



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Evolución de las señales acústicas en especies de *Drosophila* cactófilas

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

Patricia Paola Iglesias

Director de tesis: Dr. Esteban Hasson

Consejero de estudios: Dr. Juan J. Fanara

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

IEGEB-CONICET. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de
Buenos Aires.

Ciudad de Buenos Aires, 2016

Fecha de Defensa: 11 de abril de 2017

Evolución de las señales acústicas en especies de *Drosophila* cactófilas

Las alas de las moscas del género *Drosophila* son estructuras adaptadas para el vuelo que se encuentran implicadas en una segunda función: generar señales acústicas a través de vibraciones. Estas señales (=cantos) son innatas y cumplen un rol en las exhibiciones desplegadas por los machos durante el cortejo. Un reciente análisis comparativo reveló que existe gran variación entre las señales acústicas de las especies cactófilas que forman parte del cluster *D. buzzatii* y que su evolución no tiene correlato filogenético. En este contexto se enmarca el objetivo general de esta tesis, que es comprender los factores que dieron forma a este complejo patrón de cantos.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que los cantos de cortejo cumplen un rol importante en el apareamiento conespecífico en las cuatro especies estudiadas del cluster *D. buzzatii*, ya sea incitando a la hembra a aparearse o influyendo en la rapidez con la cual las hembras se vuelven receptivas. Además, las hembras de las diferentes especies difieren en cuanto al rol que el canto conespecífico y el heterospecífico tienen en el aislamiento reproductivo.

Nuestros resultados también revelaron que las especies hermanas *D. buzzatii* y *D. koepferae* difieren en el efecto que ejercen diferentes sustratos de cría sobre sus cantos. Encontramos que la variación en los cantos tiene base genética en ambas especies, pero solo en *D. koepferae* algunos parámetros del canto se vieron afectados por el sustrato de cría. Además, los cantos de los machos de *D. koepferae* se vuelven menos conspicuos (su volumen disminuye) cuando se han desarrollado en medio de cría preparado con su cactus hospedador primario respecto de machos que se criaron en su hospedador secundario.

Asimismo, demostramos diferenciación a nivel de parámetros de las señales acústicas entre poblaciones de *D. buzzatii* en ausencia de diferenciación genética (usando microsátélites y ADN mitocondrial). El análisis de la estructura poblacional sugiere, además, que estas poblaciones han sufrido una expansión de rango reciente. Encontramos que cinco de los ocho parámetros del canto analizados varían entre las poblaciones. Dos de estos parámetros no se desviaron de la variación esperada bajo un modelo de equilibrio mutación-deriva genética, sin embargo, los restantes tres parámetros mostraron un patrón consistente con un proceso de selección direccional.

Por último, encontramos que en *D. buzzatii* las variaciones morfométricas del ala también tendrían el potencial de influir en la evolución de los cantos de cortejo.

Palabras clave: Cantos – Cortejo – *Drosophila* – Cactus hospedador – Selección sexual – Estructuración poblacional – Morfología alar

Evolution of acoustic signals in cactophilic *Drosophila* species

Wings of fruit flies of the genus *Drosophila* are structures adapted for flight that are also involved in a second function: the production of acoustic signals through vibrations. These signals (=songs) are innate and play a role during courtship displays. A recent comparative analysis revealed great variation among courtship songs of cactophilic species of the *D. buzzatii* cluster and demonstrated that song evolution was uncorrelated with phylogenetic relationships among species. In this context, the aim of this thesis is to understand the factors that shaped this complex pattern of courtship songs.

The results obtained in this study revealed that courtship songs have an important role in conspecific mating in the four species of the *D. buzzatii* cluster assessed, either inciting females to mate or influencing how quickly females become receptive to a male. In addition, females of the different species differ in the role that conspecific and heterospecific songs have in reproductive isolation.

Our results also revealed that the sister species *D. buzzatii* and *D. koepferae* differ in relation to the effect that different rearing substrates have on courtship songs. We found that song variation has a genetic basis in both species, but only in *D. koepferae* some song characters were affected by the rearing substrate. Furthermore, songs of *D. koepferae* males became less conspicuous (its volume decreases) when they have been reared in a substrate prepared with the primary cactus host relative to males that have been reared in the secondary cactus host.

Also, we demonstrated song characters differentiation among populations of *D. buzzatii* in the absence of genetic differentiation (using microsatellites and mitochondrial DNA). Moreover, the analysis of population structure suggested that *D. buzzatii* populations experienced a recent range expansion. Five out of eight song characters assessed varied among populations. Two of these characters did not deviate from expectations under a mutation-drift equilibrium model. However, the remaining three characters showed a pattern consistent with a process of directional selection.

Finally, we found that wing morphometric changes also have the potential to influence the evolution of courtship songs in the species *D. buzzatii*.

Keywords: Songs – Courtship – *Drosophila* – Cactus host – Sexual Selection – Population structure – Wing morphology

Agradecimientos

Me siento afortunada porque a lo largo de este proyecto fui conociendo numerosas personas dispuestas a tender una mano, cuya ayuda me permitió sortear cada obstáculo, y, de este modo, fueron determinantes para la culminación de esta Tesis.

A mi director, Esteban Hasson, por la confianza depositada para abordar esta temática en el laboratorio de Evolución. Por su criterio, consejos y valiosas enseñanzas que fueron sumamente enriquecedoras.

A Juan J. Fanara por ser mi consejero de estudios y por haber estado presente siempre que necesité su opinión y consejo.

A Ana Amador y Gabriel Mindlin (del Departamento de Física, FCEN-UBA) porque gracias a sus consejos y ayuda conseguimos grabar el canto de las moscas.

A Betina Colines y Eduardo Soto por su valiosa ayuda en la parte experimental del Capítulo II.

A Mariel Guala (del USDA-ARS-SABCL Laboratorio Sudamericano de Control Biológico), Diego De Panis, Eduardo y Nacho Soto, Esteban Hasson, Juan Hurtado y Julián Padro que colaboraron desinteresadamente en el trabajo de campo.

A los hermanos Soto y a Luciano Calderón por sus conocimientos y ayuda en el análisis de datos.

A Pilar Fernández (del Laboratorio de Eco-Epidemiología, EGE-IEGEB-UBA), Juan Hurtado y Nicolás Frankel por su ayuda con la compra e importación de los materiales del Capítulo III.

A todos mis compañeros del laboratorio de Evolución: Ale P., Ale S., Batichica, Chileno, Chiquito, Diego, Gonza, Irina, Juan, Julián M., Julián P., los hermanos Soto, los Pitu (Betina y Nahue), Lucía, Marcos, María, Mariana, Momo, Stefa, Nico L. Nico M. x 2, Sato, Sole, Vale y Vicki.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por darme la oportunidad de cursar esta formación de postgrado y por ofrecerla de manera gratuita.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar mi beca Doctoral.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por los subsidios PICT 2795/2010 y PICT 1121/2013 y a la Universidad de Buenos Aires (UBA) por el subsidio UBACyT 20020130100058BA que hicieron posible la realización de esta tesis.

A las autoridades nacionales y provinciales que otorgaron los permisos necesarios para la recolección del material biológico.

A las familias Iglesias, Pereyra y Johansson por su cariño y constante apoyo.

A mi papá, a quien admiro, por su apoyo incondicional y ejemplo.

A Martín y Camila por ser la mayor inspiración en mi vida.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1	El cortejo en <i>Drosophila</i>	1
1.2	Comportamiento de la hembra durante el cortejo	3
1.3	Las señales de cortejo en especies crípticas	6
1.4	El grupo de especies <i>D. repleta</i>	7
1.5	Asociación con el sustrato de cría: drosófilas cactófilas	9
1.6	Los cantos de cortejo en el grupo <i>D. repleta</i>	12
1.7	El cluster <i>D. buzzatii</i> del grupo <i>D. repleta</i>	16
1.8	Los cantos de cortejo en el cluster <i>D. buzzatii</i>	20
1.9	Objetivos	25
1.10	Bibliografía	26

2 CAPÍTULO I: Importancia de la señal acústica durante el cortejo en especies del cluster *D. buzzatii*

2.1	Introducción	34
2.1.1	Objetivos e hipótesis	37
2.2	Materiales y métodos	38
2.2.1	<i>Stocks</i> de moscas	38
2.2.2	Condiciones experimentales	40
2.2.3	Variables medidas	42
2.2.4	Grabación de los cantos y <i>playback</i>	43
2.2.5	Análisis estadístico	44
2.3	Resultados	45
2.3.1	Experimento 1	45
2.3.1.1	Importancia del estímulo acústico en parejas conespecíficas	45
2.3.2	Experimento 2	48
2.3.2.1	Importancia del canto en el aislamiento precópula	48
2.3.2.2	Duración de las cópulas	51
2.4	Discusión	52
2.4.1	Importancia del estímulo acústico para las hembras del cluster <i>D. buzzatii</i>	52
2.4.2	Importancia del estímulo acústico en el complejo <i>D. buzzatii</i>	54
2.4.3	El canto de cortejo y su rol en el aislamiento precópula	55
2.4.4	Duración de las cópulas	58
2.6	Conclusiones	59

2.7	Bibliografía	61
3 CAPÍTULO II: Variación genética y ambiental de la señal acústica en <i>D. buzzatii</i> y <i>D. koepferae</i>		
3.1	Introducción	66
3.1.1	Objetivos e hipótesis	69
3.2	Materiales y métodos	71
3.2.1	<i>Stocks</i> de drosófilas	71
3.2.2	Medios de cría semi-naturales	71
3.2.3	Obtención de los individuos experimentales	71
3.2.4	Análisis de los cantos	72
3.2.5	Morfometría geométrica de las alas	74
3.2.6	Análisis Estadísticos	75
3.3	Resultados	77
3.3.1	Fuentes de variación de la morfología alar	77
3.3.1.1	Tamaño	77
3.3.1.2	Conformación	78
3.3.2	Fuentes de variación del canto de cortejo	80
3.3.2.1	Descripción de las variables del canto	80
3.3.2.2	Volumen	81
3.3.2.3	Estructura A	83
3.3.2.4	Estructura B	84
3.3.3	Covariación entre la estructura del canto y la conformación del ala	85
3.4	Discusión	86
3.4.1	Implicancias evolutivas en la divergencia de la importancia del canto	89
3.4.2	Implicancias de la morfología alar en las variaciones de los cantos	92
3.5	Bibliografía	95

4 CAPÍTULO III: Patrones de diferenciación geográfica y diversificación del canto en *D. buzzatii*

4.1	Introducción	102
4.1.1	Objetivos e hipótesis	104
4.2	Materiales y métodos	105
4.2.1	<i>Stocks</i> de drosófilas y análisis de los cantos	105
4.2.2	Diferenciación genética entre las poblaciones	108
4.2.2.1	Marcadores microsatélites	108
4.2.2.2	Marcador de ADN mitocondrial	110
4.2.3	Patrones de divergencia acústica y genética	111
4.3	Resultados	113
4.3.1	Divergencia poblacional en la señal acústica	113
4.3.2	Diferenciación genética entre las poblaciones	116

4.3.2.1	Resultados de los análisis de ADN mitocondrial	116
4.3.2.2	Resultados del estudio con marcadores nucleares	120
4.3.3	Comparación entre divergencia genética, acústica y distancia geográfica	121
4.3.4	Fuerzas diversificadoras del canto de cortejo	121
4.4	Discusión	124
4.5	Bibliografía	131
5 CONCLUSIONES GENERALES		139
6 MATERIAL SUPLEMENTARIO		140
6.1	Capítulo I	140
6.2	Capítulo III	144

Introducción general

1.1. El cortejo en *Drosophila*

El cortejo forma parte de los comportamientos reproductivos que ocurren antes de la cópula y entre sus funciones se encuentran la sincronización en tiempo y espacio del apareamiento, la supresión del comportamiento agresivo o de escape del individuo cortejado y la orientación correcta para la cópula (Tinbergen 1953). Sin embargo, su función en la discriminación entre individuos no compatibles (aislamiento reproductivo) e individuos compatibles (selección sexual), ha sido una de las que más ha llamado la atención de los biólogos evolutivos (Templeton 1992).

Sturtevant (1915) fue quien primero describió un cortejo de *Drosophila* y desde entonces ha habido un flujo constante de trabajos describiendo el comportamiento sexual de estas moscas (Spieth 1952; Manning 1960; Brown 1965; Ewing 1983; Cobb *et al.* 1986, 1989; Tomaru & Yamada 2011). Los rituales de cortejo son llevados a cabo por los machos y forman parte del comportamiento innato. Es decir, un macho adulto criado en completo aislamiento desde el estadio de huevo es capaz de realizar un cortejo con todos los componentes necesarios que aseguran su éxito reproductivo cuando se lo pone en contacto con una hembra virgen por primera vez (Greenspan & Ferveur 2000). El ritual de cortejo está formado por una serie de movimientos estereotipados que, a excepción de la orientación que ocurre primero, no siguen un patrón secuencial fijo. Los elementos que usualmente forman parte del cortejo de los machos son los siguientes (Spieth 1974; Bontonou & Wicker-Thomas 2014; Figura 1):

Orientación: el macho gira en dirección a otro individuo, con el cuerpo levemente levantado.

Seguimiento: El macho persigue a la hembra.

Vibración o extensión de las alas: El macho despliega una o ambas alas, según la especie, y las hace vibrar enérgicamente, produciendo sonido. Alternativamente, en algunas especies, las alas presentan un patrón de coloración característico y el macho las exhibe extendidas frente a la hembra en ausencia de vibración.

Rodeo (Circling): El macho se mueve en derredor de la hembra, hacia la derecha y hacia la izquierda. A veces incluso da vueltas completas alrededor de la hembra.

Dar golpecitos ligeros (Tapping): El macho levanta y extiende una pata, luego la baja contra la hembra. En algunas especies, la hembra también interviene.

Lamer la genitalia (Licking): El macho extiende la probóscide y lame la genitalia de la hembra.

Intento de cópula: El macho curva la punta del abdomen hacia adelante, se sujeta al abdomen de la hembra mediante sus patas delanteras y medias e intenta la cópula.

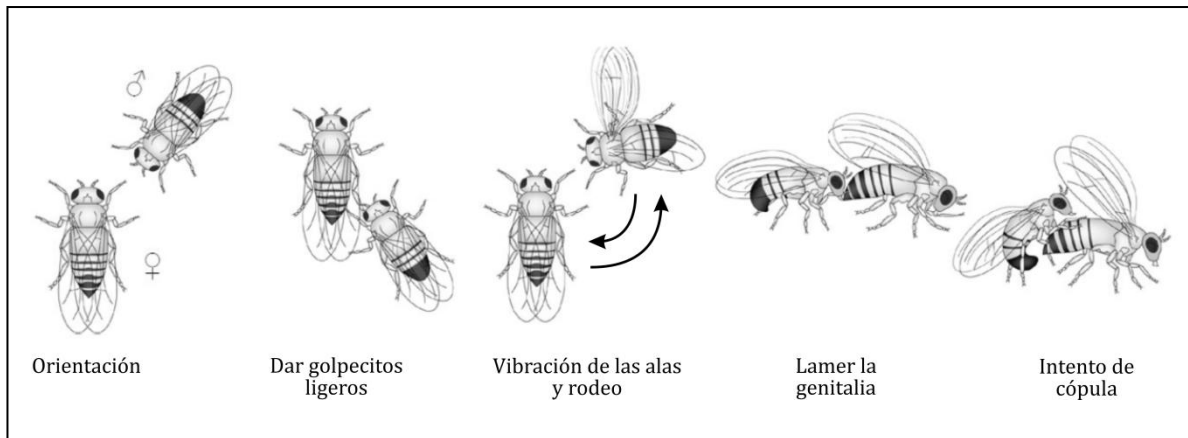


Figura 1. Algunos componentes del cortejo de *Drosophila*. Figura adaptada de Bontonou y Wicker-Thomas (2014).

Estos elementos del cortejo pueden repetirse, alternarse e incluso combinarse; por ejemplo, el macho puede dar vueltas alrededor de la hembra o perseguirla mientras vibra sus alas al mismo tiempo (Spieth 1974; Figura 1).

Cada componente del cortejo posibilita el intercambio de señales visuales, acústicas y químicas entre el macho y la hembra, lo cual posibilita una activa comunicación a través de múltiples modalidades sensoriales.

1.2. Comportamiento de la hembra durante el cortejo

El comportamiento de la hembra durante el cortejo suele dividirse en comportamiento de aceptación o de rechazo (Spieth 1974; Ewing 1983). La aceptación de los machos puede evidenciarse en las hembras de algunas especies por la disminución de su actividad locomotora, la extensión de las alas y/o la extensión de la genitalia. En cambio, para rechazar al macho cortejante las hembras generalmente huyen del macho, dan patadas, producen un rápido aleteo o elevan y bajan el abdomen frustrando el intento de cópula (Ewing 1983). No obstante, existe gran controversia con respecto al significado del comportamiento de las hembras debido a que en algunas especies el comportamiento de aceptación se produce en circunstancias que imposibilitan su percepción por el macho o debido a que el comportamiento de rechazo en muchas especies no consigue interrumpir el cortejo del macho aunque sí impide la cópula (Ewing 1983).

En general, tres tipos de estímulos sensoriales diferentes pueden disparar el comportamiento de aceptación o rechazo: visual, químico y acústico.

- *Estímulo Visual*

Para que una señal del cortejo tenga un componente visual debe ser emitida en presencia de luz y dentro del campo visual de la hembra (Markow & O'Grady 2005).

Sin embargo, varios de los componentes del cortejo implican que el macho se encuentre detrás o al costado de la hembra, posición en la cual puede recibir información visual pero no emitirla. Solo en un reducido grupo de drosófilas los machos realizan movimientos frente a las hembras. A su vez, estas especies generalmente presentan un conspicuo dimorfismo sexual en el patrón de coloración, de las alas o de otras estructuras morfológicas y no aparean en la oscuridad (Ringo 1976; Yeh *et al.* 2006; Revadi *et al.* 2015).

- *Estímulo Químico*

La comunicación química es mediada por compuestos hidrocarbonados de cutícula que funcionan como feromonas y son percibidos a corta distancia por los órganos olfativos de la cabeza (antenas y palpos maxilares) y/o por contacto

utilizando los tarsos y la probóscide (Stocker 1994; Bontonou & Wicker-Thomas 2014; Figura 2).

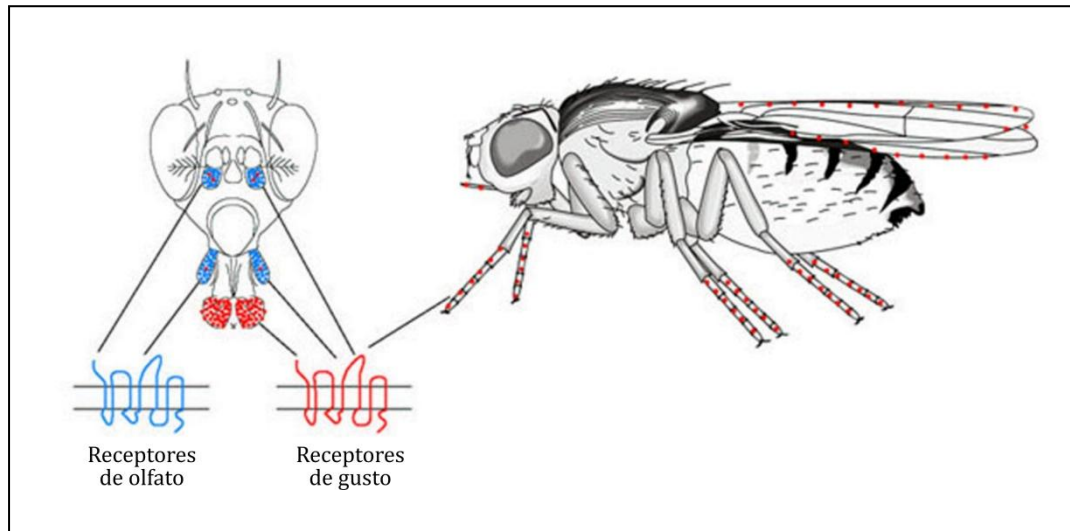


Figura 2. Ubicación de los receptores de olfato y gusto en un adulto de *Drosophila*. Figura adaptada de <http://biologicalexceptions.blogspot.com.ar/2014/03/taste-and-be-tasted-fair-is-fair.html>.

Es abundante la evidencia que apoya la participación de estos compuestos hidrocarbonados en la señalización sexual intraespecífica así como también en el reconocimiento de parejas compatibles (revisado en Ferveur 2005). Las especies de *Drosophila* difieren en cuanto a la existencia y al grado de dimorfismo sexual en los perfiles de hidrocarburos de cutícula, en la presencia de moléculas únicas y en la variación cuantitativa intraespecífica (Markow & O'Grady 2005; Bontonou & Wicker-Thomas 2014). En este sentido, las drosófilas hawaianas, por ejemplo, muestran perfiles de hidrocarburos de cutícula únicos y sexo-específicos, mientras que las drosófilas del grupo *D. repleta* presentan muy poca variación en los perfiles y dicha variación es solamente cuantitativa (Markow & O'Grady 2005).

- Estímulo Acústico

Los machos de *Drosophila* generan señales acústicas que se conocen como cantos de cortejo mediante la vibración de una o ambas alas (Shorey 1962; Bennet-Clark & Ewing 1968; Ewing & Bennet-Clark 1968). Estas señales acústicas son percibidas por las hembras gracias a una estructura en forma de pluma,

denominada arista, que se ubica sobre el último segmento de la antena (Göpfert & Robert 2001, 2002; Riabinina *et al.* 2011; Figura 3).

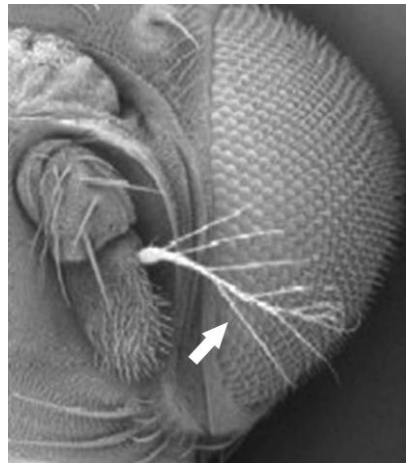


Figura 3. Fotografía electrónica de barrido de la mitad derecha de una cabeza de *Drosophila*. La flecha indica la arista (en blanco), ubicada sobre el último segmento de la antena. Figura modificada de www.cdb.riken.jp/jp/04_news/annual_reports/2006/WebHelp/common/lab1_02hfig2.htm

La diversidad de cantos dentro de *Drosophila* es notable, aunque existen especies en las cuales el macho no canta (*e.g.*, *D. subobscura*, *D. nebulosa*; Markow & O'Grady 2005). La mayoría de los cantos están compuestos por varios pulsos y/o notas no pulsadas (zumbidos) que tienen diferentes características estructurales y temporales, que los caracterizan a nivel de especie. Algunas especies (*e.g.*, las especies del complejo *D. auraria*, Tomaru & Oguma 1994) utilizan un único "tipo" de canto (=nota), mientras que otras especies (*e.g.*, algunas especies del complejo *D. willistoni*, Ritchie & Gleason, 1995) pueden emitir tres o cuatro tipos diferentes de notas. A su vez, las diferentes notas pueden variar temporalmente durante el cortejo, apareciendo unas al principio y otras hacia el final (Crossley 1986; Ewing & Miyan 1986; Ritchie & Gleason 1995; Yamada *et al.* 2002; Blyth *et al.* 2008).

Estas señales pueden cumplir un rol incitando a las hembras a aparearse o influyendo en la rapidez con la cual las hembras se vuelven receptivas (*e.g.*, Talyn & Dowse 2004; Bontonou & Wicker-Thomas 2014). Además, estos cantos se consideran un componente crucial en el aislamiento precópula de muchas especies de drosófilas (Nanda & Singh 2012). De esta manera, las hembras son capaces de discriminar a los machos sin alas, debido a su incapacidad de producir señales audibles (*e.g.*, Hoikkala & Aspi 1993; Talyn & Dowse 2004). Además, se ha

demostrado que es posible romper experimentalmente el aislamiento reproductivo entre especies mediante la reproducción del canto conespecífico usando *playbacks* (*e.g.*, Saarikettu *et al.* 2005).

1.3. Las señales de cortejo en especies crípticas

Las especies crípticas son especies superficialmente indistinguibles desde el punto de vista morfológico (Lincoln *et al.* 1998; Bickford *et al.* 2007) y son comunes independientemente del grupo taxonómico y la región biogeográfica considerada (Pfenninger & Schwenk 2007). Más allá de la estrecha similitud morfológica entre ellas, generalmente exhiben diferencias a nivel de las señales desplegadas durante el cortejo (Bickford *et al.* 2007). De hecho, muchas veces se utiliza la diferenciación en estas señales para distinguir especies morfológicamente similares en grupos tan diversos como anfibios (*e.g.*, Angulo & Reichle 2008), hemípteros (*e.g.*, Sueur & Puissant 2007), ortópteros (*e.g.*, David *et al.* 2003), aves paseriformes (*e.g.*, Chaves *et al.* 2010) y hasta primates (*e.g.*, Burton & Nietsch 2010).

En las especies sinmórficas, las señales del cortejo involucran generalmente modos de comunicación no visuales tales como el sonido (vibración) o la química (feromonas) (Jones 1997; Wells & Henry 1998). El canal visual no suele formar parte de la comunicación en especies crípticas, dado que un pre-requisito para la comunicación visual es una conspicua diferenciación morfológica y la ausencia de tal diferenciación es lo que define a estas especies como crípticas (Wells & Henry 1998).

En algunos casos, incluso la diferenciación genética es muy poca, sugiriendo que la evolución de las señales del cortejo ha sido el resultado de un proceso rápido o que la evolución morfológica ha sido muy conservativa (Wells & Henry 1998).

Estas características tornan particularmente interesante el estudio de la evolución de las señales desplegadas durante el cortejo en grupos de especies crípticas debido a que es esperable que presenten altos niveles de variación y que sean ricas en información para compensar la reducción en el número de modalidades involucradas en la comunicación intersexual (*i.e.*, ausencia de uso de la modalidad visual).

1.4. El grupo de especies *D. repleta*

El grupo de especies *Drosophila repleta* (Sturtevant 1942) es considerado una de las más importantes y exitosas radiaciones dentro del enorme género *Drosophila* (Durando *et al.* 2000) y se encuentra ampliamente distribuido en las regiones áridas y semiáridas de Norteamérica, el Caribe y Sudamérica (Oliveira *et al.* 2012). Incluye alrededor de 100 especies (Bächli 2016), sin embargo, su número exacto es difícil de precisar debido a la existencia de numerosas especies crípticas, algunas de las cuales resultan muy difíciles de delimitar (Oliveira *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2008).

Tradicionalmente, y basados en evidencias cromosómicas, genéticas y en la morfología de la genitalia de los machos, se ha clasificado a las especies de este grupo en seis subgrupos: *D. fasciola*, *D. hydei*, *D. inca*, *D. mercatorum*, *D. mulleri* y *D. repleta*. Además, algunas especies del grupo no han sido asignadas a ningún subgrupo debido a la combinación particular de caracteres que presentan (Patterson 1943; Wharton 1944; Vilela 1983; Rafael & Arcos 1988, 1989; Wasserman 1992).

El estudio de las relaciones filogenéticas ha sido abordado desde varias fuentes de evidencia. Inicialmente, las relaciones fueron establecidas mediante el análisis de los cromosomas politénicos que permiten inferir los reordenamientos cariotípicos resultantes de inversiones cromosómicas y se manifiestan como diferencias fijadas entre especies y como polimorfismos intraespecíficos (Wasserman 1982, 1992). Más recientemente comenzaron a utilizarse aproximaciones sistemáticas basadas en el análisis combinado de marcadores moleculares mitocondriales y nucleares e inversiones cromosómicas (Durando *et al.* 2000; O'Grady *et al.* 2001) o empleando únicamente marcadores mitocondriales y nucleares (Oliveira *et al.* 2012). La filogenia más reciente y completa es la de Oliveira *et al.* (2012) que incluye 58 especies del grupo *D. repleta* y nueve especies de grupos relacionados, los cuales fueron incluidos para poner a prueba la hipótesis de monofilia del grupo (Figura 4). Este trabajo incluye, además, el mayor número de caracteres parsimoniosamente informativos (1204 incluyendo genes mitocondriales y nucleares). Los autores encontraron que la monofilia del grupo *D. repleta* se encuentra bien soportada estadísticamente, lo cual es concordante con estudios previos basados en morfología, rearreglos

cromosómicos y datos moleculares para el grupo. Además se encontró que si bien la mayoría de los subgrupos de especies se recuperan como monofiléticos, el subgrupo *D. mulleri*, uno de los más diversos, resultó polifilético (Figura 4).

Entre los resultados más novedosos del trabajo de Oliveira *et al.* (2012), se encuentra el mapeo de los patrones de uso de plantas hospedadoras en el grupo *D. repleta*. Este análisis permitió entender la diversificación de las especies del grupo y la compleja historia de utilización de recursos nutricionales, especialmente de los cactus.

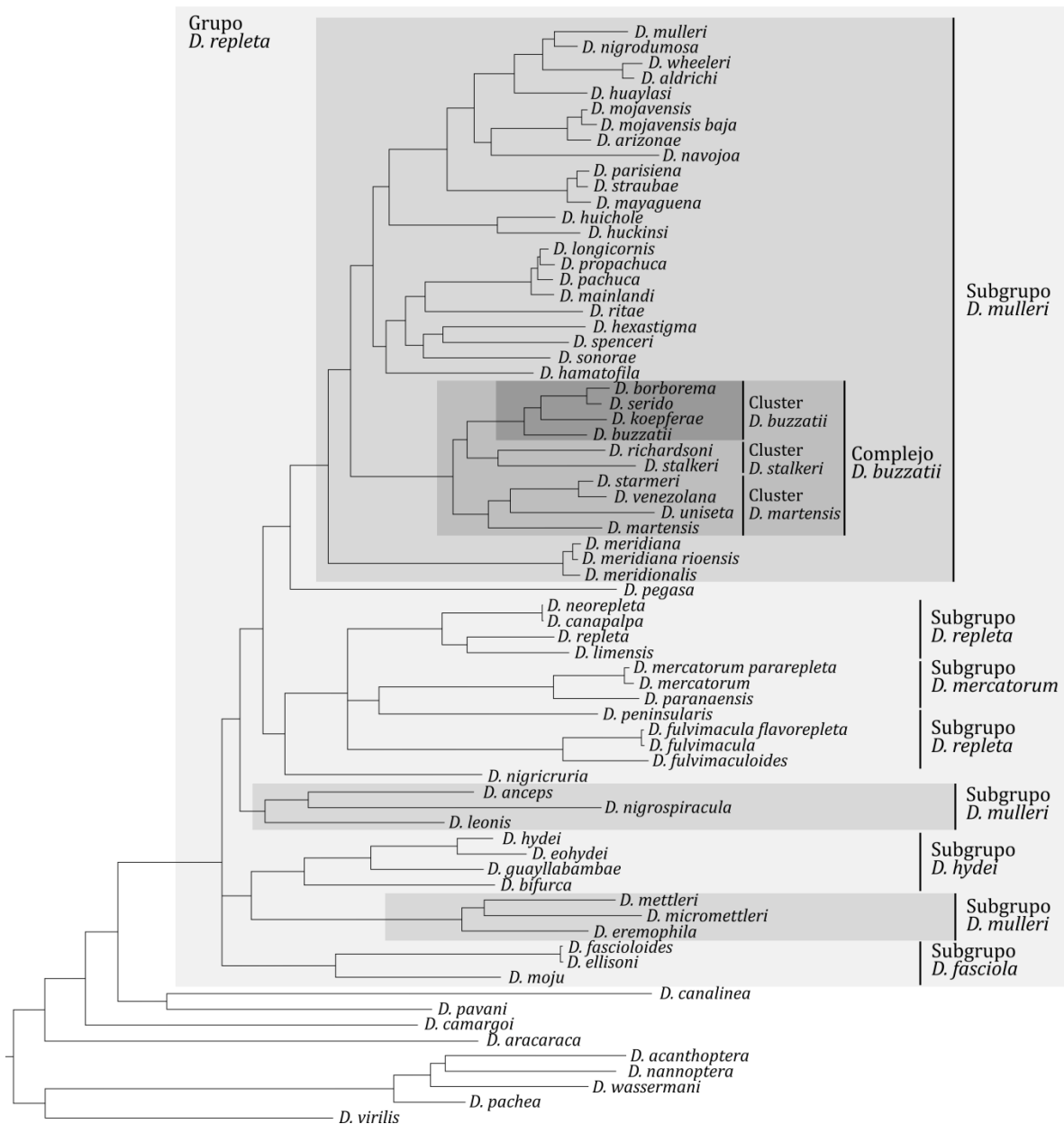


Figura 4. Hipótesis filogenética para el grupo de *D. repleta*. Figura modificada de Oliveira *et al.* (2012).

1.5. Asociación con el sustrato de cría: drosófilas cactófilas

Una de las particularidades más salientes de la mayoría de las especies que conforman el grupo *D. repleta* es que utilizan tejidos de cactáceas en descomposición como sitio de apareamiento, oviposición y desarrollo larval (Markow & O'Grady 2005; Oliveira *et al.* 2012; Figura 5). La evolución de este grupo parece haber estado estrechamente asociada con la transición del uso de frutas fermentadas de plantas no cactáceas en los bosques húmedos a los cladodios carnosos y húmedos de las tunas (género *Opuntia*) y otros cactus (Oliveira *et al.* 2012). Se ha sugerido que el grupo *D. repleta* se originó durante un período seco y de aislamiento de América del Sur, durante el Mioceno Medio, y que rápidamente radió conjuntamente con sus cactus hospedadores (Mauseth 1990; Nyffeler 2002). La diversificación de los principales linajes del grupo ocurrió hace 12-16 millones de años, lo cual se aproxima al tiempo estimado de aparición de las Opuntoideae, hace 15 millones de años (Nyffeler & Eggli 2010).

Un estudio reciente reveló que *Opuntia* sería el hospedador ancestral del grupo *D. repleta* y el uso de cactus columnares (*i.e.*, *Trichocereus*, *Stenocereus*, *Cereus*), una condición derivada que surgió independientemente en varios clados (Oliveira *et al.* 2012). Del total de especies incluidas en dicho estudio el 33% utilizan únicamente especies de *Opuntia* como hospedador, 18% utilizan solo cactus columnares y al menos 25 % utilizan ambos tipos de recursos. Las especies del complejo *D. eremophila* son las únicas que utilizan como sitio de apareamiento y oviposición exudados de cactus que se depositan en el suelo. Solo una minoría utiliza otros tipos de sustratos que no son cactáceas (Figura 5). A excepción del subgrupo *D. fasciola*, el uso de especies del género *Opuntia* resultó común en todas las especies (Figura 5). La evidencia filogenética sugiere que la pérdida del uso de *Opuntia* habría ocurrido independientemente solo seis veces en el grupo *D. repleta*. Muchas especies que utilizan como hospedadores especies de cactus columnares conservan el estado ancestral de uso de *Opuntia* en partes de su área de distribución o no se han especializado completamente en el uso de cactus columnares. En consecuencia, especies como *D. buzzatii* y *D. koepferae* utilizan con mayor frecuencia un tipo de cactus, que denominaremos hospedador primario, y en menor frecuencia otro, que llamaremos hospedador secundario, como sitio de

apareamiento y oviposición (Carson & Wasserman 1965; Hasson *et al.* 1992, 2009; Fanara *et al.* 1999).

