T. A., Ichtchenko, K., & Petrenko, A. G. (2002).** Post-translational Proteolytic Processing of the Calcium-independent Receptor of α -Latrotoxin (CIRL), a Natural Chimera of the Cell Adhesion Protein and the G Protein-coupled Receptor ROLE OF THE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEOLYSIS SITE (GPS) MOTIF. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46518-46526.
- Kruuk, L. E., Clutton-Brock, T. H., Slate, J., Pemberton, J. M., Brotherstone, S., & Guinness, F. E. (2000).** Heritability of fitness in a wild mammal population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 698-703.
- Krzemiński, W., & Krzemińska, E. (2003).** Triassic *Diptera*: descriptions, revisions and phylogenetic relations. *Acta zoologica cracoviensia*, 46(Suppl.), 153-184.
- Laayouni, H., Hasson, E., Santos, M., & Fontdevila, A. (2003).** The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXXV. Inversion polymorphism and nucleotide variability in different regions of the second chromosome. *Molecular biology and evolution*, 20(6), 931-944.
- Lachaise, D., & Silvain, J. F. (2004).** How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster* - *D. simulans* palaeogeographic riddle. In *Drosophila melanogaster, Drosophila simulans: So Similar, So Different* (pp. 17-39). Springer Netherlands.
- Langley, C. H., Stevens, K., Cardeno, C., Lee, Y. C. G., Schrider, D. R., Pool, J. E., ... & Begun, D. J. (2012).** Genomic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, genetics-112.
- Lebreton, S., Becher, P. G., Hansson, B. S., & Witzgall, P. (2012).** Attraction of *Drosophila melanogaster* males to food-related and fly odours. *Journal of insect physiology*, 58(1), 125-129.
- Levins, R., & MacArthur, R. (1969).** An hypothesis to explain the incidence of monophagy. *Ecology*, 50(5), 910-911.
- Lin, M. F., Carlson, J. W., Crosby, M. A., Matthews, B. B., Yu, C., Park, S., ... & Kellis, M. (2007).** Revisiting the protein-coding gene catalog of *Drosophila melanogaster* using 12 fly genomes. *Genome research*, 17(12), 1823-1836.
- Linn, C., Feder, J.L., Nojima, S., Dambroski, H.R., Berlocher, S.H., and Roelofs, W. (2003).** Fruit odor discrimination and sympatric host race formation in *Rhagoletis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11490–11493.

BIBLIOGRAFÍA

- Linz, J., Baschwitz, A., Strutz, A., Dweck, H. K., Sachse, S., Hansson, B. S., & Stensmyr, M. C. (2013).** Host plant-driven sensory specialization in *Drosophila erecta*. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 280(1760), 20130626.
- Lu, Q., & Adler, P. N. (2015).** The diaphanous Gene of *Drosophila* Interacts Antagonistically with multiple wing hairs and Plays a Key Role in Wing Hair Morphogenesis. PloS one, 10(3), e0115623.
- Luque, Teresa, and David R. O'Reilly.** "Functional and phylogenetic analyses of a putative *Drosophila melanogaster* UDP-glycosyltransferase gene." Insect biochemistry and molecular biology 32.12 (2002): 1597-1604.
- Lunau, K. (2014).** Visual ecology of flies with particular reference to colour vision and colour preferences. Journal of Comparative Physiology A, 200(6), 497-512.
- Lushchak, V., Gospodaryov, D. V., Rovenko, B. M., Yurkevych, I. S., Perkhulyn, N. V., & Lushchak, V. I. (2013).** Specific dietary carbohydrates differentially influence the life span and fecundity of *Drosophila melanogaster*. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, glt077.
- Lynch, M., & Walsh, B. (1998).** Genetics and analysis of quantitative traits. (Vol. 1). Sunderland, MA: Sinauer
- Mackay, T. F. (2001).** Quantitative trait loci in *Drosophila*. Nature Reviews Genetics, 2(1), 11-20.
- Mackay, T. F. (2001).** The genetic architecture of quantitative traits. The character concept in evolutionary biology, 391-411.
- Mackay, T. F. C., Richards, S., & Gibbs, R. (2008).** Proposal to sequence a *Drosophila* Genetic Reference Panel: a community resource for the study of genotypic and phenotypic variation. White Paper.
- Mackay, T. F., Stone, E. A., & Ayroles, J. F. (2009).** The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. Nature Reviews Genetics, 10(8), 565-577.
- Mackay, T. F. (2010).** Mutations and quantitative genetic variation: lessons from *Drosophila*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 365(1544), 1229-1239.
- Mackay, T. F., Richards, S., Stone, E. A., Barbadilla, A., Ayroles, J. F., Zhu, D., ... & Thornton, K. R. (2012).** The *Drosophila melanogaster* genetic reference panel. Nature, 482(7384), 173-178.
- Mackay, T. F. (2015).** Epistasis for Quantitative Traits in *Drosophila*. In Epistasis (pp. 47-70). Springer New York.

BIBLIOGRAFÍA

- Magwire, M. M., Fabian, D. K., Schweyen, H., Cao, C., Longdon, B., Bayer, F., & Jiggins, F. M. (2012).** Genome-wide association studies reveal a simple genetic basis of resistance to naturally coevolving viruses in *Drosophila melanogaster*.
- Manjunatha, T., Dass, S. H., & Sharma, V. K. (2008).** Egg-laying rhythm in *Drosophila melanogaster*. *Journal of genetics*, 87(5), 495-504.
- Manning, A. (1967).** The control of sexual receptivity in female *Drosophila*. *Animal Behaviour*, 15(2), 239-250.
- Markow T.A. & P. O'Grady (2006).** *Drosophila: a Guide to Species Identification and Use*. Academic Press (Elsevier), London.
- Maung, S., Myat T. W. & Andreas Jenny (2015).** "Planar Cell Polarity in *Drosophila*." *organogenesis* 7.3 (2011). 165–179.
- McBride, C. S. (2007).** Rapid evolution of smell and taste receptor genes during host specialization in *Drosophila sechellia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), 4996-5001.
- Meigen, J. W. (1830).** *Drosophila*. Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten, 6, 81-88.
- Miller, P. M., Saltz, J. B., Cochrane, V. A., Marcinkowski, C. M., Mobin, R., & Turner, T. L. (2011).** Natural variation in decision-making behavior in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 6(1), e16436.
- Moreteau, B., R'Kha, S., & David, J. R. (1994).** Genetics of a nonoptimal behavior: Oviposition preference of *Drosophila mauritiana* for a toxic resource. *Behavior genetics*, 24(5), 433-441.
- Morgan, T. J., & Mackay, T. F. C. (2006).** Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 96(3), 232-242.
- Navarro, A., Barbadilla, A., & Ruiz, A. (2000).** Effect of inversion polymorphism on the neutral nucleotide variability of linked chromosomal regions in *Drosophila*. *Genetics*, 155(2), 685-698.
- Nosil, P. (2008).** Ernst Mayr and the integration of geographic and ecological factors in speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95(1), 26-46.
- Nosil P. (2012).** *Ecological Speciation*. Oxford SAeries in Ecology and Evolution. Oxford UNiversity Press. Oxford, Reino Unido
- Oakeshott, J. G., Vacek, D. C., & Anderson, P. R. (1989).** Effects of microbial floras on the distributions of five domestic *Drosophila* species across fruit resources. *Oecologia*, 78(4), 533-541.

BIBLIOGRAFÍA

- Ober, U., Ayroles, J. F., Stone, E. A., Richards, S., Zhu, D., Gibbs, R. A., ... & Simianer, H. (2012).** Using whole-genome sequence data to predict quantitative trait phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS genetics*, 8(5), e1002685.
- Ozon, S., Guichet, A., Gavet, O., Roth, S., & Sobel, A. (2002).** *Drosophila* stathmin: a microtubule-destabilizing factor involved in nervous system formation. *Molecular biology of the cell*, 13(2), 698-710.
- Palanca, L., Gaskett, A. C., Günther, C. S., Newcomb, R. D., & Goddard, M. R. (2013).** Quantifying variation in the ability of yeasts to attract *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 8(9), e75332.
- Panhuis, T. M., & Swanson, W. J. (2006).** Molecular evolution and population genetic analysis of candidate female reproductive genes in *Drosophila*. *Genetics*, 173(4), 2039-2047.
- Patterson J.T. & W.S. Stone (1952).** Evolution in the Genus *Drosophila*. New York: Macmillan.
- Paulk, A., Millard, S. S., & van Swinderen, B. (2013).** Vision in *Drosophila*: seeing the world through a model's eyes. *Annual review of entomology*, 58, 313-332.
- Pavlou, H. J., & Goodwin, S. F. (2013).** Courtship behavior in *Drosophila melanogaster*: towards a 'courtship connectome'. *Current opinion in neurobiology*, 23(1), 76-83.
- Pearson, T. A., & Manolio, T. A. (2008).** How to interpret a genome-wide association study. *Jama*, 299(11), 1335-1344.
- Phillips, P. C. (2008).** Epistasis—the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics*, 9(11), 855-867.
- Pigliucci, M., Murren, C. J., & Schlichting, C. D. (2006).** Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology*, 209(12), 2362-2367.
- Pigliucci, M., & Kaplan, J. (2010).** Making sense of evolution: the conceptual foundations of evolutionary biology. University of Chicago Press.
- Plautz, J. D., Kaneko, M., Hall, J. C., & Kay, S. A. (1997).** Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*, 278(5343), 1632-1635.
- Postlethwait, J. H., & Handler, A. M. (1979).** The roles of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone during vitellogenesis in isolated abdomens of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 25(5), 455-460.
- Price, P. W., Bouton, C. E., Gross, P., McPherson, B. A., Thompson, J. N., & Weis, A. E. (1980).** Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and systematics*, 41-65.

BIBLIOGRAFÍA

- Prokupek, A. M., Kachman, S. D., Ladunga, I., & Harshman, L. G. (2009).** Transcriptional profiling of the sperm storage organs of *Drosophila melanogaster*. *Insect molecular biology*, 18(4), 465-475.
- Quinlan, M. E. (2013).** Direct interaction between two actin nucleators is required in *Drosophila* oogenesis. *Development*, 140(21), 4417-4425.
- Ranc, N., Muños, S., Xu, J., Le Paslier, M. C., Chauveau, A., Bounon, R., ... & Causse, M. (2012).** Genome-wide association mapping in tomato (*Solanum lycopersicum*) is possible using genome admixture of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*. *G3: Genes Genomes Genetics*, 2(8), 853-864.
- Ridley, M (2004).** *Evolution*. Third edition Blackwell Publishing.
- R'kha, S., Capy, P., & David, J. R. (1991).** Host-plant specialization in the *Drosophila melanogaster* species complex: a physiological, behavioral, and genetical analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5), 1835-1839.
- Robertson, A. (1959).** The sampling variance of the genetic correlation coefficient. *Biometrics*, 15(3), 469-485.
- Rockman, M. V., & Kruglyak, L. (2006).** Genetics of global gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 7(11), 862-872.
- Roff, D. A. (1997).** Phenotypic Plasticity and Reaction Norms. In *Evolutionary Quantitative Genetics* (pp. 196-240). Springer US.
- Roff, D. A., & Mousseau, T. A. (1999).** Does natural selection alter genetic architecture? An evaluation of quantitative genetic variation among populations of *Allenomobius socius* and *A. fasciatus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(2), 361-369.
- Saito, R., Smoot, M. E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P. L., Lotia, S., ... & Ideker, T. (2012).** A travel guide to Cytoscape plugins. *Nature methods*, 9(11), 1069-1076.
- Schlichting, C. D., & Pigliucci, M. (1998).** *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sinauer Associates Incorporated.
- Schluter, D. (2009).** Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science*, 323(5915), 737-741.
- Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J., & Dicke, M. (2005).** *Insect-plant biology* (No. Ed. 2). Oxford University Press.
- Service, P. M., & Rose, M. R. (1985).** Genetic co variation among life-history components: the effect of novel environments. *Evolution*, 943-945.

BIBLIOGRAFÍA

- Sezer, M., & Butlin, R. K. (1998).** The genetic basis of oviposition preference differences between sympatric host races of the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1413), 2399-2405.
- Sieberts, S. K., & Schadt, E. E. (2007).** Moving toward a system genetics view of disease. *Mammalian Genome*, 18(6-7), 389-401.
- Silberbush, A., & Blaustein, L. (2011).** Mosquito females quantify risk of predation to their progeny when selecting an oviposition site. *Functional Ecology*, 25(5), 1091-1095.
- Singer, M. C. (1986).** The definition and measurement of oviposition preference in plant-feeding insects. In *Insect-plant interactions* (pp. 65-94). Springer New York.
- Sgro, C. M., & Hoffmann, A. A. (2004).** Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity*, 93(3), 241-248.
- Smallegange RC, Qiu YT, Bukovinskine-Kiss G, Van Loon JJ, Takken W (2009).** The effect of aliphatic carboxylic acids on olfaction-based host-seeking of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Journal of Chemical Ecology* 35: 933–943.
- Sokolowski, M. B. (2001).** *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nature Reviews Genetics*, 2(11), 879-890.
- Soto, E. M., Soto, I. M., Carreira, V. P., Fanara, J. J., & Hasson, E. (2008).** Host-related life history traits in interspecific hybrids of cactophilic *Drosophila*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 126(1), 18-27.
- Soto, E. M., Soto, I. M., Cortese, M. D., & Hasson, E. (2011).** Oviposition site preferences and performance in natural resources in the human commensals *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Fly*, 5(2), 102-109.
- Soto, E. M., Goenaga, J., Hurtado, J. P., & Hasson, E. (2012).** Oviposition and performance in natural hosts in cactophilic *Drosophila*. *Evolutionary Ecology*, 26(4), 975-990.
- Soto, E. M., Betti, M. I., Hurtado, J., & Hasson, E. (2014).** Differential responses to artificial selection on oviposition site preferences in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Insect science*.
- StatSoft Inc., STATISTICA (data analysis software system) 8.0 Edition. (2007).** Tulsa: StatSoft Inc., OK. www.statsoft.com
- Stearns, S., de Jong, G., & Newman, B. (1991).** The effects of phenotypic plasticity on genetic correlations. *Trends in Ecology & Evolution*, 6(4), 122-126.
- Steen, C. B. (2013).** ALiX controls cytokinesis in vivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Stephens, D. W., & Krebs, J. R. (1986).** Foraging theory. Princeton University Press.
- Stergachis, A. B., Haugen, E., Shafer, A., Fu, W., Vernot, B., Reynolds, A., ... & Stamatoyannopoulos, J. A. (2013).** Exonic transcription factor binding directs codon choice and affects protein evolution. *Science*, 342(6164), 1367-1372.
- Stone, A. (1970).** A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, supplement IV.(Diptera: *Culicidae*). Catálogo sinóptico de los zancudos del mundo, suplemento IV.(*Diptera: Culicidae*). Proceedings of the Entomological Society of Washington., 72(2), 137-171.
- Stone, E. A., & Ayroles, J. F. (2009).** Modulated modularity clustering as an exploratory tool for functional genomic inference. *PLoS Genet*, 5(5), e1000479.
- Swanson, W. J., Wong, A., Wolfner, M. F., & Aquadro, C. F. (2004).** Evolutionary expressed sequence tag analysis of *Drosophila* female reproductive tracts identifies genes subjected to positive selection. *Genetics*, 168(3), 1457-1465.
- Sultan, S. E., & Stearns, S. C. (2005).** Environmentally contingent variation: phenotypic plasticity and norms of reaction. *Variation: a central concept in biology*, 303-332.
- Swarup, S., Huang, W., Mackay, T. F., & Anholt, R. R. (2013).** Analysis of natural variation reveals neurogenetic networks for *Drosophila* olfactory behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 1017-1022.
- Szafraniec, K., Borts, R. H., & Korona, R. (2001).** Environmental stress and mutational load in diploid strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), 1107-1112.
- Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., & Pascual-Montano, A. (2012).** GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic acids research*, 40(W1), W478-W483.
- Team, R. C. (2013).** R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 3(0).
- Thompson, K. J. (1986).** Oviposition digging in the grasshopper. I. Functional anatomy and the motor programme. *Journal of Experimental Biology*, 122(1), 387-411.
- Thompson J.N. (1988).** Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. *Entomol. Exp. Appl.* 47: 3-14.
- Takamura, T., & Fuyama, Y. (1980).** Behavior genetics of choice of oviposition sites in *Drosophila melanogaster*. I. Genetic variability and analysis of behavior. *Behavior genetics*, 10(1), 105-120.

BIBLIOGRAFÍA

- Toshima, N., & Tanimura, T. (2012).** Taste preference for amino acids is dependent on internal nutritional state in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of experimental biology*, 215(16), 2827-2832.
- Turner, T. L., Miller, P. M., & Cochrane, V. A. (2013).** Combining genome-wide methods to investigate the genetic complexity of courtship song variation in *Drosophila melanogaster*. *Molecular biology and evolution*, 30(9), 2113-2120.
- Tweedie, S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., McQuilton, P., Marygold, S., ... & FlyBase Consortium. (2009).** FlyBase: enhancing *Drosophila* gene ontology annotations. *Nucleic acids research*, 37(suppl 1), D555-D559.
- Ungerer, M. C., & Rieseberg, L. H. (2003).** Genetic architecture of a selection response in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution*, 57(11), 2531-2539.
- Vanbergen, A. J., Raymond, B., Pearce, I. S., Watt, A. D., Hails, R. S., & Hartley, S. E. (2003).** Host shifting by *Operophtera brumata* into novel environments leads to population differentiation in life-history traits. *Ecological Entomology*, 28(5), 604-612.
- Van Der Linde, K., Bächli, G., Toda, M. J., Zhang, W. X., Katoh, T., Hu, Y. G., & Spicer, G. S. (2007).** Case 3407: *Drosophila Fallén*, 1832 (Insecta, Diptera): proposed conservation of usage. *Bulletin of Zoological Nomenclature*, 64(4), 238-242.
- Van Raden, P. M. (2008).** Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of dairy science*, 91(11), 4414-4423.
- Via, S., & Lande, R. (1985).** Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution*, 505-522.
- Via, S. (1987).** Genetic constraints on the evolution of phenotypic plasticity. In *Genetic constraints on adaptive evolution* (pp. 47-71). Springer Berlin Heidelberg.
- Videla, M., Valladares, G. R., & Salvo, A. (2012).** Choosing between good and better: optimal oviposition drives host plant selection when parents and offspring agree on best resources. *Oecologia*, 169(3), 743-751.
- Vosshall, L. B., & Stocker, R. F. (2007).** Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30, 505-533.
- Walsh, B. D. (1864).** On certain entomological speculations of the New England school of naturalists.
- Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., ... & Morris, Q. (2010).** The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic acids research*, 38(suppl 2), W214-W220.

BIBLIOGRAFÍA

- Weber, A. L., Khan, G. F., Magwire, M. M., Tabor, C. L., Mackay, T. F., & Anholt, R. R. (2012).** Genome-wide association analysis of oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 7(4), e34745.
- West-Eberhard, M. J. (1989).** Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual review of Ecology and Systematics*, 249-278.
- Whiteman, N. K., & Pierce, N. E. (2008).** Delicious poison: genetics of *Drosophila* host plant preference. *Trends in ecology & evolution*, 23(9), 473-478.
- Wiegmann, B. M., Trautwein, M. D., Winkler, I. S., Barr, N. B., Kim, J. W., Lambkin, C., ... & Yeates, D. K. (2011).** Episodic radiations in the fly tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5690-5695.
- Wilhelm, J. (1911).** The genotype conception of heredity. *The American Naturalist*, 45.
- Wright, S. (1931).** Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97.
- Wright, S. (1978).** *Evolution and the Genetics of Populations: A Treatise in Four Volumes: Vol. 4: Variability Within and Among Natural Populations.* University of Chicago Press.
- Wogaman, D. J., & Seiger, M. B. (1983).** Light intensity as a factor in the choice of an oviposition site by *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. *Canadian journal of genetics and cytology*, 25(4), 370-377.
- Wu, X., Wang, Z., Chang, X., & Jing, R. (2010).** Genetic dissection of the developmental behaviours of plant height in wheat under diverse water regimes. *Journal of experimental botany*, 61(11), 2923-2937.
- Yang, C. H., Belawat, P., Hafen, E., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2008).** *Drosophila* egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. *Science*, 319(5870), 1679-1683.
- Yeates D.K. & Wiegmann B.M. (2005).** *Evolutionary biology of flies.* Columbia University Press New York.
- Yew, J. Y., Dreisewerd, K., Luftmann, H., Müthing, J., Pohlentz, G., & Kravitz, E. A. (2009).** A New Male Sex Pheromone and Novel Cuticular Cues for Chemical Communication in *Drosophila*. *Current Biology*, 19(15), 1245-1254.
- Zar, J. H. (1999).** *Biostatistical analysis.* Pearson Education India.