Además, se ha propuesto que la transición al uso de cactus columnares habría sido gradual dada la compleja naturaleza química de los mismos (Oliveira *et al.* 2012). La mayoría de los cactus columnares estudiados hasta el presente se caracterizan por contar con concentraciones significativas de una variedad de aleloquímicos o compuestos secundarios que incluyen alcaloides, glucósidos triterpénicos, ácidos grasos atípicos y fitoesteroles mientras que las especies de *Opuntia* carecen, generalmente, de cantidades apreciables de estos compuestos (Kircher 1982; Fogleman & Abril 1990; Fogleman & Danielson 2001; Padró & Soto 2013; Carreira *et al.* 2014).

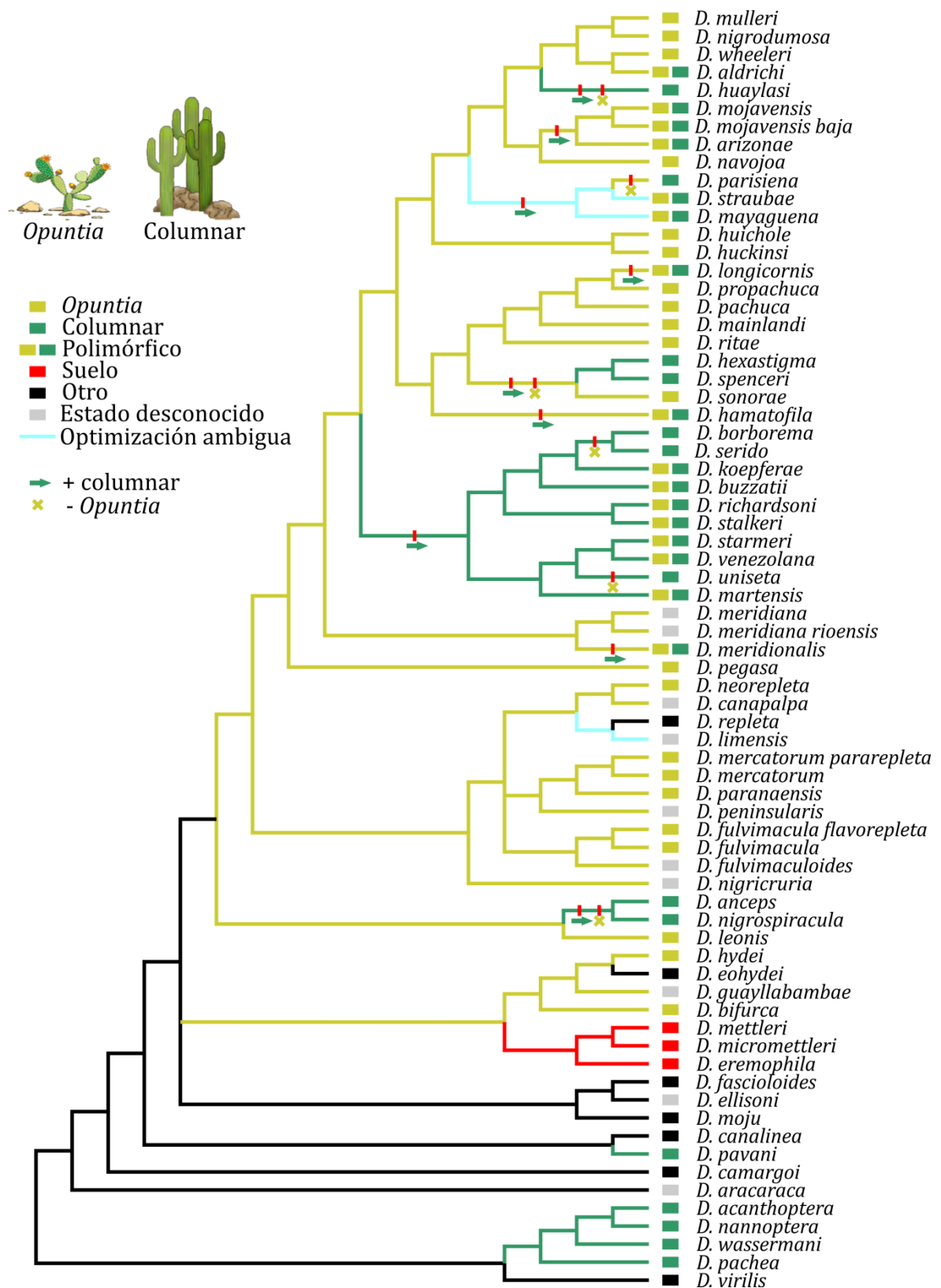


Figura 5. Mapeo del uso de hospedadores por las especies del grupo de *D. repleta*. Figura modificada de Oliveira *et al.* (2012).

1.6. Los cantos de cortejo en el grupo *D. repleta*

Ewing y Miyan (1986) analizaron los cantos de 22 especies del grupo *D. repleta* y encontraron que los patrones del canto de las diferentes especies, y en algunos casos dentro de las especies, eran muy variados (Figura 6). Esto dificulta establecer criterios para realizar comparaciones estadísticas válidas. Uno de los parámetros del canto más informativo es el intervalo interpulso (IPI¹) que ha demostrado brindar información sobre la compatibilidad de pareja en *Drosophila* (*i.e.*, es un parámetro especie-específico; Bennet-Clark & Ewing 1969). Los autores encontraron que los cantos dentro del grupo *D. repleta* diferían en la distribución del IPI, en algunas especies el canto tiene una distribución unimodal, en otras bimodal, pudiendo, incluso, llegar a ser trimodal.

Ewing y Miyan (1986) notaron, además, que todos los cantos del grupo consistían o bien de una única estructura o de dos estructuras claramente diferenciables. En aquellos cantos que presentaban dos estructuras fue posible clasificarlas según el orden temporal de aparición durante el cortejo. El tipo de estructura que aparece en una etapa temprana del cortejo se denominó “Canto A” y la estructura que aparece más tardíamente se llamó “Canto B”.

Al interpretar la variación del canto entre las 22 especies del grupo en una filogenia basada en inversiones cromosómicas (propuesta por Wasserman 1982), encontraron que en algunos casos especies estrechamente relacionadas tenían cantos similares, en otras especies estrechamente relacionadas se observaron cantos muy diferentes e incluso que especies poco relacionadas entre sí mostraban cantos similares.

Teniendo en cuenta el número de estructuras presentes en los cantos de otros grupos de especies, tales como los grupos *D. affinis*, *D. funebris*, *D. melanica* y *D. melanogaster*, se sugirió que la condición ancestral (plesiomórfica) sería la compuesta por dos tipos de estructuras dado que este es el patrón que se encuentra más extendido en el género *Drosophila*. Además, observaron que dentro del grupo *D. repleta* la condición más frecuente es que el canto A presente series

¹ En la literatura de *Drosophila* se ha utilizado como indistinto los términos intervalo interpulso (IPI) y período (PER). Sin embargo, PER equivale a la suma de un pulso y su espacio interpulso. Ewing y Millan (1986) y Oliveira *et al.* (2013) utilizan estos términos como sinónimos y asumen que las variaciones en PER son el producto de variaciones en el IPI.

cortas de pulsos con IPIs entre 8-15 ms (*e.g.*, cantos A de *D. navojoa* y *D. mercatorum* en la Figura 6), mientras que el canto B consiste mayormente en series más largas de pulsos y con IPIs más extensos (*e.g.*, canto B de *D. navojoa* en la Figura 6).

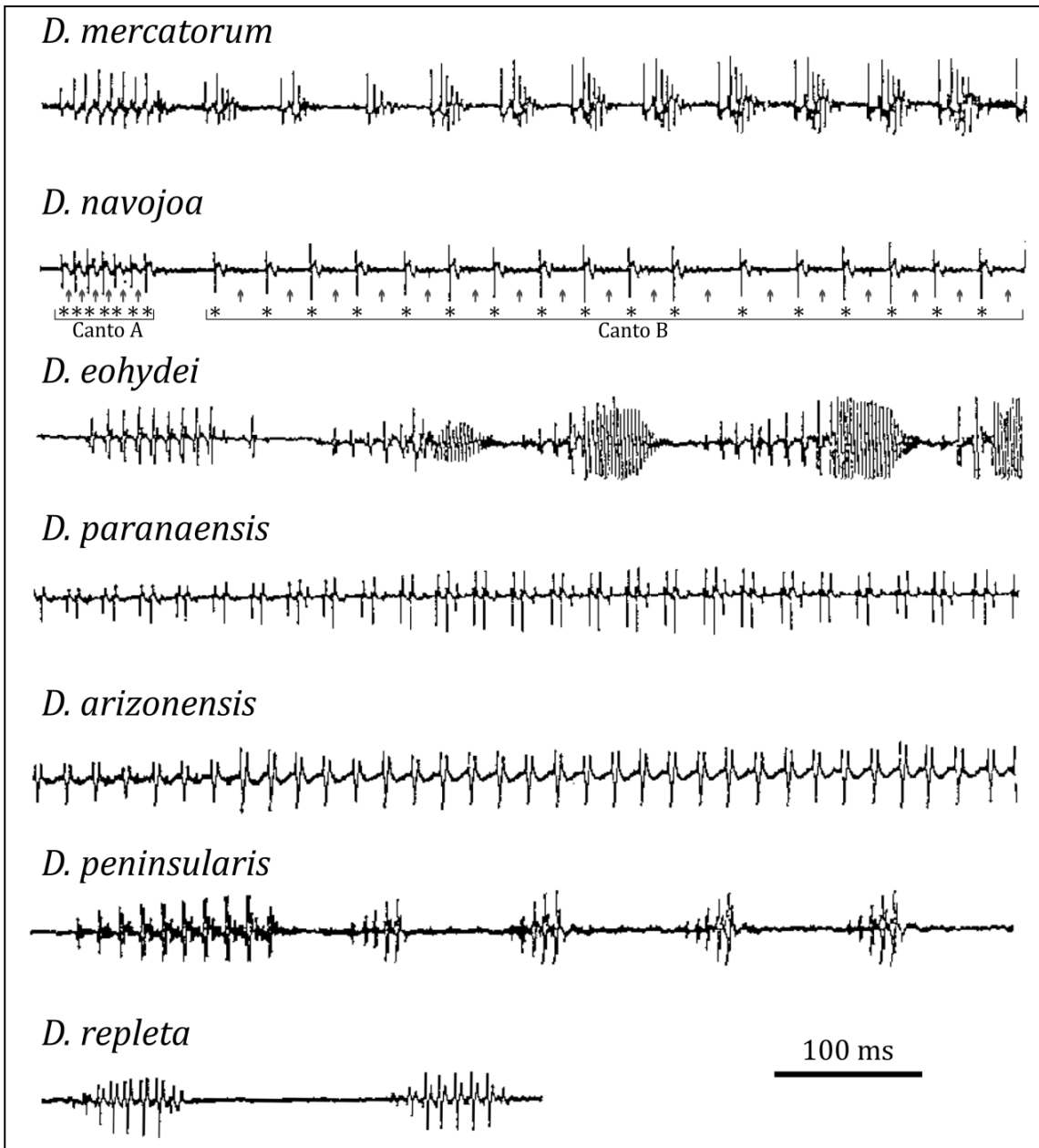


Figura 6. Oscilogramas de los cantos de cortejo de siete especies representativas de la variación encontrada en el grupo *D. repleta*. Figura modificada de Ewing y Miyan (1986). Los asteriscos indican los pulsos y las flechas los intervalos interpulsos (IPIs).

De esta manera, todos los tipos de cantos que pueden encontrarse en el grupo *D. repleta* se pueden derivar de este patrón ancestral sobre la base de relativamente pocos pasos evolutivos (Figura 7): pérdida del canto A, pérdida del canto B y elaboración del canto B (acompañada o no por la pérdida del canto A).

En las especies que han perdido el canto A, la única estructura presente en el canto está compuesta por pulsos cuyo IPI medio se encuentra entre 15 y 26 ms, típica de los cantos tipo B. Asimismo, en las especies que perdieron el canto B la única estructura emitida se encuentra caracterizada por IPIs cuyas medias son menores a 15 ms.

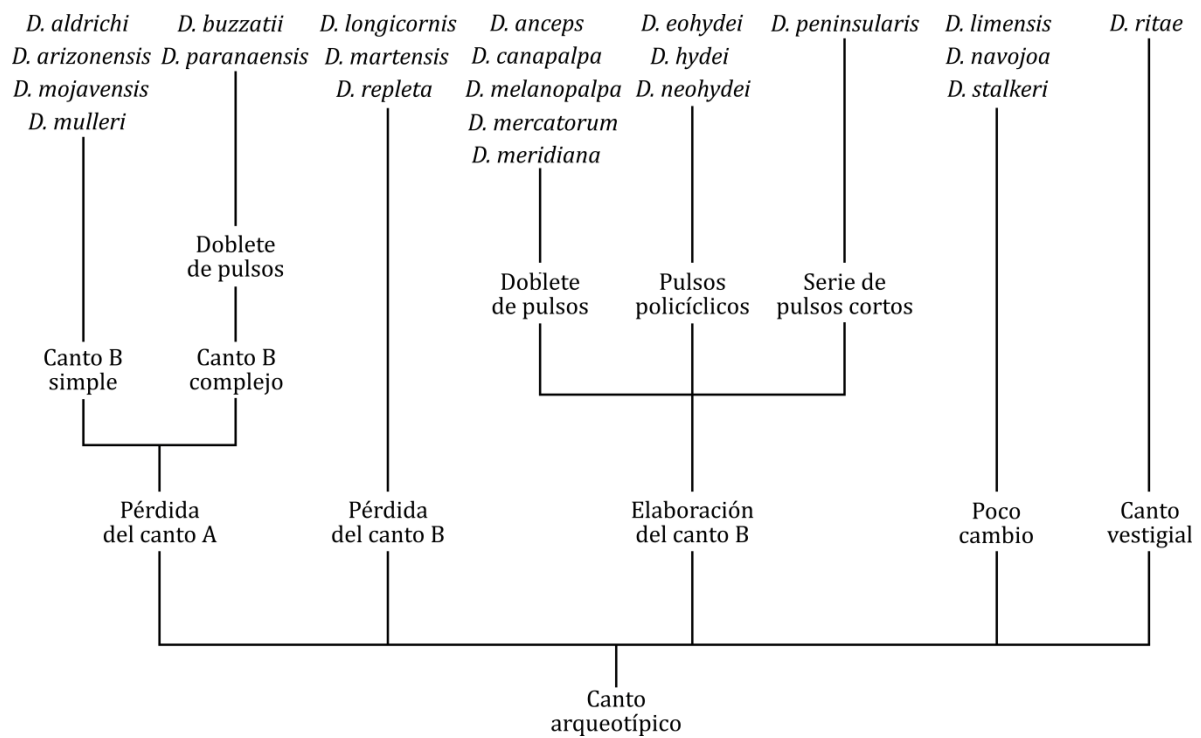


Figura 7. Principales pasos evolutivos inferidos en la evolución de los cantos de cortejo del grupo *D. repleta* propuestos por Ewing y Miyan(1986). Figura modificada de Ewing y Miyan (1986).

Además, al analizar estos pasos evolutivos a la luz de las relaciones filogenéticas se puso en evidencia que algunas especies podrían encontrarse en proceso de pérdida de alguno de sus componentes. *Drosophila arizonensis*, *D. mojavensis* y *D. navojoa* son especies estrechamente relacionadas según las inferencias evolutivas basadas en inversiones cromosómicas. En las dos primeras se ha perdido el canto A, mientras que en *D. navojoa* los dos tipos de cantos

estuvieron presentes solo en los cantos emitidos por el 50% de los machos y los restantes machos solo emitieron el canto B. Por lo tanto, Ewing y Miyan (1986) propusieron que esta condición intermedia entre el canto ancestral y la pérdida del canto A probablemente sea el reflejo de un proceso hacia la pérdida de esta estructura.

Por otra parte, la elaboración del canto B a partir del patrón ancestral de pulsos simples ha sido muy divergente. Es posible encontrar cantos B constituidos por series de pulsos monocíclicos simples, por pulsos policíclicos y por dobletes de pulsos (Figura 8).

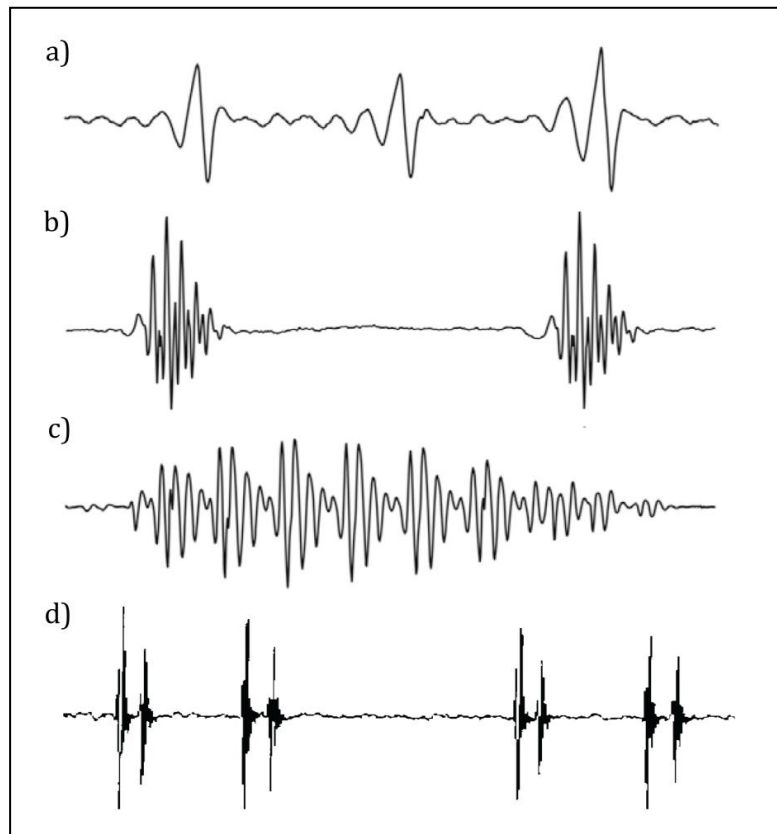


Figura 8. Diferentes patrones de series de pulsos presentes en los cantos B del grupo *D. repleta* según Ewing y Miyan(1986): a) pulsos monocíclicos simples, b-c) pulsos policíclicos con diferentes IPIs y d) doblete de pulsos. Figuras a-c adaptadas de Cande *et al.* (2014) y Figura d, de Costa *et al.* (2000).

En algunas especies se ha observado que el canto B se emite siempre de forma acoplada al canto A respetando su aparición en una etapa más tardía del cortejo (*e.g.*, canto de *D. eohydei* en Figura 6).

Además, Ewing y Miyan(1986) sugirieron que el IPI de los cantos A podría estar determinado por un oscilador neuronal especie-específico y que la elaboración de los cantos B sería el producto de la eliminación parcial o completa de los pulsos intermedios. Esta hipótesis se fundamenta en la tendencia encontrada en los dobletes de pulsos a alternar un pulso ruidoso con uno más silencioso, y que en algunas especies, como *D. buzzatii* y *D. paranaensis*, los dobletes de pulsos llegan a convertirse en pulsos simples por eliminación de los pulsos más silenciosos en alguna parte de sus cantos.

1.7. El cluster *D. buzzatii* del grupo *D. repleta*

El cluster *D. buzzatii* constituye un grupo monofilético que comprende siete especies cactófilas en diferentes estados de divergencia evolutiva (Manfrin & Sene 2006; Hasson *et al.* 2009), y junto a los cluster *D. stalker* y *D. martensis* forman el complejo *D. buzzatii* (Spicer 1995; Rodríguez-Trelles *et al.* 2000) dentro del polifilético subgrupo *D. mulleri* (Oliveira *et al.* 2012).

Las especies del cluster *D. buzzatii* se encuentran distribuidas principalmente en el sureste de Sur América y sus rangos de distribución se encuentran parcialmente solapados (Figura 9). *Drosophila buzzatii* es la única especie que se encuentra ampliamente extendida y co-ocurre con todas las demás especies del cluster en diferentes áreas de su vasto rango geográfico (Manfrin & Sene 2006; Hasson *et al.* 2009). Además, ésta es la única especie cactófila que se volvió semi-cosmopolita; puede encontrarse en África, Europa, Asia y Australia adonde llegó de forma pasiva siguiendo la expansión de diferentes especies de tuna (especialmente *Opuntia ficus-indica*) por acción antrópica (Manfrin & Sene 2006). *Drosophila koepferae* coexiste con *D. buzzatii* a lo largo de toda su distribución, al igual que *D. antonietae*, que también coexiste con *D. gouveai* solo en el extremo noreste de su distribución (Manfrin & Sene 2006). Las restantes especies del cluster (*D. borborema*, *D. gouveai*, *D. serido* y *D. seriema*) coexisten simpátricamente en algunas áreas del noreste de Brasil (ver Figura 9).

Las especies de este cluster son crípticas (sinmórficas), es decir, presentan una morfología externa muy similar a pesar de presentar un grado más o menos avanzado de aislamiento reproductivo (Machado *et al.* 2002). Tal es así que, en los 70s y 80s, las actuales especies *D. koepferae*, *D. seriema*, *D. gouveai* y *D. antonietae* eran consideradas como parte de lo que se denominaba superespecie *D. serido*. La morfología del aedeago (Silva & Sene 1991), las inversiones cromosómicas paracéntricas fijadas (Tosi & Sene 1989), el cariotipo metafásico (Baimal *et al.* 1983) y el grado de aislamiento reproductivo (Bizzo 1983) revelaron que *D. serido* se trataba de una especie politípica (ver revisión de Sene *et al.* 1982, 1988; Manfrin & Sene 2006; Figura 10). Estas cinco especies junto con *D. borborema* (que había sido descrita previamente), constituyen actualmente el denominado “*D. serido sibling set*” (Tidon-Sklorz & Sene 1995, 2001). Por lo tanto, se puede decir que el cluster *D. buzzatii* está conformado por *D. buzzatii* y las seis especies que componen el “*D. serido sibling set*” (Manfrin & Sene 2006). En la actualidad, es posible distinguirlas fácilmente utilizando el tamaño y la forma del órgano intromitente del macho (aedeago; Manfrin & Sene 2006; Figura 10). Sin embargo, la determinación de las hembras continúa siendo un desafío y solo se consigue analizando los machos de su descendencia.

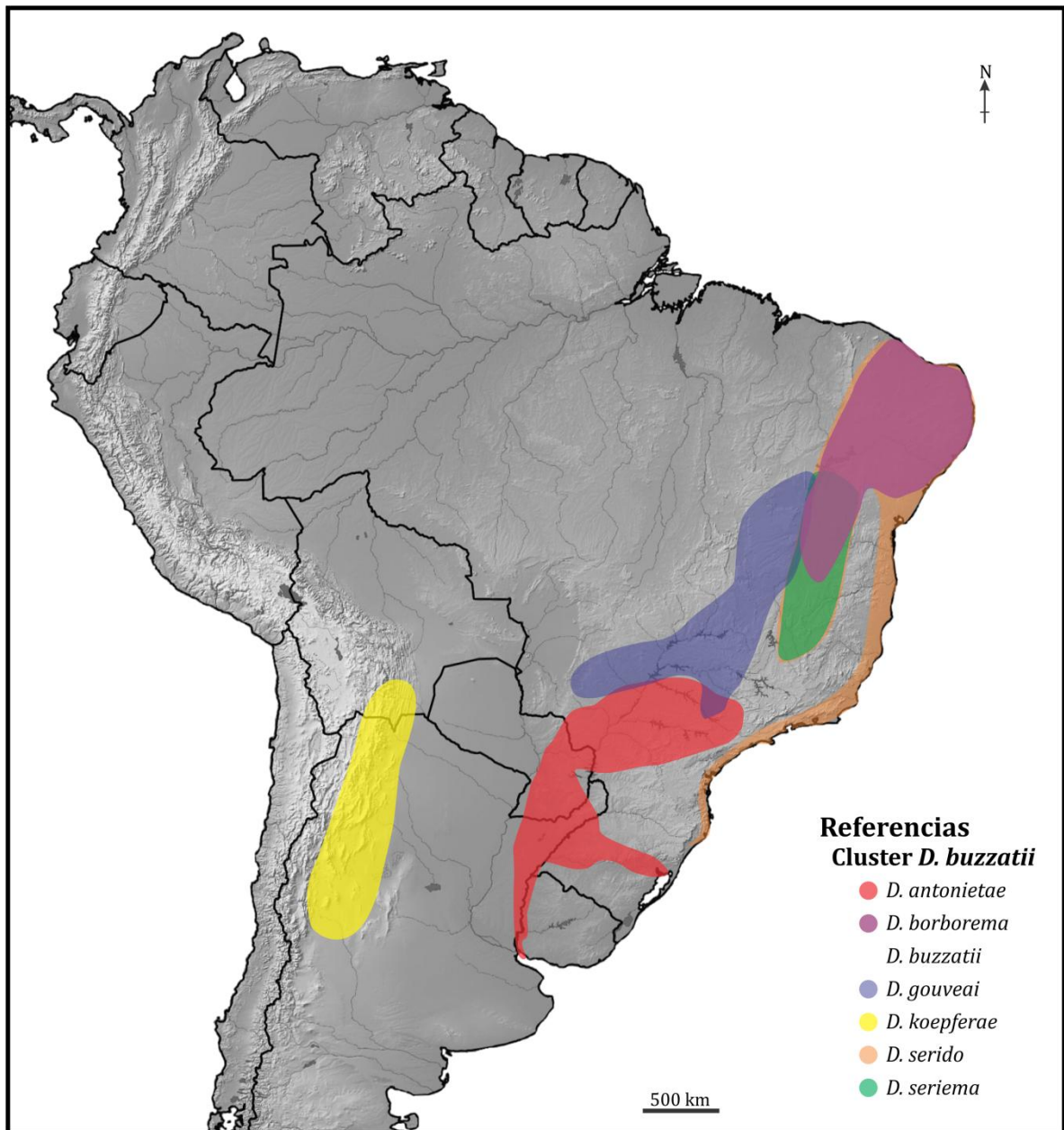


Figura 9. Distribución geográfica de las especies del cluster *D. buzzatii*. El área de distribución de *D. buzzatii* se superpone con la de todas las especies del cluster, por lo tanto, no se encuentra delimitada en el mapa. Fuente: Manfrin y Sene (2006), Oliveira *et al.* (2011), y J. Hurtado, P. P. Iglesias y E. Hasson (datos de campo no publicados).

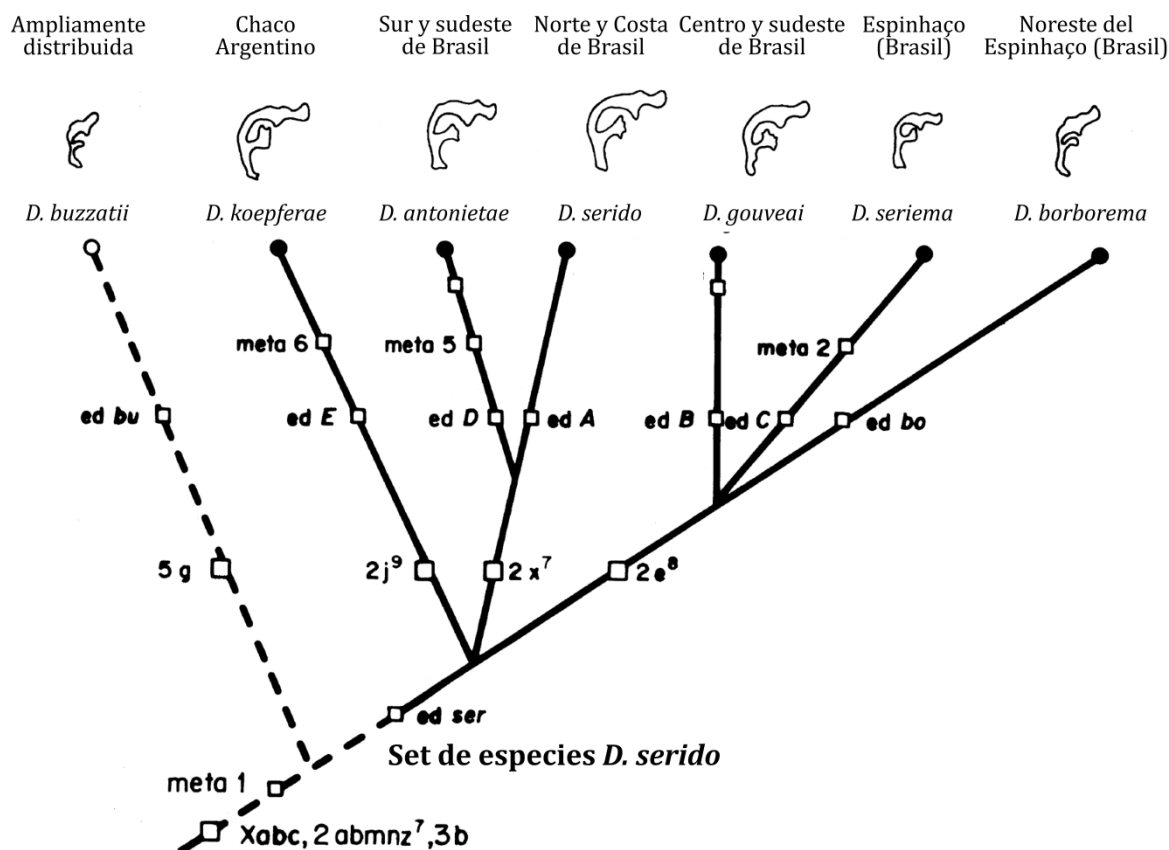


Figura 10. Hipótesis filogenética del *cluster buzzatii*. ed A-E: morfotipos de aedeagos (genitalia masculina) según Silva y Sene (1991). **bu**: aedeago de *D. buzzatii*; **bo**: aedeago de *D. borborema*; **meta**: tipos de cromosomas metafásicos según Baimai *et al.* (1983). **5g**, **2j⁹**, **2x⁷** y **2e⁸**: inversiones cromosómicas. La línea llena indica las relaciones de las especies incluidas dentro del grupo denominado "*D. serido sibling set*" (Tidon-Sklorz & Sene 1995, 2001). Sobre los nombres de las especies se ilustran los contornos de los aedeagos y se indica la distribución geográfica en Sudamérica. Figura modificada de Manfrin y Sene (2006).

Todas las especies de este cluster son cactófilas, utilizan cactáceas como sitios de apareamiento, oviposición y cría. La transición al uso de cactus columnares parece haber ocurrido en la base del complejo *D. buzzatii*, manteniendo el uso de *Opuntia* (Figura 5). Sin embargo, la pérdida del uso de *Opuntia* ha ocurrido en *D. borborema*, *D. serido* y *D. gouveai* (Figura 5). En consecuencia, estas tres especies son especialistas que solo utilizan cactus columnares como hospedadores. Hasta el momento no hay información disponible con respecto a los sustratos de cría que utiliza *D. seriema* (Manfrin & Sene 2006; Oliveira *et al.* 2012). Dentro de las especies polimórficas, el conocimiento de la ecología, en relación al uso de plantas hospedadoras, está principalmente limitado a *D. antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae* (Hasson *et al.* 1992, 2009; Fanara *et al.* 1999, 2006; Soto *et al.* 2007, 2008). Estas especies no utilizan ambos tipos de

cactus por igual: *D. buzzatii* se cría principalmente en *Opuntia*, en tanto que los hospedadores primarios de *D. antonietae* y *D. koepferae* son cactus de tipo columnar, *Cereus hildemannianus* y *C. peruvianus* en el caso de la primera y *C. validus*, *Trichocereus terscheckii* y *T. candicans* en el de la segunda (revisión en Hasson *et al.* 2009 y resultados de campo no publicados).

1.8. Los cantos de cortejo en el cluster *D. buzzatii*

Oliveira *et al.* (2013) estudiaron la variación cuantitativa de los cantos de cortejo de las siete especies del cluster *D. buzzatii*. Además, reportaron que las señales acústicas eran producidas por la vibración de ambas alas en todas las especies y que no continuaban durante o después de la cópula.

Clasificaron las estructuras de los cantos siguiendo el patrón temporal de aparición definido por Ewing y Miyan(1986). La estructura primaria o canto A fue la que se emitió en mayor proporción durante el cortejo mientras que la estructura secundaria o canto B aparecía hacia el final del cortejo, inmediatamente antes de la cópula.

En general, los cantos de las siete especies se caracterizan por una baja frecuencia dominante (FD media menor a 500 Hz) y la presencia de pulsos policíclicos (entre 2 y 4 ciclos por pulso). Además, en aquellos cantos en los cuales ambas estructuras estaban presentes, la estructura primaria o canto A siempre presentó una FD mayor que la estructura secundaria o canto B.

Oliveira *et al.* (2013) encontraron que la condición ancestral en el cluster sería la presencia de ambos tipos de estructuras, tal y como fuera sugerido por Ewing y Miyan(1986). Los cantos de *D. borborema* y *D. gouveai* son los únicos que se encuentran constituidos por un único tipo de estructura, sin embargo, no explicitan la lógica utilizada para concluir que en estas especies la estructura secundaria o canto B es la que se habría perdido² (Figura 11). Además, reportaron

² Los machos de *D. borborema* emitieron los cantos con los IPIs más largos (IPI=14,20±1,3) y la FD más baja (FD= 213 Hz) dentro del cluster. Según el criterio utilizado por Ewing y Millan (1986) el canto B es caracterizado por IPIs más largos y, en el cluster *D. buzzatii*, Oliveira *et al.* (2013) encontró que los cantos B tienden a tener, además, FD más baja que los cantos A. De esta manera, la evidencia apunta a que en *D. borborema* la estructura que se perdió correspondería al canto A y no al B como proponen Oliveira *et al.* (2013; Figura 11). En el caso de *D. gouveai*, el

que en algunas especies no todos los machos emitían el canto B, sin embargo, no especificaron en qué especies sucedía este fenómeno. En consecuencia, algunas de las especies de este cluster podrían encontrarse en proceso de pérdida de esta estructura de acuerdo a los criterios de Ewing y Miyan(1986).

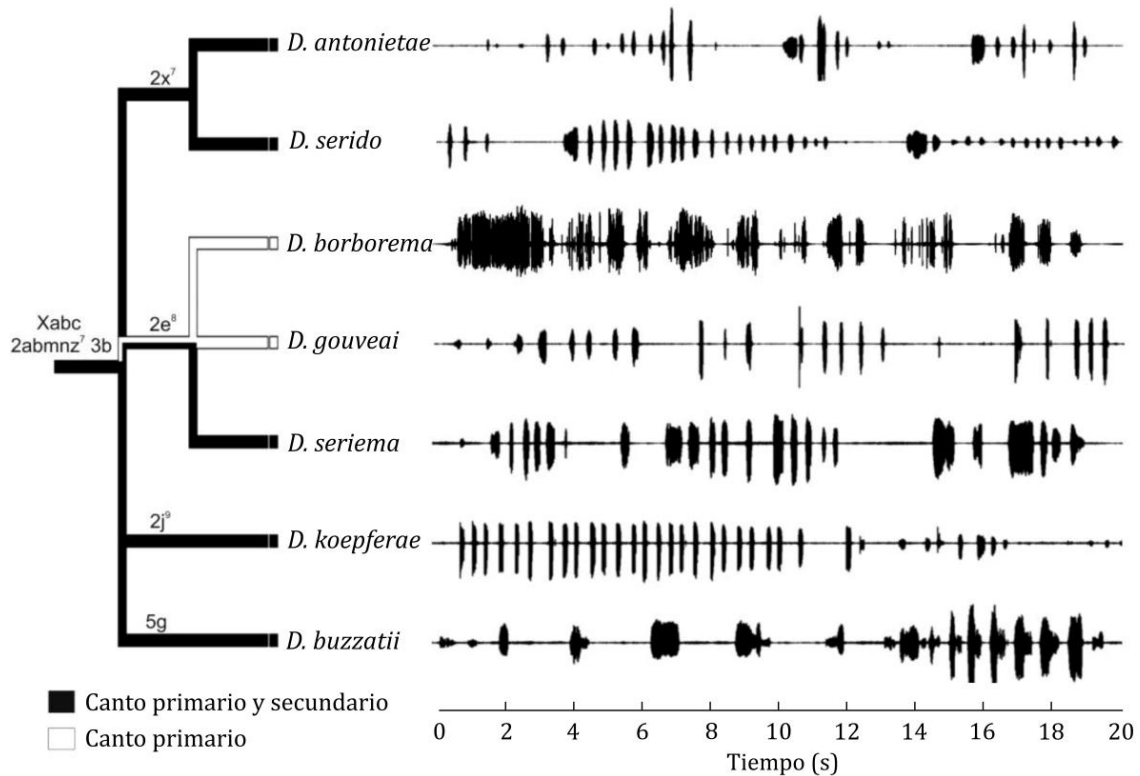


Figura 11. Hipótesis filogenética basada en inversiones cromosómicas y los cantos de cortejo de cada una de las especies del cluster *D. buzzatii*. Figura adaptada de Oliveira *et al.* (2013).

En contraste con los resultados reportados por Ewing y Miyan(1986), los cantos de los machos de *D. buzzatii* estuvieron constituidos por dos estructuras claramente diferenciables (Figura 12 b-e y g), presentes en todos los machos analizados, y en ninguna de ellas destacan la presencia de dobletes de pulsos. Sin embargo, en las imágenes de los pulsos que componen el canto A, presentada en el trabajo de Oliveira *et al.* (2013), es posible evidenciar la existencia de dobletes de pulsos en esta estructura (Figura 12f). La discrepancia en el número de estructuras

establecimiento de la homología de la única estructura presente en su canto es más complejo dado que presentó una alta FD (FD=456) e IPIs que se asemejan a los de la estructura secundaria o canto B de *D. buzzatii* (IPI=12,8±1,1 y 12,3±1,5, respectivamente).

presentes en los cantos de *D. buzzatii* en ambos trabajos, fue interpretada por Oliveira *et al.* (2013) como una posible variación intraespecífica dado que Ewing y Miyani (1986) analizaron moscas provenientes de Byblos (Líbano) y Oliveira *et al.* (2013) moscas provenientes de cuatro localidades diferentes (en tres estados) de Brasil.

Además, los cantos de *D. buzzatii* fueron los únicos que mostraron diferencias significativas entre los IPIs de la estructura primaria y de la secundaria, mientras que en las restantes especies los IPIs en ambos tipos de cantos no resultaron estadísticamente diferentes. De esta manera, de acuerdo con los resultados reportados en el trabajo de Oliveira *et al.* (2013), la diferenciación entre cantos A y B estaría mejor definida por la FD que por el IPI en el cluster *D. buzzatii*.

Finalmente Oliveira *et al.* (2013) caracterizaron cada estructura sobre la base de seis parámetros: la duración del IPI (Ver nota al pie 1), la duración de la nota (DN), la frecuencia dominante de los pulsos (FD), el número de pulsos (NP), el intervalo internota (INI) y la duración del pulso (DP), y utilizaron un enfoque comparativo para evaluar si dichas variaciones cuantitativas tenían un correlato en las relaciones filogenéticas (inferidas a partir de inversiones cromosómicas y el gen nuclear *per*). Llegaron a la conclusión de que las variaciones de los cantos no tienen correlato filogenético, un patrón que refleja los altos niveles de variación observados en los cantos del cluster *D. buzzatii* (Figura 11) y es consistente con una rápida evolución de las señales acústicas en estas especies.

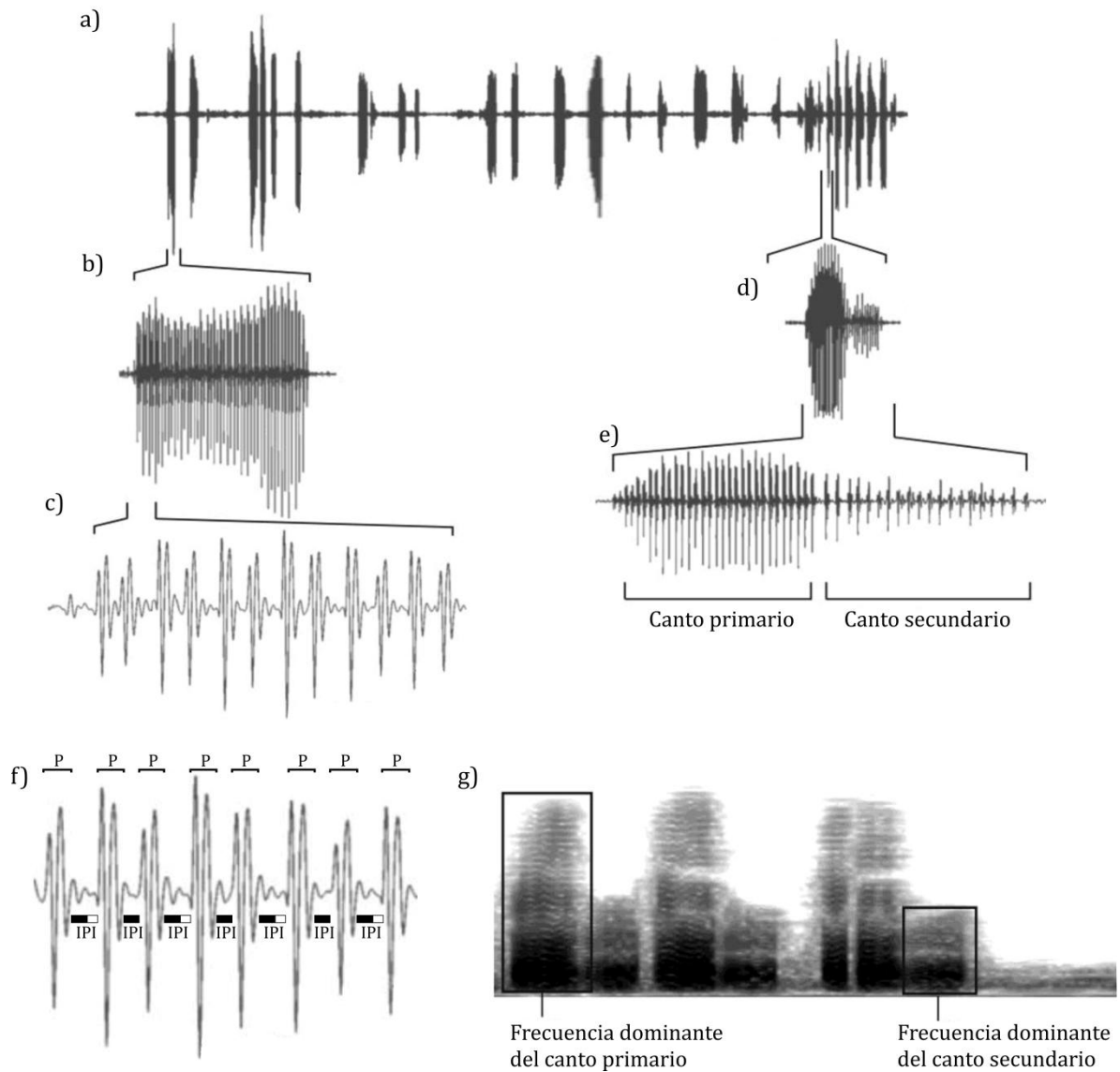


Figura 12. a) Canto de cortejo típico emitido por los machos de la especie *D. buzzatii*. b) Canto A emitido durante el cortejo temprano (Nota simple). c) Visión expandida de los pulsos del canto A. d) Cantos A y B emitidos durante el cortejo tardío (Nota compuesta). e) Visión expandida de los pulsos de la nota compuesta. f) Dobletes de pulsos en canto A; IPI corto en negro e IPI largo en negro + blanco; P: Pulso. g) Frecuencia Dominante en ambos tipos de estructuras. Figura adaptada de Oliveira *et al.* (2013).

De esta manera, el cluster *D. buzzatii* presenta características que lo hacen sumamente interesante para estudiar la evolución de las señales acústicas: 1) los cantos de cortejo de los machos resultan espectacularmente diversos; 2) las especies del cluster son crípticas, por lo tanto, este tipo de canal de señalización adquiere mayor importancia; 3) la divergencia entre sus cantos no es un subproducto de la divergencia genética entre las especies; 4) el cluster *D. buzzatii* es un grupo monofilético, lo cual es fundamental para estudios comparativos que aborden la evolución de caracteres; 5) se cuenta con mucha información acerca de la genética, biogeografía y ecología en condiciones naturales; 6) la asociación con el sustrato de cría permite investigar el rol evolutivo del uso de plantas hospedadoras y 7) son especies nativas de nuestro subcontinente.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis es comprender los factores que dieron forma al complejo patrón de cantos de cortejo en las especies cactófilas del cluster *D. buzzatii*. Para ello, en el Capítulo I, estudiamos el rol que ocupa el sistema de comunicación acústica en la receptividad de la hembra y en el aislamiento reproductivo en cuatro especies del cluster *D. buzzatii* y en una especie del cluster *D. martensis*, utilizada como grupo externo. En el capítulo II, determinamos la relevancia de la plasticidad fenotípica y la interacción genotipo-ambiente en la variación del canto en las especies hermanas simpátricas, *D. buzzatii* y *D. koepferae*, criadas en recursos naturales con propiedades nutricionales y composiciones químicas diferentes. Además, exploramos el efecto que ejerce la variación morfométrica de las alas sobre el canto de cortejo en ambas especies. Finalmente, en el Capítulo III, realizamos un estudio comparativo de estructuración poblacional en poblaciones naturales de *D. buzzatii* utilizando como caracteres el canto y dos tipos de marcadores genético-moleculares (microsatélites y ADN mitocondrial) e inferimos la importancia relativa de los procesos evolutivos involucrados en la divergencia (deriva y selección).

Bibliografia

- Angulo A. & Reichle S. (2008) Acoustic signals, species diagnosis, and species concepts: the case of a new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. *Zoological Journal of the Linnean Society* **152**, 59–77.
- Bächli G. (2016) TaxoDros v1.04: The database on taxonomy of Drosophilidae. <http://taxodros.unizh.ch/>.
- Baimal V., Sene F. M. & Pereira M. A. O. R. (1983) Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus-breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica* **60**, 81–92.
- Bennet-Clark H. C. & Ewing A. W. (1968) The wing mechanism involved in the courtship of *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology* **49**, 117–128.
- Bennet-Clark H. C. & Ewing A. W. (1969) Pulse interval as a critical parameter in the courtship song of *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour* **17**, 755–759.
- Bickford D., Lohman D. J., Sodhi N. S., Ng P. K. L., Meier R., Winker K., Ingram K. K. & Das I. (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 148–155.
- Bizzo N. M. V. (1983) Estudo sobre a biologia e isolamento reprodutivo em *D. serido*. M. Sc. tesis, Universidade de Sao Paulo, SP, Brasil.
- Blyth J. E., Lachaise D. & Ritchie M. G. (2008) Divergence in multiple courtship song traits between *Drosophila santomea* and *D. yakuba*. *Ethology* **114**, 728–736.
- Bontonou G. & Wicker-Thomas C. (2014) Sexual communication in the *Drosophila* genus. *Insects* **5**, 439–458.
- Brown R. (1965) Courtship behaviour in the *Drosophila obscura* group. Part II. Comparative studies. *Behaviour* **25**, 281–322.
- Burton J. A. & Nietsch A. (2010) Geographical variation in duet songs of Sulawesi tarsiers: Evidence for new cryptic species in south and southeast Sulawesi. *International Journal of Primatology* **31**, 1123–1146.
- Cande J., Stern D. L., Morita T., Prud'homme B. & Gompel N. (2014) Looking under the lamp post: neither fruitless nor doublesex has evolved to generate divergent male courtship in *Drosophila*. *Cell reports* **8**, 363–370.

- Carreira V. P., Padró J., Koch N. M., Fontanarrosa P., Alonso I. & Soto I. M. (2014) Nutritional composition of *Opuntia sulphurea* G. Don Cladodes. *Haseltonia* **19**, 38–45.
- Carson H. L. & Wasserman M. (1965) A widespread chromosomal polymorphism in a widespread species, *Drosophila buzzatii*. *American Naturalist* **99**, 111–115.
- Cobb M., Burnet B., Blizard R. & Jallon J.-M. (1989) Courtship in *Drosophila sechellia*: its structure, functional aspects, and relationship to those of other members of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Journal of Insect Behavior* **2**, 63–89.
- Cobb M., Burnet B. & Connolly K. (1986) The structure of courtship in the *Drosophila melanogaster* species sub-group. *Behaviour* **97**, 182–211.
- Costa C. T. A., Kuhn G. C. S. & Sene F. M. (2000) Low courtship song variation in south and southeastern Brazilian populations of *Drosophila meridionalis* (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Biologia* **60**, 53–61.
- Crossley S. A. (1986) Courtship-sounds and behaviour in the four species of the *Drosophila bipectinata* complex. *Animal Behaviour* **34**, 1146–1159.
- Chaves J. C., Cuervo A. M., Miller M. J. & Cadena C. D. (2010) Revising species limits in a group of *Myrmeciza* antbirds reveals a cryptic species within *M. laemosticta* (Thamnophilidae). *The Condor* **112**, 718–730.
- David J. A. O., Zefa E. & Fontanetti C. S. (2003) Cryptic species of *Gryllus* in the light of bioacoustic (Orthoptera: Gryllidae). *Neotropical Entomology* **32**, 75–80.
- Durando C. M., Baker R. H., Etges W. J., Heed W. B., Wasserman M. & DeSalle R. (2000) Phylogenetic analysis of the repleta species group of the genus *Drosophila* using multiple sources of characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **16**, 296–307.
- Ewing A. W. (1983) Functional aspects of *Drosophila* courtship. *Biological Reviews* **58**, 275–292.
- Ewing A. W. & Bennet-Clark H. C. (1968) The courtship songs of *Drosophila*. *Behaviour* **31**, 288–301.
- Ewing A. W. & Miyan J. A. (1986) Sexual selection, sexual isolation and the evolution of song in the *Drosophila repleta* group of species. *Animal Behaviour* **34**, 421–429.

- 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**, 900–908.
- Fanara J. J., Fontdevila A. & Hasson E. (1999) Oviposition preference and life history traits in cactophilic *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association with their natural hosts. *Evolutionary Ecology* **13**, 173–190.
- Ferveur J.-F. (2005) Cuticular hydrocarbons: their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behavior Genetics* **35**, 279–295.
- Fogleman J. C. & Abril J. R. (1990) Ecological and evolutionary importance of host plant chemistry. In: *Ecological and evolutionary genetics of Drosophila* (eds J. S. F. Barker, W. T. Starmer and R. MacIntyre) pp. 121–143. Plenum Press, New York.
- Fogleman J. C. & Danielson P. B. (2001) Chemical interactions in the cactus-microorganism-*Drosophila* model system of the Sonoran Desert. *American Zoologist* **41**, 877–889.
- Göpfert M. C. & Robert D. (2001) Biomechanics: Turning the key on *Drosophila* audition. *Nature* **411**, 908.
- Göpfert M. C. & Robert D. (2002) The mechanical basis of *Drosophila* audition. *Journal of Experimental Biology* **205**, 1199–1208.
- Greenspan R. J. & Ferveur J.-F. (2000) Courtship in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics* **34**, 205–232.
- Hasson E., Naveira H. & Fontdevila A. (1992) The breeding sites of Argentinian cactophilic species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). *Revista Chilena de Historia Natural* **65**, 319–326.
- Hasson E., Soto I. M., Carreira V. P., Corio C., Soto E. M., Betti M. I. L. & Santos E. B. (2009) Host plants, fitness and developmental instability in a guild of cactophilic species of the genus *Drosophila*. In: *Ecotoxicology Research Developments* (ed E. B. Santos) pp. 89–109. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Hoikkala A. & Aspi J. (1993) Criteria of female mate choice in *Drosophila littoralis*, *D. montana*, and *D. ezoana*. *Evolution* **47**, 768–777.

- Jones G. (1997) Acoustic signals and speciation: the roles of natural and sexual selection in the evolution of cryptic species. *Advances in the Study of Behaviour* **26**, 317–354.
- Kircher H. W. (1982) Chemical composition of cacti and its relationship to Sonoran desert *Drosophila*. In: *Ecological genetics and evolution* (eds J. S. F. Barker and W. T. Starmer) pp. 143–158. Academic Press, Sydney.
- Lincoln R., Boxshall G. & Clark P. (1998) *A dictionary of Ecology, Evolution and Systematics. 2nd ed.* Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Machado L. P. de B., Castro J. P. & Madi-Ravazzi R. (2002) Evaluation of the courtship and of the hybrid male sterility among *Drosophila buzzatii* cluster species (Diptera, Drosophilidae). *Brazilian Journal of Biology* **62**, 601–608.
- Manfrin M. H. & Sene F. M. (2006) Cactophilic *Drosophila* in South America: a model for evolutionary studies. *Genetica* **126**, 57–75.
- Manning A. (1960) The sexual behaviour of two sibling *Drosophila* species. *Behaviour* **15**, 123–145.
- Markow T. A. & O'Grady P. M. (2005) Evolutionary genetics of reproductive behavior in *Drosophila*: connecting the dots. *Annual Review of Genetics* **39**, 263–291.
- Mauseth J. D. (1990) Continental drift, climate and the evolution of cacti. *Cactus and Succulent Journal* **62**, 302–308.
- Nanda P. & Singh B. N. (2012) Behavioural reproductive isolation and speciation in *Drosophila*. *Journal of Biosciences* **37**, 359–74.
- Nyffeler R. (2002) Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. *American Journal of Botany* **89**, 312–326.
- Nyffeler R. & Egli U. (2010) A farewell to dated ideas and concept molecular phylogenetics and a revised suprageneric classification of the family Cactaceae. *Schumannia* **6**, 109–149.
- O'Grady P. M., Baker R. H., Durando C. M., Etges W. J. & De Salle R. (2001) Polytene chromosomes as indicators of phylogeny in several species groups of *Drosophila*. *BMC Evolutionary Biology* **1**, [1–6].
- Oliveira C. C., Manfrin M. H., Sene F. M. & Etges W. J. (2013) Evolution of male courtship songs in the *Drosophila buzzatii* species cluster. In: *Speciation:*

- natural processes, genetics and biodiversity* (ed P. Michalak) pp. 137–164. Nova Science Publishers, New York.
- Oliveira C. C., Manfrin M. H., Sene F. M., Jackson L. L. & Etges W. J. (2011) Variations on a theme: diversification of cuticular hydrocarbons in a clade of cactophilic *Drosophila*. *BMC Evolutionary Biology* **11**, 179.
- Oliveira D. C. S. G., Almeida F. C., O'Grady P. M., Armella M. A., DeSalle R. & Etges W. J. (2012) Monophyly, divergence times, and evolution of host plant use inferred from a revised phylogeny of the *Drosophila repleta* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **64**, 533–544.
- Oliveira D. C. S. G., Leonidas M., Etges W. J., O'Grady P. M. & De Salle R. (2008) Species delimitation in the *Drosophila aldrichi* subcluster (Diptera: Drosophilidae) using DNA sequences. *Zootaxa* **1725**, 37–47.
- Oliveira D. C. S. G., O'Grady P. M., Etges W. J., Heed W. B. & De Salle R. (2005) Molecular systematics and geographical distribution of the *Drosophila longicornis* species complex (Diptera: Drosophilidae). *Zootaxa* **1069**, 1–32.
- Padró J. & Soto I. M. (2013) Exploration of the nutritional profile of *Trichocereus terscheckii* (Parmentier) Britton & Rose stems. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **15**, 1–12.
- Patterson J. T. (1943) The Drosophilidae of Southwest. *University of Texas Publications* **4314**, 7–203.
- Pfenninger M. & Schwenk K. (2007) Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 121[1–6].
- Rafael V. & Arcos G. (1988) *Drosophila guayllabambae* n. sp., un nuevo miembro del Grupo *repleta*, Subgrupo *hydei* (Diptera, Drosophilidae). *Evolución Biológica* **2**, 167–176.
- Rafael V. & Arcos G. (1989) Subgrupo *inca*, un nuevo subgrupo del grupo *repleta*, con descripción de *Drosophila huancavilcae* n. sp. (Diptera, Drosophilidae). *Evolución Biológica* **3**, 233–243.
- Revadi S., Lebreton S., Witzgall P., Anfora G., Dekker T. & Becher P. G. (2015) Sexual behavior of *Drosophila suzukii*. *Insects* **6**, 183–196.
- Riabinina O., Dai M., Duke T. & Albert J. T. (2011) Active process mediates species-specific tuning of *Drosophila* ears. *Current Biology* **21**, 658–664.

- Ringo J. M. (1976) A communal display in hawaiian *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Annals of the Entomological Society of America* **69**, 209–214.
- Ritchie M. G. & Gleason J. M. (1995) Rapid evolution of courtship song pattern in *Drosophila willistoni* sibling species. *Journal of Evolutionary Biology* **8**, 463–479.
- Rodríguez-Trelles F., Alarcón L. & Fontdevila A. (2000) Molecular evolution and phylogeny of the *buzzatii* complex (*Drosophila repleta* group): a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 1112–1122.
- Saarikettu M., Liimatainen J. O. & Hoikkala A. (2005) The role of male courtship song in species recognition in *Drosophila montana*. *Behavior Genetics* **35**, 257–263.
- Sene F. M., Pereira M. A. Q. R. & Vilela C. R. (1982) Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* species in South America. In: *Ecological genetics and evolution: the cactus-yeast-Drosophila model system* (eds J. S. F. Barker and W. T. Starmer) pp. 97–106. Academic Press, Sidney, Australia.
- Sene F. M., Pereira M. A. Q. R. & Vilela C. R. (1988) Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. *Pacific Science* **42**, 81–88.
- Shorey H. H. (1962) Nature of the sound produced by *Drosophila melanogaster* during courtship. *Science* **137**, 677–678.
- Silva A. F. G. & Sene F. M. (1991) Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Entomologia* **35**, 455–468.
- Soto I. M., Hasson E. R. & Manfrin M. H. (2008) Wing morphology is related to host plants in cactophilic *Drosophila gouveai* and *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **95**, 655–665.
- Soto I. M., Manfrin M. H., Sene F. D. M. & Hasson E. (2007) Viability and developmental time in cactophilic *Drosophila gouveai* and *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae) are dependent on the cactus host. *Annals of the Entomological Society of America* **100**, 490–496.
- Spicer G. S. (1995) Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Journal of Molecular Evolution* **41**, 749–759.

- Spieth H. T. (1952) Mating behavior within the genus *Drosophila* (Diptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **99**, 395–474.
- Spieth H. T. (1974) Courtship behavior in *Drosophila*. *Annual Review of Entomology* **19**, 385–405.
- Stocker R. F. (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell and Tissue Research* **275**, 3–26.
- Sturtevant A. (1915) Experiments on sex recognition and the problem of sexual selection in *Drosophila*. *Journal of Animal Behavior* **5**, 351–366.
- Sturtevant A. H. (1942) The classification of the genus *Drosophila*, with descriptions of nine new species. *University of Texas Publications, Studies in Genetics* **4213**, 5–51.
- Sueur J. & Puissant S. (2007) Similar look but different song: a new *Cicadetta* species in the montana complex (Insecta, Hemiptera, Cicadidae). *Zootaxa* **1442**, 55–68.
- Talyn B. C. & Dowse H. B. (2004) The role of courtship song in sexual selection and species recognition by female *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour* **68**, 1165–1180.
- Templeton A. (1992) The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In: *The units of evolution: essays on the nature of species* (ed M. Ereshefsky). Massachusetts Institute of Technology Press, Massachusetts.
- Tidon-Sklorz R. & Sene F. M. (1995) Evolution of the *buzzatii* cluster (*Drosophila repleta* species group) in middle South America. *Evolución Biológica* **8**, 71–85.
- Tidon-Sklorz R. & Sene F. M. (2001) Two new species of the *Drosophila serido* sibling set (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia. Série Zoologia* **90**, 141–146.
- Tinbergen N. (1953) *Social behaviour in animals with special reference to vertebrates*. Chapman & Hall, London.
- Tomaru M. & Oguma Y. (1994) Differences in courtship song in the species of the *Drosophila auraria* complex. *Animal Behaviour* **47**, 133–140.
- Tomaru M. & Yamada H. (2011) Courtship of *Drosophila*, with a special interest in courtship songs. *Low Temperature Science* **69**, 61–85.
- Tosi D. & Sene F. d. M. (1989) Further studies on chromosomal variability in the complex taxon *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Genética* **12**, 729–745.

- Vilela C. R. (1983) A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Entomologia* **27**, 1–114.
- Wasserman M. (1982) Cytological evolution in the *Drosophila repleta* species group. In: *Ecological Genetics and Evolution: The Cactus–Yeast–Drosophila Model System* (eds J. S. F. Barker and W. T. Starmer) pp. 49–64. Academic Press, New York.
- Wasserman M. (1992) Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In: *Drosophila Inversion Polymorphism* (eds C. B. Krimbas and J. R. Powell) pp. 455–552. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Wells M. M. & Henry C. S. (1998) Songs, reproductive isolation, and speciation in cryptic species of insects. In: *Endless forms: species and speciation* (eds D. J. Howard and S. H. Berlocher) pp. 217–233. Oxford University Press, Oxford.
- Wharton L. T. (1944) Interspecific hybridization in the repleta group. *University of Texas Publications* **4445**, 175–193.
- Yamada H., Sakai T., Tomaru M., Doi M., Matsuda M. & Oguma Y. (2002) Search for species-specific mating signal in courtship songs of sympatric sibling species, *Drosophila ananassae* and *D. pallidosa*. *Genes & Genetic Systems* **77**, 97–106.
- Yeh S. D., Liou S. R. & True J. R. (2006) Genetics of divergence in male wing pigmentation and courtship behavior between *Drosophila elegans* and *D. gunungcola*. *Heredity* **96**, 383–395.

Capítulo I

Importancia de la señal acústica durante el cortejo en especies del cluster *D. buzzatii*

2.1. Introducción

Durante el cortejo, los machos exhiben múltiples señales que forman parte de diferentes modalidades sensoriales. Muchas de estas señales han sufrido un importante proceso de diversificación incluso en grupos de especies estrechamente relacionadas (Darwin 1871; Bro-Jørgensen 2010). Sin embargo, cuando múltiples señales forman parte del repertorio de cortejo, no es claro si todas tienen la misma importancia en la elección de pareja o si las hembras priorizan un tipo de señal sobre las demás (Jennions & Petrie 1997; Wiens 2001; Castellano & Cermelli 2006).

En moscas del género *Drosophila*, los machos producen un complejo ritual de cortejo en el que las señales acústicas y químicas parecen ser los blancos más conspicuos en la elección de pareja por parte de las hembras (Markow & O'Grady 2005; Dickson 2008). La señal acústica, producida por la vibración de las alas de los machos, ha sido la más estudiada (*e.g.*, Ewing 1979; Cowling & Burnet 1981; Ewing & Miyan 1986; Hoikkala & Lumme 1987; Hoikkala *et al.* 1994; Tomaru & Oguma 1994; Costa & Sene 2002; Blyth *et al.* 2008). Trabajos previos, que han evaluado el rol del canto de cortejo en la elección de pareja de las hembras, revelaron gran variación entre las especies de este género. Por ejemplo, se ha reportado que el canto de cortejo en la especie hawaiana *D. heteroneura* (grupo *D. planitibia*) no afecta el éxito de apareamiento de los machos y que por lo tanto no cumple el requisito para ser considerada una señal sexual (Boake & Poulsen 1997). En cambio, las hembras de *D. montana* (grupo *D. virilis*) rechazan al macho cortejante si no escuchan su canto (Liimatainen *et al.* 1992). En algunas especies del complejo *D. melanogaster* el canto parece no ser necesario para el apareamiento, aunque escucharlo disminuye el tiempo requerido para que el macho sea aceptado por la hembra y se produzca la cópula (Ritchie *et al.* 1999; Tomaru & Oguma 2000). Además, existe evidencia de que los parámetros del canto

no son siempre especie-específicos, dado que los cantos heterospecíficos también pueden estimular el comportamiento sexual en las especies del complejo *D. melanogaster* (Ritchie *et al.* 1999; Tomaru & Oguma 2000). Por el contrario, las hembras de *D. sechellia* (complejo *D. simulans*) y *D. biauraria* (complejo *D. auraria*) rechazan a los machos cuando los parámetros del canto son heterospecíficos (Tomaru *et al.* 1995, 2000). En resumen, la evidencia disponible muestra que aunque la señal acústica varía enormemente entre especies, su diversificación no siempre implica un rol primario en la elección de pareja de las hembras y en el aislamiento reproductivo (Ritchie *et al.* 1999).

El complejo *D. buzzatii* es un conjunto de especies distribuido en tres clusters: *D. buzzatii*, *D. martensis* y *D. stalker*. Su área de distribución comprende Argentina, Brasil, Bolivia y Paraguay (cluster *D. buzzatii*), Colombia y Venezuela (cluster *D. martensis*), y el Caribe y la península de Florida (cluster *D. stalker*) (Ruiz & Wasserman 1993; Manfrin & Sene 2006). Las relaciones filogenéticas entre estos clusters es aún controversial dado que sus relaciones han estado poco soportadas estadísticamente en todas las hipótesis filogenéticas propuestas. La evidencia cromosómica (Ruiz y Wasserman 1993) y los marcadores moleculares Xdh, COI, COII y COIII (Rodríguez-Trelles *et al.* 2000) sugieren que el cluster *D. stalker* constituye el linaje más antiguo y es parafilético. Además, sugieren que los clusters *D. buzzatii* y *D. martensis*, que fueron recuperados como clados hermanos monofiléticos, se dividieron posteriormente. Sin embargo, una nueva hipótesis filogenética basada en cuatro marcadores mitocondriales y seis nucleares propone que los clusters *D. buzzatii* y *D. stalker* son clados hermanos monofiléticos (Oliveira *et al.* 2012).

Estudios recientes sobre el canto de cortejo y los hidrocarburos de cutícula (HCC, los cuales tienen el potencial de actuar como feromonas) en el cluster *D. buzzatii*, revelaron una rápida evolución de la señal acústica (Oliveira *et al.* 2013) pero un cierto grado de conservación en los perfiles de HCC (Oliveira *et al.* 2011). En efecto, el mapeo de los perfiles de HCC sobre una filogenia basada en inversiones cromosómicas y el gen nuclear *per* reveló que una significativa proporción de la variación en HCC puede explicarse por la divergencia entre especies (Oliveira *et al.* 2011); sin embargo, la variación interespecífica en la señal acústica no tiene correlato filogenético (Oliveira *et al.* 2013). En consecuencia, se

ha sugerido que el canto de cortejo en estas especies podría codificar información que permita discriminar a los machos tanto dentro como entre especies. No obstante, no existe evidencia directa (*e.g.*, experimentos utilizando *playbacks* y machos sin alas, que no pueden cantar) que confirme esta hipótesis (Oliveira *et al.* 2013).

La historia evolutiva de los cantos del cluster *D. buzzatii* se caracteriza por un complejo patrón de pérdidas y/o elaboración de las notas, lo cual generó variación cualitativa entre las especies (Oliveira *et al.* 2013). De esta manera, encontramos especies cuyos cantos presentan una única estructura (*D. borborema* y *D. gouveai*) y otras cuyos cantos tienen dos estructuras claramente diferenciables (*D. antonietae*, *D. buzzatii*, *D. koepferae*, *D. serido* y *D. seriema*). Además, el canto de cortejo de *D. buzzatii* es el único que muestra una distribución trimodal en la duración de los intervalos interpulsos (IPI, *InterPulse Interval*) debido a que la estructura primaria o canto A presenta dobletes de pulsos (Ewing & Miyan 1986; Oliveira *et al.* 2013; Capítulo II y III de esta tesis). La variación observada en este parámetro resulta interesante debido a que los insectos por lo general tienen una baja resolución espectral y es el componente temporal el que lleva la mayor parte de la información (Hennig *et al.* 2014). La importancia del IPI en el reconocimiento de especies ha sido demostrada en varias especies de *Drosophila* (ver revisión en Tomaru & Yamada 2011).

Además de presentar el canto más divergente dentro del cluster, *D. buzzatii* se diferencia del resto de las especies (conocidas como el "*D. serido sibling set*") en aspectos ecológicos, morfológicos y biogeográficos: es la única especie que utiliza como hospedador primario cactáceas del género *Opuntia*, su órgano copulador masculino (aedeago) es el más divergente tanto en tamaño como en conformación (ver Figura 10 de la Introducción general) y es la única especie semi-cosmopolita que co-ocurre con todas las demás en distintas regiones del área de distribución (ver revisión en Manfrin & Sene 2006; Figura 9 en Introducción general). Esta última característica, la convierte en un blanco interesante para estudios evolutivos de caracteres implicados en el aislamiento precópula debido a que el fortalecimiento de los mecanismos involucrados en la discriminación de pareja evitaría la potencial hibridación perjudicial (Noor, 1999). De esta manera, los cantos de los machos de *D. buzzatii* tendrían la suficiente complejidad para ser

fácilmente discriminados por las hembras del “*D. serido* sibling set” y para ser reconocidos por las hembras conespecíficas.