ANEXO METOLÓGICO

1. Stock de líneas del panel de referencia genética de *Drosophila* (*DGRP*)

En esta tesis utilizamos 40 líneas que conforman el núcleo fundacional del panel de referencia genética de *Drosophila* (por sus siglas en inglés *DGRP*). El stock de líneas es una muestra de la población natural de *Drosophila melanogaster* de la localidad de Raleigh en el estado de Carolina del Norte en Estados Unidos. El muestreo que dio lugar al *DGRP* se realizó en la primavera del año 2003 en el Mercado NC Farmer's de Raleigh (35°45'46" N 78°39'44" O; Figura 1).



Figura 1. Mercado NC Farmer's en la ciudad de Raleigh. Carolina del norte. USA en donde se realizó el muestro original para fundar el *DGRP*.

Cada una de las líneas del panel deriva de una hembra fecundada en la naturaleza y se mantuvo por cruzamientos hermano x hermana a lo largo de 20 generaciones (Figura 2) para alcanzar un grado de isogenización del 98.6% (Huang *et al.*, 2014). Como resultado del procedimiento de isogenización se establecieron líneas viables y fértiles altamente homocigóticas para todos sus loci, con una reducción significativa de alelos deletéreos.

ANEXO METOLÓGICO

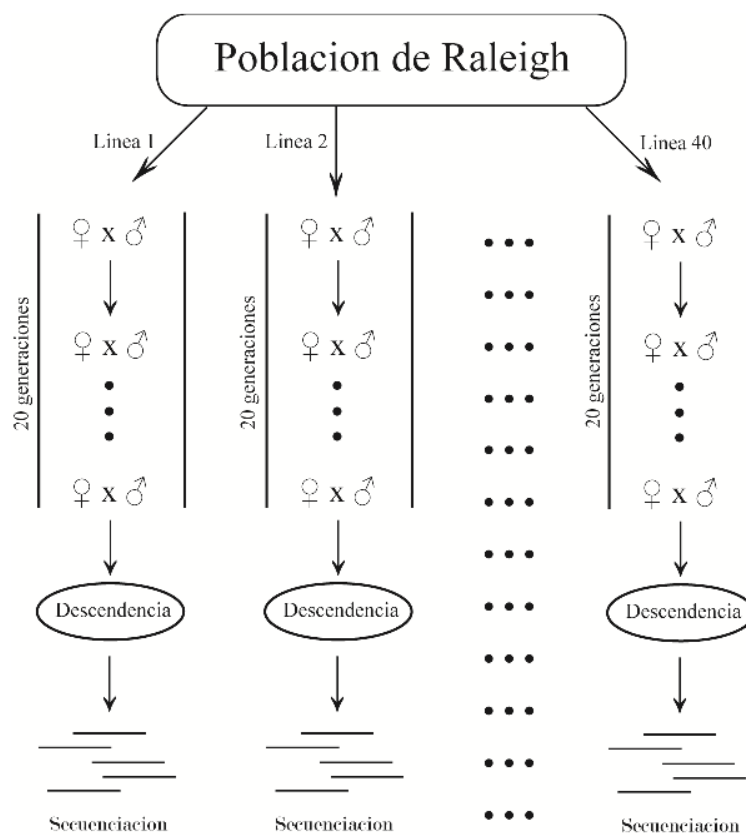


Figura 2. Metodología utilizada para la obtención del *DGRP* con el protocolo de isogenización y posterior secuenciación de cada una de las líneas.

Una vez finalizada la isogenización y hasta el momento de efectuarse los ensayos fenotípicos, las líneas se mantuvieron como poblaciones estables en el laboratorio. Los adultos de las diferentes líneas se criaron en medio de cultivo estándar de *Drosophila*. Este medio de cultivo es alimento preparado a base de harina de maíz, azúcar y agar. Aproximadamente cada 15 días los adultos se transferían a tubos con medio de cultivo fresco para evitar mortalidad larvaria denso-dependiente y para mantener un control del tamaño poblacional. Todas las líneas se mantuvieron en cámaras de cría bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 1 °C), humedad (60 - 70%) y fotoperiodo (12:12 hs. luz/oscuridad). Transcurrieron aproximadamente 40 generaciones entre el final de la isogenización y el comienzo de los ensayos fenotípicos.

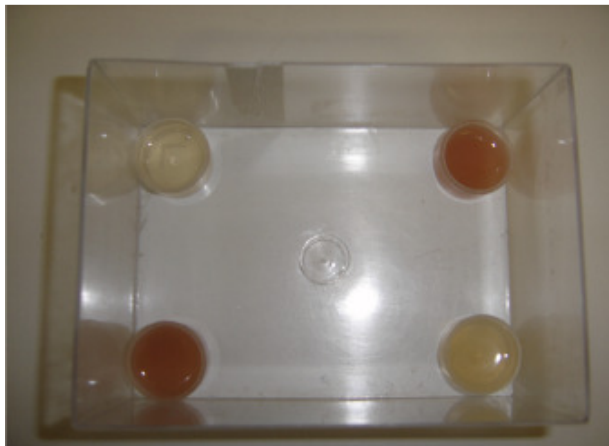
2. Ensayos Preferencia de oviposición (PO)

El ensayo biológico para medir la preferencia de oviposición (PO) consistió en la liberación de veinte machos y veinte hembras maduros (4 a 6 días de edad) de la misma línea del *DGRP* en cámaras de oviposición (cajas de acrílico transparente de 20 cm. x 15 cm. x 5 cm.). Cada cámara contenía en su interior cuatro placas con medio de oviposición (placas de acrílico transparente de 0.15 cm. x 0.2.5 cm.). El medio de oviposición consistió en un preparado de agar (10 gr./l.), agua

ANEXO METOLÓGICO

destilada más un licuado (200 gr/l) de uno de los recursos elegidos. Las placas de oviposición se distribuyeron en el interior de cada cámara de oviposición de forma tal que los dos tipos de recursos quedaran intercalados para asegurar la aleatoriedad de las mismas (Figura 3).

[A]



[B]

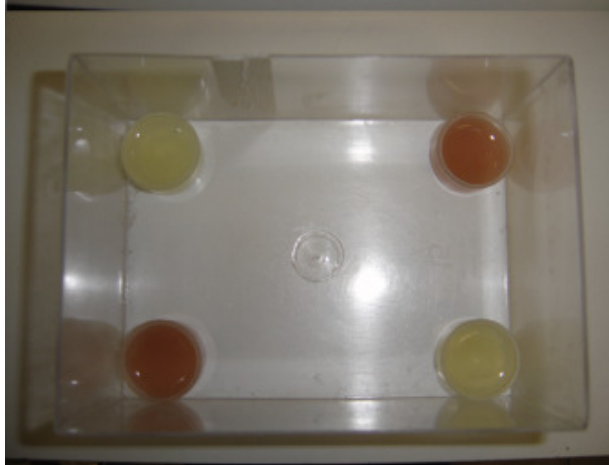


Figura 3. Cámaras de oviposición utilizadas en los ensayos de PO. [A] cámara de oviposición con la combinación de recursos UT. [B] cámara de oviposición con la combinación de recursos UN.

Una vez preparadas las cámaras se les permitió a las hembras oviponer durante un periodo de 36 hs. bajo condiciones controladas de luz, temperatura (foto período 12:12 a 25°C) y humedad (60 - 70%). Al cabo de las 36 hs. se desarmaron las cámaras y se procedió a fotografiar cada una de las placas de oviposición (figura 4). El dispositivo para tomar las fotografías consta de una cámara digital (*Sony Cybershot DSC-P93A*) conectada a una lupa (*Leica L2*). Por último, de cada fotografía obtenida se contabilizó el número de huevos utilizando el programa *Tpsdig v1.40* (Rohlf, 2001).

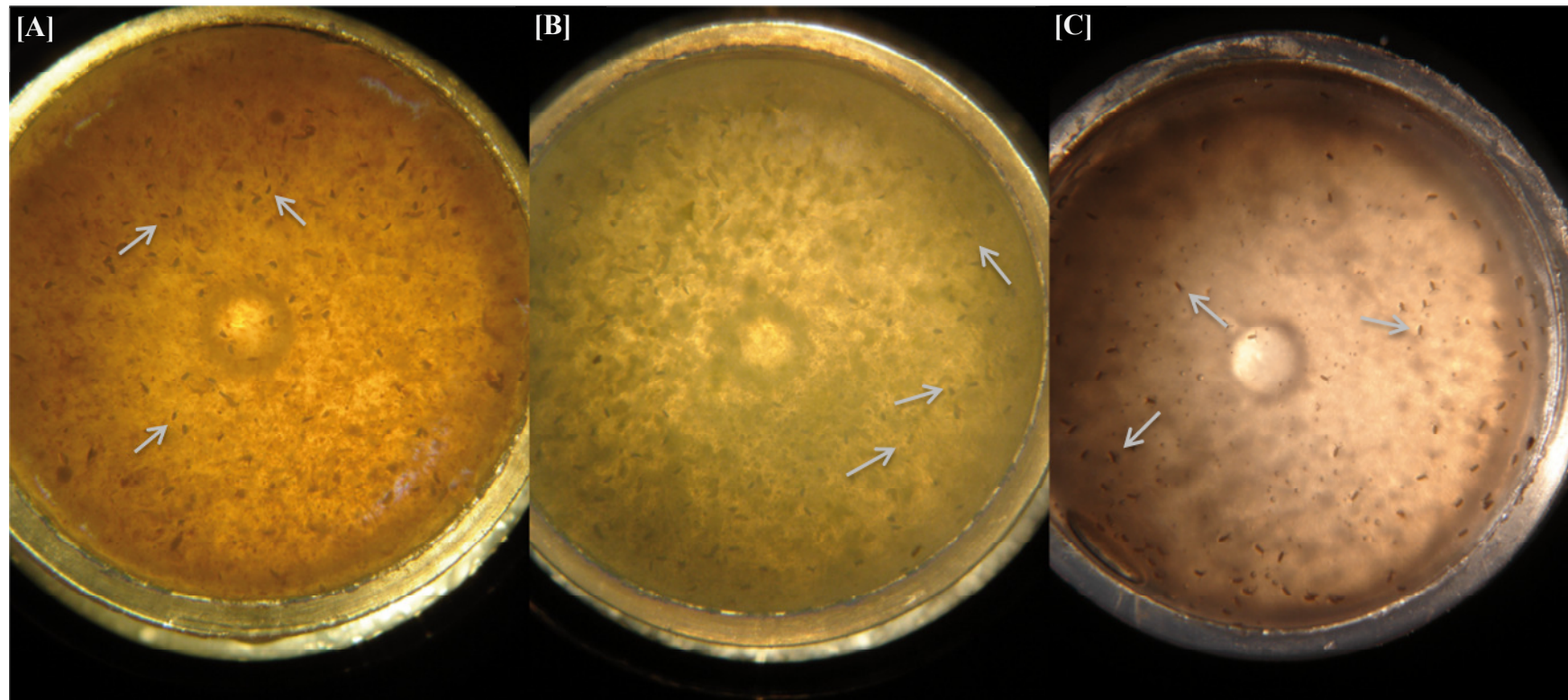


Figura 4. Placas de oviposición. [A] corresponde al recurso uva. [B] corresponde al recurso naranja y [C] al recurso tomate. Las flechas indican la posición de un huevo a modo de ejemplo.

3. Ensayos de Aceptación de recursos de oviposición (AO)

Los ensayos de Aceptación de recursos de oviposición fueron idénticos a los ensayos realizados para medir la PO con la diferencia que en vez de usar dos recursos distintos como estímulos de oviposición, se utilizó solo un recurso por cámara de oviposición. En otras palabras, cada cámara contenía en su interior 4 placas con el mismo medio de oviposición (Figura 5). Los recursos utilizados fueron, alternativamente, uva, tomate y naranja. La preparación de los medios de oviposición, edad de las moscas, tiempos de permanencia de las mismas en las cámaras de recolección de huevos fueron iguales a los ensayos de PO. Una vez finalizado cada ensayo, se fotografió cada placa de oviposición y se contabilizó el número de huevos siguiendo el mismo protocolo descrito en los ensayos de PO. Se realizaron 5 réplicas por cada línea por cada recurso.



Figura 5. Cámaras de oviposición preparadas para los ensayos de AO. Cada cámara posee un solo recurso en su interior [A] Uva, [B] Naranja, [C] Tomate y [D] Cámaras terminadas.

4. Secuenciación de las *DGRP*

La extracción del ADN genómico se realizó utilizando el *Gentra Purgene Tissue Kit* para un total de 168 líneas (ver Mackay *et al.*, 2012 para más detalles). La secuenciación se realizó usando dos tecnologías de secuenciación: *Solexa de Illumina inc.* y *454 de Roche Diagnostics Corporation*. En el ensamblado de los genomas de las líneas del *DGRP* se utilizaron complementariamente los resultados de las dos tecnologías de secuenciación para resolver

problemas inherentes a cada tecnología y de ensamble en las secuencias. El genoma de referencia usado durante el ensamble fue la versión 5.13 del genoma de *Drosophila melanogaster*. En la genotipificación e identificación de las variantes genéticas se empleó el método probabilístico *Joint genotyper for inbred lines (JGIL)*. Para detalles extras sobre la secuenciación, ensamblado y genotipificación ver Mackay *et al.* (2012) y Huang *et al.* (2014).

Se han publicado dos versiones de la base de datos del *DGRP*, la primera base fue la llamada *freeze 1.0* (Mackay *et al.*, 2012) y posteriormente, se publicó la segunda versión, el *freeze 2.0* (Huang *et al.*, 2014). Las bases de datos se utilizan durante los análisis de asociación fenotipo – genotipo. La diferencia entre las dos, es que en la segunda se tienen en cuenta los efectos del genotipo para las inversiones cromosómicas que segregan en la población natural de las *DGRP* y también, realizan correcciones por el status de infección por *Wolbachia* sp. de las líneas del *DGRP* (Huang *et al.*, 2014).

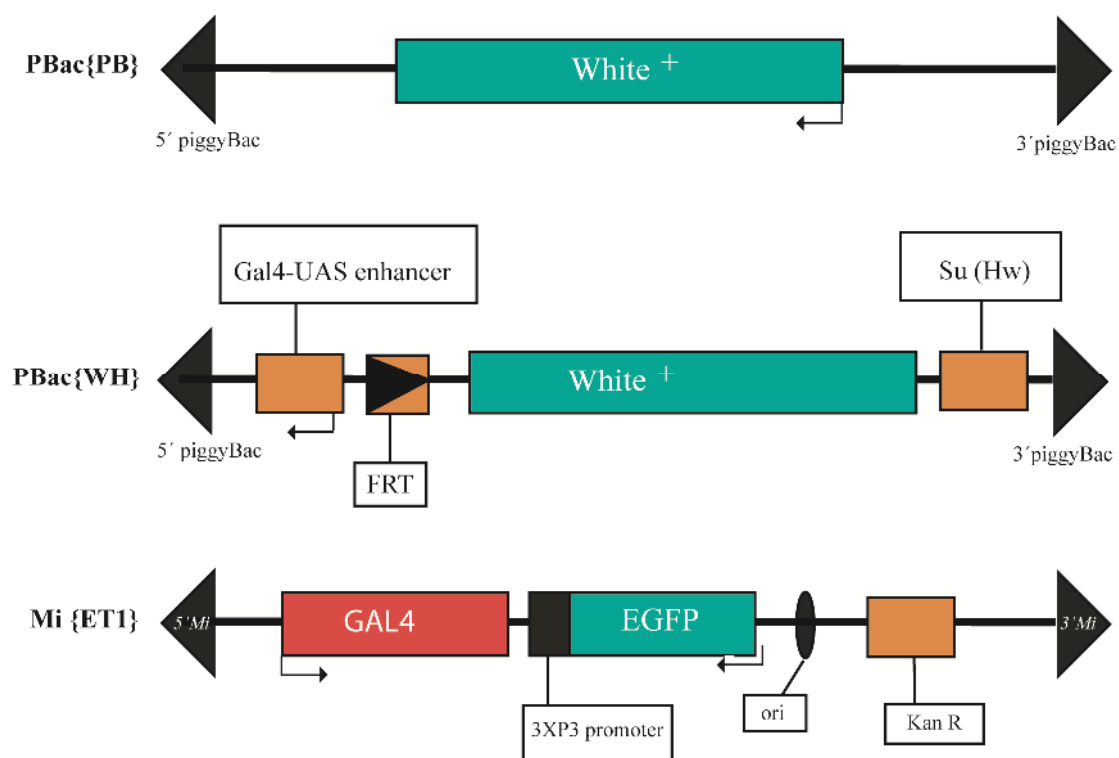


Figura 6. Esquema de los distintos elementos transponibles insertados en las líneas mutantes usadas en las pruebas de validación funcional.

ANEXO DE RESULTADOS

Tabla 1. Medias fenotípicas de las 40 líneas del *DGRP* utilizadas en los experimentos de AO en los tres medios de recolección de huevos. MEDIA: número total de huevos por réplica, DE: desvío estándar, EE: al error estándar, MÍN y MÁX: son los valores máximos y mínimos, respectivamente, del valor fenotípico obtenidos para cada línea, n: número de réplicas.

UVA						
LÍNEA <i>DGRP</i>	n	MEDIA	DE	EE	MÍN	MÁX
RA_208	5	13.31	2.28	1.02	11.42	17.19
RA_301	5	11.52	0.63	0.28	10.74	12.18
RA_303	5	13.47	1.88	0.84	11.51	16.07
RA_304	5	7.04	2.34	1.05	4.17	9.82
RA_306	5	12.65	3	1.34	8.27	14.91
RA_307	5	13.27	2.78	1.25	8.39	15.05
RA_313	5	6.79	1.14	0.51	5.95	8.74
RA_315	5	12.48	1.62	0.73	10.88	14.88
RA_324	5	14.03	1.98	0.88	11.33	16.2
RA_335	5	11.03	1.98	0.88	8.33	13.54
RA_357	5	12.64	1.69	0.76	10.27	15.05
RA_358	5	8.54	1.32	0.59	6.35	9.56
RA_360	5	9.95	2.02	0.91	7.51	12.14
RA_362	5	11.77	1.43	0.64	9.97	13.91
RA_365	5	14.92	2.32	1.04	12.54	17.84
RA_375	5	11.88	1.65	0.74	9.29	13.62
RA_379	5	6.92	0.6	0.27	6.03	7.44
RA_380	5	17.39	2.14	0.96	15.89	21.15
RA_391	5	8.72	1.8	0.81	6.11	11.15
RA_399	5	12.13	0.84	0.37	11.06	13.09
RA_427	5	13.05	1.24	0.55	11.33	14.3
RA_437	5	8.58	2.05	0.92	6.66	12.06
RA_486	5	12.23	2.21	0.99	9.29	15.11
RA_514	5	12.62	1.39	0.62	10.17	13.43
RA_517	5	11.22	1.34	0.6	9.4	12.5
RA_555	5	14	0.72	0.32	13.09	14.88
RA_639	5	11.13	1.55	0.69	9.71	13.65
RA_705	5	10	1.57	0.7	7.57	11.64
RA_707	5	10.02	1.11	0.5	8.97	11.33
RA_712	5	12.74	1.64	0.73	10.83	14.85
RA_714	5	7.69	0.78	0.35	6.66	8.33

ANEXO DE RESULTADOS

RA_730	5	9.46	1.12	0.5	8.51	11.37
RA_732	5	11.21	1.53	0.68	8.74	12.9
RA_765	5	12.59	0.82	0.37	11.37	13.43
RA_774	5	12.61	1.49	0.67	11.33	15.18
RA_786	5	8.25	2.49	1.11	6.35	12.34
RA_799	5	10.85	3.23	1.44	5.6	13.43
RA_820	5	13.56	3.57	1.6	8.62	17.19
RA_852	5	11.81	1.35	0.6	9.77	13.32
RA_859	5	12.24	0.54	0.24	11.55	12.94

NARANJA

LÍNEA <i>DGRP</i>	n	MEDIA	DE	EE	MÍN	MÁX
RA_208	5	11.92	1.06	0.47	10.6	13.32
RA_301	5	12.93	2.66	1.19	10.36	16.86
RA_303	5	12.42	1.96	0.88	9.02	13.87
RA_304	5	9.47	0.99	0.44	7.77	10.22
RA_306	5	11.45	2.4	1.08	8.62	15.11
RA_307	5	13.59	2.69	1.2	10.74	17.62
RA_313	5	8.91	0.95	0.43	7.96	10.12
RA_315	5	6.6	1	0.45	5.33	8.09
RA_324	5	15.08	1.93	0.86	13.43	18.29
RA_335	5	14.46	1	0.45	13.39	15.47
RA_357	5	10.07	1.12	0.5	9.13	11.89
RA_358	5	9.19	1.15	0.51	7.64	10.31
RA_360	5	8.97	2.14	0.96	5.6	11.33
RA_362	5	11.72	2.71	1.21	9.08	14.98
RA_365	5	12.33	2.72	1.22	7.57	14.37
RA_375	5	11.89	2.55	1.14	7.51	13.94
RA_379	5	7.63	1.62	0.72	5.04	9.4
RA_380	5	14.53	0.86	0.38	13.01	15.08
RA_391	5	9.72	0.68	0.31	8.85	10.6
RA_399	5	16.08	1.55	0.69	13.98	17.7
RA_427	5	16.11	2.4	1.07	13.24	19.14
RA_437	5	8.41	2.29	1.02	6.03	11.15
RA_486	5	11.15	1.23	0.55	9.92	12.5
RA_514	5	13.55	2.02	0.9	10.12	15.47
RA_517	5	9.68	0.56	0.25	8.8	10.31

ANEXO DE RESULTADOS

RA_555	5	14.73	1.63	0.73	12.62	16.53
RA_639	5	9.69	1.88	0.84	6.96	11.64
RA_705	5	14.15	0.78	0.35	13.47	15.05
RA_707	5	13.89	1.5	0.67	12.62	16.38
RA_712	5	8.29	1.28	0.57	7.1	10.07
RA_714	5	7.48	2.14	0.96	5.86	11.06
RA_730	5	13.06	1.16	0.52	11.42	14.44
RA_732	5	15.06	1.36	0.61	13.58	16.44
RA_765	5	16.1	1.24	0.56	14.19	17.13
RA_774	5	12.1	2.38	1.06	9.77	15.57
RA_786	5	8.89	1.33	0.59	7.57	10.88
RA_799	5	7.27	1.72	0.77	5.42	9.61
RA_820	5	10.76	1.58	0.71	8.68	12.5
RA_852	5	8.06	0.86	0.38	6.66	8.97
RA_859	5	6.01	4.32	1.93	0.61	11.81

TOMATE

LÍNEA <i>DGRP</i>	n	MEDIA	DE	EE	MÍN	MÁX
RA_208	5	15.48	3.26	1.46	10.55	19.45
RA_301	5	15.46	1.92	0.86	12.78	18.07
RA_303	5	12.27	3.76	1.68	6.19	15.41
RA_304	5	6.96	1.16	0.52	5.14	7.9
RA_306	5	9.88	1.71	0.77	7.17	11.33
RA_307	5	11.99	1.94	0.87	10.36	15.08
RA_313	5	13.72	2.7	1.21	10.6	17.53
RA_315	5	7.52	1.48	0.66	5.23	8.8
RA_324	5	12.76	2.6	1.16	8.8	15.01
RA_335	5	9.64	2.3	1.03	6.19	12.34
RA_357	5	9.69	1.92	0.86	6.27	10.79
RA_358	5	9.4	1.74	0.78	7.03	11.11
RA_360	5	10.02	1.53	0.68	8.15	11.76
RA_362	5	17.09	2.34	1.05	13.94	19.53
RA_365	5	15.37	2.19	0.98	12.62	18.61
RA_375	5	15.35	3.33	1.49	10.55	19.45
RA_379	5	12.45	1.64	0.73	9.87	14.08
RA_380	5	15.98	1.25	0.56	14.57	17.42
RA_391	5	12.84	0.34	0.15	12.34	13.28

ANEXO DE RESULTADOS

RA_399	5	10.18	1.75	0.78	7.64	11.97
RA_427	5	15.15	3.39	1.52	11.46	18.5
RA_437	5	7.39	1.94	0.87	4.51	9.13
RA_486	5	12.3	1.3	0.58	10.51	13.72
RA_514	5	15.26	1.88	0.84	13.01	18.12
RA_517	5	9.67	0.73	0.33	8.74	10.69
RA_555	5	15.28	0.51	0.23	14.47	15.76
RA_639	5	5.65	1.01	0.45	4.51	7.03
RA_705	5	12.51	2.32	1.04	9.45	15.85
RA_707	5	15.7	1.74	0.78	13.76	18.26
RA_712	5	7	2.11	0.95	4.62	9.24
RA_714	5	7.64	0.5	0.22	7.1	8.39
RA_730	5	14.39	1.87	0.84	13.13	17.65
RA_732	5	12.28	3.31	1.48	8.51	16.53
RA_765	5	14.04	3.65	1.63	9.4	18.39
RA_774	5	15.68	1.46	0.65	13.24	16.83
RA_786	5	4.96	1.85	0.83	3.22	8.09
RA_799	5	9.02	1.31	0.58	7.77	10.74
RA_820	5	12.32	1.89	0.84	10.93	15.54
RA_852	5	12.34	2.28	1.02	8.33	13.83
RA_859	5	5.38	1.02	0.46	4.62	6.96

Tabla 2. Medias fenotípicas de las 40 líneas del *DGRP* en los experimentos de PO en las dos combinaciones de medios de recolección de huevos. MEDIA: valor medio por réplica del índice de preferencia (IP), DE: desvío estándar, EE: al error estándar, MÍN y MÁX: son los valores máximos y mínimos, respetivamente, del valor fenotípico obtenidos para cada línea, n: número de réplicas.

UT						
LÍNEA <i>DGRP</i>	n	MEDIA	DE	EE	MÍN	MÁX
RA_208	5	0.27	0.2	0.09	0.01	0.55
RA_301	5	0.38	0.21	0.09	0.05	0.57
RA_303	5	0.25	0.21	0.1	0.08	0.52
RA_304	5	0.29	0.29	0.13	0.04	0.7
RA_306	5	0.19	0.15	0.07	0.04	0.41
RA_307	5	0.42	0.23	0.1	0.04	0.63
RA_313	5	0.12	0.38	0.17	-0.28	0.55
RA_315	5	0.16	0.29	0.13	-0.33	0.41

ANEXO DE RESULTADOS

RA_324	5	0.2	0.3	0.13	-0.13	0.52
RA_335	5	0.16	0.23	0.1	-0.19	0.41
RA_357	5	0.16	0.15	0.07	-0.08	0.3
RA_358	5	0.29	0.17	0.08	0.05	0.52
RA_360	5	0.2	0.24	0.11	-0.12	0.56
RA_362	5	0.5	0.11	0.05	0.34	0.63
RA_365	5	0.3	0.33	0.15	-0.22	0.66
RA_375	5	0.47	0.23	0.1	0.2	0.67
RA_379	5	0.48	0.16	0.07	0.27	0.67
RA_380	5	0.24	0.28	0.12	-0.08	0.67
RA_391	5	0.28	0.23	0.1	-0.08	0.53
RA_399	5	0.51	0.24	0.11	0.25	0.77
RA_427	5	0.37	0.18	0.08	0.17	0.62
RA_437	5	0.49	0.05	0.02	0.43	0.55
RA_486	5	0.27	0.15	0.07	0.11	0.44
RA_514	5	0.52	0.27	0.12	0.1	0.71
RA_517	5	0.48	0.07	0.03	0.36	0.56
RA_555	5	0.32	0.26	0.12	0.05	0.69
RA_639	5	0.23	0.18	0.08	0.07	0.44
RA_705	5	0.38	0.2	0.09	0.06	0.55
RA_707	5	0.35	0.27	0.12	0.06	0.68
RA_712	5	0.16	0.19	0.09	-0.12	0.37
RA_714	5	0.2	0.31	0.14	-0.28	0.55
RA_730	5	0.1	0.1	0.05	0.0034	0.27
RA_732	5	0.22	0.31	0.14	-0.05	0.56
RA_765	5	0.24	0.15	0.07	0.07	0.41
RA_774	5	0.36	0.18	0.08	0.16	0.58
RA_786	5	0.1	0.38	0.17	-0.43	0.6
RA_799	5	0.52	0.11	0.05	0.34	0.63
RA_820	5	0.28	0.28	0.13	-0.16	0.47
RA_852	5	0.29	0.36	0.16	-0.03	0.89
RA_859	5	0.53	0.11	0.05	0.35	0.62

ANEXO DE RESULTADOS

UN						
LÍNEA <i>DGRP</i>	n	MEDIA	DE	EE	MÍN	MÁX
RA_208	5	0.26	0.2	0.09	-0.06	0.44
RA_301	5	0.16	0.19	0.08	-0.14	0.34
RA_303	5	0.33	0.15	0.07	0.07	0.46
RA_304	5	0.57	0.2	0.09	0.26	0.75
RA_306	5	-0.1	0.34	0.15	-0.3	0.5
RA_307	5	0.52	0.15	0.07	0.35	0.68
RA_313	5	-0.001	0.26	0.12	-0.31	0.26
RA_315	5	0.22	0.14	0.06	0.03	0.4
RA_324	5	0.14	0.19	0.08	-0.17	0.28
RA_335	5	-0.03	0.07	0.03	-0.13	0.05
RA_357	5	0.19	0.23	0.1	-0.21	0.36
RA_358	5	0.3	0.21	0.1	0.05	0.58
RA_360	5	0.09	0.4	0.18	-0.61	0.35
RA_362	5	0.11	0.37	0.16	-0.4	0.63
RA_365	5	0.35	0.31	0.14	-0.07	0.74
RA_375	5	0.15	0.18	0.08	-0.05	0.38
RA_379	5	0.03	0.1	0.05	-0.11	0.17
RA_380	5	0.22	0.24	0.11	0	0.61
RA_391	5	0.55	0.13	0.06	0.41	0.71
RA_399	5	0.05	0.13	0.06	-0.13	0.19
RA_427	5	0.37	0.15	0.07	0.2	0.53
RA_437	5	-0.15	0.3	0.13	-0.42	0.34
RA_486	5	0.04	0.27	0.12	-0.28	0.32
RA_514	5	0.22	0.27	0.12	-0.07	0.61
RA_517	5	0.62	0.14	0.06	0.44	0.76
RA_555	5	0.08	0.23	0.1	-0.26	0.31
RA_639	5	0.03	0.17	0.08	-0.22	0.24
RA_705	5	0.47	0.35	0.16	-0.05	0.8
RA_707	5	0.06	0.2	0.09	-0.09	0.39
RA_712	5	0.17	0.14	0.06	-0.01	0.32
RA_714	5	0.17	0.21	0.1	-0.07	0.47
RA_730	5	0.2	0.16	0.07	-0.01	0.44
RA_732	5	0.01	0.15	0.07	-0.17	0.21
RA_765	5	0.02	0.13	0.06	-0.21	0.13
RA_774	5	0.11	0.19	0.09	-0.12	0.34

ANEXO DE RESULTADOS

RA_786	5	0.14	0.35	0.15	-0.25	0.51
RA_799	5	-0.24	0.23	0.1	-0.5	0.03
RA_820	5	0.1	0.43	0.19	-0.5	0.53
RA_852	5	0.01	0.21	0.09	-0.19	0.28
RA_859	5	-0.08	0.22	0.1	-0.4	0.14

Tabla 3. Resultados de los *GWAS* realizados para los recursos uva, naranja y tomate y sus interacciones obtenidos en los experimentos de AO. FAM corresponde a la Frecuencia del alelo minoritario, EFECTO es el efecto medio de los alelos.

UVA			
POLIMORFISMO	FAM	EFECTO	P valor
2L_5861809_DEL	0.303	1.729	1.358x10 ⁻⁰⁸
2R_18878291_SNP	0.184	1.767	4.103x10 ⁻⁰⁷
3L_6457637_SNP	0.250	1.598	7.645 x10 ⁻⁰⁷
2L_20317282_SNP	0.457	-1.394	1.113 x10 ⁻⁰⁶
3L_13740771_SNP	0.462	-1.308	1.472 x10 ⁻⁰⁶
X_7621720_SNP	0.324	-1.427	1.598 x10 ⁻⁰⁶
2L_7058177_SNP	0.270	1.495	1.923 x10 ⁻⁰⁶
X_7621807_SNP	0.342	-1.376	2.159 x10 ⁻⁰⁶
3L_5543268_SNP	0.205	1.594	2.270 x10 ⁻⁰⁶
2R_2803308_DEL	0.297	1.440	2.545 x10 ⁻⁰⁶
2R_2803317_INS	0.297	1.440	2.545 x10 ⁻⁰⁶
2L_7186753_SNP	0.487	1.310	3.027 x10 ⁻⁰⁶
X_7621822_SNP	0.342	-1.351	3.782 x10 ⁻⁰⁶
3L_6459120_SNP	0.194	1.662	3.952 x10 ⁻⁰⁶
3L_13704840_DEL	0.158	1.741	5.075 x10 ⁻⁰⁶
2L_8767323_SNP	0.500	-1.297	5.958 x10 ⁻⁰⁶
X_7621816_SNP	0.316	-1.355	6.255 x10 ⁻⁰⁶
2R_8591184_SNP	0.487	1.272	7.010 x10 ⁻⁰⁶
2L_15083782_SNP	0.351	-1.331	7.108 x10 ⁻⁰⁶
2R_18874786_SNP	0.167	1.727	7.346 x10 ⁻⁰⁶
2L_8767272_SNP	0.486	-1.298	8.650 x10 ⁻⁰⁶
X_7622091_SNP	0.359	-1.279	9.009 x10 ⁻⁰⁶
X_7622092_SNP	0.359	-1.279	9.009 x10 ⁻⁰⁶
X_7622118_SNP	0.359	-1.279	9.009 x10 ⁻⁰⁶
X_7622125_SNP	0.359	-1.279	9.009 x10 ⁻⁰⁶

ANEXO DE RESULTADOS

NARANJA

POLIMORFISMO	FAM	EFEECTO	<i>P</i> valor
2L_4629840_SNP	0.429	1.880	3.682x10 ⁻⁰⁷
X_8719158_SNP	0.180	2.275	1.363 x10 ⁻⁰⁶
2L_5611472_SNP	0.294	-1.999	1.679 x10 ⁻⁰⁶
2L_19900436_INS	0.235	-2.144	1.838 x10 ⁻⁰⁶
2L_20255829_DEL	0.158	-2.350	2.238 x10 ⁻⁰⁶
X_17268493_SNP	0.263	1.871	3.825 x10 ⁻⁰⁶
3L_5566999_SNP	0.189	-2.120	4.029 x10 ⁻⁰⁶
2R_2860360_SNP	0.189	-2.147	5.258 x10 ⁻⁰⁶
3L_16481089_SNP	0.229	2.097	5.805 x10 ⁻⁰⁶
3L_16481072_INS	0.250	1.970	6.657 x10 ⁻⁰⁶
3R_12315144_SNP	0.135	-2.453	6.985 x10 ⁻⁰⁶
X_17076304_INS	0.308	-1.719	7.098 x10 ⁻⁰⁶
X_15288456_SNP	0.290	1.818	7.121 x10 ⁻⁰⁶
3L_16481086_SNP	0.243	1.966	7.387 x10 ⁻⁰⁶
3L_16481087_SNP	0.243	1.966	7.387 x10 ⁻⁰⁶
3L_16481091_SNP	0.243	1.966	7.387 x10 ⁻⁰⁶
2L_7085689_SNP	0.250	-1.913	7.955 x10 ⁻⁰⁶
2R_8646252_SNP	0.342	-1.752	8.746 x10 ⁻⁰⁶
3L_16481067_SNP	0.265	1.961	9.472 x10 ⁻⁰⁶
2R_1718935_SNP	0.108	-2.647	9.700 x10 ⁻⁰⁶

TOMATE

POLIMORFISMO	FAM	EFEECTO	<i>P</i> valor
2L_16334560_SNP	0.417	-2.246	2.350x10 ⁻⁰⁷
3L_10932552_SNP	0.421	-2.119	3.734x10 ⁻⁰⁷
2L_10510926_SNP	0.472	-2.127	5.077x10 ⁻⁰⁷
X_14339942_SNP	0.395	-2.072	8.129x10 ⁻⁰⁷
3L_3935808_DEL	0.189	2.597	1.050 x10 ⁻⁰⁶
2R_2015111_SNP	0.333	-2.180	1.098 x10 ⁻⁰⁶
2L_16334400_SNP	0.471	-2.213	1.168 x10 ⁻⁰⁶
X_14339941_SNP	0.421	-2.026	1.206 x10 ⁻⁰⁶
3R_9635393_DEL	0.250	2.451	1.255 x10 ⁻⁰⁶
X_17658734_SNP	0.308	-2.187	1.378 x10 ⁻⁰⁶

ANEXO DE RESULTADOS

2L_16334673_SNP	0.382	-2.156	2.177 x10 ⁻⁰⁶
X_17658804_INS	0.316	-2.167	2.553 x10 ⁻⁰⁶
X_17658807_SNP	0.316	-2.167	2.553 x10 ⁻⁰⁶
2L_4151015_SNP	0.211	2.446	2.633 x10 ⁻⁰⁶
2L_6114772_SNP	0.132	2.951	3.609 x10 ⁻⁰⁶
3L_3935924_SNP	0.231	2.210	5.929 x10 ⁻⁰⁶
X_14340068_SNP	0.417	-1.980	6.774 x10 ⁻⁰⁶
2R_8446682_SNP	0.421	1.935	7.387 x10 ⁻⁰⁶
X_12643623_SNP	0.417	-1.884	7.553 x10 ⁻⁰⁶
X_12645967_SNP	0.389	-1.888	7.775 x10 ⁻⁰⁶
2R_6252725_SNP	0.343	2.094	7.994 x10 ⁻⁰⁶
2R_2059465_SNP	0.474	-2.025	8.206 x10 ⁻⁰⁶
2R_17307040_SNP	0.306	2.096	8.396 x10 ⁻⁰⁶
3R_23526606_SNP	0.405	-1.962	8.700 x10 ⁻⁰⁶
2R_16971153_SNP	0.444	-1.947	8.736 x10 ⁻⁰⁶
2L_5462164_SNP	0.432	1.845	8.906 x10 ⁻⁰⁶
X_12644653_SNP	0.444	-1.831	8.923 x10 ⁻⁰⁶
2L_16334529_SNP	0.342	-2.033	9.345 x10 ⁻⁰⁶
X_17658736_SNP	0.290	-2.118	9.497 x10 ⁻⁰⁶
X_16148634_INS	0.432	-1.977	9.717 x10 ⁻⁰⁶
2R_4502553_SNP	0.270	2.156	9.720 x10 ⁻⁰⁶

INTERACCIÓN UVA-NARANJA

POLIMORFISMO	FAM	EFFECTO	P valor
X_18222820_DEL	0.167	-2.984	1.355 x10 ⁻⁰⁶
2L_13665798_SNP	0.132	-3.207	1.474 x10 ⁻⁰⁶
3R_15728462_SNP	0.105	-3.520	1.825 x10 ⁻⁰⁶
3R_18211656_SNP	0.132	-3.153	2.485 x10 ⁻⁰⁶
2R_7605545_SNP	0.105	-3.502	2.770 x10 ⁻⁰⁶
2R_9806725_SNP	0.108	-3.463	2.774 x10 ⁻⁰⁶
2R_9802542_INS	0.105	-3.452	2.816 x10 ⁻⁰⁶
2R_9802544_SNP	0.105	-3.452	2.816 x10 ⁻⁰⁶
2R_9804296_SNP	0.105	-3.452	2.816 x10 ⁻⁰⁶
2R_9804866_SNP	0.105	-3.452	2.816 x10 ⁻⁰⁶
2R_9805778_SNP	0.105	-3.452	2.816 x10 ⁻⁰⁶
2R_9808494_SNP	0.105	-3.452	2.816 x10 ⁻⁰⁶
2R_9808685_SNP	0.105	-3.452	2.816 x10 ⁻⁰⁶