2.1.1. Objetivos e hipótesis

En este capítulo empleamos una aproximación que combina experimentos manipulativos y el uso de *playbacks* para desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el rol que ocupa el sistema de comunicación acústica en la elección de pareja de la hembra en cuatro especies del cluster *D. buzzatii* y en una especie del cluster *D. martensis*, utilizada como grupo externo.
- Determinar el rol que ocupa el sistema de comunicación acústica en el aislamiento sexual precópula en cuatro especies del cluster *D. buzzatii*.

Para ello, se trabajará con las siguientes hipótesis:

- Los sistemas sensoriales (Olfativo , gustativo y auditivo) utilizados por las hembras durante el cortejo divergieron.
- Las hembras responden a cantos de cortejo especie-específicos en los linajes donde la señal acústica es utilizada como estímulo.
- Las hembras discriminan cantos heteroespecíficos que pueden encontrar en simpatría de cantos conespecíficos.
- Existe divergencia en las respuesta de las hembras a los cantos de cortejo.
- El aislamiento sexual precópula desaparece o disminuye cuando el estímulo acústico es conespecífico.
- El aislamiento sexual precópula desaparece o disminuye cuando se elimina el estímulo acústico heteroespecífico.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Stocks de moscas

Utilizamos un total de 13 isolíneas representantes de cuatro especies del cluster *Drosophila buzzatii*: *D. buzzatii* (4 líneas), *D. koepferae* (4), *D. antonietae* (4) y *D. borborema* (1).

Las isolíneas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* fueron originalmente fundadas con la progenie de hembras inseminadas en la naturaleza, recolectadas en la Reserva Natural de San Agustín del Valle Fértil (San Juan). Las líneas de *D. antonietae* derivan de hembras inseminadas en la naturaleza recolectadas en la Isla Martín García (Buenos Aires) donde coexiste con *D. buzzatii* (J. Hurtado, P. P. Iglesias & E. Hasson, datos de campo no publicados). La línea de *D. borborema* utilizada en este estudio fue adquirida a Stock Center (<https://stockcenter.ucsd.edu/>) y deriva de la progenie de una hembra inseminada en la naturaleza recolectada en la localidad de Morro do Chapéu (Brasil) donde también coexiste con *D. buzzatii* (Kuhn *et al.* 2003).

Por último, incluimos una isolínea de *D. venezolana*, que forma parte del cluster *D. martensis*, para realizar una comparación como grupo externo. Esta especie es también cactófila, se encuentra distribuida en el norte de América del Sur y es alopátrica a todas las especies del cluster *D. buzzatii* (Ruiz & Wasserman 1993; Figura 1). Esta línea deriva de la progenie de una hembra inseminada en la naturaleza recolectada en la Isla Los Roques (Venezuela) (Cerdeira y Fontdevila, 1998).

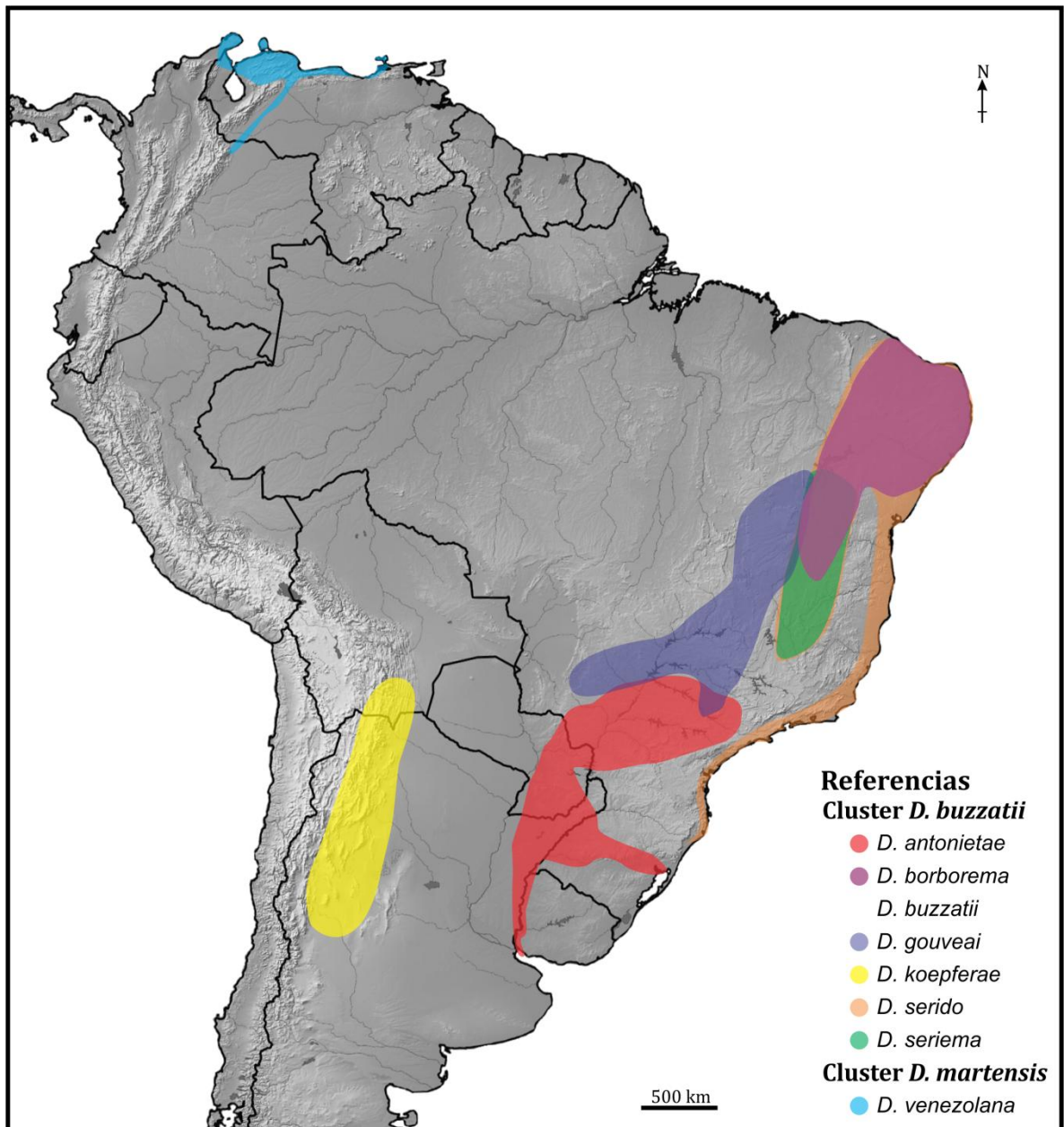


Figura 1. Distribución de las especies del cluster *D. buzzatii* y *D. venezolana*. El área de distribución de *D. buzzatii* se superpone con la de todas las especies del cluster, por lo que no se encuentra delimitada en el mapa. Fuente: Cerda y Fontdevila (1998), Manfrin y Sene (2006), Oliveira *et al.* (2011), y J. Hurtado, P. P. Iglesias y E. Hasson, datos de campo no publicados.

2.2.2. Condiciones experimentales

Con el fin de explorar el rol de la señal acústica y su importancia durante el cortejo se realizaron dos tipos de experimentos:

En el primer experimento (ver Figura 2) exploramos la importancia y el rol de la modalidad acústica en la elección de pareja de las hembras cuando eran confrontadas con machos conespecíficos sin alas (*i.e.*, sin los órganos implicados en la emisión de la señal acústica) en tres condiciones diferentes: en ausencia de *playback* (NP), con el *playback* del canto conspecífico (PC), y con el *playback* de un canto heteroespecífico (PH). Además, incluimos un grupo de parejas como control positivo (Ct+) que consistieron en hembras y machos con alas de la misma especie. Dado que el canto de *D. buzzatii* es el más diferente y que todas las hembras provienen de áreas donde coexisten con *D. buzzatii*, usamos cantos de esta especie como *playbacks* heteroespecíficos en la condición PH. En los ensayos que involucraron hembras de *D. buzzatii*, utilizamos *playbacks* del canto de *D. koepferae* (como *playbacks* heteroespecíficos) debido a que las líneas de ambas especies provienen de poblaciones que son simpátricas en la Reserva Natural de San Agustín del Valle Fértil (San Juan).

El segundo experimento tuvo por objetivo explorar el rol del canto de cortejo en el aislamiento precópula entre *D. buzzatii* y las restantes especies del cluster (Figura 2). Con este fin, confrontamos a las hembras de las diferentes especies con machos de *D. buzzatii* sin alas en dos condiciones acústicas diferentes: en ausencia de *playback* (NP) y con el *playback* conspecífico de la hembra (PC). En este experimento incluimos dos tipos de controles: un control positivo idéntico al grupo Ct+ del experimento anterior, utilizando parejas conespecíficas, y un control negativo (Ct-) usando machos de *D. buzzatii* con alas para corroborar la existencia de aislamiento precópula entre las especies implicadas. Al igual que en el Experimento 1, en los ensayos que involucraron hembras de *D. buzzatii*, utilizamos machos de *D. koepferae* como machos heteroespecíficos debido a que las líneas de ambas especies provienen de un área donde ambas especies coexisten.

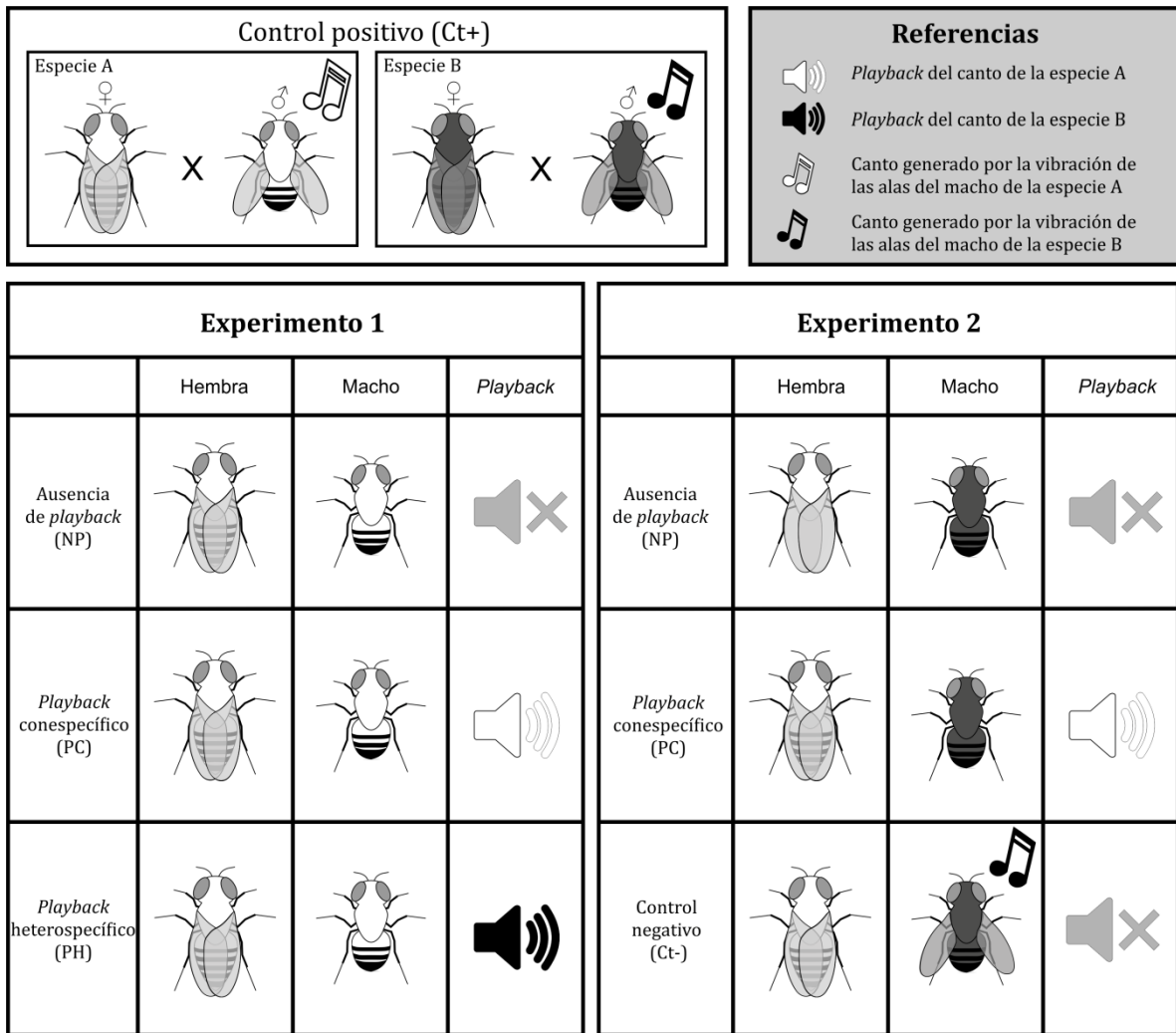


Figura 2. Diseño experimental. Esquema que muestra cómo se abordó el estudio de la elección de pareja de las hembras para una especie hipotética A en diferentes condiciones acústicas y usando machos conoespecíficos (blancos) en el Experimento 1 y heteroespecíficos (negros) en el Experimento 2. Aunque el grupo Ct+ se representó gráficamente una sola vez, cada experimento tuvo su propio grupo Ct+.

Los experimentos se llevaron a cabo entre las 8:00–11:00 de la mañana, momento en el cual se registra la mayor actividad de apareamiento, en una habitación aislada acústicamente. Las moscas fueron sexadas bajo suave anestesia con CO₂ dentro de las seis horas posteriores a su eclosión, cuando las alas ya se encontraban extendidas. En ese momento, se removieron las alas de algunos machos empleando tijeras microquirúrgicas (machos sin alas) y los restantes machos permanecieron sin manipular (machos con alas). De esta manera, los machos con o sin alas estuvieron expuestos al CO₂ por el mismo intervalo de tiempo. Ambos tipos de machos y las hembras fueron mantenidos separados por 5-7 días hasta su uso en los experimentos.

2.2.3. Variables medidas

Para evaluar el efecto de las diferentes condiciones acústicas, registramos las siguientes variables: aceptación del macho (AM) y tiempo de latencia hasta la cópula (TLC). La aceptación del macho se computó como una medida binaria, 1 cuando ocurría la cópula y 0 cuando no había cópula. El tiempo de latencia hasta la cópula es el tiempo que transcurre desde que el macho comienza a cortejar a la hembra (*i.e.*, se posiciona detrás de la hembra y/o comienza a perseguirla) hasta que ocurre la cópula. El período de observación se limitó a 10 minutos desde que se comenzaba a registrar TLC. Medir las variables comportamentales desde que el macho inicia el cortejo excluye toda variación debida a las preferencias de los machos, especialmente en los experimentos en los que evaluamos parejas heteroespecíficas. Por lo tanto, TLC puede ser comparado entre condiciones que involucran machos conoespecíficos (Ct+) y machos heteroespecíficos (Ct-/Sc/PC; Experimento 2) sin sesgo alguno. Además, es importante tener en cuenta que los machos de *D. buzzatii* (o *D. koepferae*) son muy promiscuos y, una vez que deciden cortejar, persisten aunque la hembra muestre signos de rechazo como pegar patadas, subir y bajar el abdomen o moverse continuamente.

Utilizamos la duración de la cópula para definir la aceptación del macho en las parejas heteroespecíficas del Experimento 2. Dado que la duración de la cópula podría acortarse en parejas heteroespecíficas debido a procesos que involucran preferencias o discriminación postcópula (Jagadeeshan & Singh 2006; Soto 2012; Soto *et al.* 2013), considerar solo cópulas prolongadas podría subestimar la respuesta de la hembra al comportamiento precópula del macho. Por lo tanto, registramos como aceptación del macho cuando la hembra permanecía por al menos 10 segundos en posición de cópula sin exhibir comportamiento de rechazo (es decir, dar patadas o intentar huir). De todas maneras, se registró la duración de todas las cópulas (ver Tabla 1) y el criterio utilizado se analiza en la sección Discusión.

Se evaluaron 30 parejas por cada combinación de especie, isolínea y condición acústica en cada tratamiento, excepto en el caso de *D. borborema* en el Experimento 2 en el cual dos réplicas debieron descartarse porque los machos no iniciaron el cortejo. Todas las líneas fueron utilizadas en el Experimento 1; sin embargo, el extenso tiempo requerido por los machos para iniciar el cortejo en

parejas heterospecíficas (cuyo efecto nuestro diseño experimental pretende descartar) sumado a nuestro interés en registrar la duración de las cópulas, imposibilitó evaluar un gran número de parejas. Por este motivo se decidió evaluar solo una isolínea por especie en el Experimento 2.

2.2.4. Grabación de los cantos y *playback*

Los cantos utilizados en este capítulo fueron grabados individualmente en formato WAV no comprimido (PCM) empleando un grabador SONY ICD-SX712 y una tasa de muestreo de 44.1 kHz y 16-bits de precisión. Se grabaron los cantos de diez machos por cada combinación isolínea por especie.

Las cámaras de grabación consistieron en cilindros de polimetil metacrilato de 0,5 cm de alto y 1,2 cm de diámetro interno (el mismo diámetro que el micrófono). El micrófono, incorporado en el grabador, constituyó el piso de las cámaras y en el extremo opuesto se utilizó una tapa de gomaespuma por donde se introducían las moscas. Las grabaciones se realizaron en un mismo canal (mono) y en una habitación aislada acústicamente a $25\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ (medido con termómetro digital).

Los machos fueron confrontados con hembras cuyas alas habían sido removidas para evitar la posible interferencia acústica y los cantos fueron grabados hasta que ocurrió la cópula. Antes de su utilización en los experimentos con *playbacks*, los cantos fueron editados para eliminar el período de tiempo transcurrido desde que se introduce la pareja en la cámara hasta que el macho comienza a cantar. Se utilizó el programa Sound Forge 9.0 (Sony Creative Software Inc., 2007) para las ediciones.

Para los *playbacks* se utilizó el mismo grabador acoplado a auriculares SONY MDR-E708. En estos ensayos, se utilizaron cilindros de polimetil metacrilato de 1 cm de alto y 1,2 cm de diámetro interno y se reemplazó el micrófono situado en la base por un auricular. Los diez cantos grabados de una misma isolínea fueron utilizados de forma aleatoria en cada ensayo con *playbacks* conspecíficos en los cuales las hembras siempre procedían de la misma isolínea del macho cuyo canto se reproducía (*playback*). Para los *playbacks* heterospecíficos se eligieron 10 cantos al azar de cada especie utilizada como heteroespecífica y se procedió de la

manera descripta anteriormente. El conjunto de réplicas por especie fue aleatorizado en diferentes sesiones para evitar efectos de confusión.

2.2.5. Análisis estadístico

Debido a que las variables medidas en este estudio describen dos aspectos diferentes de la elección de pareja (Edward 2015), “qué” es elegido (variable AM) y “qué tanto” es elegido (variable TLC), decidimos analizarlas de forma separada. Todos los modelos incluyeron Tratamiento (condición acústica) como factor fijo y para *D. antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae* en el Experimento 1, se incluyó Isolnea como factor aleatorio (solo en estos últimos casos se usaron modelos mixtos). Por lo tanto, para poner a prueba si AM difería entre tratamientos, se ajustó un modelo lineal generalizado mixto [MLGM, usando la función *glmer* del paquete *lme4* (Bates *et al.* 2015)] o un modelo lineal generalizado [MLG, usando la función *glm* en el programa R (version 3.2.0; R Development Core Team 2015)], ambos con distribución binomial de errores y link logit, para cada especie según correspondía. Por otro lado, utilizamos un modelo lineal mixto (MLM, usando la función *lmer* del paquete *lme4* para R) o un modelo lineal (LM usando la función *lm* de R) para investigar las diferencias en TLC entre los tratamientos con más del 50% de AM. La variable TLC fue transformada usando la función logaritmo para satisfacer los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Debido a que este último análisis es desbalanceado se utilizó una suma de cuadrados tipo III [función *Anova* del paquete *car* en R; Fox *et al.* 2015)]. La prueba de Tukey se utilizó para las comparaciones a posteriori usando la función *glht* del paquete *multcomp* en R (Hothorn *et al.* 2015). Por último, empleamos gráficas de Kaplan-Meier [paquete *survival* para R (Therneau & Lumley, 2015)] para presentar visualmente los resultados.

2.3. Resultados

2.3.1. Experimento 1

2.3.1.1. Importancia del estímulo acústico en parejas conespecíficas

Se ensayaron un total de 1320 parejas con el fin de evaluar la importancia de la señal acústica en parejas conspecíficas en cuatro especies del cluster *D. buzzatii* y en *D. venezolana*. La figura 3 resume gráficamente los resultados obtenidos. Las comparaciones pareadas entre tratamientos y los p-valores asociados pueden encontrarse en las tablas S1.1 y S1.2 (Material suplementario) para las variables AM y TLC, respectivamente.

Los análisis de los datos revelaron un efecto significativo del estímulo acústico sobre la aceptación del macho (AM) en todas las especies del cluster *D. buzzatii* analizadas (*D. antonietae*, *D. borborema*, *D. buzzatii* y *D. koepferae*). En efecto, AM se redujo significativamente (en relación al grupo Ct+) cuando los machos sin alas cortejaron en ausencia de *playback* (NP; Figura 3a-d). Esto implica que las alas son importantes para el apareamiento de los machos; sin embargo, no establece la importancia del canto conespecífico. Aunque en todas las especies al menos una hembra aceptó la cópula con un macho sin alas en ausencia de *playback*, la reducción de AM fue mayor en *D. borborema* (Figura 3b) y *D. buzzatii* (Figura 3c) e intermedia en *D. antonietae* (Figura 3a), mientras que *D. koepferae* fue la menos afectada por la ausencia de estas estructuras (Figura 3d). La alta aceptación de machos sin alas por parte de las hembras de *D. koepferae* en ausencia de *playback* (NP: 0,79) estuvo acompañada por un incremento en el tiempo medio de latencia hasta la cópula (TLC; Sc: 87 ± 106 s vs. Ct: 25 ± 43 s, prueba de Tukey: $Z = 6,771$, $P < 0,001$). Esto pone en evidencia que existen diferencias interespecíficas en relación al efecto que la ausencia de alas ejerce sobre la elección de pareja de las hembras. En *D. antonietae*, *D. borborema* y *D. buzzatii* la presencia o ausencia de alas determinó la aceptación o rechazo de los machos en la mayoría de las hembras, mientras que en *D. koepferae* las alas redujeron el tiempo de cortejo necesario para que los machos sean aceptados.

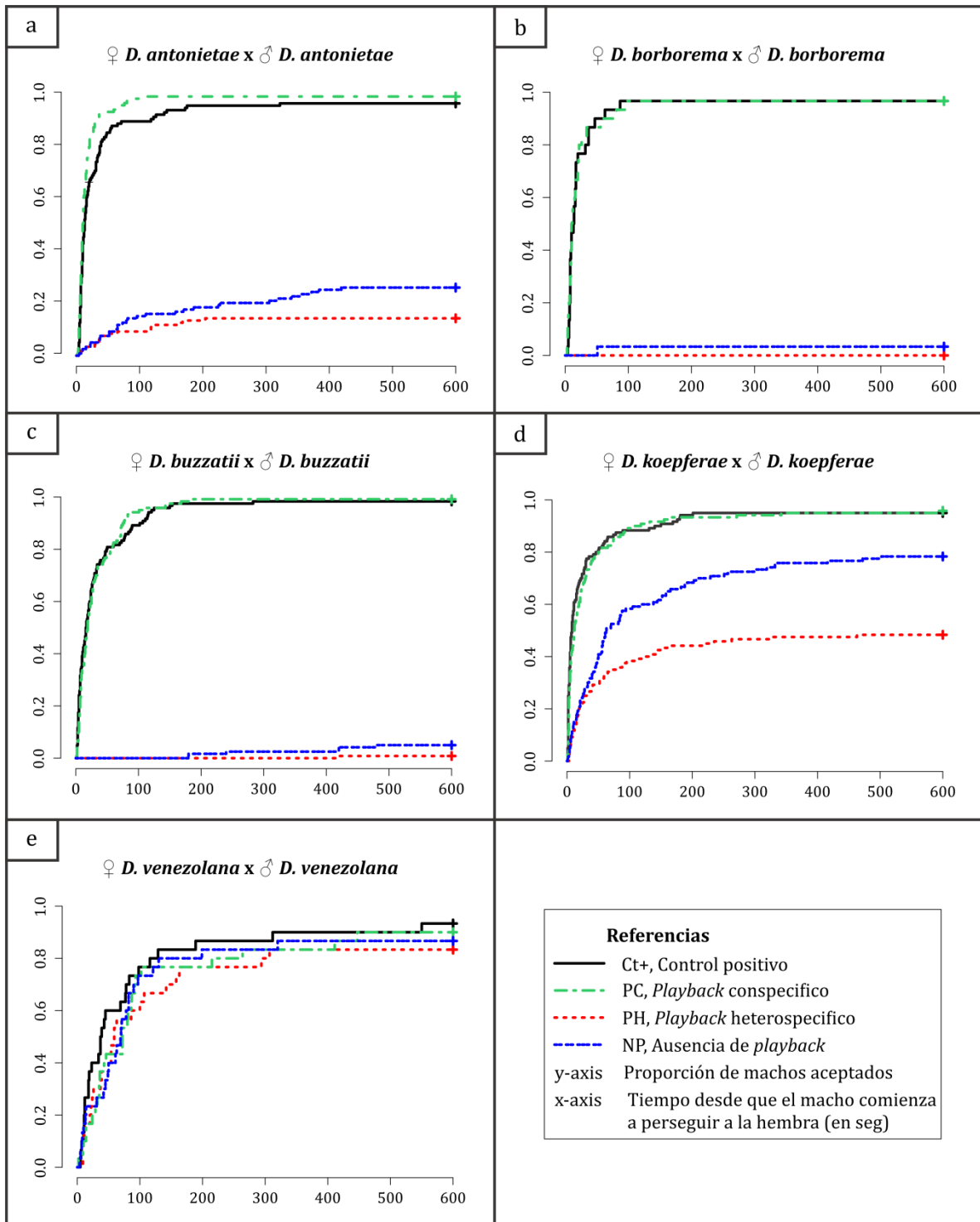


Figura 3. Efecto de diferentes condiciones acústicas sobre la aceptación de los machos y el tiempo de latencia a la cópula usando parejas conespecíficas (Experimento 1). Las diferentes isolíneas de *D. antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae* se encuentran pooleadas en esta figura para simplificar su visualización.

Para determinar la importancia y el rol del canto conoespecífico sobre la elección de pareja, evaluamos si las hembras aceptaban machos sin alas al reproducir un canto conoespecífico versus un canto heteroespecífico. Utilizamos el canto de *D. buzzatii* como canto heteroespecífico porque, como se mencionó antes, todas las hembras provienen de zonas donde coexisten con esta especie (*D. buzzatii* es la única especie que co-ocurre con todas las demás especies del cluster) y por presentar los cantos más diferentes dentro del cluster. Asimismo, cuando se ensayaron hembras de *D. buzzatii* utilizamos el canto de *D. koepferae* dado que las líneas utilizadas provienen de la misma localidad (poblaciones simpátricas).

Al igual que en los ensayos realizados en ausencia de *playback*, AM se redujo significativamente (en relación al grupo Ct+) cuando los machos sin alas cortejaron mientras se reproducía el *playback* heteroespecífico (PH; Figura 3). Sin embargo, el *playback* conoespecífico restauró el comportamiento de las hembras en relación a las dos variables analizadas, AM y TLC (Figura 3). Esto demuestra que la reproducción del canto conoespecífico es suficiente para compensar la ausencia de alas. Por lo tanto, la reducción de AM y el incremento de TLC en los ensayos con machos sin alas en ausencia de *playback* puede explicarse únicamente por la ausencia del canto conoespecífico. Además, no encontramos diferencias significativas entre el *playback* heteroespecífico (PH) y la ausencia de *playback* (NP) en *D. antonietae*, *D. borborema* y *D. buzzatii* (Figura 3a-c; Tabla S1.1). Esto demuestra que el canto de un macho heteroespecífico no estimula ni reduce la aceptación de los machos por parte de las hembras en estas especies. En cambio, en *D. koepferae*, el canto heteroespecífico (Figura 3d; condición PH) tuvo un efecto negativo sobre AM (PH: 0,48) comparado con los machos que cortejaron en ausencia de *playback* (NP: 0,79; prueba de Tukey: $Z = 4,773$, $P < 0,001$). En consecuencia, solo en *D. koepferae* encontramos evidencias en favor de que el canto heteroespecífico reduce AM.

Finalmente, para explorar si los patrones observados en las especies del cluster *D. buzzatii* se encuentran conservados en el complejo *D. buzzatii* o si, por el contrario, existe evidencia de una mayor diversidad, incluimos a *D. venezolana* que forma parte del cluster *D. martensis*. Nuestros resultados revelaron que las diferentes condiciones acústicas ensayadas en *D. venezolana* no difirieron significativamente ni en AM (GLM: $\chi^2_3 = 1,660$; $P = 0,646$) ni en TLC (LM: $F_{3,102} =$

0,457; $P = 0,71$). Esto pone en evidencia que las hembras de *D. venezolana* no requieren del canto conespecífico o de las alas para aceptar a los machos. Además, escuchar el canto de *D. buzzatii* (aunque es largamente alopátrica con *D. venezolana*), tampoco afectó la elección de estas hembras. En consecuencia, podemos concluir el patrón detectado en *D. venezolana* amplía la diversidad detectada en el cluster *D. buzzatii* en relación a las modalidades sensoriales utilizadas por las hembras en la elección de pareja.

2.3.2. Experimento 2

2.3.2.1. Importancia del canto en el aislamiento precópula

Con el fin de evaluar la importancia del canto de cortejo en el aislamiento precópula, cuantificamos las mismas variables respuesta (AM y TLC) en parejas heteroespecíficas utilizando hembras provenientes de poblaciones que se encuentran en simpatria con *D. buzzatii* (o con *D. koepferae* en el caso de las hembras *D. buzzatii*). Los resultados de estos experimentos se resumen gráficamente en la Figura 4. Las comparaciones pareadas entre tratamientos y los p-valores asociados pueden encontrarse en las tablas S1.3 y S1.4 (Material Suplementario) para las variables AM y TLC, respectivamente.

Para determinar si existe aislamiento precópula confrontamos a las hembras de las especies evaluadas con machos de *D. buzzatii* con alas (o de *D. koepferae*, en el caso de las hembras de *D. buzzatii*). En todas las especies, AM fue completamente suprimida en estas parejas (condición Ct-; Figura 4). Por lo tanto podemos concluir que existe un fuerte aislamiento precópula en todas las parejas heteroespecíficas en el intervalo de tiempo considerado. Además, AM también fue completamente suprimida cuando se utilizaron machos sin alas en ausencia de *playback*, es decir, incapaces de emitir el canto heteroespecífico (condición NP; Figura 4). Esto demuestra que el canto heteroespecífico no es el responsable de que las hembras rechacen a los machos heteroespecíficos con alas.

La reproducción del *playback* conespecífico, sin embargo, restauró los valores de las variables AM (PC vs Ct, prueba de Tukey, $Z = 0,464$, $P = 0,966$) y TLC (PC vs Ct, LM: $F_{1,53} = 0,991$, $P = 0,324$) a niveles comparables a los del grupo Ct+ en las parejas conformadas por hembras de *D. buzzatii* y machos de *D. koepferae*. En

consecuencia, el canto conespecífico tuvo un efecto drástico ya que permitió eliminar completamente el aislamiento precópula entre hembras *D. buzzatii* y machos *D. koepferae*.

A su vez, las hembras de *D. antonietae* también aceptaron machos *D. buzzatii* sin alas cuando se reprodujo el canto conespecífico (condición PC) y no se diferenciaron del grupo Ct+ en cuanto a AM (condiciones CP vs Ct+, prueba de Tukey: $Z = -0,581$, $P = 0,937$). No obstante, se encontraron diferencias significativas en TLC; el cortejo fue más largo con el *playback* conespecífico (PC) que en el grupo Ct+ (PC: 27 ± 30 s vs. Ct+: 12 ± 8 s, LM: $F_{1, 56} = 8,9841$, $P < 0,01$). Esto demuestra que, aunque el canto conespecífico es capaz de eliminar el aislamiento precópula entre hembras de *D. antonietae* y machos de *D. buzzatii*, la detección de otro tipo de señales estaría contribuyendo a alargar el tiempo necesario para que la hembra acepte a estos machos comparado con los machos de su especie.

Entre las otras especies examinadas, la reproducción del canto conespecífico (condición PC) falló en restaurar AM en las parejas constituidas por hembras de *D. borborema* y machos de *D. buzzatii* sin alas en relación a los valores del grupo Ct+ [PC: 0,61 vs Ct+: 0,93, $Z = -2,567$, $P < 0,05(0,0477)$]. Sin embargo, es de destacar que más de la mitad de las hembras aceptaron machos de *D. buzzatii* sin alas cuando se usó el *playback* conespecífico. En este caso, si bien el canto conespecífico redujo el aislamiento precópula entre hembras de *D. borborema* y machos de *D. buzzatii*, no fue suficiente para eliminarlo por completo.