ANEXO DE RESULTADOS

2R_9808941_SNP	0.105	-3.452	2.816 x10 ⁻⁰⁶
2L_20255829_DEL	0.158	-2.930	2.936 x10 ⁻⁰⁶
X_8625171_SNP	0.108	-3.435	3.266 x10 ⁻⁰⁶
X_8625188_SNP	0.108	-3.435	3.266 x10 ⁻⁰⁶
2R_8565535_SNP	0.105	-3.425	3.532 x10 ⁻⁰⁶
2L_3412491_SNP	0.105	-3.431	3.712 x10 ⁻⁰⁶
3R_7789458_SNP	0.111	-3.415	4.539 x10 ⁻⁰⁶
3R_7705047_DEL	0.111	-3.445	4.543 x10 ⁻⁰⁶
2L_20255828_SNP	0.135	-3.110	4.619 x10 ⁻⁰⁶
3R_16814693_SNP	0.135	-3.094	4.957 x10 ⁻⁰⁶
3L_16808001_INS	0.235	-2.610	5.031 x10 ⁻⁰⁶
2R_7588731_SNP	0.103	-3.434	5.211 x10 ⁻⁰⁶
3R_5660260_SNP	0.103	-3.434	5.211 x10 ⁻⁰⁶
3L_8076749_SNP	0.108	-3.382	5.226 x10 ⁻⁰⁶
3R_18297933_SNP	0.105	-3.390	5.379 x10 ⁻⁰⁶
3R_18297935_SNP	0.105	-3.390	5.379 x10 ⁻⁰⁶
3R_18297941_SNP	0.105	-3.390	5.379 x10 ⁻⁰⁶
2L_6887035_SNP	0.105	-3.432	5.591 x10 ⁻⁰⁶
2L_6887132_SNP	0.105	-3.432	5.591 x10 ⁻⁰⁶
3R_18397772_SNP	0.103	-3.358	5.850 x10 ⁻⁰⁶
2R_7295906_SNP	0.103	-3.427	6.482 x10 ⁻⁰⁶
2L_20265188_DEL	0.105	-3.431	7.382 x10 ⁻⁰⁶
3R_24561305_SNP	0.162	-2.846	7.403 x10 ⁻⁰⁶
3R_22880834_INS	0.108	-3.333	7.459 x10 ⁻⁰⁶
2L_6227483_SNP	0.118	-3.437	7.545 x10 ⁻⁰⁶
2L_6887142_SNP	0.108	-3.389	7.680 x10 ⁻⁰⁶
2R_3609310_SNP	0.342	-2.167	7.758 x10 ⁻⁰⁶
3L_3010876_SNP	0.108	-3.321	8.386 x10 ⁻⁰⁶
3L_3010579_SNP	0.108	-3.332	8.431 x10 ⁻⁰⁶
2L_20083929_SNP	0.286	-2.404	9.574 x10 ⁻⁰⁶
3R_26298741_INS	0.111	-3.379	9.756 x10 ⁻⁰⁶
X_17244532_SNP	0.132	-3.005	9.772 x10 ⁻⁰⁶
X_17244555_SNP	0.132	-3.005	9.772 x10 ⁻⁰⁶

ANEXO DE RESULTADOS

INTERACCIÓN UVA-TOMATE

POLIMORFISMO	FAM	EFEECTO	<i>P</i> valor
2R_10248195SNP	0.111	-3.801	3.656 x10 ⁻⁰⁶
2L_11980200SNP	0.194	-2.993	4.621x10 ⁻⁰⁶
2R_10248142SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248192SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248264_MNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248268SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248290SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248291SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248293DEL	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248300SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248315SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248317SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248331DEL	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248382SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248390SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248391SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248396SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10248400SNP	0.108	-3.761	4.672x10 ⁻⁰⁶
2R_10247986SNP	0.132	-3.401	4.834x10 ⁻⁰⁶
2R_10237768SNP	0.128	-3.394	5.681x10 ⁻⁰⁶
X_9446758SNP	0.460	2.157	6.347x10 ⁻⁰⁶
3R_18491021DEL	0.154	-3.118	6.725x10 ⁻⁰⁶
3R_18491025SNP	0.154	-3.118	6.725x10 ⁻⁰⁶
2L_16334560SNP	0.417	-2.328	6.767x10 ⁻⁰⁶
2L_11980178SNP	0.177	-3.155	7.774x10 ⁻⁰⁶
2R_10248381SNP	0.111	-3.691	8.229x10 ⁻⁰⁶
2L_11980205SNP	0.216	-2.744	8.385x10 ⁻⁰⁶
2L_16334400SNP	0.471	-2.353	8.672x10 ⁻⁰⁶
X_14434713SNP	0.158	-3.015	9.040x10 ⁻⁰⁶
2R_10236592SNP	0.105	-3.665	9.411x10 ⁻⁰⁶
2L_7635359SNP	0.111	-3.648	9.639x10 ⁻⁰⁶
X_19223170SNP	0.108	-3.672	9.781x10 ⁻⁰⁶

ANEXO DE RESULTADOS

INTERACCIÓN NARANJA-TOMATE

POLIMORFISMO	FAM	EFEECTO	<i>P</i> valor
3R_26297607_SNP	0.158	2.217	7.388x10 ⁻⁰⁷
3R_26295477_SNP	0.135	2.330	1.718 x10 ⁻⁰⁶
3R_26295277_SNP	0.132	2.320	1.885 x10 ⁻⁰⁶
3R_26295430_SNP	0.132	2.320	1.885 x10 ⁻⁰⁶
3R_23503045_SNP	0.132	2.312	1.929 x10 ⁻⁰⁶
3R_26295413_SNP	0.139	2.310	2.536 x10 ⁻⁰⁶
X_12643496_SNP	0.243	-1.870	2.779 x10 ⁻⁰⁶
X_12643515_SNP	0.243	-1.870	2.779 x10 ⁻⁰⁶
2L_12266179_SNP	0.406	1.728	2.822 x10 ⁻⁰⁶
3L_12451487_SNP	0.158	2.092	3.186 x10 ⁻⁰⁶
3R_26295335_DEL	0.108	2.506	3.847 x10 ⁻⁰⁶
3R_26295468_SNP	0.108	2.506	3.847 x10 ⁻⁰⁶
X_15155169_SNP	0.235	1.892	3.984 x10 ⁻⁰⁶
3R_26961773_SNP	0.237	1.779	4.186 x10 ⁻⁰⁶
3L_9626431_SNP	0.135	2.298	4.538 x10 ⁻⁰⁶
3R_25026094_SNP	0.421	-1.569	4.552 x10 ⁻⁰⁶
3R_26297352_SNP	0.139	2.259	4.895 x10 ⁻⁰⁶
3L_18970882_SNP	0.395	1.622	5.420 x10 ⁻⁰⁶
2L_21939393_SNP	0.250	1.826	6.260 x10 ⁻⁰⁶
3R_26291288_SNP	0.105	2.460	6.303 x10 ⁻⁰⁶
3R_26291290_SNP	0.105	2.460	6.303 x10 ⁻⁰⁶
3R_26291472_SNP	0.105	2.460	6.303 x10 ⁻⁰⁶
3R_26291687_SNP	0.105	2.460	6.303 x10 ⁻⁰⁶
3R_26292343_SNP	0.105	2.460	6.303 x10 ⁻⁰⁶
3R_26294445_SNP	0.105	2.460	6.303 x10 ⁻⁰⁶
3L_9393139_SNP	0.216	1.867	6.689 x10 ⁻⁰⁶
3L_18973933_SNP	0.378	1.647	6.841 x10 ⁻⁰⁶
2L_7112518_SNP	0.211	1.872	7.408 x10 ⁻⁰⁶
3R_26295646_SNP	0.111	2.503	7.560 x10 ⁻⁰⁶
3L_13244509_SNP	0.231	1.741	7.601 x10 ⁻⁰⁶
3R_23858912_SNP	0.216	1.831	7.757 x10 ⁻⁰⁶
3R_23482323_SNP	0.171	2.082	7.869 x10 ⁻⁰⁶
2L_12266185_SNP	0.429	1.587	7.932 x10 ⁻⁰⁶
3R_26291481_SNP	0.108	2.436	8.399 x10 ⁻⁰⁶
3L_18991078_SNP	0.211	1.866	8.927 x10 ⁻⁰⁶
3R_12262990_SNP	0.205	1.828	9.906 x10 ⁻⁰⁶

ANEXO DE RESULTADOS

Tabla 4. Resultados de los *GWAS* realizados para las combinaciones de recursos uva-naranja, uva-tomate y su interacciones obtenidos en los experimentos de PO. FAM corresponde a la Frecuencia del alelo minoritario, EFECTO es el efecto medio de los alelos.

UT			
POLIMORFISMO	FAM	EFECTO	P valor
2R_6732582_SNP	0.500	0.078	3.210x10 ⁻⁰⁷
2L_2409741_SNP	0.460	0.076	1.640 x10 ⁻⁰⁶
2L_13641525_DEL	0.382	0.079	3.191 x10 ⁻⁰⁶
2L_15398051_SNP	0.405	-0.075	3.555 x10 ⁻⁰⁶
X_11924948_SNP	0.351	0.076	4.806 x10 ⁻⁰⁶
2L_13641592_SNP	0.371	0.077	5.220 x10 ⁻⁰⁶
2L_5918357_SNP	0.263	-0.081	5.233 x10 ⁻⁰⁶
2L_13641674_SNP	0.250	0.085	5.520 x10 ⁻⁰⁶
3R_4839140_SNP	0.342	-0.075	6.025 x10 ⁻⁰⁶
3R_10593340_SNP	0.405	0.073	6.661 x10 ⁻⁰⁶
2R_1111096_SNP	0.324	-0.080	6.909x10 ⁻⁰⁶
2L_10860001_SNP	0.486	0.073	9.105x10 ⁻⁰⁶
3L_5430378_SNP	0.368	-0.073	9.779x10 ⁻⁰⁶

UN			
POLIMORFISMO	FAM	EFECTO	P valor
2L_16797835_SNP	0.180	-0.173	9.963x10 ⁻⁰⁸
2L_16798087_SNP	0.180	-0.173	9.963x10 ⁻⁰⁸
3R_19596643_SNP	0.237	-0.153	4.282x10 ⁻⁰⁷
2L_16862000_SNP	0.180	-0.166	5.001x10 ⁻⁰⁷
2L_16843057_SNP	0.432	-0.132	5.292 x10 ⁻⁰⁷
3L_6764833_INS	0.194	-0.180	6.031 x10 ⁻⁰⁷
2L_16815760_SNP	0.184	-0.166	6.167 x10 ⁻⁰⁷
2L_16815770_SNP	0.184	-0.166	6.167 x10 ⁻⁰⁷
2L_16840444_INS	0.324	-0.143	1.060x10 ⁻⁰⁶
3R_20347647_SNP	0.167	-0.173	1.308 x10 ⁻⁰⁶
2L_5570497_SNP	0.167	-0.172	1.790 x10 ⁻⁰⁶
2L_16843030_SNP	0.405	-0.129	1.793 x10 ⁻⁰⁶
3L_4601550_INS	0.290	-0.137	2.055 x10 ⁻⁰⁶
3R_26069873_SNP	0.417	-0.129	2.250 x10 ⁻⁰⁶
3L_1210458_SNP	0.161	-0.186	2.343 x10 ⁻⁰⁶
2L_16815436_SNP	0.128	-0.181	2.784 x10 ⁻⁰⁶

ANEXO DE RESULTADOS

2L_16815455_SNP	0.128	-0.181	2.784 x10 ⁻⁰⁶
2L_16815461_SNP	0.128	-0.181	2.784 x10 ⁻⁰⁶
3L_16886623_SNP	0.135	-0.182	2.870 x10 ⁻⁰⁶
2L_4598904_SNP	0.243	-0.145	3.130 x10 ⁻⁰⁶
2L_4599045_SNP	0.243	-0.145	3.130 x10 ⁻⁰⁶
2L_4599227_SNP	0.243	-0.145	3.130 x10 ⁻⁰⁶
2L_8774516_SNP	0.361	0.131	3.154 x10 ⁻⁰⁶
3R_5298092_SNP	0.105	-0.199	3.420 x10 ⁻⁰⁶
3L_18492618_SNP	0.457	-0.128	3.561 x10 ⁻⁰⁶
3L_14848234_SNP	0.158	-0.167	3.665 x10 ⁻⁰⁶
3L_14848238_SNP	0.158	-0.167	3.665 x10 ⁻⁰⁶
2L_9335902_SNP	0.132	-0.180	3.714 x10 ⁻⁰⁶
2L_9335924_SNP	0.132	-0.180	3.714 x10 ⁻⁰⁶
3L_16898432_SNP	0.103	-0.198	3.721 x10 ⁻⁰⁶
3L_5961490_SNP	0.103	-0.198	3.721 x10 ⁻⁰⁶
3L_5961708_SNP	0.103	-0.198	3.721 x10 ⁻⁰⁶
3L_5961727_SNP	0.103	-0.198	3.721 x10 ⁻⁰⁶
2L_16778469_SNP	0.371	-0.131	3.950 x10 ⁻⁰⁶
3L_10256550_SNP	0.368	-0.126	3.994 x10 ⁻⁰⁶
2L_16842796_SNP	0.297	-0.134	4.158 x10 ⁻⁰⁶
2L_16841704_SNP	0.444	-0.125	4.286 x10 ⁻⁰⁶
3L_1210299_SNP	0.114	-0.198	4.454 x10 ⁻⁰⁶
2L_5885247_SNP	0.297	0.134	4.519 x10 ⁻⁰⁶
2R_7847821_SNP	0.278	-0.139	4.669 x10 ⁻⁰⁶
2L_16852742_SNP	0.135	-0.179	4.822 x10 ⁻⁰⁶
2L_16842209_SNP	0.135	-0.179	5.077 x10 ⁻⁰⁶
2L_16842493_SNP	0.189	-0.156	5.178 x10 ⁻⁰⁶
3L_12996593_SNP	0.474	-0.120	5.314 x10 ⁻⁰⁶
3L_12478303_SNP	0.316	-0.129	5.492 x10 ⁻⁰⁶
2R_4603032_SNP	0.118	-0.196	5.978 x10 ⁻⁰⁶
3L_16896924_SNP	0.231	-0.140	6.080 x10 ⁻⁰⁶
2L_16815413_SNP	0.105	-0.195	6.188 x10 ⁻⁰⁶
2L_19761391_SNP	0.105	-0.195	6.515 x10 ⁻⁰⁶
2L_16855578_SNP	0.270	-0.136	6.588 x10 ⁻⁰⁶
X_20928257_SNP	0.316	-0.128	7.043 x10 ⁻⁰⁶
2L_16852690_DEL	0.194	-0.167	7.355 x10 ⁻⁰⁶
2L_16842795_SNP	0.290	-0.131	7.549 x10 ⁻⁰⁶

ANEXO DE RESULTADOS

3L_1210198_SNP	0.105	-0.193	8.164 x10 ⁻⁰⁶
3L_1210204_SNP	0.105	-0.193	8.164 x10 ⁻⁰⁶
2R_3836770_SNP	0.105	-0.193	8.164 x10 ⁻⁰⁶
3L_16896832_SNP	0.103	-0.192	8.504 x10 ⁻⁰⁶
3R_19598056_SNP	0.103	-0.192	8.504 x10 ⁻⁰⁶
3R_19598278_SNP	0.103	-0.192	8.504 x10 ⁻⁰⁶
2L_16842538_SNP	0.211	-0.145	8.514 x10 ⁻⁰⁶
3L_781209_SNP	0.472	-0.122	8.704 x10 ⁻⁰⁶
2L_5885289_SNP	0.324	0.128	8.857 x10 ⁻⁰⁶
2R_10031763_SNP	0.129	-0.194	9.605 x10 ⁻⁰⁶
3L_14376313_SNP	0.211	-0.144	9.694 x10 ⁻⁰⁶
3R_26582085_SNP	0.103	-0.191	9.947 x10 ⁻⁰⁶

INTERACCIÓN UT-UN

POLIMORFISMO	FAM	EFEECTO	P valor
3R_4800216_SNP	0.194	0.221	2.104x10 ⁻⁰⁸
3L_4396938_SNP	0.184	0.209	1.627x10 ⁻⁰⁷
3L_10222344_SNP	0.286	0.188	1.903x10 ⁻⁰⁷
3L_12996599_SNP	0.472	0.163	5.181x10 ⁻⁰⁷
3L_12996594_SNP	0.487	-0.161	6.103x10 ⁻⁰⁷
3L_820596_SNP	0.297	0.171	6.952x10 ⁻⁰⁷
3L_4547637_SNP	0.105	0.255	9.837x10 ⁻⁰⁷
3L_11361055_SNP	0.105	0.254	1.033 x10 ⁻⁰⁶
2L_9339890_SNP	0.105	0.253	1.232 x10 ⁻⁰⁶
2L_9340192_SNP	0.105	0.253	1.232 x10 ⁻⁰⁶
2L_9340505_SNP	0.105	0.253	1.232 x10 ⁻⁰⁶
X_9499643_SNP	0.154	0.210	1.386 x10 ⁻⁰⁶
X_9499649_SNP	0.154	0.210	1.386 x10 ⁻⁰⁶
X_9499670_SNP	0.154	0.210	1.386 x10 ⁻⁰⁶
3R_4790679_SNP	0.105	0.250	1.409 x10 ⁻⁰⁶
2L_6128832_SNP	0.103	0.249	1.504 x10 ⁻⁰⁶
2L_6128862_SNP	0.103	0.249	1.504 x10 ⁻⁰⁶
2R_13837704_SNP	0.103	0.249	1.504 x10 ⁻⁰⁶
3R_4741600_SNP	0.103	0.249	1.504 x10 ⁻⁰⁶
3R_4741611_SNP	0.103	0.249	1.504 x10 ⁻⁰⁶
3R_11898025_SNP	0.243	0.182	1.598 x10 ⁻⁰⁶
3R_4777785_SNP	0.108	0.249	1.615 x10 ⁻⁰⁶