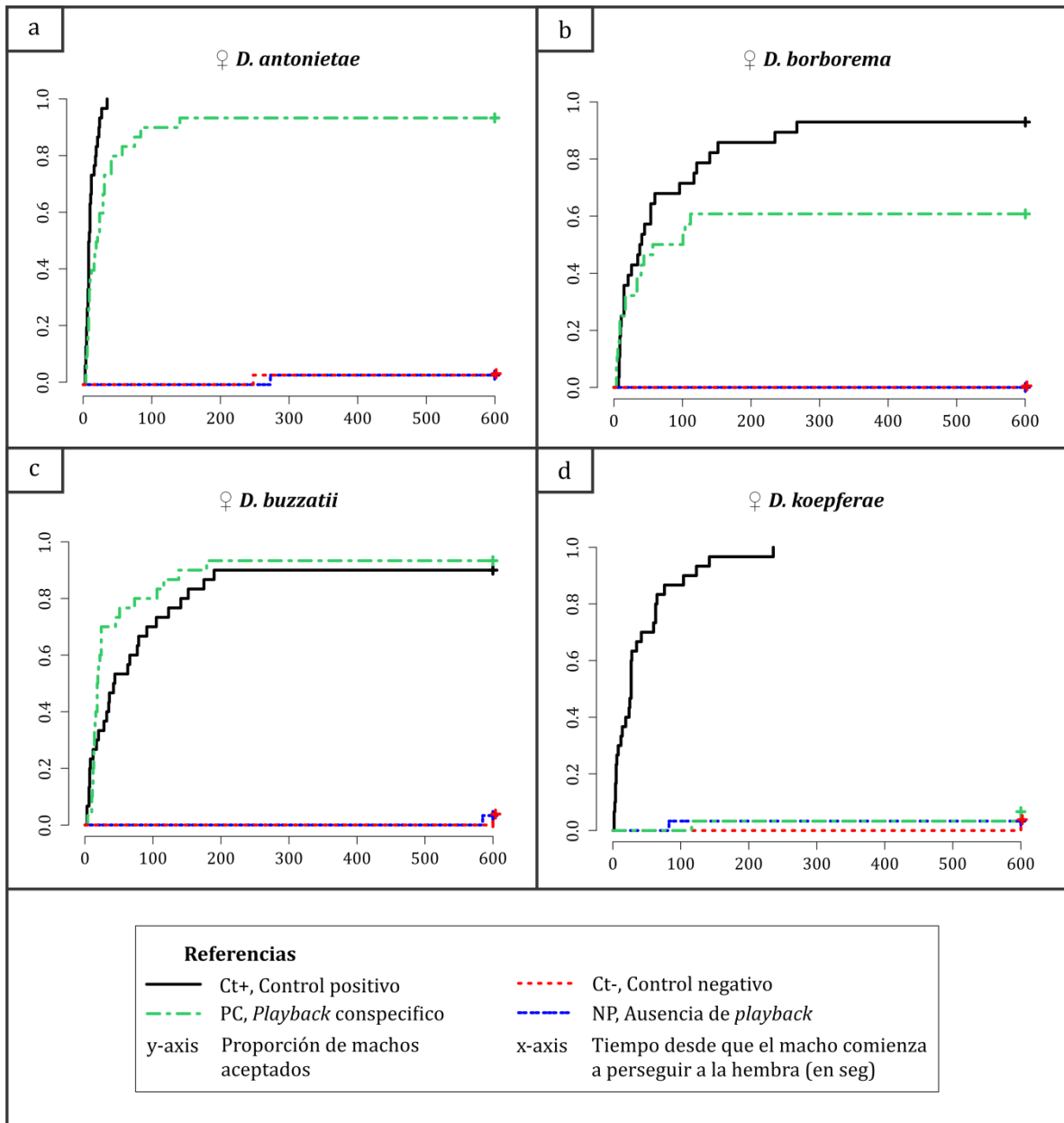


Figura 4. Efecto de diferentes condiciones acústicas sobre la aceptación de los machos y el tiempo de latencia a la cópula usando machos heteroespecíficos (PC, NP y Ct-) y machos conespecíficos (Ct+) en el Experimento 2.

En contraste, AM se redujo drásticamente en *D. koepferae* independientemente de la condición acústica cuando se usaron machos de *D. buzzatii* (Figura 4d). El hecho de que las hembras no aceptaran machos *D. buzzatii* con alas o sin alas en ausencia de *playback* (Figura 4d, condición Ct- y NP, respectivamente) sugiere que, a pesar de que el canto heteroespecífico reduce la aceptación de los machos en *D. koepferae* (Figura 3d, condición PH), el rechazo de los machos *D. buzzatii* sin alas sería consecuencia de otro tipo de señales (Figura 4d, condición NP). Además, las hembras tampoco aceptaron machos sin

alas en presencia del canto conespecífico (Figura 4d, condición PC). Por lo tanto, podemos concluir que el canto conespecífico no es capaz de eliminar ni de reducir el aislamiento precópula entre hembras de *D. koepferae* y machos de *D. buzzatii*.

2.3.2.2. Duración de las cópulas

Se registró la duración de la cópula en todos los casos en los que las hembras aceptaron al macho en el Experimento 2. Existe una considerable variación en la duración de las cópulas conespecíficas de las especies ensayadas (Grupo Ct+ en Tabla 1).

La duración mínima de las cópulas interespecíficas correspondió al 46.6% (♀ *D. antonietae*), 20% (♀ *D. borborema*) y al 47.7% (♀ *D. buzzatii*) de la duración mínima registrada en las parejas Ct+. Estos resultados muestran que el tiempo mínimo de duración de la cópula registrado en la totalidad de las parejas ensayadas duplicó el tiempo de 10 segundos utilizado como criterio para definir la aceptación del macho (Tabla 1). Además, en *D. antonietae*, la duración media de las cópulas heteroespecíficas en presencia del *playback* conespecífico (CP) superó a las del grupo Ct+ (Tabla 1). En el resto de las especies, la duración media de las cópulas en parejas que involucraron machos heteroespecíficos (CP) fueron más cortas respecto del grupo Ct+ (Tabla 1).

Tabla 1. Duración de las cópulas (en segundos) registradas en las parejas del Experimento 2 utilizando machos con alas conespecíficos (Ct+) o heteroespecíficos (Ct-) y machos sin alas heteroespecíficos en dos condiciones acústicas diferentes (NP, PC).

	<i>D. antonietae</i>			<i>D. borborema</i>			<i>D. buzzatii</i>			<i>D. koepferae</i>		
	md	min	max	md	min	max	md	min	max	md	min	max
Ct+	257	191	1559	190	105	290	119	78	229	202	141	307
NP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PC	356	89	1974	48	21	187	68	37	148	—	—	—
Ct-	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Ct+ = Control positivo (usando machos con alas conespecíficos); PC = con *playback* conespecífico; NP = ausencia de *playback*; Ct- = Control negativo (usando machos con alas heteroespecíficos).
md = Media; min = duración mínima; max = duración máxima.

2.4. Discusión

Las señales acústicas de los machos han sufrido una espectacular diversificación en el cluster *D. buzzatii* (Oliveira *et al.* 2013). En consecuencia, se ha sugerido que la selección sexual habría jugado un papel significativo promoviendo la rápida diversificación, el aislamiento reproductivo y, por lo tanto, la especiación (Oliveira *et al.* 2013). Sin embargo, existe evidencia en *Drosophila* de que la señal acústica no siempre es utilizada en la elección de pareja, como en el caso de *D. heteroneura* (Boake & Poulsen 1997), ni reviste la misma importancia cuando es tomada en cuenta para la elección de pareja (revisión en Hoikkala & Mazzi 2009 y Tomaru & Yamada 2011). Por lo tanto, en este capítulo hemos investigado el rol que la señal acústica juega en la elección de pareja de las hembras y en el aislamiento reproductivo evaluando dos aspectos diferentes: “qué” situación acústica favorece la aceptación de los machos (AM) y “qué tan rápido” son elegidos (TLC). Para asegurarnos de poner a prueba solamente las preferencias de las hembras y evitar confundirlas con las preferencias de los machos, eliminamos el tiempo de latencia al cortejo de los machos comenzando los ensayos cuando el macho comenzaba a cortejar (*i.e.*, se posicionaba detrás de la hembra inmediatamente después de la orientación).

2.4.1. Importancia del estímulo acústico para las hembras del cluster *D. buzzatii*

Nuestro estudio reveló que en las especies estudiadas del cluster *D. buzzatii* las señales acústicas son utilizadas como un criterio para la aceptación del macho o influyen en la velocidad con que los machos son aceptados. Por lo tanto, podemos afirmar que la selección sexual efectivamente ha jugado un papel importante en la diversificación de los cantos de este grupo de especies.

El canto de cortejo de *D. buzzatii* es el más diferente dentro del cluster *D. buzzatii*. Es la única especie que presenta “dobletes de pulsos” en el denominado canto A o primario (Ewing & Miyan 1986; Oliveira *et al.* 2013; Capítulos II y III de esta tesis) y, además, los períodos de estos pulsos se diferencian claramente de los del Canto B o secundario (Oliveira *et al.* 2013; Capítulos II y III de esta tesis). Estas propiedades particulares del canto de *D. buzzatii* son parte inherente de la señal acústica de *D. buzzatii* y no presentan variación geográfica al menos en territorio

argentino y brasileño (Oliveira *et al.* 2013; Capítulo III). Por lo tanto, estas características tienen el potencial de convertir a los cantos de cortejo de *D. buzzatii* en señales fácilmente discriminables por las hembras de las restantes especies del cluster y también en señales fácilmente reconocibles por las hembras conespecíficas.

El hecho de que la aceptación de los machos se haya visto reducida cuando los machos conespecíficos cortejaban en silencio o cuando lo hacían en presencia del canto heteroespecífico de *D. buzzatii* (o de *D. koepferae* en el caso de las hembras de *D. buzzatii*; Figura 3), y que el *playback* conespecífico restaurara los valores de AM y TLC a niveles observados en el grupo Ct+, muestra que existen parámetros del canto que estimulan a las hembras de manera especie-específica. Además, y a diferencia de las restantes hembras del cluster, es claro que las hembras de *D. koepferae* discriminan a los machos conespecíficos con el *playback* heteroespecífico de forma más intensa que a los machos conespecíficos que cortejan en silencio (Figura 3d). No obstante, un 40% de las hembras aceptaron al macho aún en presencia del canto de *D. buzzatii*, lo cual refleja algún tipo de similitud entre los cantos que confunde a algunas hembras.

Estos resultados muestran que las hembras de *D. koepferae* son las más diferentes en cuanto al uso de la señal acústica en la elección de pareja. Las hembras aceptan a los machos cuando el canto es conespecífico, reducen intensamente la aceptación de los machos en presencia de un canto heteroespecífico y exhiben una respuesta intermedia cuando el cortejo se produce en ausencia de estímulo acústico (Figura 3d). Debido a que la alta aceptación de machos en ausencia de *playback* estuvo acompañada de un aumento en TLC, la diferencia en AM entre los ensayos en ausencia *playback* y los que incluyeron el *playback* conespecífico podría explicarse por la disminución en el tiempo necesario para que los machos sean aceptados, lo cual ocasiona un aumento en el número de machos aceptados por las hembras en el lapso de tiempo definido en este experimento (*i.e.*, 10 minutos).

De esta manera, la importancia y el efecto del canto conespecífico y heteroespecífico difieren entre las especies. En *D. koepferae* el canto heteroespecífico cumple un rol importante reduciendo el número de apareamientos no compatibles y el canto conespecífico no es particularmente

necesario para conseguir la cópula; sin embargo, reduce el tiempo de cortejo necesario para ser aceptado. En las restantes especies, la presencia o ausencia del canto conespecífico determina la aceptación de los machos en la mayoría de las hembras, mientras que el canto heterospecífico pareciera no cumplir un rol prioritario en la elección de pareja debido a que no encontramos diferencias significativas entre la ausencia de *playback* y la presencia de un *playback* heteroespecífico (Tabla S1.1). Asimismo, es importante notar que al menos una hembra aceptó al macho en ausencia del *playback* conespecífico en *D. antonietae*, *D. borborema* y *D. buzzatii*. Esto sugiere la existencia de variación intraespecífica entre las hembras de las especies mencionadas en relación a las modalidades sensoriales utilizadas en la elección de pareja, y que esta variación es mayor en *D. antonietae* (Figura 3 A-C). No obstante, la aceptación de los machos en ausencia del *playback* conespecífico siempre implicó un TLC mayor (Figura 3 A-C).

Además, nuestros resultados sugieren que la señal acústica emitida a través de un parlante o directamente de la vibración de las alas de un macho sin manipular es procesada de manera equivalente por el sistema nervioso de las hembras. Este hallazgo contrasta con los resultados de estudios en *D. melanogaster*, en los cuales la reproducción del canto conespecífico natural o generado artificialmente consistentemente reduce AM con respecto a los controles (Bennet-Clark & Ewing 1969; Kyriacou & Hall 1982; Ritchie *et al.* 1999; Rybak *et al.* 2002; Talyn & Dowse 2004). Se han propuesto diversas explicaciones para dar cuenta de estas observaciones, entre ellas, que la vibración de las alas puede contribuir también a esparcir feromonas que estimularían la receptividad de las hembras (Rybak *et al.* 2002). Sin embargo, nuestros resultados muestran que las alas no están proveyendo o facilitando ninguna señal visual o química en estas especies.

2.4.2. Importancia del estímulo acústico en el complejo *D. buzzatii*

Con el fin de explorar si la importancia de la señal acústica muestra un patrón conservado por fuera del cluster *D. buzzatii*, incluimos en el estudio a *D. venezolana* como representante del cluster *D. martensis*.

Las hembras de esta especie aceptaron a los machos conespecíficos independientemente de la condición acústica (Figura 3E), lo cual implica que el

estímulo acústico no sería relevante para las hembras durante el cortejo dado que ni siquiera encontramos diferencias en TLC. En este sentido, nuestros resultados sugieren que otras señales influyen sobre la elección de pareja en *D. venezolana*.

En consecuencia, y aunque solo hemos estudiado una única especie por fuera del cluster *D. buzzatii*, podemos concluir que el uso de la señal acústica en la elección de pareja de las hembras no es una característica que se encuentra conservada en el complejo *D. buzzatii*. Sin embargo, el estudio de más representantes del cluster *D. martensis* permitirá establecer si la pérdida del uso del canto de cortejo en la elección de pareja de las hembras es una característica compartida por todas las especies del cluster *D. martensis* o si, por el contrario, es una autapomorfía de *D. venezolana*.

Hasta el momento, nuestros resultados sugieren que en la historia evolutiva del complejo *D. buzzatii* (integrado por los clusters *D. buzzatii*, *D. martensis* y *D. stalkerii*) ocurrió al menos un cambio en las preferencias de las hembras que trajo aparejado un cambio en el canal sensorial utilizado, dado que las hembras pasaron de procesar la información sobre la calidad y/o compatibilidad de los machos usando señales no acústicas a usar parámetros acústicos, o viceversa. Sin embargo, para poder definir con exactitud el nodo del árbol filogenético donde surgió este cambio evolutivo, y la polaridad (dirección) de la transformación, es necesario contar con más representantes de los grupos hermanos (clusters *D. martensis* y *D. stalkerii*).

2.4.3. El canto de cortejo y su rol en el aislamiento precópula

Drosophila buzzatii se destaca como la especie más divergente dentro del cluster *D. buzzatii* no solo en la composición de sus cantos de cortejo, sino también en aspectos ecológicos, morfológicos y geográficos. Si bien es la única especie que utiliza cactus del género *Opuntia* como hospedadores primarios, también tiene la capacidad de utilizar cactus columnares como hospedadores secundarios (Hasson *et al.*, 1992). Por ejemplo, se ha observado la emergencia de *D. buzzatii* de las necrosis de cactus columnares en áreas donde se encuentra en simpatria con *D. koepferae* y ambos tipos de recursos (tunas y columnares) se encuentran presentes (Fanara *et al.* 1999). Esto indica que existe un cierto grado de solapamiento de nicho. Debido a que *D. buzzatii*, además, es la única especie que

co-ocurre con todas las demás especies del cluster, la diferenciación en las señales acústicas de los machos, o en el canal sensorial utilizado por las hembras para la elección de pareja, tienen el potencial de reducir o evitar apareamientos incompatibles en simpatria. Utilizando parejas heteroespecíficas que involucraron hembras provenientes de poblaciones simpátricas, evaluamos el rol del canto de cortejo en el aislamiento precópula entre *D. buzzatii* y las restantes especies del cluster.

Las hembras exhibieron un fuerte aislamiento precópula cuando fueron confrontadas con machos heteroespecíficos alados (Figura 4a-d, condición acústica Ct-) y dicho aislamiento no se alteró al utilizar machos heteroespecíficos sin alas, es decir, en ausencia del canto heteroespecífico (Figura 4a-d, condición NP). En consecuencia, podemos descartar que el canto heteroespecífico juegue un rol primordial en el aislamiento precópula. La única especie capaz de discriminar en contra del canto heteroespecífico en el Experimento 1 fue *D. koepferae*. Sin embargo, un 40% de las hembras copularon cuando se reprodujo el canto de *D. buzzatii*. Nuestro estudio sugiere que la capacidad de discriminar el canto heteroespecífico observada en la mayoría de las hembras de *D. koepferae* en el Experimento 1 reforzaría el aislamiento precópula, pero no lo determina, dado que el aislamiento no se redujo al eliminar la señal heteroespecífica en el Experimento 2.

Por otra parte, encontramos que la importancia del canto conoespecífico en el aislamiento precópula muestra variación interespecífica. En efecto, con solo reproducir el canto conoespecífico se logró que las hembras de *D. antonietae*, *D. borborema* y *D. buzzatii* acepten machos heteroespecíficos sin alas. En contraposición, las hembras de *D. koepferae* rechazaron machos de *D. buzzatii* en todas las condiciones acústicas (Figura 4d).

Sin embargo, el canto conoespecífico no tuvo el mismo efecto entre las hembras de las especies que lograron ser engañadas. La reproducción de la señal conoespecífica fue suficiente para romper completamente el aislamiento precópula entre las hembras de *D. buzzatii* y los machos de *D. koepferae* dado que no se registraron diferencias significativas ni en AM ni en TLC al ser comparados con el grupo Ct+ (Figura 4c; condición CP y Ct+). No obstante, otras señales parecen ejercer un efecto sobre estas variables en el caso de *D. antonietae* y *D. borborema*.

Las hembras de *D. antonietae* no mostraron diferencias con el grupo control en relación a la variable AM, sin embargo tardaron más en aceptar a los machos de *D. buzzatii* que a los de su especie (Tabla S1.2). En el Experimento 1 habíamos observado que escuchar el canto proveniente directamente de la vibración de las alas o por medio de un parlante no altera la respuesta de las hembras en estas especies. Por lo tanto, podemos inferir que algún tipo de señal transmitida por los machos *D. buzzatii* a través de un canal sensorial diferente del acústico resulta menos atractiva para las hembras de *D. antonietae* que las emitidas por los machos de su especie. En *D. borborema*, por el contrario, disminuyó significativamente la aceptación de los machos (Figura 4b), aún así el 60% de las hembras fueron engañadas y aceptaron al macho *D. buzzatii*. Esto indica que otras señales emitidas durante el cortejo también están ejerciendo influencia sobre la elección de pareja en *D. borborema*. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que los machos *D. buzzatii* puedan variar en la intensidad del cortejo hacia las hembras *D. borborema* dado que estos machos tardaron más en iniciar el cortejo cuando fueron confrontados con las hembras de *D. borborema* (observación personal) y algunos nunca iniciaron el cortejo.

La implicancia del canto de cortejo como principal responsable del aislamiento entre especies simpátricas ya ha sido reportado en *D. montana* (Saarikettu *et al.* 2005) y en el complejo de especies *D. athabasca* (Yukilevich *et al.* 2016).

Es importante notar que solo las líneas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* utilizadas en este trabajo provienen de la misma localidad y, por lo tanto, representan poblaciones simpátricas. En cambio, las hembras de las líneas de *D. antonietae* (Isla Martín García) y de *D. borborema* (Morro do Chapeau, Brasil) provienen de poblaciones simpátricas con *D. buzzatii*, pero alopátricas respecto de los machos de *D. buzzatii* utilizados como heteroespecíficos en este trabajo. No esperamos que esto tenga un impacto en los resultados del Experimento 1, dado que de existir desplazamiento de caracteres en simpatría la respuesta al canto heteroespecífico sería aún más drástica. Sin embargo, en el Experimento 2, es posible que la existencia de desplazamiento de caracteres en las señales percibidas por modalidades diferentes a la acústica tenga el potencial de reducir el efecto del *playback* conoespecífico en estas dos especies. No obstante, esperamos que, en caso

de ocurrir dicha reducción, no sea tan intensa como la observada en *D. koepferae* debido a que en el Experimento 1 (utilizando parejas conespecíficas) la ausencia de *playback* mostró una drástica reducción en el número de cópulas de *D. antonietae* y de *D. borborema* en relación a lo observado para *D. koepferae*. Por lo tanto, las señales no acústicas serían menos importantes para las hembras de *D. antonietae* y de *D. borborema* que para las hembras de *D. koepferae*.

2.4.4. Duración de las cópulas

Para determinar la aceptación del macho en las parejas heteroespecíficas del Experimento 2 utilizamos el criterio de considerar como aceptación los casos en los que las parejas permanecían en posición de cópula sin mostrar signos de rechazo por parte de las hembras por al menos 10 segundos. Debido a que *D. buzzatii* tiene el aedeago más pequeño en comparación con los de las demás especies, se podría hipotetizar que la permanencia en posición de cópula podría encontrarse imposibilitada en parejas heteroespecíficas que involucran tanto machos como hembras *D. buzzatii* debido a algún tipo de incompatibilidad mecánica.

El tamaño del aedeago de los machos de *D. antonietae* y *D. koepferae* es similar (Manfrin & Sene, 2006; Figura 10 en Introducción General), sin embargo, al reproducir el canto conespecífico en el Experimento 2 no se observaron cópulas cuando se usaron hembras *D. koepferae* y todas las hembras copularon cuando se usaron hembras *D. antonietae*. En efecto, cuando se usaron hembras *D. antonietae*, el tiempo mínimo registrado de permanencia en la posición de cópula fue de 89 segundos (Tabla 3) y el tiempo medio de duración de las cópulas fue aún mayor que en las parejas Ct+ usando machos *D. antonietae* (tabla 3). Asimismo, cuando se utilizaron hembras *D. buzzatii* con machos *D. koepferae*, el tiempo mínimo de permanencia en la posición de cópula fue de 37 segundos (tres veces más que el tiempo considerado como criterio de aceptación) y la duración media de las cópulas se redujo un 43% con respecto a las parejas control. La menor duración de cópulas se registró al utilizar hembras *D. borborema*, a pesar de que los machos de esta especie tienen un tamaño de aedeago intermedio entre el aedeago de los machos *D. buzzatii* y los aedeagos de *D. antonietae* y *D. koepferae*. No obstante, el tiempo mínimo registrado duplicó el tiempo utilizado como criterio de aceptación.

La hipótesis de la llave y cerradura propone que el aislamiento reproductivo es producto del aislamiento estructural debido a diferencias en la morfología genital (Dufour 1844). Posteriormente, se propuso que de acuerdo con esta hipótesis el aislamiento reproductivo podía operar a través de dos mecanismos diferentes. El primer mecanismo es denominado clásico o estructural y corresponde a la existencia de incompatibilidades mecánicas que reducen o impiden la cópula y/o la inseminación (Shapiro & Porter 1989; Kamimura & Mitsumoto 2012). El segundo mecanismo se denomina sensorial y propone que las diferencias morfológicas son percibidas por uno o ambos sexos y evocan respuestas comportamentales o fisiológicas que dan lugar a la terminación prematura de la cópula o a una reducción del *fitness* reproductivo postcópula (Eberhard 1992). Un gran número de evidencia experimental no brinda apoyo al mecanismo estructural, sin embargo, no descarta que el mecanismo sensorial pueda encontrarse ampliamente extendido limitando el flujo génico entre especies (revisión en Masly 2011). Nuestros resultados se suman a la evidencia experimental que apoya el mecanismo sensorial, a la vez que demuestran que el criterio utilizado para definir aceptación en las parejas heteroespecíficas del Experimento 2 resulta apropiado para no confundir el efecto de los caracteres pre- (*e.g.*, cantos) y postcópula (*e.g.*, morfología del aedeago) en la elección de parejas de las hembras.

2.6. Conclusiones

En este Capítulo aportamos evidencia de que las señales acústicas, en las especies estudiadas del cluster *D. buzzatii*, son utilizadas como un criterio para la aceptación del macho o influyen en la velocidad con que los machos son aceptados. Aunque nuestro estudio incluyó tres especies (*D. antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae*) que divergieron tempranamente dentro del cluster y una más derivada (*D. borborema*), no podemos concluir que esto sea así para todo el cluster *D. buzzatii*.

Además, observamos que esta característica no es compartida por *D. venezolana*, la especie representante del cluster *D. martensis* que utilizamos como grupo externo, lo cual indica que existe una mayor diversidad en relación a las modalidades sensoriales utilizadas por las hembras durante el cortejo en el complejo *D. buzzatii*.

Por otra parte, encontramos que las especies estudiadas del cluster *D. buzzatii* difieren en cuanto al rol que los cantos conoespecíficos y heteroespecíficos tienen en la elección de pareja de las hembras, y en el aislamiento precópula en relación a la única especie semi-cosmopolita, *D. buzzatii*. En consecuencia, nuestros resultados apuntan a que la divergencia en las preferencias de las hembras por los cantos de cortejo, así como el uso de diversas modalidades sensoriales durante el cortejo ejercerían diferentes presiones selectivas que habrían moldeado diferencialmente la señal acústica en los diferentes linajes.

No obstante, nuestro estudio también reveló la existencia de variación intraespecífica en las preferencias de las hembras, dado que una minoría de las hembras se comportó de manera diferente en algunas condiciones acústicas. Futuros estudios que aborden la variación intraespecífica en cada una de las especies nos permitirán conocer que tan conservado se encuentran el patrón de divergencia interespecífico observado en este trabajo, así como también entender las causas que subyacen a la variación en las preferencias entre las hembras de una misma especie.

2.7. Bibliografía

- Bates D., Maechler M., Bolker B., Walker S., Christensen R. H. B., Singmann H., Dai B. & Grothendieck G. (2015) Package 'lme4'.
- Bennet-Clark H. C. & Ewing A. W. (1969) Pulse interval as a critical parameter in the courtship song of *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour* **17**, 755–759.
- Blyth J. E., Lachaise D. & Ritchie M. G. (2008) Divergence in multiple courtship song traits between *Drosophila santomea* and *D. yakuba*. *Ethology* **114**, 728–736.
- Boake C. R. B. & Poulsen T. (1997) Correlates versus predictors of courtship success: courtship song in *Drosophila silvestris* and *D. heteroneura*. *Animal Behaviour* **54**, 699–704.
- Bro-Jørgensen J. (2010) Dynamics of multiple signalling systems: animal communication in a world in flux. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 292–300.
- Castellano S. & Cermelli P. (2006) Reconciling sexual selection to species recognition: a process-based model of mating decision. *Journal of Theoretical Biology* **242**, 529–538.
- Cerda H. & Fontdevilla A. (1998) Evolutionary divergence of *Drosophila venezolana* (*martensis* Cluster, *buzzatii* Complex) on Gran Roque Island, Venezuela. *Drosophila Information Service* **81**, 144–147.
- Costa C. & Sene F. (2002) Characterization of courtship sounds of species of the subgroup *fasciola* (Diptera, Drosophilidae, *Drosophila repleta* group): interspecific and interpopulational analyses. *Brazilian Journal of Biology* **62**, 573–583.
- Cowling D. E. & Burnet B. (1981) Courtship songs and genetic control of their acoustic characteristics in sibling species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Animal Behaviour* **29**, 924–935.
- Darwin C. (1871) *The descent of man, and selection in relation to sex*.
- Dickson B. J. (2008) Wired for sex: the neurobiology of *Drosophila* mating decisions. *Science* **322**, 904–909.
- Dufour L. (1844) Anatomie générale des Diptères. *Annales des Sciences Naturelles* **1**, 244–264.

- Eberhard W. G. (1992) Species isolation, genital mechanics, and the evolution of species-specific genitalia in three species of *Macrodactylus* beetles (Coleoptera, Scarabeidae, Melolonthinae). *Evolution* **46**, 1774–1783.
- Edward D. A. (2015) The description of mate choice. *Behavioral Ecology* **26**, 301–310.
- Ewing A. W. (1979) Complex courtship songs in the *Drosophila funebris* species group: escape from an evolutionary bottleneck. *Animal Behaviour* **27**, 343–349.
- Ewing A. W. & Miyan J. A. (1986) Sexual selection, sexual isolation and the evolution of song in the *Drosophila repleta* group of species. *Animal Behaviour* **34**, 421–429.
- Fanara J. J., Fontdevila A. & Hasson E. (1999) Oviposition preference and life history traits in cactophilic *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association with their natural hosts. *Evolutionary Ecology* **13**, 173–190.
- Fox J., Weisberg S., Adler D., Bates D., Baud-Bovy G., Ellison S., Firth D., Friendly M., Gorjanc G., Graves S., Heiberger R., Laboissiere R., Monette G., Murdoch D., Nilsson H., Ogle D., Ripley B., Venables W., Zeileis A. & R-Core. (2015) Package ‘car’.
- Hennig R. M., Heller K.-G. & Clemens J. (2014) Time and timing in the acoustic recognition system of crickets. *Frontiers in Physiology* **5**.
- Hoikkala A., Kaneshiro K. Y. & Hoy R. R. (1994) Courtship songs of the picture-winged *Drosophila planitibia* subgroup species. *Animal Behaviour* **47**, 1363–1374.
- Hoikkala A. & Lumme J. (1987) The genetic basis of evolution of the male courtship sounds in the *Drosophila virilis* group. *Evolution* **41**, 827–845.
- Hoikkala A. & Mazzi D. (2009) Evolution of complex acoustic signals in *Drosophila* species. In: *Handbook of Behavior Genetics* (ed Y.-K. Kim) pp. 187–196. Springer, New York.
- Hothorn T., Bretz F., Westfall P., Heiberger R. M., Schuetzenmeister A., Scheibe S. & Hothorn M. T. (2015) Package ‘multcomp’.
- Jagadeeshan S. & Singh R. (2006) A time-sequence functional analysis of mating behaviour and genital coupling in *Drosophila*: role of cryptic female choice

- and male sex-drive in the evolution of male genitalia. *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 1058–1070.
- Jennions M. D. & Petrie M. (1997) Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biological Reviews* **72**, 283–327.
- Kamimura Y. & Mitsumoto H. (2012) Lock-and-key structural isolation between sibling *Drosophila* species. *Entomological Science* **15**, 197–201.
- Kuhn G., Franco F. F., Martinez-Rossi N. M. & Sene F. M. (2003) On the pBuM189 satellite DNA variability among south american populations of *Drosophila buzzatii*. *Hereditas* **139**, 161–166.
- Kyriacou C. P. & Hall J. C. (1982) The function of courtship song rhythms in *Drosophila*. *Animal Behaviour* **30**, 794–801.
- Liimatainen J., Hoikkala A., Aspi J. & Welbergen P. (1992) Courtship in *Drosophila montana*: the effects of male auditory signals on the behaviour of flies. *Animal Behaviour* **43**, 35–48.
- Manfrin M. H. & Sene F. M. (2006) Cactophilic *Drosophila* in South America: a model for evolutionary studies. *Genetica* **126**, 57–75.
- Markow T. A. & O'Grady P. M. (2005) Evolutionary genetics of reproductive behavior in *Drosophila*: connecting the dots. *Annual Review of Genetics* **39**, 263–291.
- Masly J. P. (2011) 170 years of “lock-and-key”: genital morphology and reproductive isolation. *International Journal of Evolutionary Biology* **2012**, 247352 [1–11].
- Noor M. A. F. (1999) Reinforcement and other consequences of sympatry. *Heredity* **83**, 503–508.
- Oliveira C. C., Manfrin M. H., Sene F. M. & Etges W. J. (2013) Evolution of male courtship songs in the *Drosophila buzzatii* species cluster. In: *Speciation: natural processes, genetics and biodiversity* (ed P. Michalak) pp. 137–164. Nova Science Publishers, New York.
- Oliveira C. C., Manfrin M. H., Sene F. M., Jackson L. L. & Etges W. J. (2011) Variations on a theme: diversification of cuticular hydrocarbons in a clade of cactophilic *Drosophila*. *BMC Evolutionary Biology* **11**, 179.
- R Development Core Team. (2015) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

- Ritchie M. G., Halsey E. J. & Gleason J. M. (1999) *Drosophila* song as a species-specific mating signal and the behavioural importance of Kyriacou & Hall cycles in *D. melanogaster* song. *Animal Behaviour* **58**, 649–657.
- Rodríguez-Trelles F., Alarcón L. & Fontdevila A. (2000) Molecular evolution and phylogeny of the *buzzatii* complex (*Drosophila repleta* group): a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 1112–1122.
- Ruiz A. & Wasserman M. (1993) Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity* **70**, 582–596.
- Rybak F., Aubin T., Moulin B. & Jallon J.-M. (2002) Acoustic communication in *Drosophila melanogaster* courtship: Are pulse-and sine-song frequencies important for courtship success? *Canadian Journal of Zoology* **80**, 987–996.
- Saarikettu M., Liimatainen J. O. & Hoikkala A. (2005) The role of male courtship song in species recognition in *Drosophila montana*. *Behavior Genetics* **35**, 257–263.
- Shapiro A. M. & Porter A. H. (1989) The lock-and-key hypothesis: evolutionary and biosystematic interpretation of insect genitalia. *Annual Review of Entomology* **34**, 231–245.
- Soto I. M. (2012) Aedeagal divergence in sympatric populations of two sibling species of cactophilic *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): evidence of character displacement? *Neotropical Entomology* **41**, 207–213.
- Soto I. M., Carreira V. P., Soto E. M., Márquez F., Lipko P. & Hasson E. (2013) Rapid divergent evolution of male genitalia among populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolutionary Biology* **40**, 395–407.
- Talyn B. C. & Dowse H. B. (2004) The role of courtship song in sexual selection and species recognition by female *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour* **68**, 1165–1180.
- Therneau T. M. & Lumley T. (2015) Package ‘survival’. Verze.
- Tomaru M., Doi M., Higuchi H. & Oguma Y. (2000) Courtship song recognition in the *Drosophila melanogaster* complex: heterospecific songs make females receptive in *D. melanogaster*, but not in *D. sechellia*. *Evolution* **54**, 1286–1294.
- Tomaru M., Matsubayashi H. & Oguma Y. (1995) Heterospecific inter-pulse intervals of courtship song elicit female rejection in *Drosophila biauraria*. *Animal Behaviour* **50**, 905–914.

- Tomaru M. & Oguma Y. (1994) Differences in courtship song in the species of the *Drosophila auraria* complex. *Animal Behaviour* **47**, 133–140.
- Tomaru M. & Oguma Y. (2000) Mate choice in *Drosophila melanogaster* and *D. sechellia*: criteria and their variation depending on courtship song. *Animal Behaviour* **60**, 797–804.
- Tomaru M. & Yamada H. (2011) Courtship of *Drosophila*, with a special interest in courtship songs. *Low Temperature Science* **69**, 61–85.
- Wiens J. J. (2001) Widespread loss of sexually selected traits: how the peacock lost its spots. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 517–523.
- Yukilevich R., Harvey T., Nguyen S., Kehlbeck J. & Park A. (2016) The search for causal traits of speciation: Divergent female mate preferences target male courtship song, not pheromones, in *Drosophila athabasca* species complex. *Evolution* **70**, 526–542.

Capítulo II

Variación genética y ambiental de la señal acústica en

D. buzzatii y *D. koepferae*

3.1. Introducción

La especiación ecológica ocurre cuando las poblaciones se aíslan reproductivamente como resultado de la adaptación a ambientes diferentes (Rundle & Nosil 2005). Muchos trabajos señalan que este tipo de especiación ha jugado un papel importante en la diversificación de muchos grupos de insectos fitófagos (StiremanIII *et al.* 2005; Matsubayashi *et al.* 2010). En general, la colonización de un nuevo hospedador produce efectos de largo alcance sobre la biología de estos organismos (Carroll *et al.* 1998; Soto *et al.* 2007; Coccoft *et al.* 2010; Ruiz-Montoya & Núñez-Farfán 2013). Sin embargo, para que la divergencia tenga lugar los caracteres afectados deben estar sujetos no solo a selección divergente sino también a apareamiento no aleatorio (Servedio *et al.* 2011). Si los caracteres sexuales transmiten información acerca de la identidad del hospedador en el cual se ha desarrollado un individuo podrían facilitar la adaptación ecológica (Rodríguez *et al.* 2008; Butlin *et al.* 2012; Wilkins *et al.* 2013). La habilidad de identificar parejas que se hayan desarrollado en un ambiente similar puede suponer una ventaja selectiva, permitiendo que los organismos cuyos genotipos sean compatibles con la supervivencia en un ambiente dado encuentren otros con la misma característica (Hirsch & Tompkins 1994; Rodríguez *et al.* 2008). Sin embargo, con el paso del tiempo, los fenotipos inducidos por el ambiente podrían experimentar lo que se conoce como “asimilación genética”, un proceso por el cual se pierde la sensibilidad ambiental y los fenotipos comienzan a expresarse constitutivamente (Pfennig *et al.* 2010).

En simpatría, los individuos de especies con un fuerte aislamiento post-zigótico, en los que el cortejo y la oviposición ocurren en el hospedador, pero la especialización por los hospedadores no es completa, necesitan ser capaces de discriminar entre individuos conespecíficos y heterospecíficos (Otte *et al.* 2016).

Diversos estudios han demostrado que el uso diferencial de recursos puede afectar tanto las señales como las preferencias sexuales y, de esta manera, alterar la relación entre la variación en las señales y el éxito en el apareamiento, es decir, cambiar la naturaleza de la selección sexual (Cocroft *et al.* 2010).

En este contexto es importante establecer si existe alguna relación entre el uso diferencial de los recursos y los caracteres involucrados en el cortejo y cómo esto afecta al aislamiento reproductivo (Butlin *et al.* 2012). Para empezar, es necesario entender la naturaleza de los procesos involucrados en el control de la variación fenotípica de los caracteres sexuales: la relación entre plasticidad fenotípica (cambio en la media de los fenotipos expresados en diferentes ambientes) y canalización (la capacidad de producir consistentemente un fenotipo independientemente del ambiente) (Debat *et al.* 2009).

La comprensión de la relación entre los cambios en el uso de los recursos y la divergencia en los caracteres sexuales requiere idealmente de especies estrechamente emparentadas que se especialicen en recursos diferentes y para las cuales se hayan identificado los caracteres involucrados en el aislamiento reproductivo (Etges 2002; Cocroft *et al.* 2010).

Drosophila buzzatii y *D. koepferae* son especies hermanas que forman parte del cluster *buzzatii* y tienen rangos de distribución parcialmente solapados en las regiones áridas y semiáridas de la Argentina. *Drosophila buzzatii* se alimenta y pone sus huevos preferencialmente en cactáceas del género *Opuntia* (tunas), en tanto que *D. koepferae* lo hace en cactáceas de los géneros *Cereus* y *Trichocereus* (cardones) (revisión en Hasson *et al.* 2009). Sin embargo, ambas especies tienen un solapamiento parcial de nicho ya que pueden desarrollarse hasta alcanzar el estado adulto en las necrosis naturales de ambos tipos de recursos (Hasson *et al.* 1992; Fanara *et al.* 1999). Estos hospedadores representan ambientes nutricionales y químicos muy diferentes. Las *Opuntia* son ricas en azúcares libres (mono- y disacáridos), carbohidratos y grasas saturadas y poli-insaturadas (Stintzing & Carli 2005; Carreira *et al.* 2014), mientras que las cactáceas del género *Trichocereus* contienen alcaloides como mescalina y trichocereína (Reti & Castrillon 1951; Corio *et al.* 2013; Padró & Soto 2013; De Panis *et al.* 2016). El desarrollo de las larvas en estos ambientes alternativos tiene consecuencias diferenciales en la supervivencia, la tasa de desarrollo e incluso en la morfología

(por ejemplo el tamaño corporal y el tamaño y la forma del ala y del aedeago) (Fanara *et al.* 1999; Soto *et al.* 2007; Hasson *et al.* 2009). Asimismo, un estudio reciente acerca del efecto del recurso de cría sobre el apareamiento utilizando moscas criadas en ambos tipos de recursos, reveló que los machos de estas especies son más exitosos cuando se desarrollan en sus respectivos recursos primarios (Hurtado *et al.* 2012). Sin embargo, el diseño experimental utilizado no permitió dilucidar si este resultado era consecuencia de variaciones en las preferencias de las hembras (feromonas o cantos que covarían con el recurso de cría) o en el comportamiento de los machos (por ejemplo, en el tiempo de latencia en iniciar el cortejo). Existe evidencia de que la tendencia de algunos machos a comenzar antes o después el cortejo es un factor importante que afecta el éxito reproductivo (Hoikkala & Suvanto 1999).

En el Capítulo 1 de esta tesis hemos establecido la importancia relativa de la comunicación acústica en la elección de pareja de las hembras del cluster *D. buzzatii*. Observamos que las especies hermanas *D. buzzatii* y *D. koepferae* son las más divergentes; el aislamiento reproductivo y la aceptación de los machos dependen de la señal acústica en *D. buzzatii*, mientras que las hembras de *D. koepferae* pueden prescindir de esta señal.

El uso de recursos alternativos puede generar cambios en la señal acústica por medio de plasticidad fenotípica en el desarrollo neuronal o como subproducto debido a cambios correlacionados (pleiotropía o ligamiento) que alteran la producción de la señal (Pfennig *et al.* 2010).

La plasticidad fenotípica cambia la media de los fenotipos expresados en diferentes ambientes (Schlichting & Pigliucci 1998) y promueve la acumulación y liberación de variación genética críptica (Ghalambor *et al.* 2007; Pfennig *et al.* 2010). De esta manera, la variación genética subyacente permite responder rápidamente a la selección. Además, si existe variación genética en las normas de reacción, la aptitud de los genotipos podría modificarse de manera independiente en cada ambiente (Falconer & Mackay 1996). Este fenómeno se conoce como interacción genotipo-ambiente y mantiene la variación genética bajo selección si hay suficiente flujo génico entre los hospedadores, pero puede promover la divergencia si el flujo génico se reduce (Pfennig *et al.* 2010). En *D. mojavensis*, una especie cactófila del desierto de Sonora, se ha reportado la existencia de

interacciones genotipo-ambiente para varios parámetros del canto (Etges *et al.* 2007). Además, se ha sugerido que la plasticidad de la función neurológica podría dar cuenta, al menos en parte, de tales diferencias (Smith *et al.* 2013).

Por otro lado, un cambio en la morfología inducida por el ambiente puede estar acompañada de cambios en el comportamiento (Derryberry *et al.* 2012; Wilkins *et al.* 2013). Un ejemplo clásico lo constituyen los pinzones de Darwin en los cuales variaciones en el tamaño y la forma del pico han tenido un impacto directo en la diversificación de sus cantos (Podos 2001). En *D. melanogaster* se ha observado que la reducción en el tamaño del músculo torácico del ala *hg1*, que se encuentra más desarrollado en los machos, reduce el volumen al cual se emite la nota sinusoidal no pulsada (*sine song*), pero no la nota pulsada (*pulse song*) del canto de cortejo (Shirangi *et al.* 2013). Esta reducción en el volumen no se encontró acompañada por ninguna modificación en los demás parámetros del canto. Además, se demostró que las hembras presentan una menor disposición a aparearse con los machos que emitieron la nota sinusoidal no pulsada a un menor volumen (Shirangi *et al.* 2013).

En *D. buzzatii* y *D. koepferae* se encuentra bien documentada la existencia de interacción genotipo-ambiente en el tamaño y en la conformación de las alas (Carreira *et al.* 2006; Soto *et al.* 2008). Dado que el canto de estas especies se produce por vibraciones en estas estructuras y que el tamaño del ala es un buen indicador del tamaño corporal en *Drosophila*, su alteración podría traer aparejada variaciones en la señal acústica del cortejo.

3.1.1. Objetivos e hipótesis

En este capítulo nos proponemos desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la relevancia de la plasticidad fenotípica y la interacción genotipo-ambiente en la variación del canto en las especies hermanas simpátricas, *D. buzzatii* y *D. koepferae*, criadas en recursos naturales con propiedades nutricionales y químicas diferentes.
- Explorar el efecto que ejerce la variación morfométrica de las alas sobre el canto de cortejo en ambas especies .

Para ello, se trabajará con las siguientes hipótesis:

- Las poblaciones de *D. buzzatii* y *D. koepferae* presentan variación genética intrapoblacional para los parámetros que caracterizan sus cantos de cortejo.
- Las poblaciones de *D. buzzatii* y *D. koepferae* presentan plasticidad fenotípica debida al recurso de cría larval para los parámetros que caracterizan sus cantos de cortejo.
- Las poblaciones de *D. buzzatii* y *D. koepferae* presentan variación genética para la plasticidad fenotípica debida al recurso de cría para los parámetros que caracterizan sus cantos de cortejo.
- La variación morfométrica observada en la forma del ala tiene un correlato con las variaciones en el canto de cortejo.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Stocks de drosófilas

Las isolíneas de *D. buzzatii* y de *D. koepferae* utilizadas fueron fundadas a partir de hembras fecundadas en la naturaleza, recolectadas en la Reserva Natural de San Agustín del Valle Fértil (San Juan). Se utilizaron siete isolíneas de cada especie para los experimentos que se describen a continuación.

3.2.2. Medios de cría semi-naturales

Se tomaron muestras de material fresco de *Opuntia sulphurea* y *Trichocereus terscheckii* en la misma localidad donde se recolectaron las moscas. Para la preparación de los medios se licuó el material fresco, se añadió como fuente de proteínas un 1% de levadura comercial deshidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) y 0,8% de agar con el fin de lograr una consistencia similar a los sustratos que las moscas encuentran en la naturaleza. En cada tubo se colocaron seis gramos de medio semi-natural y, previo a su uso, se esterilizaron en autoclave.

3.2.3. Obtención de los individuos experimentales

Con el objetivo de obtener individuos desarrollados a densidad controlada, se sembraron 40 larvas de primer estadio en cada tubo conteniendo medio de cría semi-natural preparado con tejidos de una u otra planta hospedadora. Una densidad larvaria constante durante el desarrollo reduce el efecto de mortandad larvaria denso-dependiente (Sang 1949), además de reducir la varianza fenotípica para el tamaño corporal de las moscas emergentes (Sang 1949; Santo 1996; Imasheva & Bublik 2003). Se realizaron ocho réplicas por cada combinación de especie, isolínea y planta hospedadora. El desarrollo desde el estado de larva de primer estadio hasta la emergencia del adulto tuvo lugar en una cámara de cría, a 25 ± 1 °C y bajo un fotoperíodo de 12:12 horas luz:oscuridad.

Debido a que los machos de *Drosophila* solo comienzan el cortejo en presencia de la hembra, se utilizaron parejas conformadas por machos y hembras vírgenes de 5-6 días de edad para la grabación de los cantos. En todos los ensayos se removieron ambas alas de cada una de las hembras para evitar la potencial interferencia ocasionada por el ruido que genera el movimiento de estas estructuras.

El sexado de las moscas, la remoción de las alas de las hembras, el mantenimiento de los adultos hasta su utilización y la grabación de los cantos se realizó siguiendo el protocolo descrito utilizado en el Capítulo 1 (ver “Condiciones Experimentales” y “Grabación de los cantos y *playback*”).

3.2.4. Análisis de los cantos

Para el análisis de los cantos se utilizó el programa Raven Pro v1.4 (Bioacoustics Research Program 2011).

Los distintos componentes que se pueden encontrar desde que un macho comienza a cantar hasta que se produce la cópula (aquí referidas como **Canto**; Ver Figura 12 en “Introducción General”) se definen de acuerdo con la propuesta de Duellman & Trueb (1994):

Nota: Es una unidad individual de sonido.

Pulsos: Son impulsos energéticos enfatizados en el espectro temporal de una nota.

Frecuencia dominante: Los sonidos emitidos tienen un espectro de frecuencias, medido en Hertz (Hz). En notas afinadas el espectro se divide en distintos armónicos. El primer armónico es conocido como la frecuencia fundamental, mientras que el armónico con mayor énfasis es conocido como frecuencia dominante.

De estas definiciones se desprende el concepto de **Intervalo Interpulso** como el lapso de tiempo en el que no hay impulso energético, entre el final de un pulso y el comienzo del siguiente pulso en una nota. Además, se define **Período** como el lapso de tiempo entre un pulso y el siguiente, lo cual corresponde a la suma de un pulso y su espacio interpulso. A pesar de la diferencia conceptual, estos dos parámetros han sido utilizados como sinónimos en la literatura de *Drosophila* (Hoikkala & Lumme 1987; Hoikkala *et al.* 1994; Saarikettu *et al.* 2005; Etges *et al.* 2007; Grillet *et al.* 2012; Lagisz *et al.* 2012) asumiendo que las variaciones en el período se corresponden con variaciones en el intervalo interpulso. Sin embargo, un incremento en la duración del período puede tener lugar tanto por un aumento en la duración del pulso como por un aumento en el espacio interpulso, o en ambos.

Los cantos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* están compuestos por dos estructuras diferentes, que consisten en una serie de pulsos, denominados

inicialmente Canto A y Canto B (Ewing & Miyan 1986) y, posteriormente, redefinidos como Canto Primario y Canto Secundario, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2013). Dado que hemos definido como Canto al conjunto de señales emitidas por un macho durante el cortejo, a partir de ahora nos referiremos a estas series de pulsos como estructuras tipo A o B. De acuerdo con estos autores, la estructura A es la que se repite un mayor número de veces durante el cortejo y se emite desde el comienzo del cortejo. La estructura B se emite hacia el final del cortejo y un menor número de veces. A su vez estas estructuras pueden identificarse por la frecuencia de sus pulsos relativos: la estructura A tiene una mayor frecuencia intrapulso en relación a la estructura B en ambas especies (Oliveira *et al.* 2013). Con base en cómo estas estructuras se combinan durante una emisión de cortejo clasificamos a las notas en:

Nota Simple: Aquella compuesta por un único tipo de conjunto de pulsos. De esta manera podemos hablar de **Nota Simple A** o **Nota Simple B**.

Nota Compuesta: Aquella que alterna entre una estructura tipo A y una tipo B. Aunque el número de estructuras puede variar, siempre comienzan por el tipo A y terminan con el tipo B. La mayoría de las veces, en las notas compuestas solo se repite cada estructura una sola vez.

Dado que en *D. buzzatii* la estructura B siempre la encontramos formando parte de notas compuestas, solo utilizamos este tipo de notas para realizar las mediciones de ambas estructuras. En el caso de *D. koepferae* las estructuras B pueden aparecer formando parte de notas compuestas o de notas simples (variación entre machos).

Además, observamos que en *D. buzzatii* la estructura tipo A esta compuesta por una serie compleja de pulsos a los que Ewing & Miyan (1986) denominaron “doblete de pulsos”. Es decir, existe una alternancia entre un período corto y uno largo (Figura 12f en “Introducción General”).

De esta manera, es posible dividir el canto en tres subconjuntos de datos:

Volumen: Amplitud a la cual se emiten las estructuras A (V_a) y B (V_b) por nota. El volumen se midió mediante el cálculo de la raíz cuadrada de la amplitud media (RMS, *root-mean-square*) de todos los pulsos que componían cada tipo de estructura siguiendo a Shirangi *et al.* (2013).

Estructura A: Se midió la duración de la serie pulsos (D_a), el período (PER_a) y la frecuencia dominante por pulso (FDA). En el caso de *D. buzzatii* el período y la frecuencia se subdividieron en corto (PER_{aC} y FDA_C) y largo (PER_{aL} y FDA_L).

Estructura B: Se midió la duración de la serie pulsos (D_b), el período (PER_b) y la frecuencia dominante por pulso (FDB).

También se registraron la duración de las notas compuestas con el fin de conocer si su longitud final depende de la longitud de alguna de sus partes y la duración de los pulsos y la de los espacios interpulsos para conocer cuál de estos parámetros es el responsable de las variaciones en el período. Cada parámetro fue medido cinco veces por cada canto y se usaron las medias de cada parámetro por macho en los análisis subsiguientes. Como los parámetros del canto están medidos en diferentes unidades, las medias individuales fueron estandarizadas.

3.2.5. Morfometría geométrica de las alas

Inmediatamente después de grabar los cantos, los machos fueron guardados individualmente en alcohol 96%. Posteriormente, se removieron las alas derechas de cada macho y se montaron sobre portaobjetos. Solo se utilizaron las alas derechas con el fin de evitar la pseudoreplicación. Las alas fueron fotografiadas utilizando una cámara digital adosada a una lupa y conectada a una computadora. Todas las imágenes fueron tomadas con la misma resolución fotográfica y en las mismas condiciones de iluminación.

Para capturar geoméricamente la forma de las alas se utilizó un método de referencias anatómicas (*landmarks*). Para ello se digitalizaron 10 *landmarks* sobre las imágenes fotográficas utilizando las mismas referencias anatómicas que en Soto *et al.* (2008; ver Figura 1) y el programa TpsDig 1.4 (Rohlf 2004). Luego se aplicó el Análisis Generalizado de Procrustes ó GPA (por su sigla en inglés: *Generalized Procrustes Analysis*) con el fin de remover la variación en ubicación, rotación y escala (Elewa 2010) utilizando el programa MorphoJ 1.06a (Klingenberg 2011). Al utilizar esta metodología la forma del ala de cada individuo se puede desdoblar en dos variables: tamaño y conformación. Se utilizó el tamaño del centroide (TC) como estimador del tamaño del ala de cada individuo, el cual se define como la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias al cuadrado entre el centro geométrico de la forma y sus *landmarks* (Elewa 2010). Por otra parte, el

análisis describe la conformación del ala de cada individuo por medio de Coordenadas de Procrustes. Con el fin de reducir el número de variables se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre la matriz de varianzas-covarianzas de estas coordenadas. Se utilizaron los componentes principales resultantes (CPs) como variables de conformación en los análisis subsiguientes.

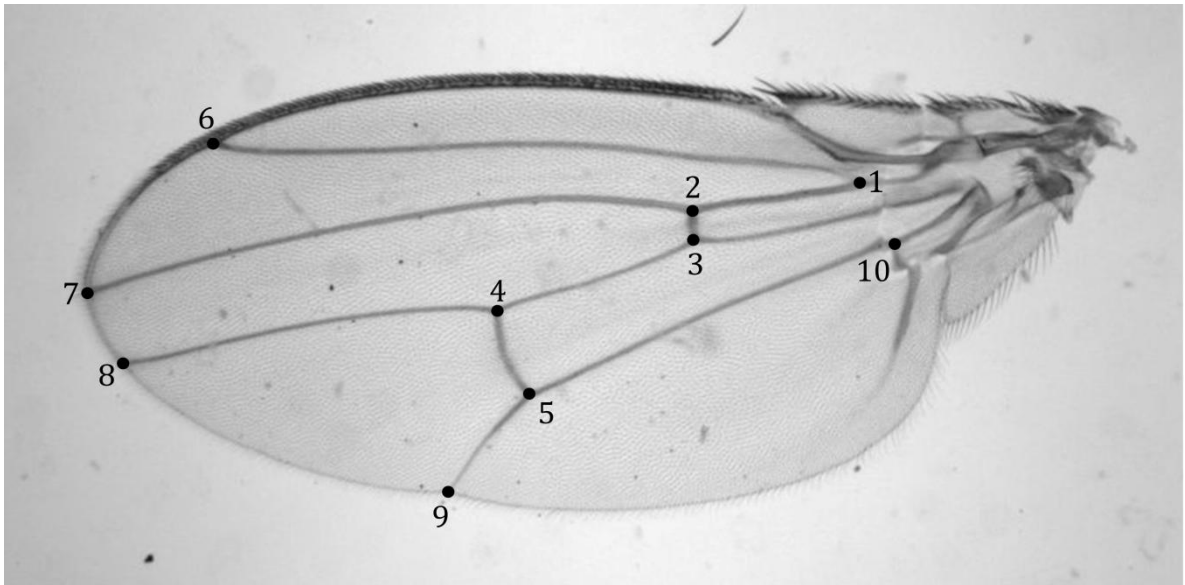


Figura 1. Vista dorsal del ala derecha de *D. buzzatii* y la posición de los *landmarks* utilizados.

3.2.6. Análisis Estadísticos

Como primer paso determinamos si los medios de cría semi-naturales (recurso) utilizados en esta tesis tuvieron un efecto sobre el tamaño y la conformación de las alas en concordancia con resultados previos (Soto *et al.* 2008). Para ello, realizamos un análisis de varianza (ANOVA) univariado utilizando el TC como variable dependiente, y los factores Cactus (dos niveles) y Línea (siete niveles) como independientes. La variación en los caracteres que se asocia o es explicada por la variación en tamaño se conoce como alometría (Klingenberg 2016). Por lo tanto, con el fin de tomar en cuenta la potencial relación entre conformación y tamaño del ala, realizamos un análisis multivariado de covarianza (MANCOVA) utilizando los CPs de conformación como variables dependientes, el TC como covariable y los factores Cactus y Línea como variables independientes.

Para determinar si el volumen o las estructuras tipo A y B de los cantos de cortejo varían entre líneas (variación entre genotipos o varianza genética) y/o en

función del cactus de cría (plasticidad fenotípica), realizamos análisis multivariados de la varianza (MANOVA) y de covarianza (MANCOVA) utilizando cada subconjunto de datos acústicos (ver “Análisis de cantos”) como variables dependientes, el TC como covariable y los factores Cactus (dos niveles) y Línea (dos niveles). Para determinar cuáles de los parámetros del canto eran los responsables de los patrones revelados por estos análisis, se realizaron ANOVA/ANCOVAs *post hoc* para cada parámetro.

Todos los análisis fueron realizados con la función *adonis* del paquete *Vegan* (Oksanen *et al.* 2013) en el programa R. Esta función utiliza matrices de distancia para comparar las medias entre dos o más grupos y su significación se evalúa mediante pruebas de permutación.

Para estudiar la covariación entre la conformación alar y las estructuras A y B del canto, realizamos un análisis de dos bloques de mínimos cuadrados (2B-PLS) usando el paquete *geomorph* (Adams & Otárola-Castillo 2013) para R. Además, calculamos el coeficiente R_v , que es una generalización multivariada del coeficiente de correlación de Pearson, que cuantifica la cantidad de varianza explicada. Para ello utilizamos la función de Pitchers *et al.* (2014) escrita en R.

3.3. Resultados

3.3.1. Fuentes de variación de la morfología alar

3.3.1.1. Tamaño

Las fuentes de variación intraespecíficas para el tamaño del ala fueron puestas a prueba mediante ANOVAs (Tabla 1). Se detectaron diferencias entre Líneas en ambas especies y solamente en *D. koepferae* la interacción Cactus por Línea fue significativa. Esta interacción denota que hay variación de las normas de reacción de las líneas dependiente del recurso de cría.

Tabla 1. ANOVAs para el tamaño del ala. *gl*: Grados de libertad.

Especie	Fuentes de variación	gl	CM	F	p-valor
<i>D. buzzatii</i>	Cactus	1	0,00357	23,96	0,0001**
	Línea	6	0,00227	15,24	0,0001**
	Cactus x Línea	6	0,00015	1,01	0,4169
	Error	98	0,00014		
<i>D. koepferae</i>	Cactus	1	0,01956	90,02	0,0001**
	Línea	6	0,00163	7,51	0,0001**
	Cactus x Línea	6	0,00053	2,45	0,0303*
	Error	94	0,00022		

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

El recurso de cría (Cactus) tuvo un efecto significativo en ambas especies. Este efecto fue independiente de si los cactus utilizados constituían el recurso primario o el secundario en la naturaleza. En ambas especies los individuos criados en *Opuntia* fueron, en promedio, de mayor tamaño y, a su vez, *D. koepferae* tuvo un mayor tamaño que *D. buzzatii* en ambos recursos (Figura 2).

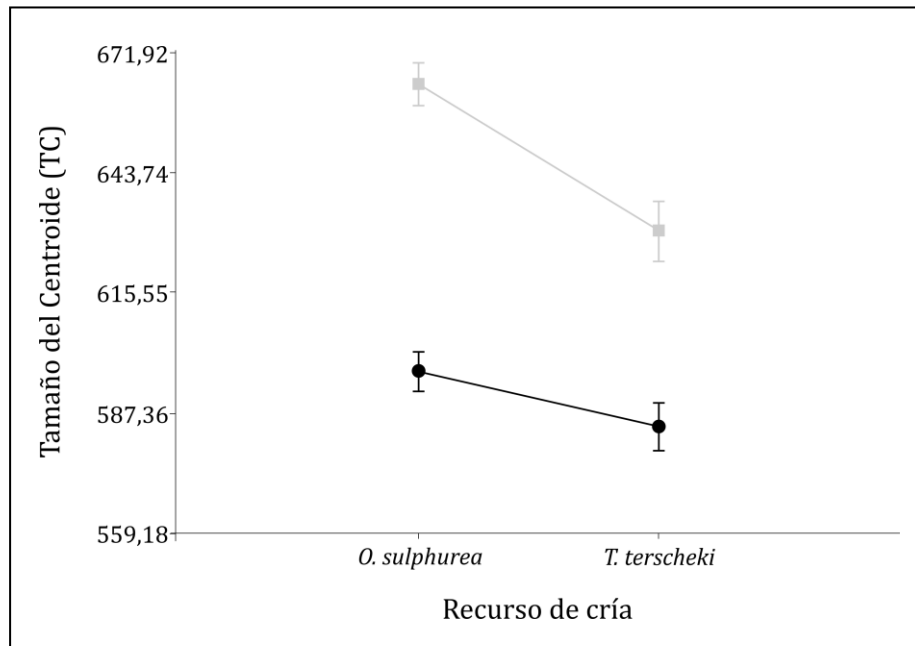


Figura 2. Tamaño medio del ala (en pixeles) e intervalos de confianza para a) *D. buzzatii* (círculos negros), *D. koepferae* (cuadrados grises).

3.3.1.2. Conformación

El análisis morfométrico nos arrojó un total de 20 variables (Coordenadas de Procrustes) que en conjunto describen la conformación total del ala. Con el fin de reducir el número de variables realizamos un PCA y nos quedamos con los primeros cuatro CPs que, en conjunto, explican un total de 72,47% y 76,37% de la variación total en *D. buzzatii* y en *D. koepferae*, respectivamente.

Los análisis intraespecíficos permitieron discriminar las fuentes de variación fenotípica en la conformación del ala (Tabla 2). Los MANOVAs mostraron diferencias significativas entre líneas, que es indicativo de que la variación observada tiene base genética (David *et al.* 2005). Además, se detectó un efecto del recurso de cría solo en *D. koepferae*. La interacción Línea por Cactus (que es una estimación de la interacción Genotipo-Ambiente) fue significativa en ambas especies indicando que existe variación entre líneas en cuanto a las normas de reacción de la conformación del ala dependiente del recurso de cría.

Tabla 2. MANOVAs (a) de la conformación alar y MANCOVAs (b) — usando como covariable el tamaño del centroide —. *gl*: Grados de libertad.

	<i>Drosophila buzzatii</i>				<i>Drosophila koepferae</i>			
	gl	CM	F	p-valor	gl	CM	F	p-valor
(a) MANOVA								
Cactus	1	0,00208	1,99	0,1086	1	4,79e-07	9,33	0,0001**
Línea	6	0,00965	9,25	0,0001**	6	1,84e-06	35,92	0,0001**
Cactus x Línea	6	0,00737	7,06	0,0001**	6	1,15e-07	2,23	0,0022**
Error	98	0,00104			94	5,13e-08		
(b) MANCOVA								
Cactus	1	0,00208	1,99	0,1136	1	4,79e-07	9,59	0,0001**
Línea	6	0,00965	9,26	0,0001**	6	1,84e-06	36,92	0,0001**
Cactus x Línea	6	0,00715	6,87	0,0001**	6	1,00e-07	2,01	0,0011**
TC	1	0,00252	2,42	0,0579	1	2,64e-07	5,29	0,0059**
Error	97	0,00104			93	4,99e-08		

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

La relación entre los cambios en caracteres morfológicos y el cambio en su tamaño se conoce como alometría (Klingenberg 2016). Si hay un desfase en el crecimiento de distintas partes del ala al incrementarse el tamaño (el crecimiento no es isométrico), entonces nos encontraremos con que una parte de la variación conformacional puede explicarse por las diferencias de tamaño entre los individuos. Dado que encontramos diferencias en el tamaño de los individuos debidas a la línea de pertenencia y al recurso donde fueron criadas (Tabla 1), utilizamos el TC como covariable para indagar si la variación en la morfología alar de ambas especies tiene un componente alométrico. Encontramos que la covariable TC fue significativa solo en *D. koepferae* (Tabla 2), indicando que solo en esta especie existe un componente alométrico.

3.3.2. Fuentes de variación del canto de cortejo

3.3.2.1. Descripción de las variables del canto

Con el fin de evitar la multicolinealidad en los análisis posteriores y de conocer cuál de las subestructuras que componen las notas compuestas y los períodos son las que efectivamente gobiernan su variación, se estudió la correlación entre las variables del canto.

Encontramos un alto coeficiente de correlación ($r=0,82$) entre los volúmenes a los cuales se emiten las estructuras A y B en *D. buzzatii*. En cambio, la correlación entre estas variables fue baja en *D. koepferae* ($r=0,36$). Este es un resultado esperado debido a que la estructura B de *D. buzzatii* siempre se emite como parte de notas compuestas, no así en el canto de *D. koepferae*. Dado que para evitar la multicolinealidad es aconsejable no incluir pares de variables con $r \geq 0,8$ (Adriana Pérez, comunicación personal), solo consideramos la variable Vb como representante del volumen general del canto (Vol) para el análisis en *D. buzzatii* y ambas variables, Va y Vb, para el análisis en *D. koepferae*. Nos quedamos con Vb como representante del volumen general del canto en el caso de *D. buzzatii* porque es la que satisfacía el supuesto de homogeneidad de varianzas sin necesidad de transformar la variable.

La variación en la duración de las notas compuestas de *D. buzzatii* correlaciona positivamente con la duración de la estructura A ($\rho=0,91$), pero la correlación es baja con la duración de la estructura B ($\rho=0,31$). De esta manera, la duración total de las notas compuestas no fue incluida en los análisis. Además, encontramos que la frecuencia dominante de los pulsos que intervienen en períodos cortos (PERaC) y largos (PERaL) también correlacionan positivamente ($r=0,94$) y no difieren significativamente entre sí ($t=0,62$; $p=0,53$). Por consiguiente solo se utilizó un único valor de frecuencia dominante (FD=FDa) en los análisis subsiguientes.

Con respecto a los períodos, observamos que en *D. buzzatii* los períodos cortos y largos de la estructura A tienen un mayor coeficiente de correlación con la duración de los intervalos interpulsos ($r=0,51$ y $r=0,67$, respectivamente) que con la duración de los pulsos ($r=0,26$ y $r=0,07$, respectivamente). Sin embargo, observamos lo contrario en los períodos de la estructura B. En este caso, el período

tiene un coeficiente de correlación mayor con la duración del pulso ($\rho=0,78$) que con la duración del intervalo interpulso ($\rho=0,02$).

En *D. koepferae*, por el contrario, encontramos que las notas compuestas tienen un coeficiente de correlación mayor con la duración de la estructura B ($\rho=0,69$) que con la duración de la estructura A ($\rho=0,05$). Por otra parte, y al igual que en *D. buzzatii*, el período de la estructura A correlaciona más con la duración del intervalo inter-pulso ($\rho=0,66$) que con la duración del pulso ($\rho=0,05$). Sin embargo, el período de la estructura B correlaciona igual con la duración del pulso ($\rho=0,45$) y con el intervalo interpulso ($\rho=0,48$).

En la tabla 3 se pueden observar los valores medios y los desvíos estándar para cada una de las variables utilizadas en los análisis subsiguientes para cada especie.

Tabla 3. Medias y desvíos estándar de los parámetros del canto para *D. buzzatii* (*Db*) y *D. koepferae* (*Dk*).

	Va (RMS)	Vb (RMS)	Da (ms)	Db (ms)	FDa (Hz)	FDb (Hz)	PERa (ms)	PERaC (ms)	PERaL (ms)	PERb (ms)
<i>Db</i>	1323,41	826,68	457,71	241,03	378,78	228,12	—	8,36	10,36	15,45
	±665,35	±494,35	±180,18	±73,64	±22,35	±16,23		±0,5	±0,84	±0,97
<i>Dk</i>	1105,40	1156,38	114,30	259,57	341,70	194,24	11,36	—	—	10,04
	±658,30	±671,41	±57,36	±97,37	±35,72	±18,59	±0,55			±0,50

a = Estructura A; b= Estructura B; V = Volumen; D = Duración; FD = Frecuencia dominante; PER = período (L=largo/C=corto).

3.3.2.2. Volumen

Debido a que el volumen del canto podría estar influenciado por el tamaño de las alas, realizamos un ANCOVA/MANCOVA (para *D. buzzatii* y *D. koepferae*, respectivamente) utilizando TC como covariable. Los análisis revelaron que el volumen general del canto varía entre las líneas en ambas especies y no es afectado por las diferencias de tamaño de las alas (Tabla 4). Además, tanto el factor Cactus como la interacción Cactus por Línea fueron significativos en *D. koepferae*. En promedio, los machos de *D. koepferae* criados en *O. sulphurea* cantaron a un volumen mayor que los machos criados en *T. terscheckii* (Figura 3).

Tabla 4. ANOVA/MANOVA (a) y ANCOVA/MANCOVA (b) — usando como covariable el tamaño del centroide — del volumen del canto. *gl*: Grados de libertad.

<i>Drosophila buzzatii</i>					<i>Drosophila koepferae</i>			
	gl	CM	F	p-valor	gl	CM	F	p-valor
(a) ANOVA					(a) MANOVA			
Cactus	1	0,03803	0,59	0,5009	1	0,02059	13,47	0,0001**
Línea	6	0,24164	3,74	0,0008**	6	0,00392	2,56	0,0107*
Cactus x Línea	6	0,09839	1,52	0,1456	6	0,00444	2,90	0,0035*
Error	98	0,06456			94	0,00153		
(b) ANCOVA					(b) MANCOVA			
Cactus	1	0,02510	0,40	0,6054	1	0,02123	13,96	0,0001**
Línea	6	0,22336	3,56	0,0013**	6	0,00397	2,60	0,0091*
Cactus x Línea	6	0,09804	1,56	0,1360	6	0,00439	2,88	0,0058*
TC	1	0,10762	1,71	0,1828	1	0,00123	0,81	0,4267
Error	93	0,06267			92	0,00152		

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

En los ANOVAs *post hoc* para el volumen de ambas estructuras de *D. koepferae* fueron significativos el factor Cactus (A: $F_{(1,94)}=3,71$; $p=0,0375$ — B: $F_{(1,94)}=14,42$; $p=0,0004$) y la interacción Cactus por Línea (A: $F_{(6,94)}=1,99$; $p=0,0423$ — B: $F_{(6,94)}=2,96$; $p=0,0051$), en tanto que el factor Línea fue significativo solo para la estructura B ($F_{(6,94)}=3,44$; $p=0,0019$).