ANEXO DE RESULTADOS

3L_4547759_SNP	0.105	0.251	1.688 x10 ⁻⁰⁶
2L_12598975_SNP	0.154	0.207	2.052 x10 ⁻⁰⁶
2L_5912132_SNP	0.368	0.157	2.417 x10 ⁻⁰⁶
2L_17249008_SNP	0.162	0.206	2.820 x10 ⁻⁰⁶
3R_4743618_SNP	0.114	0.245	2.884 x10 ⁻⁰⁶
2L_5611062_SNP	0.222	0.184	2.947 x10 ⁻⁰⁶
X_12009087_SNP	0.158	0.206	3.156 x10 ⁻⁰⁶
X_12008868_SNP	0.154	0.205	3.179 x10 ⁻⁰⁶
X_12008899_SNP	0.154	0.205	3.179 x10 ⁻⁰⁶
X_12008906_SNP	0.154	0.205	3.179 x10 ⁻⁰⁶
X_12008921_SNP	0.154	0.205	3.179 x10 ⁻⁰⁶
X_12008932_SNP	0.154	0.205	3.179 x10 ⁻⁰⁶
X_12008971_SNP	0.154	0.205	3.179 x10 ⁻⁰⁶
X_12009076_SNP	0.154	0.205	3.179 x10 ⁻⁰⁶
X_10309206_INS	0.353	0.161	3.250 x10 ⁻⁰⁶
2L_13521337_SNP	0.105	0.244	3.561 x10 ⁻⁰⁶
3L_820516_SNP	0.306	0.161	3.593 x10 ⁻⁰⁶
3L_5301727_SNP	0.333	0.162	3.620 x10 ⁻⁰⁶
X_1594171_SNP	0.103	0.243	4.214 x10 ⁻⁰⁶
3R_25584498_SNP	0.132	0.219	4.269 x10 ⁻⁰⁶
2L_6722668_DEL	0.171	0.209	4.404 x10 ⁻⁰⁶
3L_5301722_SNP	0.378	0.154	4.480 x10 ⁻⁰⁶
3L_1059550_SNP	0.135	0.221	4.529 x10 ⁻⁰⁶
2L_6223899_SNP	0.351	-0.153	4.627 x10 ⁻⁰⁶
3L_6758455_SNP	0.147	0.222	4.931 x10 ⁻⁰⁶
X_12009390_SNP	0.167	0.201	5.203 x10 ⁻⁰⁶
2L_12472955_DEL	0.139	0.221	5.463 x10 ⁻⁰⁶
2L_14429488_DEL	0.111	0.242	5.680 x10 ⁻⁰⁶
2L_16617899_SNP	0.229	0.184	5.983 x10 ⁻⁰⁶
3L_11361124_SNP	0.132	0.217	5.996 x10 ⁻⁰⁶
3L_15469812_SNP	0.132	0.215	6.088 x10 ⁻⁰⁶
3L_11361029_SNP	0.128	0.217	6.395 x10 ⁻⁰⁶
3L_11361034_SNP	0.128	0.217	6.395 x10 ⁻⁰⁶
2L_19996396_SNP	0.171	0.202	6.442 x10 ⁻⁰⁶
3L_820511_SNP	0.324	0.154	6.551 x10 ⁻⁰⁶
3R_22246979_SNP	0.250	0.173	6.672 x10 ⁻⁰⁶
3R_15309002_SNP	0.447	0.147	6.972 x10 ⁻⁰⁶

ANEXO DE RESULTADOS

3L_4397738_SNP	0.263	0.164	7.378 x10 ⁻⁰⁶
2L_6722549_SNP	0.162	0.203	7.526 x10 ⁻⁰⁶
3L_7083799_SNP	0.211	0.177	7.770 x10 ⁻⁰⁶
3L_9296407_SNP	0.189	0.195	7.833 x10 ⁻⁰⁶
2R_16069268_SNP	0.132	0.214	7.901 x10 ⁻⁰⁶
3L_5241861_DEL	0.290	0.171	8.450 x10 ⁻⁰⁶
2L_11589249_SNP	0.237	0.171	8.729 x10 ⁻⁰⁶
2L_9316487_SNP	0.206	0.192	9.323 x10 ⁻⁰⁶
3R_19020666_DEL	0.114	0.235	9.356 x10 ⁻⁰⁶
2L_1195122_SNP	0.237	0.171	9.598 x10 ⁻⁰⁶
2R_18966041_SNP	0.486	0.148	9.884 x10 ⁻⁰⁶

Tabla 5. Resultados de los análisis de asociación fenotipo – transcriptoma para los recursos uva, naranja y tomate en los experimentos de AO. ID corresponde a la identificación única del *QTT*, MÓD es el número de módulo de transcripción al cual el *QTT* pertenece, CM son los cuadrados medios, F es el estadístico de Fisher. SÍMBOLO corresponde a la abreviatura del nombre conocido de los genes que mapean con cada *QTTs*. Todos los *QTTs* son significativos con un *P* valor ≤ 0.03 .

UVA

ID	MÓD	CM	F	SÍMBOLO
1623576_at	1	28.598	5.948	<i>CG1850</i>
1634871_s_at	1	26.563	5.464	<i>Src64B</i>
1637564_a_at	1	26.874	5.537	<i>CG5382</i> <i>muted</i> <i>CG7071</i>
1629239_s_at	2	35.406	7.648	<i>CG2246</i>
1637578_at	2	34.146	7.324	<i>Set</i>
1640980_at	2	29.416	6.145	<i>CG7218</i>
1640077_at	2	26.987	5.563	
1637453_at	2	26.960	5.557	<i>CG3797</i>
1629470_at	2	26.641	5.482	<i>HP1c</i> <i>CG17141</i>
1639522_at	2	26.561	5.463	<i>CG31950</i>
1639046_at	2	26.475	5.443	<i>snRNP-UI-C</i>
1626823_a_at	2	26.065	5.347	<i>CG7945</i>
1641336_at	2	25.694	5.260	<i>CG6443</i> <i>CG17118</i>
1629809_at	3	48.469	11.310	<i>CG30491</i>
1630453_at	3	47.989	11.165	<i>CG32267</i>
1623827_a_at	3	45.892	10.542	<i>fra</i>
1637520_at	3	42.706	9.625	<i>CG1518</i>

ANEXO DE RESULTADOS

1626096_at	3	41.559	9.303	CG5220	
1636597_at	3	40.949	9.134	Osi13	
1624252_s_at	3	40.229	8.935	sle	
1632654_at	3	34.946	7.529		
1634672_at	3	33.001	7.033	Srp68	
1625801_s_at	3	31.878	6.751	skpA	
1631577_a_at	3	31.778	6.726	CG3760	CG2811
1638166_at	3	31.642	6.692	Rpb10	CG13630
1626523_a_at	3	31.488	6.654	Aats-glupro	
1634501_at	3	31.187	6.579	CG16979	
1623470_at	3	31.162	6.573	Las	
1638541_at	3	31.136	6.567	mRpL32	CG1750
1634281_at	3	30.170	6.329	CG12343	
1627739_at	3	29.946	6.274	SC35	
1641214_at	3	29.104	6.070	Trs23	
1627945_at	3	29.091	6.067	Fdxh	CG4452
1631996_at	3	28.506	5.926	CG4925	mRpS34
1632985_at	3	28.433	5.908	scramb2	Jafrac2
1632789_at	3	27.896	5.779	CG3701	
1627749_at	3	27.863	5.771	CG6412	
1640069_at	3	27.449	5.673	CG4866	Patronin
1639856_at	3	27.359	5.651	CG5727	
1638456_at	3	26.460	5.439	CG8531	
1638942_at	3	26.416	5.429	CG30499	
1639768_at	3	26.409	5.427	Ptth	cold
1629432_at	3	26.221	5.383	Psn	mRpL15
1636718_s_at	3	26.025	5.337	CG4502	
1625573_at	3	25.972	5.325	Yippee	Tim9a
1627109_at	3	25.330	5.175	Hsc70-5	Mdr50
1627788_at	3	25.259	5.159	CG14722	
1627778_a_at	3	24.830	5.060	Art3	Cqf1
1637923_at	3	24.696	5.029	Eno	Rrp40
1639085_at	4	38.182	8.380		
1627938_at	4	32.705	6.958	CG17840	
1629510_at	4	30.159	6.326	CG4294	
1625725_at	4	28.244	5.863	CG17922	Ppcdc CG42496
1627118_at	4	26.484	5.445	HPS1	

ANEXO DE RESULTADOS

1633799_a_at	4	26.454	5.438	CG12010		
1635074_s_at	4	24.971	5.092		Snap25	CG15831
1632139_at	4	24.827	5.059	CG14174	nbs	
1634845_at	5	48.519	11.325	Tsp42Ef		
1630753_at	5	47.035	10.880	ric8a		
1639337_at	5	44.261	10.068	CG9346	CG3295	
1627827_a_at	5	42.758	9.639	RpII33	mRpS23	
1639430_at	5	42.619	9.600	CG6569	lsn	
1626211_at	5	40.390	8.979	CG34351		
1628290_s_at	5	40.130	8.908	CG17292		
1632971_at	5	38.250	8.399	CG12895	RanBPM	
1631412_at	5	38.240	8.396	Pat1		
1640824_at	5	38.094	8.357	CG11306	MED1	
1625377_at	5	37.654	8.239	CG5104	CG4825	
1629676_at	5	37.430	8.180	Hrd3	Tbp-1	
1627621_at	5	37.207	8.121			
1639064_s_at	5	37.015	8.070	Akt1		
1641305_at	5	36.987	8.062	piwi	SCAR	
1624153_at	5	36.720	7.992	Tina-1		
1624649_a_at	5	36.628	7.968	rogdi		
1634522_s_at	5	36.374	7.901	Papss		
1637676_at	5	36.294	7.880	CG5482		
1629791_at	5	36.221	7.861	CG17271		
1637302_s_at	5	36.126	7.836	flfl		
1632322_at	5	35.439	7.657	CG16953		
1625879_at	5	35.419	7.652	Pomp	vari	
1639091_at	5	34.385	7.385	Rpn5		
1631637_a_at	5	34.113	7.315	Cpr		
1623422_a_at	5	33.966	7.278	CG31908		
1632946_at	5	33.675	7.204	Stlk		
1628662_at	5	33.498	7.159	CG3649	CG13531	
1640352_at	5	33.199	7.083	Nuf2	CG13779	
1634899_a_at	5	32.205	6.832	CG6512		
1623648_s_at	5	31.954	6.770	Psa		
1637149_s_at	5	31.900	6.756	Fit1		
1623481_at	5	31.527	6.663	MSBP		
1634041_at	5	31.101	6.558	CG31548		

ANEXO DE RESULTADOS

1627216_s_at	5	30.835	6.492	<i>Zyx</i>	
1635737_at	5	30.814	6.487	<i>CG6701</i>	
1638119_at	5	30.657	6.448	<i>PGRP-LE</i>	
1640146_at	5	30.476	6.404	<i>CG33116</i>	
1633918_s_at	5	30.380	6.380	<i>Rack1</i>	<i>CG7115</i>
1624324_a_at	5	30.273	6.354	<i>CR42723</i>	
1634070_at	5	30.190	6.334	<i>CG4101</i>	
1632936_at	5	30.125	6.318	<i>rec</i>	<i>alpha-Man-IIb</i>
1625836_at	5	30.095	6.311	<i>CG4036</i>	<i>CG13123</i>
1635079_at	5	29.982	6.283	<i>sax</i>	<i>CG1550</i>
1623288_at	5	29.874	6.257	<i>Pros26</i>	
1630750_at	5	29.851	6.251	<i>CG5323</i>	<i>CG5327</i>
1629600_at	5	29.779	6.234	<i>CG17660</i>	
1636695_at	5	29.423	6.147	<i>Pk17E</i>	
1629844_s_at	5	29.387	6.138	<i>rap</i>	
1628984_s_at	5	29.082	6.064	<i>HmgZ</i>	
1640842_at	5	28.713	5.975	<i>CG34159</i>	
1624326_at	5	28.683	5.968	<i>Drep-4</i>	<i>CG6043</i>
1636596_at	5	28.675	5.966	<i>CG9948</i>	<i>CG10075</i>
1636221_a_at	5	28.478	5.919	<i>tkv</i>	<i>TpnC25D</i>
1635706_at	5	28.032	5.812	<i>mRpL20</i>	
1631001_s_at	5	27.689	5.730	<i>CG11475</i>	<i>Snp</i>
1634650_at	5	27.604	5.710	<i>galectin</i>	
1635306_at	5	27.417	5.665	<i>CG4650</i>	
1627598_at	5	27.391	5.659	<i>CG11490</i>	
1632904_at	5	27.220	5.619	<i>wee</i>	<i>Rat1</i>
1640619_at	5	26.874	5.537	<i>CG7028</i>	
1627665_at	5	26.860	5.534	<i>CG17486</i>	
1629629_at	5	26.852	5.532	<i>CG12155</i>	
1637679_s_at	5	26.733	5.503	<i>UbcD2</i>	
1634087_at	5	26.628	5.479	<i>CG1311</i>	
1640977_at	5	26.628	5.479	<i>CG12264</i>	<i>CG6746</i>
1629078_s_at	5	26.529	5.456	<i>Pdk1</i>	
1635335_at	5	26.504	5.450	<i>CG12018</i>	<i>CG2021</i>
1634015_s_at	5	26.499	5.448		
1632306_at	5	26.426	5.431	<i>CG9467</i>	
1624344_at	5	26.405	5.426	<i>CG17922</i>	<i>Ppcdc</i> <i>CG42496</i>

ANEXO DE RESULTADOS

1633931_a_at	5	26.310	5.404		
1628264_a_at	5	26.220	5.383	<i>RecQ5</i>	<i>CG9628</i>
1634560_at	5	26.069	5.348	<i>140up</i>	<i>twf</i>
1638342_at	5	25.944	5.318	<i>CG1218</i>	<i>CG2046</i>
1640520_at	5	25.923	5.313	<i>ChLD3</i>	<i>LSm7</i>
1624881_at	5	25.881	5.304	<i>CG11448</i>	
1624471_s_at	5	25.859	5.298	<i>Act42A</i>	<i>Pngl</i>
1637226_at	5	25.759	5.275	<i>RpLP1</i>	<i>CG11885</i>
1632026_at	5	25.732	5.269	<i>EndoGI</i>	
1638044_a_at	5	25.697	5.261	<i>CG5902</i>	
1629363_at	5	25.640	5.248	<i>Acyp2</i>	
1633664_at	5	25.577	5.233	<i>bc10</i>	
1635892_at	5	25.432	5.199	<i>Arp5</i>	<i>CG12321</i>
1624364_at	5	25.229	5.152	<i>CG4849</i>	
1624372_at	5	25.217	5.149	<i>Der-1</i>	
1626787_s_at	5	25.190	5.143	<i>CG3678</i>	<i>CG17556</i> <i>CG31274</i>
1630943_at	5	25.186	5.142	<i>sec3</i>	
1637992_at	5	25.098	5.122	<i>CG6607</i>	<i>CG13623</i>
1627439_at	5	25.093	5.120	<i>CG14840</i>	
1632078_at	5	25.018	5.103	<i>CG10326</i>	<i>CG10324</i>
1623194_at	5	25.006	5.100	<i>CG12935</i>	<i>CG7637</i>
1622995_at	5	24.993	5.097	<i>mRpS17</i>	
1637307_at	5	24.985	5.095	<i>CG31694</i>	
1633233_a_at	5	24.973	5.093	<i>CG15817</i>	
1626729_at	5	24.905	5.077	<i>CG2970</i>	<i>CG3803</i>
1640997_at	5	24.892	5.074	<i>CG30122</i>	
1634353_at	5	24.759	5.043	<i>Lcp3</i>	
1633960_at	5	24.751	5.041	<i>CG5823</i>	
1641560_at	6	64.195	16.581	<i>Drp1</i>	
1637280_at	6	40.238	8.938	<i>LpR1</i>	
1640090_a_at	6	39.380	8.704	<i>slgA</i>	
1623335_a_at	6	37.968	8.323	<i>ldlCp</i>	<i>CG5044</i>
1634758_at	6	37.576	8.219	<i>CG34393</i>	
1627323_at	6	37.403	8.172	<i>CG8388</i>	<i>CG8389</i>
1637754_at	6	36.558	7.949	<i>CG9458</i>	
1624406_at	6	36.192	7.853	<i>CG5168</i>	
1630431_s_at	6	35.275	7.615	<i>CG10417</i>	

ANEXO DE RESULTADOS

1633389_at	6	34.219	7.342	<i>CG12404</i>	
1633586_at	6	34.166	7.329	<i>l(3)neo18</i>	<i>Atg12</i>
1634173_at	6	34.078	7.306	<i>Trap1</i>	
1624560_at	6	32.227	6.838	<i>ergic53</i>	
1641583_at	6	31.568	6.674	<i>CG14443</i>	<i>pigs</i>
1623402_at	6	31.515	6.661	<i>Arc-p34</i>	
1640313_s_at	6	31.370	6.625	<i>Surf4</i>	
1630930_a_at	6	31.302	6.608	<i>fus</i>	
1631076_at	6	31.285	6.604	<i>CG11070</i>	<i>CG13771</i>
1624029_at	6	31.208	6.584	<i>CG3608</i>	<i>CG4741</i>
1626177_s_at	6	31.091	6.555	<i>Gint3</i>	<i>CG42306</i>
1636546_s_at	6	30.612	6.437	<i>CG1640</i>	
1627248_at	6	30.493	6.408		
1626047_at	6	30.254	6.349	<i>Ssl2</i>	
1634614_at	6	30.158	6.326	<i>hfw</i>	<i>CG32809</i>
1625949_at	6	30.058	6.302	<i>Gpdh</i>	
1640351_s_at	6	29.541	6.176	<i>CG4390</i>	
1635281_at	6	29.469	6.158	<i>CG8237</i>	
1627850_at	6	29.167	6.085	<i>CG3689</i>	<i>CG3967</i>
1640311_s_at	6	28.922	6.026		<i>lolal</i>
1638113_at	6	28.789	5.994	<i>beta4GalNAcTA</i>	
1623983_at	6	28.099	5.828	<i>CG9514</i>	<i>Flo-2</i>
1625374_at	6	27.640	5.718	<i>CG9466</i>	
1625466_at	6	27.454	5.674	<i>CG2656</i>	
1631389_at	6	26.734	5.504	<i>CG30440</i>	
1632846_at	6	26.412	5.428	<i>CG17264</i>	<i>alpha4GT1</i>
1632195_at	6	26.163	5.370	<i>CG4645</i>	
1625528_at	6	25.824	5.290	<i>CG17593</i>	
1637771_s_at	6	25.376	5.186	<i>CG7220</i>	
1625851_s_at	6	25.374	5.186	<i>Pp2A-29B</i>	
1632980_at	6	25.070	5.115	<i>CG11637</i>	<i>CG3902</i>
1633613_at	7	45.482	10.422	<i>CG2765</i>	
1629191_s_at	7	44.192	10.048	<i>CG6154</i>	
1633559_at	7	38.403	8.440	<i>CG8331</i>	
1633253_s_at	7	36.317	7.886	<i>CG2991</i>	
1640734_a_at	7	35.742	7.736	<i>CG16718</i>	
1632453_at	7	34.315	7.367	<i>eloF</i>	

ANEXO DE RESULTADOS

1638844_s_at	7	33.783	7.231	CG3714		
1627283_at	7	33.518	7.164	CG42458		
1635661_at	7	33.048	7.045	CG14777	CG14778	CG32808
1638963_s_at	7	31.554	6.670	mrj		
1636352_at	7	30.787	6.481	CG15435	CG15443	
1631392_at	7	30.694	6.458	CG11089	CG31381	CG31121
1629055_a_at	7	30.000	6.287	Got2	CG7289	
1637829_at	7	29.099	6.069	CG4020		
1624464_s_at	7	28.982	6.040	CG14712	Csk	
1624889_a_at	7	28.757	5.986	l(2)k16918		
1636382_at	7	28.074	5.822	CG17574		
1637768_at	7	27.847	5.768	CG30100	CG42372	
1640822_s_at	7	27.189	5.611	qkr54B		
1636223_at	7	26.907	5.545	Hex-t1		
1624775_at	7	26.606	5.474	CG10628		
1631579_a_at	7	25.434	5.200			
1629207_at	7	25.433	5.199	CG6287		
1628602_a_at	7	25.308	5.170	CG9248	Nbr	
1639095_at	7	25.207	5.147	CG10426		
1625082_a_at	8	34.228	7.345	CG7882		
1630551_at	8	34.199	7.337	CG14353	CG5290	
1622929_at	8	31.694	6.705	CG42613	CG43732	
1629963_at	8	29.725	6.220	sut1		
1629843_s_at	8	26.263	5.393	Ubc-E2H		
1635125_a_at	9	51.497	12.244	CG6206		
1632228_at	9	48.867	11.431	CG6733	CG13830	
1633691_at	9	48.070	11.190	CG32262		
1634738_s_at	9	44.661	10.183	msl-1	CG31751	
1626745_at	9	44.189	10.047	Suchb		
1626707_a_at	9	43.276	9.786	AnnIX		
1627448_at	9	42.643	9.607	Updo	CG12929	
1626591_at	9	41.863	9.388	siz		
1628929_s_at	9	41.640	9.326	CG1902		
1632497_a_at	9	39.730	8.799	Gug		
1623302_at	9	39.723	8.797	RN-tre	CG8067	
1634222_at	9	39.331	8.690	CG18596		
1641206_at	9	39.180	8.649	sima		