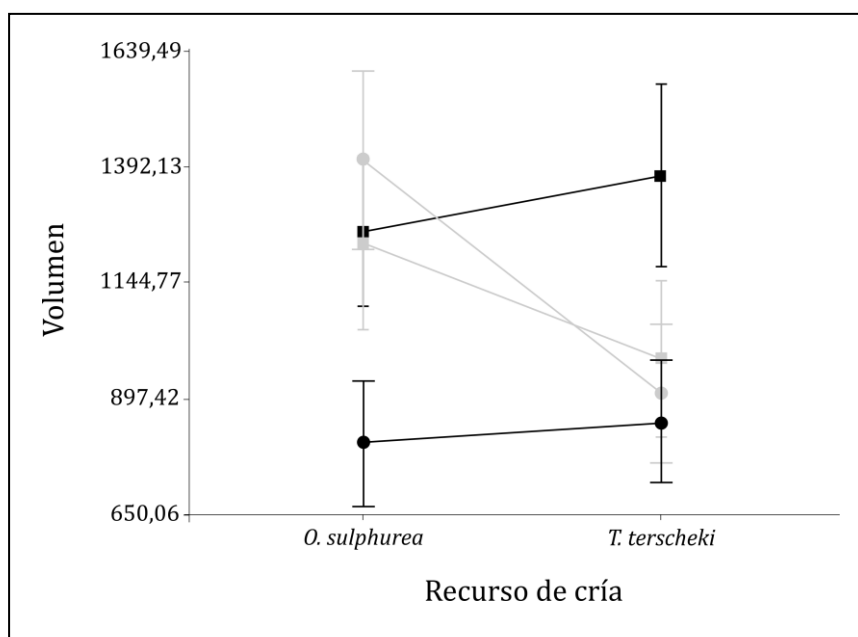


Figura 3. Volumen medio (en RMS) al cual se emiten las estructuras A (cuadrados) y B (círculos) e intervalos de confianza para *D. buzzatii* (negro) y *D. koepferae* (gris).

3.3.2.3. Estructura tipo A

En el canto de cortejo de estas especies la estructura tipo A es la que predomina en una emisión de cortejo. Puede aparecer formando parte de notas simples o compuestas. Los parámetros que la describen son la frecuencia dominante de los pulsos (FDa), el período (PERa) y su duración (Da). Además, en *D. buzzatii* esta estructura es la que presenta mayor complejidad por la existencia de “dobletes de pulsos” que dan lugar a dos tipos de períodos (PERaC y PERaL).

Las fuentes de variación con respecto a esta estructura para ambas especies se detallan en la Tabla 5. No encontramos un efecto de la covariable TC por lo tanto fue eliminada del modelo. Se observó un efecto significativo de la línea en ambas especies y un efecto del recurso de cría solo en *D. koepferae*.

Tabla 5. MANOVAs (a) y MANCOVAs (b) — usando como covariable el tamaño del centroide — de la estructura tipo A del canto. *gl*: Grados de libertad.

	<i>Drosophila buzzatii</i>				<i>Drosophila koepferae</i>			
	gl	CM	F	p-valor	gl	CM	F	p-valor
(a) MANOVA								
Cactus	1	0,00334	2,20	0,1003	1	0,00533	4,08	0,0144*
Línea	6	0,00953	6,29	0,0001**	6	0,00875	6,71	0,0001**
Cactus x Línea	6	0,00142	0,94	0,5109	6	0,00183	1,4	0,1528
Error	98	0,00152			94	0,00130		
(b) MANCOVA								
Cactus	1	0,00425	2,80	0,0499	1	0,00430	3,45	0,0248
Línea	6	0,00942	6,22	0,0001**	6	0,00948	7,61	0,0001**
Cactus x Línea	6	0,00124	0,82	0,2934	6	0,00172	1,38	0,1649
TC	1	0,00069	0,46	0,6727	1	0,00269	2,16	0,1086
Error	93	0,00046			92	0,00125		

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

Los ANOVAs *post hoc* revelaron, en *D. buzzatii*, un efecto significativo de la línea sobre todos los parámetros: FDa ($F_{(6,98)}=17,03$; $p=0,0001$), Da ($F_{(6,98)}=3,37$; $p=0,0029$), PERaC ($F_{(6,98)}=2,80$; $p=0,0133$) y PERaL ($F_{(6,98)}=7,77$; $p=0,0001$). En *D. koepferae* solo fueron significativos FDa ($F_{(6,94)}=7,33$; $p=0,0001$) y PERa ($F_{(6,94)}=10,68$; $p=0,0001$) y únicamente para el factor Línea. Esto sugiere que existe

una respuesta correlacionada que es la responsable de que el factor Cactus sea significativo en el MANOVA (Márquez & Knowles 2007). Explorando la variación de los parámetros con respecto al recurso de cría encontramos que en promedio la frecuencia y el período de la estructura A son diferentes y se comportan de manera inversa en *O. sulphurea* que en *T. terscheckii* (Figura 4). En *O. sulphurea* los cantos presentan una menor frecuencia, pero un mayor período en los pulsos de la estructura A y ocurre lo contrario en *T. terscheckii*.

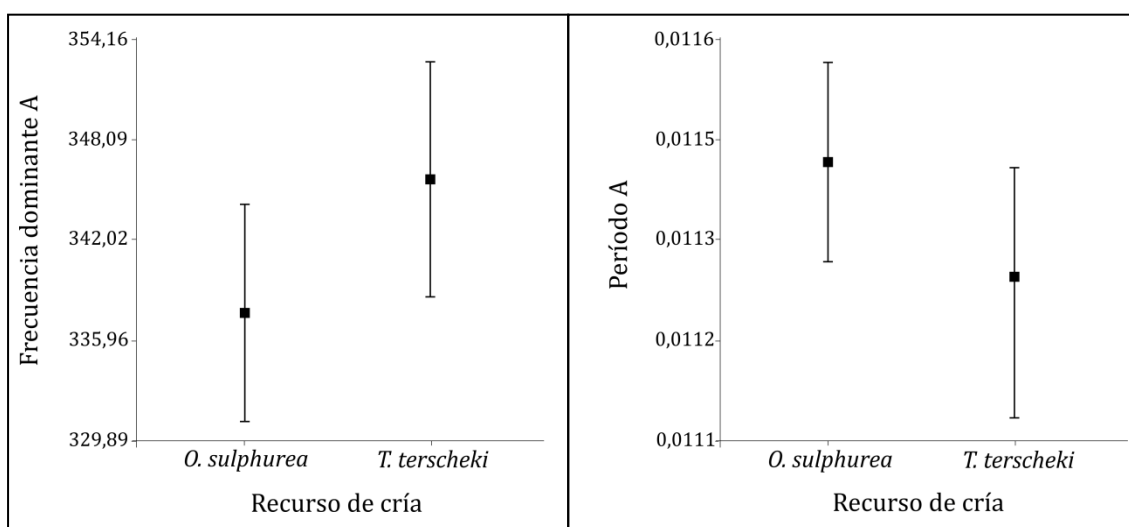


Figura 4. Frecuencia dominante media (en hertz) y período medio (en milisegundos) de la estructura tipo A e intervalos de confianza en cada recurso de cría para *D. koepferae*.

3.3.2.4. Estructura tipo B

Este tipo de estructura aparece hacia el final de una emisión de cortejo. Al igual que la estructura tipo A se describe por la frecuencia dominante de sus pulsos (FDb), el período (PERb) y por su duración (Db), ya sea formando parte únicamente de notas compuestas en el caso de *D. buzzatii* o formando parte de notas simples o compuestas en el caso de *D. koepferae*.

Encontramos que las líneas de ambas especies difieren significativamente en la estructura tipo B (Tabla 6a) y que esta no se encuentra afectada por el tamaño de las alas (Tabla 6b). Los ANOVAs *post hoc*, en *D. buzzatii*, indican que todos los parámetros [FDb ($F_{(6,98)}=10,60$; $p=0,0001$), PERb ($F_{(6,98)}=13,54$; $p=0,0001$) y Db ($F_{(6,98)}=4,13$; $p=0,0005$)] difieren significativamente.

En *D. koepferae* solo encontramos diferencias significativas para la frecuencia dominante ($F_{(6,94)} = 7,95$; $p = 0,0001$).

Tabla 6. MANOVAs (a) y MANCOVAs (b) — usando como covariable el tamaño del centroide — de la estructura tipo B del canto. *gl*: Grados de libertad.

	<i>Drosophila buzzatii</i>				<i>Drosophila koepferae</i>			
	gl	CM	F	p-valor	gl	CM	F	p-valor
(a) MANOVA								
Cactus	1	0,00197	1,54	0,2056	1	0,00334	2,14	0,1035
Línea	6	0,01043	8,15	0,0001**	6	0,00525	3,36	0,0002**
Cactus x Línea	6	0,00108	0,84	0,6456	6	0,00168	1,07	0,3818
Error	98	0,00128			94	0,00156		
(b) MANCOVA								
Cactus	1	0,00255	1,98	0,1300	1	0,00318	2,07	0,1083
Línea	6	0,00985	7,64	0,0001**	6	0,00522	3,39	0,0001**
Cactus x Línea	6	0,00093	0,73	0,7632	6	0,00186	1,21	0,2623
TC	1	0,00217	1,68	0,1793	1	0,00295	1,92	0,1350
Error	93	0,00129			92	0,00154		

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

3.3.3. Covariación entre la estructura del canto y la conformación del ala

Para explorar si la conformación de las alas y las estructuras del canto covarían, usamos un análisis de bloques de cuadrados mínimos parciales (2B-PLS). Esta técnica extrae combinaciones lineales de variables (vectores) que maximizan la covariación entre dos sets de datos multivariados.

Debido a que existe variación alométrica en la conformación de las alas de *D. koepferae* (Tabla 2b), para esta especie corrimos dos análisis 2B-PLS usando los datos de conformación corregidos (componente no alométrico) y no corregidos (componente alométrico) por tamaño.

Se encontró una correlación positiva y significativa para *D. buzzatii* ($r=0,95$; $p=0,0236$), pero no para *D. koepferae* (Variación alométrica: $r=0,85$; $p=0,42$; Variación no alométrica: $r=0,73$; $p=0,87$; Figura 5). Sin embargo, dado que solo tenemos datos de siete líneas el número máximo de permutaciones permitido es 5040 (7!) y, por consiguiente, la potencia de la prueba es baja.

El vector significativo de variables del canto extraído para *D. buzzatii* tuvo coeficientes pequeños para cuatro de los parámetros ($Db=-0,11$; $FDb=0,16$; $PERaC=-0,30$ y $PERaL=-0,30$) y coeficientes moderados para los restantes tres parámetros ($FDa=0,56$; $PERb=0,49$ y $Da=0,47$).

El coeficiente R_v para *D. buzzatii* fue de 0,49 mientras que los de *D. koepferae* fueron de aproximadamente la mitad (componente alométrico $R_v=0,22$; componente no alométrico $R_v=0,23$).

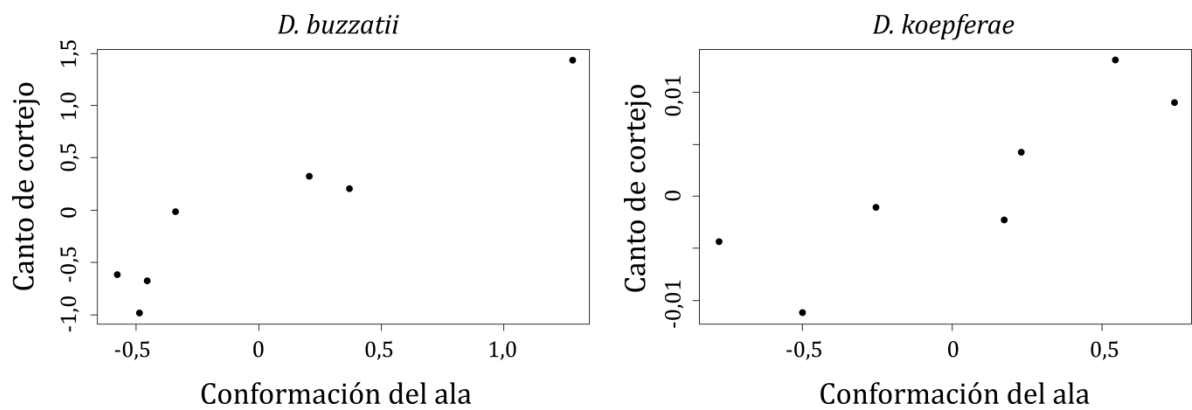


Figura 5. Covariación entre la conformación del ala y el canto de cortejo de *D.buzzatii* (a) y *D. koepferae* (b). Se grafica únicamente la covariación con el componente alométrico de la conformación del ala para *D. koepferae*.

3.4. Discusión

En insectos fitófagos, las plantas hospedadoras constituyen un factor clave que afecta diversos aspectos de su biología tales como la morfología, la fisiología y los caracteres de historia de vida (Carroll *et al.* 1998; Soto *et al.* 2007; Ruiz-Montoya & Núñez-Farfán 2013). Sin embargo, existen pocos estudios sobre el rol de la plasticidad fenotípica inducida por el uso de diferentes plantas hospedadoras en la variación y la divergencia de los sistemas de comunicación (Bro-Jørgensen 2010).

En este capítulo estudiamos las fuentes de variación genética y ambiental, impuesta por la cría en hospedadores con características nutricionales y químicas diferentes, en los cantos de cortejo de *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Estas especies están estrechamente relacionadas, conviven en simpatria y han divergido en cuanto al rol que la señal acústica tiene en la elección de pareja y en el aislamiento precópula (Capítulo 1).

Encontramos que las isolíneas analizadas de ambas especies presentan variación en los dos tipos de estructuras que constituyen el canto así como también en el volumen al cual se emiten. El factor Línea significativo se puede interpretar, bajo nuestro diseño experimental, como evidencia de que una importante fracción de la variación en esta señal tiene base genética (David *et al.* 2005). La principal diferencia entre las especies fue que todos los parámetros analizados (Vol, Da, PERaC, PERaL, FDa, Db, PERb, FDb) variaron significativamente entre las líneas de *D. buzzatii*, mientras que en *D. koepferae* la duración de ambas estructuras (Da y Db) y el período de los pulsos de la estructura B (PERb) no difirieron. Esto sugiere que la estructura B del canto estaría más conservada en *D. koepferae* que en su especie hermana.

Además, el recurso de cría afectó de manera diferencial el canto de los machos de *D. koepferae*, pero no el de los machos de *D. buzzatii*. En efecto, el volumen al cual se emiten ambas estructuras del canto y la correlación entre el período y la frecuencia de los pulsos de la estructura A variaron significativamente entre los machos de *D. koepferae* que se desarrollaron en el hospedador primario y los que se desarrollaron en el hospedador secundario. Este resultado sugiere que la señal acústica está fuertemente canalizada en *D. buzzatii*, a diferencia de lo que

se observa en el canto de *D. koepferae*, cuya variación asociada al uso de diferentes sustratos de cría es un indicador de plasticidad fenotípica.

Estos resultados están de acuerdo con lo que cabría esperar al considerar la importancia de los cantos de cortejo en la elección de pareja en cada especie. El éxito reproductivo de los machos de *D. buzzatii* depende fuertemente de la señal acústica, un carácter que no es sensible a la heterogeneidad ambiental, mientras que en los machos de *D. koepferae*, que pueden prescindir de esta señal (aumentando el tiempo de cortejo necesario; ver Capítulo 1), los cantos exhiben plasticidad fenotípica. En este sentido, nuestros resultados dan apoyo a la hipótesis de canalización adaptativa que predice una asociación positiva entre los caracteres que tienen un mayor impacto sobre el *fitness* y el grado de canalización frente a perturbaciones del ambiente (Stearns *et al.* 1995).

Asimismo, el recurso de cría afectó de manera diferencial el volumen del canto de las diferentes isolíneas de *D. koepferae*, poniendo en evidencia una significativa interacción genotipo-ambiente para este carácter. Como consecuencia, los machos con los cantos más conspicuos en cada hospedador difieren en su *background* genético. Esto podría alterar el éxito reproductivo de los diferentes genotipos en función del recurso de cría (ver “hipótesis de impulso sensorial” más abajo), sentando las bases para la existencia de respuestas divergentes a la selección.

Entre las especies cactófilas de *Drosophila*, solo la señal acústica de *D. mojavensis* ha sido estudiada con mayor detalle. En esta especie el canto de cortejo no juega un papel importante en el aislamiento reproductivo en simpatria, dado que las hembras de *D. mojavensis* no logran discriminar entre los cantos homo- o heterospecíficos de *D. arizonae* (Byrne 1999). Por lo tanto, el reconocimiento de parejas compatibles y el aislamiento precópula dependerían de otro tipo de señales, como parece ocurrir en *D. Koepferae* (ver Capítulo 1). Además, se ha observado que los cantos varían entre los machos de *D. mojavensis* criados en distintos cactus y que los genotipos responden diferencialmente a la heterogeneidad ambiental (Etges *et al.* 2007). En otras palabras, existe interacción genotipo-ambiente en la señal acústica de *D. mojavensis* (Etges *et al.* 2007) al igual que en *D. koepferae*. De esta manera, los resultados obtenidos en *D. mojavensis* también pueden considerarse evidencia de plasticidad fenotípica para un carácter

con poco impacto sobre el *fitness*, tal y como lo predice la hipótesis de canalización adaptativa.

El único carácter sexual que ha sido estudiado en *D. buzzatii* y en *D. koepferae* desde este enfoque es la genitalia del macho (aedeago). El aedeago de los machos muestra un patrón opuesto al observado para el canto de cortejo en cuanto a la existencia de plasticidad fenotípica asociada a la cría en hospedadores primarios y secundarios. Es decir, *D. buzzatii* exhibe plasticidad fenotípica para este carácter, en tanto que la morfología genital de *D. koepferae* se encuentra más canalizada (Soto *et al.* 2007). Aún resta estudiar el rol del componente feromonal en la elección de pareja de las hembras y en el aislamiento precópula, y su relación con los cactus de cría, ya que éstos podrían afectar el tipo de compuestos hidrocarbonados de cutícula que pueden actuar como feromonas. Efectivamente, las tunas, como *O. sulphurea* y los cactus columnares como *T. terscheckii* difieren tanto en la cantidad como en el tipo de ácidos grasos presentes en sus tejidos (Carreira *et al.* 2012; Padró *et al.* 2013), que en otras especies, se sabe son los precursores de los hidrocarburos de cutícula (Pennanec'h *et al.* 1997; Etges *et al.* 2006). Sin embargo, teniendo en cuenta los caracteres estudiados hasta el momento, el canto (precópula) y la genitalia (postcópula), podemos observar que *D. buzzatii* y *D. koepferae* han divergido a nivel de los caracteres que tienen el potencial de brindar información sobre el ambiente nutricional y químico al cual estuvieron expuestos los machos durante su desarrollo.

3.4.1. Implicancias evolutivas en la divergencia de la importancia del canto

Las respuestas plásticas en un carácter dan lugar a nuevas presiones selectivas sobre otros caracteres y esto puede conducir la evolución en direcciones completamente diferentes de lo previsible en ausencia de plasticidad (Price 2006).

La hipótesis de impulso sensorial (en inglés denominada “*sensory drive*”) pretende explicar cómo los sistemas de comunicación se adaptan a los ambientes locales y predice que la divergencia en los sistemas de comunicación ocurrirá cuando los ambientes difieren (Endler 1992; Boughman 2002). De esta manera, el ambiente, al afectar la transmisión y la percepción de las señales, puede provocar que las propiedades de señales sexuales que realzan su visibilidad y detección por las hembras (*e.g.*, color, intensidad, tamaño) en un ambiente dado se vean

reducidas en otros ambientes (Boughman 2002). De acuerdo con esta hipótesis las señales más fácilmente detectables en cada ambiente se verán favorecidas y, en consecuencia, serán las preferidas por los individuos. El hecho de que las hembras prefieran las señales más conspicuas durante el cortejo es consistente con esta idea. De esta manera, los sistemas sensoriales y las condiciones sensoriales tienen el potencial de “impulsar” la evolución en direcciones particulares (Endler 1992).

Por otra parte, la teoría de especiación ecológica propone que los saltos de hospedador han conducido a la diversificación en insectos fitófagos, en parte, por la influencia del cambio de planta hospedadora en la divergencia de los sistemas de comunicación durante el cortejo (Cornwallis & Uller 2010).

Nuestros resultados dan apoyo a la hipótesis del impulso sensorial y a la que propone una relación entre el cambio de planta hospedadora y el sistema de comunicación durante el cortejo. En efecto, nuestros resultados indican que el volumen al cual se emiten los dos tipos de estructuras constituyentes del canto (A y B) depende del sustrato de cría en *D. koepferae*. Los machos criados en el hospedador primario (*T. terschecki*) emiten ambas estructuras a un volumen significativamente menor que los criados en el hospedador secundario (Figura 3). En consecuencia, el canto de los machos criados en cardón sería menos conspicuo que el emitido por los machos criados en tuna, lo que posiblemente podría dificultar su detección para las hembras, convirtiendo a otras señales (*e.g.*, químicas) en las más sobresalientes. En este sentido, los resultados de los ensayos con *D. koepferae* sugieren que la plasticidad fenotípica de la señal acústica dependiente del sustrato de cría podría ayudarnos a explicar por qué las hembras de *D. koepferae* priorizan otro canal sensorial para el reconocimiento de parejas compatibles (Capítulo 1; Bro-Jørgensen 2010). Sin embargo, el canto en esta especie aún juega un papel ya que disminuye el tiempo de cortejo necesario para que ocurra la cópula. En este contexto, nuestra hipótesis es que la reducción en la visibilidad de una señal tiene mayor importancia cuando cumple un rol al inicio del cortejo, que corresponde con el momento en que el macho persigue a la hembra y la distancia al órgano sensorial es mayor. En contraste, las señales que adquieren importancia cuando la hembra ha disminuido la actividad locomotora, son percibidas más eficientemente debido a la disminución de la distancia entre el órgano emisor y el receptor de esa señal. En este contexto, se ha demostrado que

una reducción en el volumen de la nota sinusoidal no pulsada provoca una menor disposición al apareamiento en las hembras de *D. melanogaster* (Shirangi *et al.* 2013). Además, la evidencia en esta especie apunta a que la sensibilidad de la arista (*i.e.*, estructura receptora de sonido) cambia en función del ángulo de incidencia del estímulo acústico (Morley *et al.* 2012). Asimismo, los machos de *D. buzzatii*, cuyo canto cumple un rol primario en el éxito reproductivo, emiten la estructura B a un volumen 38% menor que el de la estructura A (Tabla 3) y lo hacen hacia el final del cortejo e inmediatamente antes de la cópula. La reducción observada en el volumen del canto de *D. koepferae* se asemeja al volumen con el cual se emite la estructura tipo B en *D. buzzatii* (Figura 3). Sin embargo, para confirmar esta interpretación son necesarios más experimentos que permitan evaluar la importancia relativa de cada estructura y el impacto que tienen las modificaciones en el volumen sobre la elección de pareja de estas hembras.

No obstante, tampoco podemos descartar que el desarrollo en estos recursos alternativos afecte la percepción de las hembras (*i.e.*, la habilidad de oír). Por ejemplo, a consecuencia de adaptaciones locales, muchas hembras se vuelven más sensibles a determinadas frecuencias de sonidos permitiendo su detección a una menor amplitud (Boughman 2002). En siete especies del grupo *D. melanogaster* se ha demostrado que la sintonización de la frecuencia de los receptores de sonido de las antenas correlaciona con los pulsos de alta frecuencia de los cantos de cortejo conoespecíficos (Riabinina *et al.* 2011). De acuerdo con nuestros resultados, la cría en recursos alternativos también modifica la correlación entre la frecuencia y el período de los pulsos de la estructura A (mayor frecuencia y menor período en *T. terscheckii* y lo opuesto en *O. sulphurea*). Sin embargo, existe un gran solapamiento al considerar únicamente la frecuencia a la cual se emite el canto de los machos criados en ambos recursos (Figura 4). En consecuencia, esta evidencia no da apoyo a la hipótesis que sugiere que la reducción en el volumen al cual se emite el canto podría compensarse por un ajuste en la sintonización de la frecuencia.

De todas maneras, se requieren de estudios que permitan evaluar las respuesta plásticas que ejercen los sustratos de cría sobre la percepción del canto por parte de las hembras de *D. buzzatii* y de *D. koepferae*, así como también el efecto que tienen las modificaciones del canto inducidas por el recurso en la

elección de pareja de las hembras *D. koepferae*, para desentrañar el rol que ha jugado el salto de hospedador en la divergencia de los sistemas de comunicación de estas especies hermanas.

3.4.2. Implicancias de la morfología alar en las variaciones de los cantos

Existe un supuesto ampliamente extendido en bioacústica acerca de la relación entre el tamaño del organismo y los parámetros espectrales del canto. Diversos estudios han reportado que los insectos de mayor tamaño tienden a cantar a una frecuencia menor que los de menor tamaño (Bennet-Clark 1998; Brown *et al.* 1996; Cocroft & De Luca 2006).

En este contexto, *D. buzzatii* y *D. koepferae* constituyen un modelo apropiado para poner a prueba esta hipótesis debido a que hay abundante evidencia de que el medio de cría durante el desarrollo larvario afecta el tamaño de las alas (revisión en Hasson *et al.* 2009). En esta tesis también hemos demostrado el efecto de la planta hospedadora sobre la morfología alar (Tabla 1), en concordancia con estudios previos. Sin embargo, la covariable tamaño del centroide (TC) no resultó significativa en ninguno de los tres subconjuntos de datos (ANCOVA/MANCOVAs Tablas 4-6). Por lo tanto, podemos descartar que las diferencias encontradas, tanto genéticas como ambientales, en la señal acústica sean el producto de relaciones alométricas dependientes del tamaño de las alas o de los machos en general (dado que el tamaño de las alas es utilizado también como estimador del tamaño corporal en *Drosophila*).

Un aspecto que no se abordó en esta tesis es el estudio de la anatomía del músculo torácico hg1 que como se demostró en *D. melanogaster* reduce el volumen al cual se emite la nota sinusoidal no pulsada (Shirangi *et al.* 2013). Si se observaran diferencias dependientes del sustrato de cría a nivel del músculo torácico hg1 entre machos criados en cardón y en tuna, entonces podría proporcionar una explicación para la variación en el volumen de emisión de las estructuras A y B observadas entre machos de *D. koepferae* criados en sustratos alternativos. Por lo tanto, futuros estudios podrían apuntar a evaluar la relación entre plasticidad fenotípica a nivel de este músculo, el sustrato de cría y las diferencias en el volumen de las estructuras del canto halladas en *D. koepferae* y si estas diferencias tienen base genética al igual que la encontrada para el canto.

Además de un posible efecto alométrico como explicación para algunas de las variaciones encontradas en los cantos, existe un interés biomecánico en el sistema conformación alar-estructura del canto en los insectos (Bennet-Clark 1998). Este sistema puede impulsar la divergencia en las señales acústicas así como también restringirla (Wilkins *et al.* 2013). Entre los insectos más estudiados desde este punto de vista se encuentran los grillos (Pitchers *et al.* 2014). En estos organismos las alas son utilizadas únicamente para la producción de señales acústicas, a diferencia de las moscas que también las utilizan para el vuelo. Es así que se presume que el principal agente selectivo que actúa sobre la variación en la morfología del ala en los grillos es la preferencia de las hembras. Sin embargo, en *Drosophila* podría existir algún tipo de compensación entre las presiones selectivas ejercidas sobre el canto y el vuelo que podría limitar la selección sexual direccional.

Los recursos de cría indujeron modificaciones en la conformación alar en ambas especies (Tabla 2). Las líneas (genotipos), a su vez, respondieron de forma diferencial a la cría en distintas plantas hospedadoras (Tabla 2) en consonancia con estudios previos (Soto *et al.* 2008). Estos resultados nos permitieron evaluar la hipótesis de que la variación en la conformación del ala induce modificaciones en la estructura del canto. Nuestros resultados mostraron que la frecuencia dominante de los pulsos de la estructura A, el período de los pulsos de la estructura B y la duración de la estructura B covarían moderadamente con la conformación alar en *D. buzzatii*. Asimismo, observamos una tendencia similar, aunque no significativa en *D. koepferae*. Sin embargo, es necesario destacar que la potencia de la prueba es baja debido a que solo incluimos siete líneas en nuestros experimentos. En consecuencia serían necesarios estudios adicionales, incluyendo un mayor número de líneas, para confirmar estos resultados.

Un estudio similar en el grillo *Teleogryllus commodus* (Pitchers *et al.* 2014) mostró una covariación significativa entre la estructura del canto y la conformación de las alas en solo una de las varias poblaciones estudiadas. Los coeficientes de covariación oscilaron entre 0,2 y 0,4 para la mayoría de las poblaciones, excepto en la única población cuyo coeficiente de covariación fue significativo y ascendió a 0,7. Nuestro estudio reveló un bajo coeficiente de covariación en *D. koepferae* (0,22) y una moderada covariación en *D. buzzatii*

(0,49). Dada la importancia de la señal acústica en esta última, los resultados parecen indicar que la variación en la conformación de las alas tendría el potencial de influir en la evolución del canto de cortejo en *D. buzzatii* (Wilkins *et al.* 2013). Es decir, que podría imponer un límite superior a la evolución de los parámetros correlacionados que se encuentren bajo selección sexual direccional.

3.5. Bibliografía

- Adams D. C. & Otárola-Castillo E. (2013) geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods in Ecology and Evolution* **4**, 393-9.
- Bennet-Clark H. C. (1998) Size and scale effects as constraints in insect sound communication. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **353**, 407-19.
- Bentsen C. L., Hunt J., Jennions M. D. & Brooks R. (2006) Complex multivariate sexual selection on male acoustic signaling in a wild population of *Teleogryllus commodus*. *The American Naturalist* **167**, E102-E16.
- Bioacoustics Research Program. (2011) Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software, Version 1.4. The Cornell Lab of Ornithology, New York, USA. Available at <http://www.birds.cornell.edu/raven>.
- Boughman J. W. (2002) How sensory drive can promote speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 571-7.
- Bro-Jørgensen J. (2010) Dynamics of multiple signalling systems: animal communication in a world in flux. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 292-300.
- Brown W. D., Wideman J., Andrade M. C. B., Mason A. C. & Gwynne D. T. (1996) Female choice for an indicator of male size in the song of the black-horned tree cricket, *Oecanthus nigricornis* (Orthoptera: Gryllidae: Oecanthinae). *Evolution* **50**, 2400-11.
- Butlin R., DeBelle A., Kerth C., Snook R. R., Beukeboom L. W., Castillo C. R. F., Diao W., Maan M. E., Paolucci S. & Weissing F. J. (2012) What do we need to know about speciation? *Trends in Ecology & Evolution* **27**, 27-39.
- Byrne B. C. (1999) Behaviour-genetic analysis of lovesongs in desert species of *Drosophila*. University of Leicester, UK.
- Carreira V. P., Padró J., Koch N. M., Fontanarrosa P., Alonso I. & Soto I. M. (2014) Nutritional composition of *Opuntia sulphurea* G. Don cladodes. *Haseltonia* **19**, 38-45.

- Carreira V. P., Soto I. M., Hasson E. & Fanara J. J. (2006) Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 1275-82.
- Carroll S. P., Klassen S. P. & Dingle H. (1998) Rapidly evolving adaptations to host ecology and nutrition in the soapberry bug. *Evolutionary Ecology* **12**, 955-68.
- Cocroft R. B. & De Luca P. (2006) Size-frequency relationships in insect vibratory signals. In: *Insect sounds and communication: Physiology, behavior, ecology and evolution* pp. 99-110. CRC, New York.
- Cocroft R. B., Rodriguez R. L. & Hunt R. E. (2010) Host shifts and signal divergence: mating signals covary with host use in a complex of specialized plant-feeding insects. *Biological Journal of the Linnean Society* **99**, 60-72.
- Corio C., Soto I. M., Carreira V., Padró J., Betti M. I. L. & Hasson E. (2013) An alkaloid fraction extracted from the cactus *Trichocereus terscheckii* affects fitness in the cactophilic fly *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **109**, 342-53.
- Cornwallis C. K. & Uller T. (2010) Towards an evolutionary ecology of sexual traits. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 145-52.
- David J. R., Gibert P., Legout H., Pétavy G., Capy P. & Moreteau B. (2005) Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity* **94**, 3-12.
- De Panis D. N., Padró J., Furió-Tarí P., Tarazona S., Milla Carmona P. S., Soto I. M. & Hasson E. (2016) Transcriptome modulation during host shift is driven by secondary metabolites in desert *Drosophila*. *Molecular Ecology* **25**, 4534-4550.
- Debat V., Debelle A. & Dworkin I. (2009) Plasticity, canalization, and developmental stability of the *Drosophila* wing: joint effects of mutations and developmental temperature. *Evolution* **63**, 2864-76.
- Derryberry E. P., Seddon N., Claramunt S., Tobias J. A., Baker A., Aleixo A. & Brumfield R. T. (2012) Correlated evolution of beak morphology and song in the neotropical woodcreeper radiation. *Evolution* **66**, 2784-97.
- Duellman W. E. & Trueb L. (1994) *Biology of amphibians*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Elewa A. M. T. (2010) *Morphometrics for nonmorphometricians*. Springer, Berlin.

- Endler J. A. (1992) Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *American Naturalist*, S125-S53.
- Etges W. J. (2002) Divergence in mate choice systems: does evolution play by rules? *Genetica* **116**, 151-66.
- Etges W. J., De Oliveira C. C., Gragg E., Ortíz-Barrientos D., Noor M. A. & Ritchie M. G. (2007) Genetics of incipient speciation in *Drosophila mojavensis*. I. Male courtship song, mating success, and genotype x environment interactions. *Evolution* **61**, 1106-19.
- Etges W. J., Veenstra C. L. & Jackson L. L. (2006) Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. VII. Effects of larval dietary fatty acids on adult epicuticular hydrocarbons. *Journal of chemical ecology* **32**, 2629-2646.
- Ewing A. W. & Miyan J. A. (1986) Sexual selection, sexual isolation and the evolution of song in the *Drosophila repleta* group of species. *Animal Behaviour* **34**, 421-9.
- Fairbairn D. J. (2005) Allometry for sexual size dimorphism: testing two hypotheses for Rensch's rule in the water strider *Aquarius remigis*. *The American Naturalist* **166**, S69-S84.
- Falconer D. S. & Mackay T. F. (1996) *Introduction to quantitative genetics*. Longman Group Ltd, Harlow.
- Fanara J. J., Fontdevila A. & Hasson E. (1999) Oviposition preference and life history traits in cactophilic *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association with their natural hosts. *Evolutionary Ecology* **13**, 173-90.
- Ghalambor C. K., McKay J. K., Carroll S. P. & Reznick D. N. (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* **21**, 394-407.
- Grillet M., Everaerts C., Houot B., Ritchie M. G., Cobb M. & Ferveur J.-F. (2012) Incipient speciation in *Drosophila melanogaster* involves chemical signals. *Scientific Reports* **2**, 224.
- Hallsson L. R. & Björklund M. (2012) Selection in a fluctuating environment and the evolution of sexual dimorphism in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Evolutionary Biology* **25**, 1564-75.