ANEXO DE RESULTADOS

1623770_at	9	39.047	8.613	CG1673	
1627489_a_at	9	38.467	8.457	CG10433	
1628858_at	9	37.937	8.315		
1632490_at	9	37.807	8.280	CG8008	
1637141_at	9	37.767	8.269	CG4705	
1632839_a_at	9	37.246	8.131	CG8312	
1631675_a_at	9	37.228	8.126	Phm	
1625197_at	9	36.113	7.833	exba	
1629934_at	9	34.814	7.495	CG14219	
1639040_s_at	9	34.290	7.361	bdg	
1635956_at	9	33.788	7.232	CG10089	
1641492_at	9	33.573	7.178	SP2353	
1632154_at	9	32.892	7.005		
1633547_a_at	9	32.698	6.956	CG18336	CG42336
1623624_at	9	32.636	6.941	CG14869	
1635211_at	9	32.538	6.916	sbb	
1627423_at	9	32.470	6.899	CG6178	Myo95E
1631380_s_at	9	32.344	6.867	LanBI	
1641183_a_at	9	32.158	6.821	Pect	CG15482
1634583_s_at	9	31.360	6.622	CG4822	CG11455
1625857_at	9	31.267	6.599	CG8455	CG8451
1630112_at	9	31.197	6.582	CG18731	
1632289_at	9	30.830	6.491	CG33333	
1634466_at	9	30.815	6.487	CG9507	CG42368
1624829_at	9	30.604	6.435	barc	CG33288
1640485_at	9	30.126	6.318	CG7616	
1628795_s_at	9	29.886	6.259	CG9175	
1639588_at	9	29.681	6.210	CG5073	
1623363_at	9	29.626	6.196	CG6432	
1629680_at	9	29.609	6.192	CG5984	
1623777_s_at	9	29.413	6.145		CG1358 scra
1629759_at	9	29.194	6.091	CG18815	mir-3642
1630761_at	9	29.144	6.079		bam CG11854
1631328_s_at	9	28.981	6.040	DnaJ-H	
1637960_at	9	28.653	5.961	trx	CG14839
1633752_at	9	27.594	5.707		
1632728_at	9	27.536	5.694	Gcn2	CG11337

ANEXO DE RESULTADOS

1626044_at	9	27.462	5.676	CG42575	
1637962_at	9	26.685	5.492	spir	
1637159_at	9	26.609	5.474	CG9065	
1633884_at	9	26.521	5.454	Rtf1	
1632182_at	9	26.328	5.408	CG12096	
1639803_at	9	26.204	5.379	CG5151	CG32152
1636437_at	9	26.103	5.355	CG31638	
1641501_a_at	9	26.043	5.342	Sh	
1626477_at	9	26.008	5.333	CG7236	
1623510_at	9	25.978	5.326	CG7970	
1636456_at	9	25.642	5.248	CG13053	
1637338_at	9	25.595	5.237	CG12517	
1626499_at	9	25.505	5.216	GATAe	
1626187_at	9	25.455	5.204	Brf	
1624923_s_at	9	25.211	5.148	Pak3	
1630436_at	10	46.072	10.595		
1623697_s_at	10	42.128	9.462	CG33465	
1633308_at	10	40.229	8.935	klg	CG6660
1631481_a_at	10	40.060	8.889	Kr-h1	
1637491_s_at	10	37.747	8.264	CG3835	
1637030_at	10	37.394	8.170	CG5948	
1628752_at	10	35.341	7.632	CG43129	
1632655_at	10	34.196	7.337	Hsc70Cb	blue
1635199_at	10	33.557	7.174	barc	rgn
1637359_at	10	33.179	7.078	Lsd-2	
1639599_at	10	31.400	6.632	CG4887	
1629194_s_at	10	31.190	6.580	ade2	CG31643
1633675_at	10	30.860	6.499	CG12923	CG1513 CG30008
1625695_at	10	29.091	6.066	Ets98B	
1626294_a_at	10	28.871	6.013	stai	
1624721_at	10	26.486	5.445	vimar	
1627073_a_at	10	26.477	5.443	CG10126	
1632672_at	10	25.034	5.107	lbk	
1633814_at	11	44.223	10.057	CG3842	
1632959_at	11	36.985	8.062	CG8854	
1636885_at	11	35.302	7.621	CG17560	
1631763_at	11	34.504	7.416	CG31793	

ANEXO DE RESULTADOS

1629423_at	11	32.166	6.823	<i>ics</i>		
1641143_s_at	11	30.640	6.444	<i>tsl</i>		
1635792_a_at	11	26.282	5.398	<i>Ela</i>		
1631085_a_at	12	46.974	10.862			
1627884_at	12	40.714	9.069	<i>CG5281</i>	<i>sals</i>	
1627272_at	12	39.791	8.816	<i>CG8728</i>	<i>CG30380</i>	
1635803_s_at	12	38.002	8.332	<i>bowl</i>		
1639229_at	12	37.086	8.089	<i>vkg</i>	<i>CG3887</i>	
1627420_s_at	12	35.601	7.699	<i>CG7702</i>	<i>CG7705</i>	
1626529_at	12	33.285	7.105	<i>CG42337</i>		
1630150_s_at	12	32.802	6.983	<i>Cg25C</i>		
1634971_at	12	31.484	6.653	<i>CG6465</i>		
1631188_a_at	12	31.158	6.572	<i>CG9098</i>		
1639890_at	12	31.146	6.569	<i>CG17508</i>		
1631333_s_at	12	31.051	6.546	<i>Adh</i>	<i>Adhr</i>	<i>osp</i>
1639101_at	12	30.926	6.515	<i>CG9837</i>		
1633480_at	12	30.749	6.471	<i>Prosbeta2</i>	<i>Reck</i>	
1629066_at	12	29.163	6.084	<i>GRHRII</i>		
1625341_at	12	25.551	5.227	<i>FucTC</i>		
1640831_at	12	25.239	5.154	<i>Teh2</i>	<i>CG18675</i>	
1629184_at	12	24.914	5.079	<i>CG3819</i>	<i>mir-5614</i>	
1624448_at	12	24.788	5.050	<i>CG6356</i>		
1629089_a_at	12	24.750	5.041	<i>CG12963</i>		
1641192_at	12	24.746	5.040	<i>CG14523</i>	<i>CG33203</i>	
1637786_s_at	13	59.821	15.005			
1630951_at	13	57.676	14.265	<i>CG13373</i>	<i>CR18275</i>	<i>CG18273</i>
1625833_at	13	52.866	12.679	<i>CG9896</i>		
1635065_at	13	51.815	12.345	<i>CG18585</i>	<i>CG7025</i>	
1626927_at	13	49.612	11.659	<i>Pjf1B</i>	<i>Pjf1A</i>	
1626473_a_at	13	49.300	11.563	<i>CG17350</i>	<i>fon</i>	
1624371_a_at	13	49.108	11.505	<i>Tg</i>	<i>CG7367</i>	
1629442_at	13	48.265	11.249	<i>egr</i>		
1630302_at	13	47.659	11.066	<i>CG8562</i>		
1636923_a_at	13	47.126	10.907	<i>CSN4</i>	<i>ACC</i>	
1627662_at	13	45.437	10.409	<i>Ugt35a</i>		
1636688_at	13	44.034	10.003	<i>rab3-GEF</i>	<i>Cyp4s3</i>	
1629837_at	13	43.468	9.841	<i>Neurochondrin</i>		

ANEXO DE RESULTADOS

1634174_at	13	43.002	9.708	CG9702		
1632132_at	13	42.041	9.438			
1630320_at	13	40.997	9.147	betaTry		
1637250_at	13	40.599	9.037	CG17816		
1639155_at	13	40.259	8.943			
1634515_at	13	40.052	8.887			
1635544_s_at	13	39.893	8.843	pncr003:2L		
1639638_a_at	13	38.899	8.573	sbb	CG14502	
1625844_s_at	13	38.443	8.450	apt	CG42559	CG42560
1628005_at	13	36.292	7.879	chinmo		
1637301_a_at	13	35.988	7.800	slo		
1625745_at	13	35.949	7.790	ade2	CG31643	
1633866_at	13	35.916	7.781	Su(z)2		
1640276_a_at	13	35.698	7.724	Flo-1		
1627632_at	13	35.382	7.642	CG17777		
1639883_at	13	34.621	7.446	fz		
1633089_a_at	13	34.043	7.297	lola		
1633135_s_at	13	33.842	7.246	IP3K1	CR18854	
1623430_at	13	33.624	7.191			
1632873_at	13	33.409	7.136	MtnA		
1637361_a_at	13	33.403	7.134	CG12179		
1627162_at	13	33.334	7.117	CG31681		
1631058_s_at	13	33.197	7.082	Mgstl		
1635379_at	13	32.432	6.890	CG31300		
1630127_at	13	32.167	6.823	CG42533		
1635227_at	13	32.127	6.813	ImpL3		
1624626_at	13	32.042	6.792	CG32521		
1638154_at	13	31.677	6.701	CG2187		
1626771_at	13	31.358	6.622	spri		
1632744_a_at	13	31.310	6.610	if		
1630229_at	13	30.944	6.519	CG9815		
1634136_at	13	30.355	6.374	CG2157	CG1637	
1632908_s_at	13	29.738	6.223	Lerp	TI	
1629317_at	13	29.694	6.213	Nplp3		
1637404_at	13	29.356	6.131	CG10262		
1635500_a_at	13	29.296	6.116	pros		
1633647_at	13	29.142	6.079	Cpr49Ah		

ANEXO DE RESULTADOS

1633637_at	13	29.060	6.059	<i>brm</i>	<i>CG17026</i>	
1632695_at	13	29.020	6.049	<i>CG18585</i>	<i>Myo28B1</i>	
1638226_at	13	28.994	6.043	<i>CG10562</i>		
1636869_at	13	28.603	5.949	<i>AGO1</i>		
1628190_at	13	28.322	5.881	<i>fab1</i>	<i>CG33981</i>	
1640162_at	13	28.170	5.845	<i>CG43729</i>		
1639237_at	13	28.041	5.814	<i>su(w[a])</i>	<i>CG11638</i>	<i>CG32814</i>
1636970_at	13	27.815	5.760	<i>king-tubby</i>	<i>CG9394</i>	
1628689_at	13	27.472	5.678	<i>CG17211</i>		
1637072_at	13	27.372	5.655	<i>CG11459</i>		
1634619_at	13	27.302	5.638	<i>IP3K1</i>	<i>CR18854</i>	
1639504_at	13	27.299	5.637	<i>CG14855</i>		
1623769_at	13	27.107	5.592	<i>CG7322</i>		
1639885_at	13	27.035	5.575	<i>byn</i>	<i>CG14126</i>	
1641659_s_at	13	26.818	5.524	<i>CG7834</i>		
1623411_at	13	26.709	5.498	<i>lola</i>		
1623199_a_at	13	26.654	5.485	<i>CG43078</i>		
1635744_at	13	26.649	5.484			
1636168_s_at	13	26.608	5.474	<i>CG13101</i>		
1637360_at	13	26.390	5.423	<i>CG11382</i>		
1631403_at	13	25.985	5.328	<i>CG14445</i>		
1635287_at	13	25.923	5.313	<i>CG7267</i>	<i>CG15366</i>	
1623759_at	13	25.881	5.304	<i>CG13428</i>		
1639268_at	13	25.677	5.256	<i>CG13324</i>		
1633792_a_at	13	25.663	5.253	<i>osa</i>		
1638523_at	13	25.434	5.199	<i>CG32633</i>		
1640191_a_at	13	25.412	5.194	<i>CTPsyn</i>		
1632019_s_at	13	25.268	5.161	<i>CG9008</i>	<i>CG43376</i>	
1631405_at	13	25.240	5.155	<i>CG42368</i>	<i>CG42370</i>	
1628927_at	13	25.185	5.142	<i>yellow-b</i>		
1624537_s_at	13	25.147	5.133			
1625061_at	13	25.118	5.126	<i>CG17298</i>	<i>SIFR</i>	
1635312_at	13	25.058	5.112	<i>Snoo</i>		
1629238_at	13	24.848	5.064		<i>CG13047</i>	
1623069_s_at	13	24.773	5.046	<i>CG17544</i>		
1626988_at	14	27.270	5.630	<i>CG6805</i>		
1640282_at	14	28.661	5.963	<i>CG6843</i>		
1626637_a_at	14	39.803	8.819	<i>bif</i>		

ANEXO DE RESULTADOS

NARANJA

ID	MÓD	CM	F	SÍMBOLO		
1635833_at	1	59.554	8.658	<i>CG4198</i>	<i>CG15930</i>	
1637969_at	1	46.972	6.515	<i>CG12182</i>	<i>CG16984</i>	
1637127_at	1	46.923	6.507	<i>cyr</i>	<i>CG10958</i>	
1632999_at	1	43.039	5.885	<i>SIP3</i>		
1635952_at	2	75.556	11.701	<i>l(2)efl</i>		
1634187_x_at	2	55.682	7.977		<i>CG40378</i>	
1629385_s_at	2	54.870	7.837	<i>Cralbp</i>	<i>Pmi</i>	<i>PGRP-LD</i>
1626552_at	2	50.440	7.086	<i>CG3568</i>	<i>CG32773</i>	
1638484_at	2	48.820	6.817	<i>Hsp67Bc</i>		
1626435_at	2	44.568	6.128	<i>CG15263</i>		
1632841_x_at	2	43.623	5.978	<i>Hsp70Ba</i>	<i>Hsp70Bc</i>	
1629906_s_at	2	43.065	5.889	<i>CG13877</i>	<i>pyx</i>	<i>Kaz1-ORFB</i>
1635282_at	2	41.646	5.666	<i>eIF-1A</i>	<i>CG7142</i>	
1631204_at	2	38.234	5.139			
1637975_at	3	77.482	12.094	<i>Dhc36C</i>	<i>CG15144</i>	
1634125_at	3	55.533	7.951	<i>CG30440</i>		
1639170_at	3	49.642	6.953	<i>Cyp4d21</i>		
1636647_s_at	3	47.514	6.603	<i>CG40160</i>		
1637835_at	3	46.531	6.444	<i>CG12177</i>		
1627405_at	3	44.511	6.119	<i>Hsp83</i>	<i>CG14966</i>	
1635070_at	3	43.875	6.018	<i>CG9953</i>	<i>CG10063</i>	
1625059_at	4	77.376	12.072	<i>Lk</i>	<i>CG34039</i>	
1638282_at	4	69.494	10.502	<i>CG14196</i>		
1641660_at	4	65.144	9.677	<i>CG18744</i>		
1626949_at	4	65.098	9.669	<i>CG11158</i>	<i>CG9940</i>	
1625053_at	4	62.055	9.109	<i>CG16898</i>		
1626734_at	4	61.177	8.950	<i>CG6484</i>		
1632345_at	4	56.161	8.060	<i>CG8353</i>		
1638182_at	4	55.280	7.907	<i>CG5999</i>		
1636510_a_at	4	54.506	7.774	<i>Lsd-1</i>	<i>CG10214</i>	
1625743_at	4	54.156	7.714	<i>ninaB</i>	<i>Adgf-D</i>	
1637360_at	4	52.785	7.480	<i>CG11382</i>		
1635573_at	4	47.592	6.616	<i>CG42663</i>		
1632498_at	4	46.332	6.411	<i>CG15629</i>	<i>CG3225</i>	
1630979_at	4	46.292	6.405	<i>CG6144</i>	<i>CG13144</i>	

ANEXO DE RESULTADOS

1626309_at	4	43.025	5.883	<i>Muc68D</i>	
1636583_at	4	42.912	5.865	<i>CG5195</i>	<i>mag</i>
1628296_at	4	42.755	5.840	<i>pgant4</i>	
1640991_at	4	42.712	5.834	<i>CG6071</i>	<i>CG32091</i>
1640231_a_at	4	42.032	5.727	<i>CG8908</i>	
1626759_at	4	41.032	5.571	<i>CG12050</i>	<i>CG34136</i>
1630419_a_at	4	40.708	5.520	<i>CG7300</i>	
1634935_a_at	4	39.879	5.392	<i>CG1648</i>	
1640407_at	4	39.841	5.386	<i>CG9897</i>	
1630159_at	4	39.508	5.335	<i>CG11672</i>	
1627583_at	4	39.389	5.316	<i>CG15213</i>	
1634310_at	4	39.076	5.268	<i>TpnC4</i>	<i>CG30438</i>
1638496_at	4	38.632	5.200	<i>CG42521</i>	
1631408_at	4	38.327	5.154	<i>SoxN</i>	
1639320_a_at	4	37.837	5.079	<i>Ddc</i>	<i>CG10561</i>
1633039_at	4	37.803	5.074	<i>CG5646</i>	
1632782_a_at	5	77.201	12.036	<i>CG7675</i>	
1633846_at	5	65.306	9.708	<i>CG15523</i>	
1641464_s_at	5	63.335	9.343		<i>CG17839</i> <i>CG32850</i>
1626413_at	5	58.986	8.557	<i>Rbp1-like</i>	
1632655_at	5	56.162	8.060	<i>Hsc70Cb</i>	<i>blue</i>
1630667_at	5	56.088	8.047	<i>CG34043</i>	
1630616_at	5	56.010	8.034	<i>Ugt37a1</i>	
1638636_at	5	55.890	8.013	<i>CG12512</i>	
1635349_a_at	5	55.854	8.007	<i>nAcRbeta-96A</i>	
1631606_at	5	54.714	7.810	<i>CG14285</i>	
1627528_at	5	53.712	7.638		
1637393_at	5	53.326	7.572	<i>Vmat</i>	
1640957_at	5	51.017	7.182	<i>CG2004</i>	<i>Hexo2</i>
1633089_a_at	5	50.320	7.066	<i>lola</i>	
1632839_a_at	5	48.671	6.793	<i>CG8312</i>	
1624405_a_at	5	48.096	6.698	<i>CG7059</i>	<i>CG13857</i>
1626473_a_at	5	45.601	6.294	<i>CG17350</i>	<i>fon</i>
1639805_at	5	45.472	6.273		
1637233_at	5	44.481	6.114	<i>CG13229</i>	
1633205_at	5	43.672	5.985	<i>DAT</i>	
1633818_at	5	43.467	5.953	<i>CG7368</i>	

ANEXO DE RESULTADOS

1628190_at	5	43.081	5.892	<i>fabI</i>	<i>CG33981</i>
1633268_s_at	5	42.389	5.783	<i>NhaI</i>	<i>l(2)k09022</i>
1640639_at	5	42.373	5.780	<i>CG42235</i>	
1623304_at	5	42.150	5.745	<i>CG9107</i>	
1630976_at	5	41.937	5.712	<i>vir</i>	<i>CG34424</i>
1625686_s_at	5	41.826	5.694	<i>su(r)</i>	
1627429_at	5	41.197	5.596	<i>Snoo</i>	
1625265_at	5	40.543	5.495	<i>CG9119</i>	<i>mwh</i>
1630897_at	5	40.402	5.473	<i>GluClalpha</i>	
1624402_at	5	40.047	5.418	<i>alien</i>	<i>CG17906</i>
1635744_at	5	39.989	5.409		
1634662_at	5	38.422	5.168	<i>Cyp313a1</i>	<i>Pde6</i>
1641508_s_at	5	37.792	5.072	<i>Tsp42Eh</i>	

TOMATE

ID	MÓD	CM	F	SÍMBOLO	
1639229_at	1	64.165	6.377	<i>vkg</i>	<i>CG3887</i>
1639896_at	1	74.789	7.645		
1623371_at	2	62.243	6.155	<i>CG42249</i>	
1623559_s_at	2	55.605	5.405	<i>nAcRalpha-7E</i>	
1625336_s_at	3	64.432	6.408	<i>CG42324</i>	<i>CG43074</i>
1627653_at	3	54.093	5.238	<i>l(1)G0007</i>	<i>l(1)G0469</i>
1630163_at	3	53.007	5.118	<i>CG32373</i>	
1624275_at	4	66.284	6.624	<i>insc</i>	<i>sktl</i>
1632369_at	4	63.203	6.265	<i>CG5142</i>	
1623714_at	4	61.442	6.063	<i>CG8620</i>	
1637918_s_at	4	59.786	5.874		
1626624_s_at	4	56.581	5.514	<i>Pax</i>	
1629216_at	4	56.338	5.487	<i>inc</i>	
1629507_a_at	4	54.167	5.246	<i>mle</i>	
1638305_at	5	129.244	15.479	<i>Mip</i>	
1623304_at	5	105.243	11.718	<i>CG9107</i>	
1632498_at	5	105.082	11.694	<i>CG15629</i>	<i>CG3225</i>
1635952_at	5	96.922	10.534	<i>l(2)efl</i>	
1631246_at	5	93.538	10.069	<i>Fmrf</i>	
1637301_a_at	5	92.887	9.981	<i>slo</i>	
1627974_at	5	91.161	9.748	<i>Cyp6t3</i>	

ANEXO DE RESULTADOS

1639575_at	5	85.347	8.979	<i>cbx</i>	<i>CG18446</i>	
1638496_at	5	82.786	8.648	<i>CG42521</i>		
1627855_at	5	82.450	8.605	<i>yellow-e</i>		
1627069_at	5	82.028	8.551	<i>CG7191</i>		
1632959_at	5	81.598	8.497	<i>CG8854</i>		
1634305_at	5	81.282	8.456	<i>mim</i>	<i>CheB42c</i>	<i>CheB42b</i>
1636275_a_at	5	80.820	8.398	<i>Vmat</i>		
1635005_a_at	5	80.161	8.314	<i>Rdl</i>		
1633039_at	5	75.766	7.765	<i>CG5646</i>		
1636015_s_at	5	75.284	7.706		<i>CG17839</i>	<i>CG17684</i>
1633088_at	5	71.202	7.209	<i>CG4733</i>		
1628159_a_at	5	70.142	7.081	<i>CG32206</i>		
1639001_a_at	5	68.403	6.874	<i>alpha-Est9</i>		
1624448_at	5	68.364	6.869	<i>CG6356</i>		
1637648_at	5	67.968	6.822	<i>CG11191</i>		
1627250_at	5	66.986	6.707	<i>Msp-300</i>		
1636028_at	5	66.127	6.606	<i>CG6723</i>		
1627709_at	5	65.757	6.562	<i>CG30371</i>		
1623007_a_at	5	65.282	6.507			
1632337_at	5	64.864	6.458	<i>Sur</i>		
1624995_at	5	64.783	6.449	<i>CG12355</i>		
1625053_at	5	64.648	6.433	<i>CG16898</i>		
1634619_at	5	64.296	6.392	<i>IP3K1</i>	<i>CR18854</i>	
1635349_a_at	5	64.282	6.390	<i>nAcRbeta-96A</i>		
1629474_at	5	62.881	6.228	<i>CG11368</i>	<i>CG43198</i>	
1641513_at	5	61.796	6.103	<i>CG12239</i>		
1634296_s_at	5	61.619	6.083	<i>CG17646</i>		
1641137_at	5	61.547	6.075	<i>Dr</i>		
1625065_s_at	5	60.881	5.999	<i>SK</i>		
1628572_s_at	5	60.590	5.966	<i>Gycbeta100B</i>	<i>stops</i>	
1627167_a_at	5	58.309	5.707	<i>CG40485</i>		
1631340_at	5	57.436	5.609	<i>Ggamma1</i>	<i>CG8258</i>	
1636377_at	5	56.840	5.543	<i>pHCl</i>		
1628989_at	5	56.720	5.529			
1630897_at	5	56.520	5.507	<i>GluClalpha</i>		
1633512_at	5	56.158	5.466	<i>toy</i>		
1633589_a_at	5	55.219	5.362	<i>CG1552</i>		

ANEXO DE RESULTADOS

1634093_at	5	55.163	5.356	<i>CG11155</i>	<i>CG32017</i>
1635009_at	5	54.652	5.299	<i>CG8500</i>	<i>CG12945</i>
1631274_at	5	54.264	5.257	<i>CG18095</i>	
1633913_at	5	54.110	5.240	<i>a10</i>	
1638282_at	5	53.364	5.158	<i>CG14196</i>	
1638583_at	5	53.248	5.145	<i>CG31103</i>	
1630829_at	5	52.889	5.105	<i>PIP5K59B</i>	<i>CG3501</i>
1636407_at	5	52.579	5.072	<i>gol</i>	
1631606_at	6	151.435	19.500	<i>CG14285</i>	
1628190_at	6	114.210	13.059	<i>fab1</i>	<i>CG33981</i>
1633142_at	6	85.197	8.960	<i>CG17681</i>	
1634279_at	6	82.977	8.673	<i>CG11529</i>	
1640831_at	6	77.921	8.033	<i>Teh2</i>	<i>CG18675</i>
1631763_at	6	75.661	7.752	<i>CG31793</i>	
1626503_at	6	74.356	7.592	<i>CG2254</i>	
1637393_at	6	69.799	7.040	<i>Vmat</i>	
1629757_at	6	69.219	6.971	<i>Snp</i>	
1634071_at	6	66.916	6.698	<i>kek1</i>	
1633773_s_at	6	65.146	6.491	<i>Keap1</i>	
1633852_at	6	64.071	6.366	<i>fne</i>	
1631806_at	6	63.500	6.300	<i>Mal-A4</i>	
1640143_at	6	62.377	6.170	<i>CG10463</i>	
1624721_at	6	61.100	6.024	<i>vimar</i>	
1630466_at	6	59.876	5.884	<i>l(2)k09022</i>	
1629749_a_at	6	59.512	5.843	<i>CG13870</i>	
1627882_at	6	58.594	5.739		
1636005_at	6	58.512	5.730	<i>CG14495</i>	
1640215_at	6	57.794	5.649	<i>MRG15</i>	<i>CG4338</i>
1630749_at	6	57.772	5.647	<i>CG11052</i>	
1635812_at	6	56.836	5.542	<i>CG16965</i>	
1624924_at	6	56.826	5.541	<i>CG16791</i>	
1638182_at	6	56.334	5.486	<i>CG5999</i>	
1624267_at	6	55.379	5.380	<i>DNApol-alpha50</i>	<i>CG7182</i>
1624371_a_at	6	54.319	5.263	<i>Tg</i>	<i>CG7367</i>
1634143_at	6	54.273	5.258	<i>Cyp6w1</i>	
1625168_at	6	53.842	5.210	<i>bl</i>	
1629688_at	6	53.013	5.119	<i>drpr</i>	<i>Oseg4</i>

ANEXO DE RESULTADOS

1638636_at	6	52.949	5.112	<i>CG12512</i>	
1625341_at	6	52.793	5.095	<i>FucTC</i>	
1627448_at	6	52.518	5.065	<i>Updo</i>	<i>CG12929</i>
1635927_at	6	52.155	5.025	<i>ird1</i>	

Tabla 6. Resultados de los análisis de asociación fenotipo – transcriptoma para las combinaciones de recursos uva-naranja. uva-tomate en los experimentos de PO. ID corresponde a la identificación única del *QTT*. MÓDULO es el número de módulo de transcripción al cual el *QTT* pertenece. CM son los cuadrados medios. F es el estadístico de Fisher. SÍMBOLO corresponde a la abreviatura del nombre conocido de los genes que mapean con cada *QTT*. Todos los *QTTs* son significativos con un *P* valor ≤ 0.03 .

UT						
ID	MOD	CM	F	SÍMBOLO		
1625597_a_at	1	0.023	5.306	<i>CG6441</i>		
1625698_at	1	0.028	6.578	<i>CG6639</i>		
1635233_at	1	0.023	5.178	<i>CG15258</i>		
1636743_s_at	1	0.024	5.475			
1627097_at	2	0.025	5.798	<i>T-CUP</i>		
1628852_at	2	0.025	5.812	<i>CG14262</i>		
1630121_at	2	0.026	6.148	<i>CG9392</i>		
1631451_at	2	0.023	5.202	<i>CG32061</i>		
1632703_at	2	0.025	5.773	<i>CG17003</i>		
1639446_at	2	0.023	5.214	<i>CG13243</i>		
1640740_a_at	2	0.026	5.906	<i>MS(2)35CI</i>		
1640789_a_at	2	0.027	6.228	<i>CG32392</i>		
1641311_at	2	0.024	5.382	<i>SFP53D</i>	<i>CG14077</i>	
1622965_s_at	3	0.027	6.298	<i>CG15617</i>		
1623175_at	3	0.024	5.61	<i>CG42568</i>	<i>CG42567</i>	<i>GRX-1</i>
1623925_at	3	0.023	5.28	<i>CG4477</i>		
1624949_at	3	0.023	5.127	<i>CG31546</i>		
1625767_at	3	0.026	6.097	<i>CG30056</i>		
1627867_at	3	0.025	5.873	<i>spri</i>	<i>CG12438</i>	
1630300_at	3	0.025	5.804	<i>CG4706</i>		
1630967_at	3	0.025	5.631	<i>CG13385</i>		
1631025_at	3	0.029	6.913	<i>PROSBETA5R</i>		
1631206_a_at	3	0.022	5.042	<i>CG34417</i>	<i>CG17717</i>	
1635149_at	3	0.033	7.963	<i>CG32117</i>		

ANEXO DE RESULTADOS

1640544_a_at	3	0.024	5.486	CG11112		
1625177_at	4	0.022	5.091	CG14182		
1626502_s_at	4	0.026	6.133	CR14578	BCD	
1627307_at	4	0.023	5.209	CG5681		
1629246_at	4	0.022	5.063	CG12219		
1623115_at	5	0.025	5.767	CG14071		
1624902_at	5	0.022	5.046	PH4ALPHANE2		
1628832_s_at	5	0.023	5.187	CG43052		
1629535_at	5	0.026	6.144	CG14861		
1631174_at	5	0.028	6.493	CG9875		
1631477_a_at	5	0.027	6.177	CG9377		
1631767_at	5	0.025	5.646	CG18530		
1632435_at	5	0.024	5.554	CG7804		
1635255_at	5	0.025	5.732	CG9173		
1635629_at	5	0.023	5.133	CG34274		
1636375_at	5	0.022	5.086	CG30060		
1640532_at	5	0.032	7.813	CG30356		
1625585_at	6	0.024	5.484	CG6481		
1630641_at	6	0.023	5.168	CG18505	CG11634	
1636589_s_at	6	0.027	6.252	CG14205	CG31960	CG31958
1636957_s_at	6	0.022	5.105	CG34012		
1638980_at	6	0.031	7.52	CG3611		
1640343_at	6	0.024	5.541	CG14106		
1629754_s_at	7	0.022	5.04	TRL	CG42507	
1633906_at	7	0.022	5.103	CG6485		
1640076_at	7	0.024	5.531	CG31960	OBST-A	
1628408_at	8	0.023	5.295	CG34041		
1637271_a_at	8	0.027	6.18	CG14605		
1639960_at	8	0.031	7.423	CG30093		
1641456_at	8	0.028	6.499	LAR		
1625549_at	9	0.026	5.932	CBC		
1625727_at	9	0.03	7.079	CG32006		
1626615_at	9	0.026	6.032	CG31156		
1627676_at	9	0.023	5.112	CG1074		
1628019_a_at	9	0.031	7.477	SPAS		
1629198_at	9	0.038	9.667	INTS4		
1631383_at	9	0.024	5.516	CG30472	CG42368	CG42370

ANEXO DE RESULTADOS

1631525_at	9	0.023	5.236	CG3501	
1631981_at	9	0.023	5.228	CG14457	
1632438_at	9	0.031	7.394	CG2091	
1633270_at	9	0.033	8.118	CG4884	
1633440_a_at	9	0.022	5.037	HAKAI	CG8147
1634553_at	9	0.028	6.565	CG13602	
1636055_at	9	0.047	12.523	HSC70-2	
1637465_at	9	0.048	12.88	CG31157	
1639117_a_at	9	0.045	11.93	CG33096	
1640609_at	9	0.023	5.183	CG31493	
1640643_a_at	9	0.027	6.4	CG7609	
1641702_at	9	0.024	5.487		
1623806_at	10	0.024	5.459	ADA2B	
1638988_at	10	0.023	5.336	CG12914	
1633860_at	11	0.025	5.886	CG12078	
1638824_a_at	11	0.026	6.107	NONA	
1623401_a_at	12	0.039	9.829	ROW	
1623499_at	12	0.028	6.492	CG12341	
1623613_at	12	0.024	5.539	BRV3	
1624514_at	12	0.025	5.822	VHA16-3	
1624663_a_at	12	0.027	6.254	VIS	
1628671_a_at	12	0.025	5.864	SLS	
1630652_at	12	0.024	5.631	CG43104	
1631813_at	12	0.025	5.808	CG17568	
1631937_at	12	0.024	5.51	SOYB	
1632138_at	12	0.027	6.369	SA	
1633111_at	12	0.025	5.818	PORIN2	
1633433_at	12	0.029	6.856	CG12866	
1633616_at	12	0.027	6.289	CG7650	
1634826_at	12	0.023	5.148	CG13337	
1635084_at	12	0.025	5.742	CG1444	CG31413
1635445_at	12	0.028	6.563	SLS	
1637642_at	12	0.022	5.058	CG15047	
1638752_s_at	12	0.024	5.425	CG31961	CG31415
1640060_at	12	0.041	10.6	CG33095	YMP
1641177_at	12	0.031	7.473	CG1428	
1631461_at	13	0.022	5.074	SDIC1	

ANEXO DE RESULTADOS

1632705_at	13	0.023	5.171	<i>NINAD</i>		
1637873_at	13	0.028	6.601	<i>SCPR-C</i>		
1623026_a_at	14	0.023	5.357	<i>CG7573</i>		
1624678_at	14	0.028	6.588	<i>CG9570</i>		
1625925_at	14	0.024	5.501	<i>CG32814</i>		
1626126_at	14	0.026	5.957	<i>CG18368</i>		
1627575_at	14	0.025	5.882	<i>CG34204</i>		
1627603_at	14	0.039	9.71			
1627689_at	14	0.023	5.276	<i>CG17010</i>		
1629846_at	14	0.028	6.504	<i>CG11619</i>		
1631115_at	14	0.026	5.946	<i>OBP8A</i>		
1631308_at	14	0.042	10.732	<i>CG10737</i>		
1633128_at	14	0.022	5.019	<i>CG15471</i>		
1633266_at	14	0.025	5.72	<i>SPN75F</i>	<i>CG42487</i>	
1634048_a_at	14	0.024	5.495	<i>BGM</i>		
1634224_at	14	0.025	5.867	<i>CG9997</i>		
1635535_at	14	0.023	5.274	<i>CG1287</i>	<i>CG34235</i>	
1635572_at	14	0.023	5.114	<i>CG34312</i>	<i>CG30058</i>	
1638273_at	14	0.024	5.569	<i>CG10000</i>		
1638938_at	14	0.023	5.361	<i>CG9418</i>		
1640825_a_at	14	0.033	8.103	<i>PTXI</i>		
1641263_at	14	0.023	5.172			
1641660_at	14	0.027	6.226	<i>CG18744</i>		
1623199_a_at	15	0.029	6.873	<i>CG43078</i>		
1623848_a_at	15	0.024	5.489	<i>Tep3</i>	<i>KAZ1-ORFB</i>	
1624116_at	15	0.024	5.399	<i>MST36FA</i>		
1626719_a_at	15	0.027	6.385	<i>WLS</i>		
1627926_at	15	0.028	6.672	<i>PEX11</i>	<i>ATPCL</i>	
1633264_at	15	0.041	10.407	<i>CG13024</i>		
1636465_at	15	0.022	5.083	<i>CG9215</i>		
1639792_at	15	0.025	5.885	<i>CG30183</i>		
1640539_a_at	15	0.022	5.019	<i>CG8866</i>		
1622909_at	16	0.03	7.081	<i>PI3K21B</i>		
1623119_at	16	0.058	16.617	<i>Dat</i>	<i>CG42568</i>	<i>DnaJ-60</i>
1623226_at	16	0.025	5.64	<i>CG10154</i>		
1623372_at	16	0.027	6.178	<i>CG5873</i>		
1623491_at	16	0.027	6.288	<i>CG15155</i>		

ANEXO DE RESULTADOS

1623558_at	16	0.026	6.087	<i>CPR49AE</i>		
1623659_at	16	0.024	5.464	<i>OBP56D</i>		
1623690_at	16	0.025	5.884	<i>MED25</i>	<i>CG17190</i>	
1623695_a_at	16	0.03	7.192	<i>CG11255</i>		
1623710_at	16	0.047	12.398	<i>ZYE</i>		
1623740_at	16	0.041	10.382	<i>MED25</i>	<i>CG17190</i>	<i>L(3)72DR</i>
1623753_at	16	0.036	8.772	<i>TepIII</i>		
1623766_at	16	0.03	7.035	<i>CG14054</i>		
1623899_at	16	0.024	5.625	<i>TAKR99D</i>		
1624080_s_at	16	0.034	8.422	<i>TRN</i>		
1624300_s_at	16	0.029	6.867	<i>NMO</i>		
1624595_a_at	16	0.029	6.748	<i>RBP2</i>		
1624738_at	16	0.024	5.541	<i>CR11386</i>	<i>CR33222</i>	
1624892_s_at	16	0.026	5.968	<i>CG11892</i>		
1624943_at	16	0.029	6.874	<i>CG1636</i>		
1625033_at	16	0.025	5.67	<i>CG16791</i>		
1625323_at	16	0.032	7.823	<i>CG18769</i>	<i>ju</i>	
1625325_s_at	16	0.03	7.227	<i>SIMJ</i>		
1625401_at	16	0.05	13.53	<i>CG13026</i>		
1625411_at	16	0.032	7.742	<i>CG42730</i>	<i>TECTONIC</i>	
1625546_at	16	0.028	6.464	<i>CG4557</i>		
1625552_at	16	0.027	6.371	<i>CG14820</i>		
1625559_a_at	16	0.025	5.69	<i>CG43325</i>	<i>CG43326</i>	
1625617_at	16	0.022	5.058	<i>Roc2</i>		
1625629_at	16	0.028	6.559	<i>ALPHA-EST6</i>		
1625684_at	16	0.029	6.809	<i>CG18769</i>	<i>ju</i>	<i>CG11523</i>
1625687_at	16	0.026	6.092	<i>KON</i>		
1625752_at	16	0.023	5.233	<i>TPNC41C</i>	<i>CR18166</i>	
1625859_at	16	0.022	5.047	<i>Cct2</i>		
1625933_at	16	0.023	5.172	<i>CG14731</i>		
1626058_at	16	0.025	5.817	<i>LBL</i>		
1626098_at	16	0.028	6.65	<i>CG11453</i>		
1626204_at	16	0.029	6.908	<i>CG42246</i>		
1626228_a_at	16	0.024	5.449	<i>CG6967</i>		
1626248_at	16	0.029	6.719	<i>CG18547</i>		
1626256_at	16	0.025	5.661	<i>CG13836</i>		
1626278_at	16	0.022	5.028	<i>CG6180</i>		

ANEXO DE RESULTADOS

1626285_at	16	0.023	5.145	<i>Cct2</i>	<i>CG13806</i>	
1626429_at	16	0.048	12.913	<i>LSP1GAMMA</i>		
1626439_at	16	0.024	5.382	<i>CG33543</i>	<i>CG15353</i>	
1626452_at	16	0.023	5.184	<i>CG2121</i>		
1626456_at	16	0.029	6.935	<i>L(1)G0320</i>	<i>CG32700</i>	
1626470_at	16	0.03	6.994	<i>CG10440</i>		
1626529_at	16	0.029	6.763	<i>CG42337</i>	<i>CG4080</i>	<i>DnaJ-60</i>
1626574_at	16	0.03	7.237	<i>CG9935</i>		
1626588_a_at	16	0.022	5.037	<i>PEX19</i>		
1626606_at	16	0.035	8.551	<i>BLANKS</i>		
1626650_at	16	0.028	6.585	<i>MOD(MDG4)</i>		
1626653_a_at	16	0.023	5.132	<i>FERROCHELATAS E</i>		
1627055_at	16	0.032	7.844	<i>CG6709</i>	<i>CG14164</i>	
1627566_a_at	16	0.027	6.172	<i>CG12163</i>		
1627738_a_at	16	0.029	6.831	<i>MSL-3</i>		
1627832_at	16	0.026	5.926	<i>SCAT</i>		
1627881_at	16	0.023	5.292	<i>SALM</i>		
1627890_at	16	0.023	5.268	<i>GSTD10</i>		
1628101_s_at	16	0.026	6.135	<i>CG8974</i>	<i>CG32581</i>	
1628139_at	16	0.022	5.026	<i>CG30385</i>		
1628150_a_at	16	0.034	8.42	<i>CG9449</i>		
1628231_at	16	0.039	9.861	<i>AC76E</i>		
1628245_at	16	0.038	9.411	<i>SENS-2</i>		
1628310_at	16	0.03	7.242			
1628353_at	16	0.029	6.883	<i>GSTD1</i>		
1628369_at	16	0.033	8.017	<i>BOSS</i>		
1628496_at	16	0.024	5.627	<i>dpr16</i>		
1628593_at	16	0.029	6.741	<i>CG33252</i>		
1628604_at	16	0.025	5.631	<i>D</i>		
1628605_at	16	0.037	9.058	<i>CG5662</i>		
1628657_at	16	0.024	5.484	<i>GSTE9</i>		
1628746_at	16	0.025	5.775	<i>CG8851</i>		
1628785_at	16	0.028	6.458	<i>L(3)04053</i>		
1628807_at	16	0.023	5.311	<i>CG5205</i>		
1628907_at	16	0.026	5.967	<i>pgc</i>	<i>T3dh</i>	<i>CG34207</i>
1628927_at	16	0.032	7.58	<i>YELLOW-B</i>	<i>CG17912</i>	
1629061_s_at	16	0.029	6.968	<i>HSP22</i>	<i>HSP67BB</i>	

ANEXO DE RESULTADOS

1629113_a_at	16	0.033	8.013	CG42307	MUS312	
1629159_at	16	0.023	5.224	CG16865		
1629187_s_at	16	0.027	6.321	WDB		
1629216_at	16	0.036	8.868	INC		
1629318_at	16	0.023	5.335	CG17104		
1629363_at	16	0.025	5.767	Acyp2		
1629385_s_at	16	0.024	5.471	Cralbp	Pmi	PGRP-LD
1629428_at	16	0.024	5.541	CG7342		
1629468_at	16	0.022	5.021	CG9372	Lon	
1629523_at	16	0.024	5.583	LOLA		
1629553_at	16	0.026	6.004	CG14153		
1629694_at	16	0.025	5.734	PABP2		
1629700_at	16	0.022	5.048	MAMO		
1629793_at	16	0.026	6.01	CG12772		
1629820_at	16	0.034	8.421	CG14353		
1629910_at	16	0.036	9.029	CG11570		
1630004_at	16	0.028	6.667	BEAT-IB	CG31659	
1630049_at	16	0.026	5.953	HSP67BB	CG4461	
1630231_at	16	0.024	5.512	FW		
1630252_at	16	0.025	5.637	RPS11		
1630538_at	16	0.034	8.178	CPR60D		
1630600_at	16	0.043	11.293	Dh44	Fst	
1630723_a_at	16	0.023	5.281	CG8708		
1630762_at	16	0.022	5.073	PK1R		
1630781_at	16	0.039	9.708	FS(2)LOPP43		
1630855_s_at	16	0.026	5.941			
1630897_at	16	0.035	8.635	GLUCLALPHA		
1630920_at	16	0.024	5.629	TSP42EK		
1631040_at	16	0.029	6.733	SOWAH		
1631134_at	16	0.03	7.159	GEF26		
1631285_at	16	0.04	10.099	TSP5D		
1631405_at	16	0.026	6.101	CG32181		
1631735_at	16	0.023	5.357	CG10445	GEFMESO	
1632003_a_at	16	0.028	6.505	PTP99A	CG34134	
1632072_at	16	0.027	6.228	CG8475		
1632082_at	16	0.024	5.395	NDG		
1632155_at	16	0.029	6.804	CG13676	CG3436	

ANEXO DE RESULTADOS

1632295_s_at	16	0.041	10.398	CG17493		
1632348_at	16	0.03	7.125	CG9452		
1632391_at	16	0.023	5.118	CG14234		
1632395_s_at	16	0.023	5.118	VHA100-1		
1632452_at	16	0.027	6.393	CG18258		
1632510_at	16	0.022	5.045	CG34401	CG7966	
1632517_at	16	0.022	5.071	CG5023	CG7966	CG5770
1632656_at	16	0.035	8.668	CG12112		
1632711_at	16	0.027	6.267	PEX10	CG15711	CecC
1632719_at	16	0.025	5.77	FRU	CecC	
1632872_at	16	0.028	6.61	ACP24A4		
1633002_at	16	0.023	5.35	SALT		
1633046_at	16	0.04	10.113	CG7239		
1633207_at	16	0.024	5.496	NDAE1		
1633315_at	16	0.032	7.643	CG2006	Spase12	
1633359_a_at	16	0.025	5.677	TRAF-LIKE		
1633405_s_at	16	0.033	7.988	CG4288	CG7341	
1633419_s_at	16	0.043	11.245	CG32195		
1633432_at	16	0.023	5.152	CG9657		
1633540_at	16	0.028	6.628	CG8147		
1633631_at	16	0.027	6.258	CG5380	CG9682	
1633837_at	16	0.029	6.982	OBP50C		
1633943_at	16	0.026	6.054	CG43062		
1634282_s_at	16	0.025	5.641	TOP3BETA		
1634351_at	16	0.027	6.304	CG7860		
1634398_a_at	16	0.023	5.262	DL		
1634399_at	16	0.049	13.153	CG18367		
1634406_at	16	0.025	5.884	CG32982	CG15071	
1634482_at	16	0.026	5.965	CG8918		
1634503_at	16	0.041	10.521	CG15695		
1634607_at	16	0.031	7.332	CG14160	CG42598	
1634671_a_at	16	0.029	6.959	CecC	CG42598	CG33061
1634856_at	16	0.036	8.837	HDC		
1634953_at	16	0.026	5.905	CG3795		
1634957_at	16	0.022	5.072	DH44		
1634958_at	16	0.032	7.848	CG9010	SPN42DC	
1635046_at	16	0.038	9.52	CG18869		

ANEXO DE RESULTADOS

1635161_at	16	0.031	7.489	<i>L(2)34FC</i>	<i>CG8949</i>	
1635298_at	16	0.042	10.669	<i>CG13458</i>		
1635360_at	16	0.027	6.365	<i>CG10830</i>		
1635384_at	16	0.025	5.861	<i>ZIP1</i>		
1635396_at	16	0.027	6.204	<i>CG30203</i>		
1635400_at	16	0.033	8.051	<i>DTR</i>		
1635498_at	16	0.027	6.203	<i>CG9259</i>	<i>CG11893</i>	
1635592_at	16	0.03	7.015	<i>VAV</i>		
1635683_at	16	0.026	6.067	<i>CG6136</i>		
1635773_at	16	0.023	5.271	<i>CG10144</i>		
1635789_at	16	0.032	7.732	<i>CG42533</i>	<i>CG11413</i>	
1635793_at	16	0.045	11.674	<i>CG4622</i>	<i>CG11413</i>	<i>ZETATRY</i>
1635815_at	16	0.023	5.142	<i>CG12387</i>		
1636088_at	16	0.034	8.146	<i>DLL</i>		
1636323_at	16	0.026	6.011	<i>COVHIC</i>		
1636453_at	16	0.027	6.225	<i>CG4988</i>		
1636470_at	16	0.025	5.748	<i>CG32700</i>	<i>CG34026</i>	
1636471_at	16	0.028	6.591			
1636528_at	16	0.023	5.236	<i>GP93</i>		
1636679_at	16	0.038	9.533	<i>MRTF</i>		
1636702_at	16	0.029	6.968	<i>CG15343</i>		
1636888_a_at	16	0.031	7.482	<i>APH-4</i>		
1636925_at	16	0.023	5.337	<i>CG31477</i>		
1637050_at	16	0.029	6.744	<i>CG33054</i>		
1637195_at	16	0.028	6.493	<i>CG31321</i>		
1637299_s_at	16	0.024	5.407	<i>CG6928</i>		
1637313_at	16	0.023	5.311	<i>CG32595</i>		
1637335_at	16	0.027	6.347	<i>FLN</i>		
1637516_at	16	0.025	5.775	<i>CG15449</i>		
1637669_at	16	0.023	5.215	<i>CG7442</i>	<i>MUB</i>	
1637701_at	16	0.043	10.993	<i>Cpr49Ab</i>		
1637797_at	16	0.025	5.729	<i>CG14400</i>	<i>twit</i>	
1637880_at	16	0.026	6.164	<i>CG13606</i>		
1637901_at	16	0.024	5.444	<i>CG14151</i>		
1637941_at	16	0.023	5.197	<i>RPS10A</i>		
1638048_at	16	0.027	6.362	<i>HDACX</i>		
1638122_a_at	16	0.029	6.863	<i>CG10874</i>		

ANEXO DE RESULTADOS

1638472_at	16	0.028	6.456	<i>CPR62BB</i>	
1638619_s_at	16	0.024	5.448	<i>CG17698</i>	
1638736_at	16	0.035	8.707	<i>CG11458</i>	
1638912_s_at	16	0.028	6.44	<i>HRB98DE</i>	
1638963_s_at	16	0.028	6.592	<i>MRJ</i>	
1638998_at	16	0.023	5.225	<i>CUL-5</i>	
1639173_at	16	0.043	11.102		
1639228_at	16	0.027	6.331	<i>ACTR13E</i>	
1639278_at	16	0.028	6.692	<i>ETH</i>	<i>HIPK</i>
1639306_s_at	16	0.028	6.479	<i>Pka-C3</i>	<i>hipk</i>
1639418_at	16	0.022	5.076	<i>ACP65AA</i>	
1639484_at	16	0.029	6.809	<i>CG1635</i>	
1639513_at	16	0.026	6.123	<i>CG5214</i>	
1639515_at	16	0.036	8.965	<i>CG7367</i>	
1639564_a_at	16	0.026	5.898	<i>CG7768</i>	
1639732_s_at	16	0.026	6.118	<i>SALR</i>	
1639855_at	16	0.026	6.004	<i>KP78B</i>	
1639939_at	16	0.035	8.632		
1640025_at	16	0.036	8.852	<i>OSM-6</i>	<i>CG33096</i>
1640231_a_at	16	0.023	5.319	<i>CG8908</i>	
1640449_s_at	16	0.023	5.131	<i>PICO</i>	
1640549_at	16	0.029	6.979	<i>TAL</i>	
1640799_at	16	0.033	8.049	<i>DSX</i>	
1641033_a_at	16	0.027	6.21	<i>UNK</i>	
1641077_at	16	0.024	5.509	<i>CG30158</i>	
1641109_at	16	0.024	5.564	<i>OBST-B</i>	
1641199_a_at	16	0.025	5.792	<i>CG1544</i>	
1641204_at	16	0.043	11.257	<i>CG14864</i>	
1641241_at	16	0.024	5.373	<i>CG17698</i>	
1641245_a_at	16	0.029	6.817		
1641310_at	16	0.023	5.172	<i>KO</i>	
1641332_at	16	0.033	7.932	<i>CG7324</i>	<i>CG1571</i>
1641678_at	16	0.045	11.978	<i>LUTE</i>	
1641688_at	16	0.028	6.699	<i>CG18136</i>	
1630314_at	17	0.026	6.015	<i>CG31141</i>	
1631130_at	17	0.031	7.524	<i>CG5745</i>	
1637848_at	17	0.025	5.799	<i>CG6873</i>	
1638323_at	17	0.032	7.672	<i>CG8116</i>	

ANEXO DE RESULTADOS

UN

ID	MÓD	CM	F	SÍMBOLO		
1632164_at	1	0.064	6.647	<i>scrib</i>		
1637498_at	1	0.068	7.169	<i>CG41106</i>		
1636223_at	1	0.066	6.960	<i>Hex-t1</i>		
1628854_at	1	0.057	5.874	<i>CR32252</i>	<i>CG43367</i>	
1624466_a_at	1	0.055	5.568	<i>CG15117</i>		
1630566_at	1	0.050	5.060	<i>CG15446</i>	<i>CG11566</i>	<i>stg1</i>
1629758_at	2	0.082	8.926	<i>Aats-pro</i>	<i>CG1246</i>	
1636251_at	2	0.080	8.645	<i>Tsp</i>		
1638718_at	2	0.073	7.794			
1624409_a_at	2	0.073	7.724	<i>Npc2h</i>		
1634684_at	2	0.070	7.427	<i>CG7857</i>	<i>CG7272</i>	
1628083_at	2	0.069	7.230	<i>CG5036</i>		
1630095_a_at	2	0.066	6.911	<i>Drl-2</i>		
1627548_at	2	0.066	6.880	<i>CG12541</i>		
1623597_s_at	2	0.063	6.532	<i>CG17684</i>		
1639017_at	2	0.062	6.414	<i>CG43110</i>		
1624411_at	2	0.061	6.308	<i>CG18437</i>		
1641230_at	2	0.056	5.691	<i>Ast-CC</i>		
1626524_at	2	0.056	5.654	<i>Phae1</i>		
1633167_s_at	2	0.055	5.551	<i>CG6788</i>	<i>CR32496</i>	
1623315_at	2	0.054	5.424	<i>cmpy</i>		
1628475_at	2	0.052	5.285	<i>CG8678</i>		
1629127_at	2	0.052	5.185	<i>CG6996</i>		
1624580_at	2	0.051	5.096	<i>CG9362</i>		
1632600_at	3	0.088	9.777	<i>CG34232</i>		
1637306_at	3	0.061	6.276	<i>CG31720</i>		
1637293_at	3	0.053	5.396	<i>CG17707</i>		
1638322_at	3	0.051	5.113	<i>CG10168</i>		
1623532_at	3	0.051	5.083	<i>CG34236</i>		
1627869_at	4	0.060	6.163		<i>Jon25Bi</i>	
1638114_at	4	0.056	5.741	<i>CG13022</i>		
1629716_a_at	4	0.056	5.657	<i>CG13284</i>		
1640035_at	4	0.056	5.644	<i>Fbp2</i>		
1625986_at	4	0.051	5.143	<i>CG31826</i>		

ANEXO DE RESULTADOS

1634493_at	5	0.123	15.303	<i>LysS</i>	<i>mwh</i>	
1638413_at	5	0.122	15.105	<i>fry</i>	<i>CG18180</i>	
1634878_at	5	0.089	9.920			
1635336_at	5	0.086	9.581	<i>comm2</i>		
1631814_a_at	5	0.082	8.972	<i>CG10738</i>		
1625388_at	5	0.078	8.473	<i>CG4893</i>		
1635188_at	5	0.075	8.073	<i>CG6675</i>		
1634276_a_at	5	0.075	8.023	<i>Adar</i>	<i>CG42666</i>	
1628197_at	5	0.074	7.861	<i>CG13177</i>		
1640107_at	5	0.072	7.622	<i>obst-A</i>		
1622960_at	5	0.071	7.521	<i>decay</i>		
1625354_at	5	0.069	7.259	<i>alpha-Est3</i>		
1623066_at	5	0.065	6.798	<i>Grip71</i>	<i>Irk3</i>	
1624836_at	5	0.065	6.753	<i>CG13795</i>		
1628503_at	5	0.064	6.702	<i>CG30424</i>		
1632700_a_at	5	0.064	6.651	<i>CG18324</i>		
1641496_a_at	5	0.064	6.596	<i>grass</i>		
1630915_at	5	0.063	6.511			
1623244_at	5	0.062	6.389			
1636383_at	5	0.061	6.322	<i>CG13856</i>		
1637928_at	5	0.061	6.281	<i>Oatp58Db</i>		
1628541_at	5	0.061	6.233	<i>CG17838</i>	<i>Tak1l</i>	
1635688_at	5	0.058	5.994	<i>sbr</i>	<i>CG15210</i>	
1634201_at	5	0.058	5.961	<i>CG7023</i>	<i>CG7029</i>	<i>CG13841</i>
1626577_at	5	0.058	5.898	<i>CG15556</i>		
1630233_at	5	0.057	5.867	<i>CG5399</i>		
1630667_at	5	0.057	5.810	<i>CG34043</i>		
1623961_at	5	0.056	5.735	<i>CG4991</i>	<i>Arpc3B</i>	
1635583_s_at	5	0.056	5.731	<i>fz2</i>		
1624929_at	5	0.056	5.641	<i>pelo</i>	<i>CG31710</i>	
1637900_at	5	0.055	5.543	<i>CG11852</i>		
1630051_at	5	0.054	5.511	<i>Tsp42Ec</i>		
1637042_a_at	5	0.054	5.473	<i>CG11961</i>		
1631691_at	5	0.053	5.403	<i>CG16772</i>		
1637795_at	5	0.053	5.350	<i>CG7778</i>		
1633882_at	5	0.053	5.316		<i>Rgk1</i>	
1637109_s_at	5	0.052	5.284	<i>CG3961</i>		

ANEXO DE RESULTADOS

1632720_at	5	0.051	5.077	<i>LysX</i>		
1629784_a_at	5	0.050	5.051	<i>Myo28B1</i>		
1631450_at	5	0.050	5.021	<i>CG14860</i>		
1628594_at	6	0.099	11.411	<i>rut</i>		
1635573_at	6	0.097	11.093	<i>CG42663</i>		
1629967_s_at	6	0.081	8.837	<i>park</i>		
1631869_at	6	0.074	7.924	<i>CG14053</i>		
1641343_at	6	0.072	7.696	<i>Crz</i>		
1641241_at	6	0.071	7.478		<i>CG17698</i>	
1624775_at	6	0.069	7.298	<i>CG10628</i>		
1640892_a_at	6	0.068	7.171	<i>Doa</i>		
1636040_at	6	0.068	7.092		<i>CG10527</i>	
1638079_at	6	0.063	6.560	<i>qsm</i>		
1625877_s_at	6	0.063	6.546		<i>CG41056</i>	<i>l(2)41Ab</i>
1637602_at	6	0.063	6.531	<i>Edem1</i>	<i>CR43864</i>	
1625617_at	6	0.063	6.488	<i>Roc2</i>		
1633749_at	6	0.062	6.438	<i>CG6337</i>		
1625840_at	6	0.061	6.316	<i>CG12001</i>		
1641222_at	6	0.060	6.215	<i>CG15142</i>		
1628171_at	6	0.060	6.201	<i>CG34205</i>		
1629385_s_at	6	0.060	6.156	<i>Cralbp</i>	<i>Pmi</i>	<i>PGRP-LD</i>
1629442_at	6	0.060	6.155	<i>egr</i>		
1640073_at	6	0.060	6.147	<i>CG6709</i>	<i>CG14164</i>	
1637687_at	6	0.060	6.146	<i>ct</i>		
1631382_at	6	0.060	6.142	<i>CG13085</i>		
1629259_at	6	0.059	6.098	<i>CG4042</i>	<i>CG4186</i>	
1625457_at	6	0.059	6.087	<i>CG10031</i>		
1626481_a_at	6	0.059	6.050	<i>Taz</i>		
1639164_at	6	0.059	6.013	<i>CG9486</i>	<i>Ddr</i>	
1641508_s_at	6	0.057	5.810	<i>Tsp42Eh</i>		
1635204_at	6	0.056	5.709	<i>sei</i>	<i>CG13568</i>	
1635410_at	6	0.056	5.661	<i>CG12766</i>		
1622976_at	6	0.056	5.661	<i>mod(mdg4)</i>		
1640665_at	6	0.055	5.555	<i>Sug</i>	<i>pallidin</i>	
1632359_at	6	0.054	5.485	<i>Takl2</i>		
1630844_at	6	0.054	5.482	<i>CG15293</i>		
1637097_at	6	0.054	5.472	<i>CG7497</i>		

ANEXO DE RESULTADOS

1623416_at	6	0.054	5.416	<i>Muc68E</i>	
1634033_s_at	6	0.053	5.306	<i>Glut1</i>	
1631631_at	6	0.052	5.242	<i>Cpr47Ee</i>	
1628496_at	6	0.051	5.178	<i>dpr16</i>	
1634789_at	6	0.051	5.167	<i>CG30151</i>	
1638227_at	6	0.050	5.048	<i>uif</i>	
1637253_s_at	7	0.084	9.297		
1635636_at	7	0.072	7.644	<i>to</i>	
1622893_at	7	0.063	6.510	<i>IM3</i>	
1640562_at	7	0.056	5.738	<i>dare</i>	<i>CG30033</i>