- Hasson E., Naveira H. & Fontdevila A. (1992) The breeding sites of Argentinian cactophilic species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). *Revista Chilena de Historia Natural* **65**, 319–326.
- Hasson E., Soto I. M., Carreira V. P., Corio C., Soto E. M. & Betti M. I. L. (2009) Host plants, fitness and developmental instability in a guild of cactophilic species of the genus *Drosophila*. In: *Ecotoxicology Research Developments* pp. 89-109, Hauppauge NY.
- Hirsch H. & Tompkins L. (1994) The flexible fly: experience-dependent development of complex behaviors in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* **195**, 1-18.
- Hoikkala A., Kaneshiro K. Y. & Hoy R. R. (1994) Courtship songs of the picture-winged *Drosophila planitibia* subgroup species. *Animal Behaviour* **47**, 1363-74.
- Hoikkala A. & Lumme J. (1987) The genetic basis of evolution of the male courtship sounds in the *Drosophila virilis* group. *Evolution*, 827-45.
- Hoikkala A. & Suvanto L. (1999) Male courtship song frequency as an indicator of male mating success in *Drosophila montana*. *Journal of Insect Behavior* **12**, 599-609.
- Hurtado J., Soto E. M., Orellana L. & Hasson E. (2012) Mating success depends on rearing substrate in cactophilic *Drosophila*. *Evolutionary Ecology* **26**, 733-43.
- Klingenberg C. P. (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* **11**, 353-7.
- Klingenberg C. P. (2016) Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution* **226**, 113-37.
- Lagisz M., Wen S. Y., Routtu J., Klappert K., Mazzi D., Morales-Hojas R., Schäfer M. A., Vieira J., Hoikkala A. & Ritchie M. G. (2012) Two distinct genomic regions, harbouring the period and fruitless genes, affect male courtship song in *Drosophila montana*. *Heredity* **108**, 602-8.
- Márquez E. J. & Knowles L. L. (2007) Correlated evolution of multivariate traits: detecting co-divergence across multiple dimensions. *Journal of Evolutionary Biology* **20**, 2334-48.
- Matsubayashi K. W., Ohshima I. & Nosil P. (2010) Ecological speciation in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **134**, 1-27.

- Morley E. L., Steinmann T., Casas, J. & Robert D. (2012) Directional cues in *Drosophila melanogaster* audition: structure of acoustic flow and inter-antennal velocity differences. *Journal of Experimental Biology* **215**, 2405-2413.
- Oksanen J., Kindt R., Legendre P., O'Hara B., Simpson G. L., Solymos P., Stevens M. H. H. & Wagner H. (2013) The vegan package. *Community Ecology Package* **10**.
- Oliveira C. C., Manfrin M. H., Sene F. d. M. & Etges W. J. (2013) Evolution of male courtship songs in the *Drosophila buzzatii* species cluster. In: *Speciation: Natural Processes, Genetics and Biodiversity* (ed P. Michalak) pp. 137-64. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Otte T., Hilker M. & Geiselhardt S. (2016) Phenotypic plasticity of mate recognition systems prevents sexual interference between two sympatric leaf beetle species. *Evolution* 10.1111/evo.12976.
- Padro J. & Soto I. M. (2013) Exploration of the nutritional profile of *Trichocereus terscheckii* (Parmentier) Britton & Rose stems. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **15**, 1-12.
- Pennanec'h M., Bricard L., Kunesch G. & Jallon J. M. (1997) Incorporation of fatty acids into cuticular hydrocarbons of male and female *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* **43**, 1111-1116.
- Pfennig D. W., Wund M. A., Snell-Rood E. C., Cruickshank T., Schlichting C. D. & Moczek A. P. (2010) Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 459-67.
- Pitchers W. R., Klingenberg C. P., Tregenza T., Hunt J. & Dworkin I. (2014) The potential influence of morphology on the evolutionary divergence of an acoustic signal. *Journal of Evolutionary Biology* **27**, 2163-76.
- Podós J. (2001) Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin's finches. *Nature* **409**, 185-8.
- Price T. D. (2006) Phenotypic plasticity, sexual selection and the evolution of colour patterns. *Journal of Experimental Biology* **209**, 2368-76.
- Reti L. & Castrillón J. (1951) Cactus alkaloids. I. *Trichocereus terscheckii* (Parmentier) Britton and Rose. *Journal of the American Chemical Society* **73**, 1767-9.

- Riabinina O., Dai M., Duke T. & Albert J. T. (2011) Active process mediates species-specific tuning of *Drosophila* ears. *Current Biology* **21**, 658-664.
- Rodríguez R. L., Sullivan L. M., Snyder R. L. & Cocroft R. B. (2008) Host shifts and the beginning of signal divergence. *Evolution* **62**, 12-20.
- Rohlf F. J. (2004) tpsDig 1.4. *Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.*
- Ruiz-Montoya L. & Núñez-Farfán J. (2013) Testing local host adaptation and phenotypic plasticity in a herbivore when alternative related host plants occur sympatrically. *PloS one* **8**, e79070.
- Rundle H. D. & Nosil P. (2005) Ecological speciation. *Ecology Letters* **8**, 336-52.
- Saarikettu M., Liimatainen J. & Hoikkala A. (2005) The role of male courtship song in species recognition in *Drosophila montana*. *Behavior Genetics* **35**, 257-63.
- Schlichting C. D. & Pigliucci M. (1998) *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sinauer Associates Incorporated.
- Servedio M. R., Van Doorn G. S., Kopp M., Frame A. M. & Nosil P. (2011) Magic traits in speciation: 'magic' but not rare? *Trends in Ecology & Evolution* **26**, 389-97.
- Shirangi T. R., Stern D. L. & Truman J. W. (2013) Motor control of *Drosophila* courtship song. *Cell Reports* **5**, 678-86.
- Smith G., Fang Y., Liu X., Kenny J., Cossins A. R., Oliveira C. C., Etges W. J. & Ritchie M. G. (2013) Transcriptome-wide expression variation associated with environmental plasticity and mating success in cactophilic *Drosophila mojavensis*. *Evolution* **67**, 1950-63.
- Soto I. M., Carreira V. P., Fanara J. J. & Hasson E. (2007) Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 1.
- Soto I. M., Carreira V. P., Soto E. M., Márquez F., Lipko P. & Hasson E. (2013) Rapid divergent evolution of male genitalia among populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolutionary Biology* **40**, 395-407.
- Soto I. M., Manfrin M. H. & Hasson E. (2008) Host-dependent phenotypic plasticity of aedeagus morphology in a pair of cactophilic sibling *Drosophila* species of the *repleta* group (Diptera, Drosophilidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **46**, 368-73.

- Stearns S. C., Kaiser M. & Kawecki T. J. (1995) The differential genetic and environmental canalization of fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* **8**, 539-57.
- Stillwell R. C., Blanckenhorn W. U., Teder T., Davidowitz G. & Fox C. W. (2010) Sex differences in phenotypic plasticity affect variation in sexual size dimorphism in insects: from physiology to evolution. *Annual Review of Entomology* **55**, 227.
- Stintzing F. C. & Carle R. (2005) Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition & Food Research* **49**, 175-94.
- Stireman III J. O., Nason J. D. & Heard S. B. (2005) Host-associated genetic differentiation in phytophagous insects: general phenomenon or isolated exceptions? Evidence from a goldenrod-insect community. *Evolution* **59**, 2573-87.
- Wilkins M. R., Seddon N. & Safran R. J. (2013) Evolutionary divergence in acoustic signals: causes and consequences. *Trends in Ecology & Evolution* **28**, 156-66.

Capítulo III

Patrones de diferenciación geográfica y diversificación del canto en *D. buzzatii*

4.1. Introducción

En el capítulo I concluimos que el canto de cortejo tiene una importancia primaria en la elección de pareja de las hembras de *D. buzzatii* y en el capítulo II vimos, además, que existe variación genética intrapoblacional para los parámetros que componen el canto, lo cual podría posibilitar su divergencia y evolución. La evolución de las señales involucradas en el apareamiento en una población podrían conducir a la diferenciación (e incluso aislarla sexualmente) respecto de otras cuyas señales se mantuvieron igual o evolucionaron de manera diferente (Grace & Shaw 2011). El surgimiento de estos patrones de variación interpoblacional es el resultado de la contribución relativa de cuatro procesos evolutivos diferentes: mutación, selección, deriva genética y flujo génico (Dobzhansky *et al.* 1988).

En general, se propone que las señales involucradas en el aislamiento reproductivo frecuentemente experimentan selección estabilizadora dentro de la especie. De esta manera, el potencial para la divergencia evolutiva se vería fuertemente reducido (Shaw *et al.* 2011). Surge entonces la pregunta ¿Cómo se diversifican estos sistemas en un marco en que la selección estabilizadora es el proceso dominante?

Por un lado, las mutaciones con efectos pleiotrópicos tanto en las señales como en las preferencias deprimen el efecto de la selección estabilizadora debido a que las variantes de las señales se introducen en la población “acopladas” a las variantes de preferencia (Shaw *et al.* 2011). Alternativamente, la diversificación de los cantos podría ser consecuencia de correlaciones genéticas con otros caracteres (pleiotropía o ligamiento; Pfennig *et al.* 2010).

Por otro lado, los múltiples parámetros que componen estas señales complejas no siempre están sujetos a las mismas fuerzas evolutivas. Por ejemplo,

el canto plesiomórfico (ancestral) en el grupo de especies *D. repleta* (al cual pertenece el complejo *D. buzzatii*), se cree que estaba compuesto por dos tipos de estructuras (A y B; ver “Análisis de los cantos” en el Capítulo II) y que la pérdida de una u otra estructura ocurrió a lo largo de la evolución de estas especies (Ewing & Miyani 1986). Para que un carácter sexual se pierda, es necesario que las preferencias de la hembra por dicho carácter se hayan reducido o perdido. Si las preferencias desaparecen, el carácter puede perderse posteriormente por selección natural o deriva genética (Wiens 2001). Por lo tanto, no podemos descartar que ciertos parámetros del canto puedan estar evolucionando de manera neutral.

Además existe evidencia de que los parámetros del canto puedan estar sujetos a diferentes tipos de selección (Gerhardt 1991; Bentsen *et al.* 2006). Los parámetros de la señal acústica pueden clasificarse en estáticos (estereotipados) y dinámicos (variables). Los primeros a menudo están asociados con funciones de preferencia unimodales en donde los valores intermedios se ven favorecidos. Este tipo de caracteres estarían involucrados en el aislamiento reproductivo (Shaw & Herlihy 2000; Klappert & Reinhold 2003). Por el contrario, los caracteres dinámicos se asocian frecuentemente a funciones de preferencia de final abierto (*open-ended*) en los que los favorecidos son los valores extremos (Shaw & Herlihy 2000; Klappert & Reinhold 2003). Este tipo de caracteres estaría asociado a parámetros que implican un mayor costo energético en la producción de la señal (por ejemplo, menor duración del período, mayor duración de las notas, etc). Se ha argumentado que los caracteres dinámicos transmiten de forma confiable información sobre la calidad genética o fenotípica de un determinado macho (Bentsen *et al.* 2006). De esta manera, dos fuentes de presiones selectivas cualitativamente diferentes, la interferencia de la señal interespecífica y la competencia reproductiva intraespecífica, pueden promover la evolución de las señales acústicas.

Teniendo en cuenta que, en general, los insectos fitófagos presentan una fuerte asociación con las plantas hospedadoras (Mopper & Strauss 2013), la distribución en parches de sus poblaciones crea el potencial para la estructuración genética de las poblaciones (*i.e.*, que algunas poblaciones podrían evolucionar como unidades evolutivas independientes; Slatkin 1994). Sin embargo, el

surgimiento de adaptaciones locales va a depender del grado de flujo génico entre los parches (Mopper & Strauss 1998).

Por último, la deriva genética también podría contribuir a la diferenciación debido a la asociación de *D. buzzatii* con las variedades comerciales del cactus *Opuntia ficus indica*. Esta cactácea se utiliza para consumo humano o del ganado y se ha extendido su uso en huertos familiares (Ervin 2012). Existe evidencia de deriva genética por intervención humana durante la introducción de *D. buzzatii* a Australia a través de la importación de pencas de varias especies de *Opuntia* (Barker 2013). Por otro lado, el incremento de las plantaciones de *O. ficus indica* en el noroeste de la Argentina (Ervin 2012) podría incrementar el flujo génico conectando parches previamente aislados.

3.1.1. Objetivos e hipótesis

En este capítulo nos proponemos desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- Determinar si existen variaciones en el canto en diferentes poblaciones de *D. buzzatii*.
- Determinar el rol que ha desempeñado la selección y la deriva genética en moldear patrones interpoblacionales.

Para ello, se trabajará con las siguientes hipótesis:

- Las poblaciones argentinas de *D. buzzatii* presentan variaciones poblacionales en el canto de cortejo.
- El patrón de divergencia interpoblacional puede explicarse por procesos selectivos.
- El patrón de divergencia interpoblacional puede explicarse por eventos estocásticos.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Stocks de drosófilas y análisis de los cantos

Se recolectaron moscas en 12 localidades, cubriendo la mayor parte del rango geográfico en Argentina (Figure 1; Tabla 1). Las hembras se colocaron individualmente en tubos con medio de cultivo con la intención de fundar aislíneas, es decir líneas originadas a partir de la progenie de las hembras fecundadas en la naturaleza.

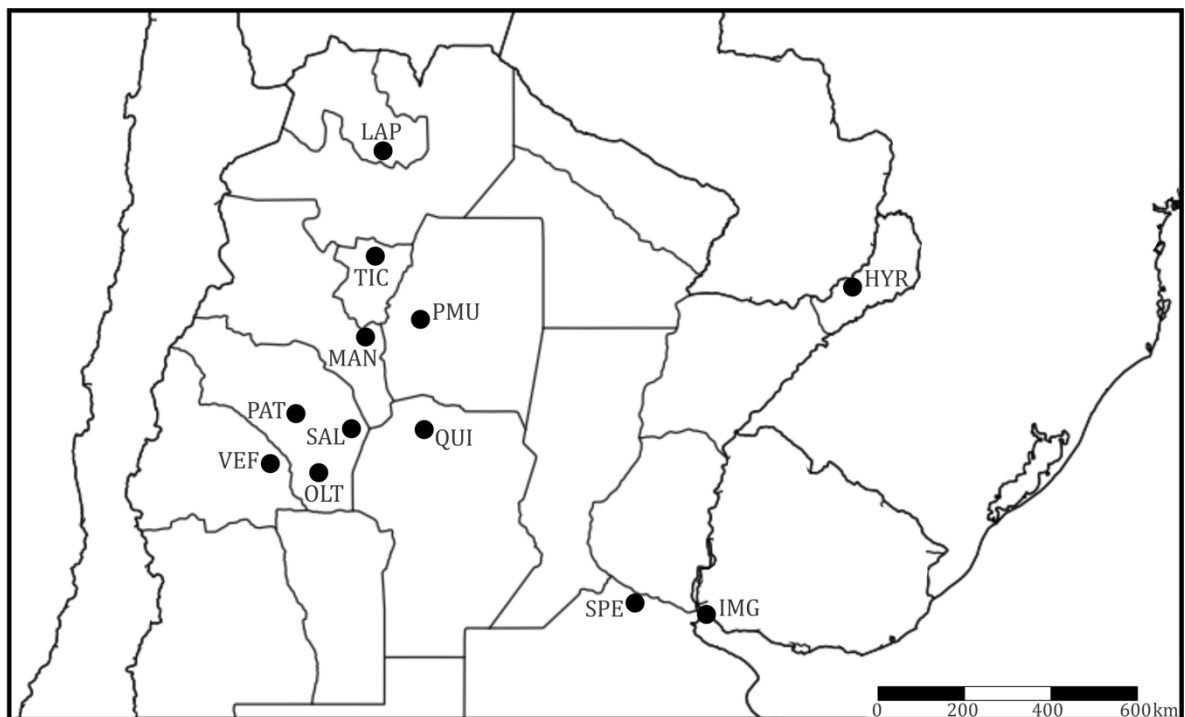


Figura 1. Mapa que muestra las 12 poblaciones muestreadas de *D. buzzatii*.

Tabla 1. Lista de las localidades muestreadas, los acrónimos utilizados en esta Tesis y las coordenadas geográficas.

Población	Acrónimo	Provincia	Latitud	Longitud
Manantial	MAN	Catamarca	28° 07' 57" S	65° 28' 31" O
Hipólito Yrigoyen	HYR	Misiones	27° 05' 06" S	55° 17' 06" O
Los Lapachos	LAP	Jujuy	24° 26' 11" S	65° 04' 57" O
Isla Martín García	IMG	Buenos Aires	34° 12' 49" S	58° 16' 02" O
Olta	OLT	La Rioja	30° 36' 22" S	66° 16' 20" O
Patquía	PAT	La Rioja	30° 02' 52" S	66° 52' 42" O
Villa Quilino	QUI	Córdoba	30° 12' 16" S	64° 28' 30" O
Salar	SAL	La Rioja	30° 09' 17" S	65° 52' 10" O
San Pedro	SPE	Buenos Aires	33° 39' 59" S	59° 40' 46" O
Pampa Muyoj	PMU	Stgo. del Estero	27° 54' 21" S	64° 26' 32" O
Ticucho	TIC	Tucumán	26° 34' 34" S	65° 14' 24" O
Valle Fértil	VFE	San Juan	30° 41' 26" S	67° 29' 45" O

Debido a que las especies del cluster *D. buzzatii* son crípticas, se identificó la especie analizando la genitalia de los machos de la descendencia de esas hembras, usando la morfología del aedeago como carácter diagnóstico (Manfrin & Sene 2006). Se fundaron entre 8 y 15 isolíneas por población y se criaron por cuatro generaciones en el laboratorio en medio estándar de *Drosophila*. Luego se sembraron 40 larvas por cada isolínea (para controlar los efectos de la densidad durante el desarrollo) en tubos conteniendo medio de cría semi-natural utilizando material fresco del cactus *O. ficus indica*. Se eligió esta especie de *Opuntia* por ser la que se encuentra más extendida a lo largo de la distribución de *D. buzzatii* y la que mostró un mejor ambiente nutricional para el desarrollo de las moscas (Fanara *et al.* 1996; Fernández Iriarte & Hasson 2000; Fernández Iriarte *et al.* 2003). Para la preparación del medio de cría semi-natural se siguió el mismo procedimiento descrito en el Capítulo II (Ver “Medios de cría semi-naturales” en Materiales y Métodos). El desarrollo larvario tuvo lugar bajo un fotoperíodo de 12:12 horas luz:oscuridad y a 25±1 °C.

Se grabó el canto de un único macho de cinco días de edad por isolínea. Las condiciones de grabación fueron las mismas que se utilizaron en los Capítulos anteriores.

Se utilizó el programa Raven Pro v1.4 (Bioacoustics Research Program 2011) para realizar la medición de los siguientes subconjuntos de datos acústicos:

Volumen: Amplitud a la cual se emiten las estructuras A (Va) y B (Vb) por nota. Debido a que encontramos una alta correlación entre ambos volúmenes ($r=0,82$) solo utilizamos el Va como representante del volumen general del canto (Vol).

Estructura A: Se midió la duración de la serie pulsos (Da), la frecuencia dominante por pulso (FDa), el período corto (PERaC) y el período largo (PERaL).

Estructura B: Se midió la duración de la serie pulsos (Db), el período (PERb) y la frecuencia dominante por pulso (FDb).

Para una descripción más detallada del canto de *D. buzzatii* y los diferentes parámetros que lo describen ver “Análisis de los cantos” en la sección Materiales y Métodos del Capítulo II. Cada parámetro fue medido cinco veces por cada canto y se usaron las medias de cada parámetro por macho en los análisis subsiguientes. Cuando se analizaron parámetros del canto que estaban medidos en diferentes unidades, las medias individuales fueron estandarizadas. El volumen se transformó a logaritmo con el objeto de homogeneizar las varianzas.

Aunque no encontramos un efecto del tamaño del ala sobre ninguno de los parámetros del canto en el estudio de la variación intrapoblacional (ver Capítulo II), controlamos por este factor debido a que sí podría ejercer un efecto a un nivel superior de organización como es el estudio interpoblacional. Para ello se obtuvo el tamaño del centroide (TC) de las alas derechas de los mismos machos que se utilizaron para grabar el canto y se digitalizaron los mismos *landmarks* utilizados en el Capítulo anterior (ver “Morfometría geométrica de las alas” en la sección Materiales y Métodos del Capítulo II).

Realizamos un análisis de varianza univariado (ANOVA) utilizando el TC como variable dependiente y el factor Población como variable independiente para explorar si existen diferencias entre las poblaciones. Luego realizamos análisis multivariados de varianza (MANOVA) y de covarianza (MANCOVA) utilizando cada subconjunto de datos acústicos como variables dependientes, el TC como covariable y el factor Población como variable independiente. Para determinar cuáles de los parámetros del canto eran los responsables de los patrones revelados por estos análisis multivariados, se realizaron ANOVAs *post hoc* para cada parámetro. Una suposición adicional de los análisis de covarianza es que la

relación entre los cambios de la variable dependiente y los de los valores de la covariable es lineal y con la misma pendiente a lo largo de todos los tratamientos o muestras. Por este motivo realizamos pruebas de paralelismo que consistieron en evaluar la interacción covariable por tratamiento y en el caso que haya sido significativa se da el supuesto por incumplido y no continuamos con el análisis. El paquete estadístico utilizado fue el Statistica en su versión v8.0 (StatSoft, Inc. 2007).

Para visualizar el resultado de los MANCOVAs realizamos un análisis discriminante para encontrar la rotación que mejor separe la variación en el canto de las poblaciones utilizando los parámetros que resultaron significativos. Luego calculamos las medias y los errores estándar.

Todos los análisis de varianza y covarianza fueron realizados con la función *adonis* del paquete *Vegan* en R (Oksanen *et al.* 2013) basada en permutaciones. El análisis discriminante se realizó con el paquete estadístico STATISTICA v8.0 (StatSoft, Inc. 2007).

4.2.2. Diferenciación Genética entre las poblaciones

Para evaluar la diferenciación genética entre poblaciones se utilizaron dos tipos de evidencia: marcadores moleculares de ADN nuclear (microsatélites) y mitocondrial (gen de la citocromo oxidasa I, COI). La naturaleza diferencial de ambos tipos de marcadores nos permite obtener información sobre el flujo génico histórico a través del ADN mitocondrial e información sobre el flujo génico más reciente con los marcadores microsatélites (Goldstein & Schlöterer 1999).

Se extrajo ADN de un individuo por aislóna utilizando el kit de purificación de ADN Puregene (Gentra Systems, QIAGEN) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante para moscas individuales.

4.2.2.1. Marcadores microsatélites

Se generaron genotipos multilocus utilizando nueve loci microsatélites de repeticiones de dos nucleótidos: B3, B54, B63, B65, B65, K60, K72, K75, K76. Las secuencias de los *primers* empleados en este trabajo se muestran en la Tabla 1. El extremo 5' de los *primers forward* se marcó con un fluorocromo. Se emplearon cuatro fluoróforos diferentes para el marcado con el fin de poder genotipificar

múltiples loci simultáneamente en una misma PCR. Para las PCRs se usó Platinum Multiplex PCR Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Las condiciones térmicas del ciclado incluyeron un paso inicial de desnaturalización 94°C por 3 min., luego 35 ciclos a 94°C por 40 s., 58°C por 30 s., y 72°C por 40 s., con una extensión final a 72°C por 4 min.

Los productos de PCRs fueron genotipificados en el servicio de secuenciación y genotipificado de la FCEyN/UBA en un secuenciador ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems). Utilizamos Peak Scanner™ software v1.0 (Applied Biosystems) para la asignación de los alelos.

Se evaluó el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores empleando GENEPOP v4.0 (Rousset 2008). Debido a que este análisis reveló que el marcador B3 se encontraba en desequilibrio de ligamiento con K72, el primero fue descartado en los análisis posteriores.

Las estimaciones de diversidad fueron calculadas con el programa Microsatellite Analyser (MSA) v4.05 (Dieringer & Schlötterer 2003). La heterocigosidad esperada ($H_{e_{pr}}$), la varianza en la longitud de los alelos (V) y el número de alelos (N_a) fueron calculadas promediando 200 pseudorréplicas (este es un método de re-muestreo en el cual se descarta aleatoriamente un alelo por locus en cada pseudorréplica) con el fin de tomar en cuenta la pérdida de variación debida a las cinco generaciones de endogamia que sufrieron las isóneas (Schlotterer *et al.* 1997; Irvin *et al.* 1998; Agis & Schlötterer 2001; Kauer *et al.* 2003). Además se calculó la heterocigosidad esperada (H_e) basada en las frecuencias alélicas observadas.

Se estimaron los valores de F_{ST} , que miden el grado de diferenciación entre pares de poblaciones, (Weir & Cockerham 1984) siguiendo el procedimiento para isóneas implementado en el programa Microsatellite Analyser (MSA) v4.05 (Dieringer & Schlötterer 2003). La significación de los valores F_{ST} entre pares de poblaciones se obtuvo permutando los genotipos de cada par de poblaciones (130 mil veces) dado que este método no se basa en los supuestos de Hardy-Weinberg (Goudet *et al.* 1996; Michalakis & Excoffier 1996). Utilizamos Bonferroni para corregir por comparaciones múltiples.

4.2.2.2. Marcador de ADN mitocondrial

Se obtuvieron secuencias parciales (723 pares de bases) de la subunidad I del gen citocromo oxidasa (COI) de 7-9 individuos de cada población. Se utilizó el *primer* C1-N-2191 y una modificación del *primer* TY-J-1460 desarrollados por Simon *et al.* (1994; Tabla 2).

Para las reacciones de PCR se utilizó GoTaq(R) Green Master Mix (PROMEGA) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El ciclado térmico consistió de un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 3 min., luego le siguieron 35 ciclos de amplificación que consistieron en: 94°C por 40 s., 48°C por 40 s., y 72°C por 45 s., con una extensión final a 72°C por 8 min.

Los productos de PCR fueron sometidos a un proceso de purificación enzimática utilizando la técnica EXO/FastAP. Esta técnica consiste en agregar 10 U de Exonucleasa I y una unidad de Fosfatasa alcalina termosensible FastAP a 22 µl de producto de PCR. La mezcla resultante se incubó a 37°C por 30 min, y luego la reacción se detiene elevando la temperatura a 85°C por 15 minutos.

Todas las muestras se secuenciaron en ambas direcciones para chequear errores potenciales, en un Secuenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems). Las secuencias fueron procesadas utilizando el programa de edición Sequencher 4.5 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA), editadas en el programa BIOEDIT v7 (Hall 1999), y alineadas utilizando CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994).

Se empleó DNAsp v5.10.1 (Librado & Rozas 2009; Rozas 2009) para obtener las medidas estándar de diversidad genética y para calcular los índices D de Tajima (Tajima 1989) y F_s de Fu (Fu 1997). Valores negativos de ambos estadísticos indican un exceso de haplotipos que se encuentran en baja frecuencia, lo que podría ser consecuencia tanto de una expansión poblacional reciente o de eventos de selección positiva. En cambio, valores positivos de D (Tajima) y F_s (Fu) podrían resultar de la reunión de poblaciones divergentes o bien ser indicativo de selección equilibradora. El programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier & Schneider 2005) se usó para el cómputo de los F_{ST} pareados.

Tabla 2. Secuencias de los *primers* utilizados en esta tesis.

Marcador	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')
ADN nuclear (microsatélites)		
B3	TAGGGTATCGAAGCATTTGCCAACC	TGTTAGCGTCAACATTCTTGCTGCG
B54	TTTATACCATTGAGCGACCCCTCAG	CATGTATGGATTGGACCAACGTGCA
B55	CCGGATGAACTGTCCAATAGATTAC	AAGTTCCACTCGCATTTTCGCTACATC
B63	GCACAATTCGAATATAATCAACAAAGG	TTCGATAAGCGGCCACAATTATTG
B65	GAATTGTGGCCAAGTTTCGTAGAATC	CTGCCACTAGTGAAGTATCAACAATG
K60	CAACCATTGCCATTTTCATCTTACTGC	AAGACAATCCAGCTTCTATATGGCG
K72	CAAATGACCAGAGGGAAGCGGG	CGCCGAGGCACAGGAGCTGTTG
K75	TGCCCTGAATACCAGGAGCATAAT	ATAGGCAAACAGAGCGGCAAATAAC
K76	CATGGCATTTCGCATTAGCATTAGTA	CGATCTCAAATGCAAGCACTACCTG
ADN mitocondrial		
COI	CAATTTATCGCCTAAACTTCAGCC	CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC

Se realizaron tests de Mantel con el objetivo de evaluar la hipótesis de aislamiento por distancia mediante análisis de correlación entre las matrices de distancia genética y distancia geográfica (utilizando el paquete de R *ade4*). La distancia genética fue medida como valores de F_{ST} linearizados [$F_{ST}/(1 - F_{ST})$] tanto para los datos de COI como para los de microsatélites, y se utilizó el logaritmo de las distancias geográficas entre poblaciones. Los valores de significación se obtuvieron mediante análisis de permutaciones (se realizaron 9999 permutaciones).

4.2.3. Patrones de divergencia acústica y genética

Investigamos los procesos que gobiernan la evolución de la señal acústica comparando la diferenciación genética (F_{ST}) y la fenotípica (Q_{ST}). La estimación de la diferenciación en la señal acústica (Q_{ST}) se realizó utilizando grabaciones del canto de machos que se desarrollaron en jardín común, a densidad y temperatura controladas y de la misma la edad. De esta manera eliminamos la variación debida al ambiente de cría e interacciones genotipo-ambiente.

Para el cálculo de Q_{ST} se empleó la siguiente fórmula:

$$Q_{ST} = \sigma_B^2 / (\sigma_B^2 + 2\sigma_W^2)$$

donde σ_B^2 y σ_W^2 son las varianzas entre y dentro de las poblaciones, respectivamente (Raeymaekers *et al.* 2007). Al utilizar esta ecuación se asume que la proporción de la varianza total debida a efectos genéticos aditivos es igual a la heredabilidad del carácter. Los componentes de varianza para las estimaciones de Q_{ST} se obtuvieron mediante ANOVAs univariados para cada parámetro de la variable dependiente y las combinaciones de poblaciones pareadas como variable independiente usando el paquete *lme4* en R (R Development Core Team 2010).

Se estimaron Q_{ST} pareados para todos los parámetros del canto que resultaron significativos en los ANOVAs *post hoc* (Ver “Stocks de drosófilas y análisis de los cantos”).

Además, evaluamos la correlación entre los valores pareados de F_{ST} y de Q_{ST} mediante la prueba de Mantel utilizando el paquete *ade4* (Dray & Dufour 2007; Dray *et al.* 2016) en R. La misma prueba fue utilizada para evaluar la correlación entre la diferenciación fenética (utilizando distancias de Mahalanobis al cuadrado) y genética (basada en F_{ST} linearizados) entre las poblaciones y el logaritmo de la distancia geográfica entre los puntos de muestreo. Por último se evaluó el grado de correlación entre los parámetros del canto.

Para determinar si F_{ST} fue significativamente diferente de Q_{ST} se calcularon las medias con los intervalos de confianza del 95% (utilizando la técnica de *bootstrapping*) de los valores pareados de F_{ST} y Q_{ST} para cada parámetro. Estos análisis se hicieron utilizando el paquete *boot* (Canty & Ripley 2016) en R.

La hipótesis nula de evolución neutral (es decir, de equilibrio mutación-deriva genética) puede rechazarse tanto si Q_{ST} es significativamente mayor o menor que F_{ST} . El primer escenario, $Q_{ST} > F_{ST}$, puede ser el resultado de la rápida divergencia de la señal acústica entre las poblaciones y podría reflejar un proceso direccional de selección sexual (Leinonen *et al.*, 2003). El escenario alternativo, $Q_{ST} < F_{ST}$, podría ser interpretado como evidencia de que la selección estabilizadora es el proceso que gobierna la evolución de los cantos dentro de las poblaciones analizadas.

4.3. Resultados

4.3.1. Divergencia poblacional en la señal acústica

Se analizaron los cantos de 153 machos de *D. buzzatii* derivados de la progenie de hembras inseminadas en la naturaleza y recolectadas en 12 poblaciones naturales representativas del área de distribución de la especie en Argentina.

Encontramos que las poblaciones difieren en los tres subconjuntos de variables del canto de cortejo. Es decir, tanto el volumen al cual se emite el canto, como también los dos tipos de estructuras que conforman el canto (A y B) presentaron variación interpoblacional (Tabla 3).

Tabla 3. MANOVAs y MANCOVAs — usando como covariable el tamaño del centroide — del volumen y los dos tipos de estructuras que conforman el canto de *D. buzzatii*, respectivamente. *gl*: Grados de libertad.

	ANOVA ¹ /MANOVA ²				ANCOVA ¹ /MANCOVA ²			
	gl	CM	F	p-valor	gl	CM	F	p-valor
(a) Volumen¹								
Población	11	0,00382	2,04	0,0255*	11	0,00377	2,06	0,0267*
TC					1	0,00608	3,33	0,0713
Error	141	0,00187			138	0,00183		
(b) Estructura A²								
Población	11	0,00368	2,18	0,0003**	11	0,00374	2,38	0,0005**
TC					1	0,00785	4,98	0,0048**
Error	141	0,00168			138	0,00158		
(c) Estructura B²								
Población	11	0,00242	1,54	0,0345*	11	0,00245	1,55	0,0342*
TC					1	0,00169	1,07	0,3830
Error	141	0,00157			138	0,00157		

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

Además, encontramos diferencias significativas en el tamaño de las alas entre las poblaciones ($F_{(11,139)} = 2,79$; $p=0,002$; Figura 2). Por lo tanto, decidimos explorar si las diferencias encontradas en los MANOVAs se mantenían al incluir el tamaño del centroide (TC) como covariable. La covariable TC solo resultó significativa para el subconjunto de datos que describen la Estructura A del canto

(Tabla 3). Sin embargo, el factor Población continuó siendo significativo tras la corrección por tamaño del ala (Tabla 3b, MANCOVA). Por lo tanto, en las pruebas *post hoc* del volumen y de la estructura B se eliminó la covariable del modelo.

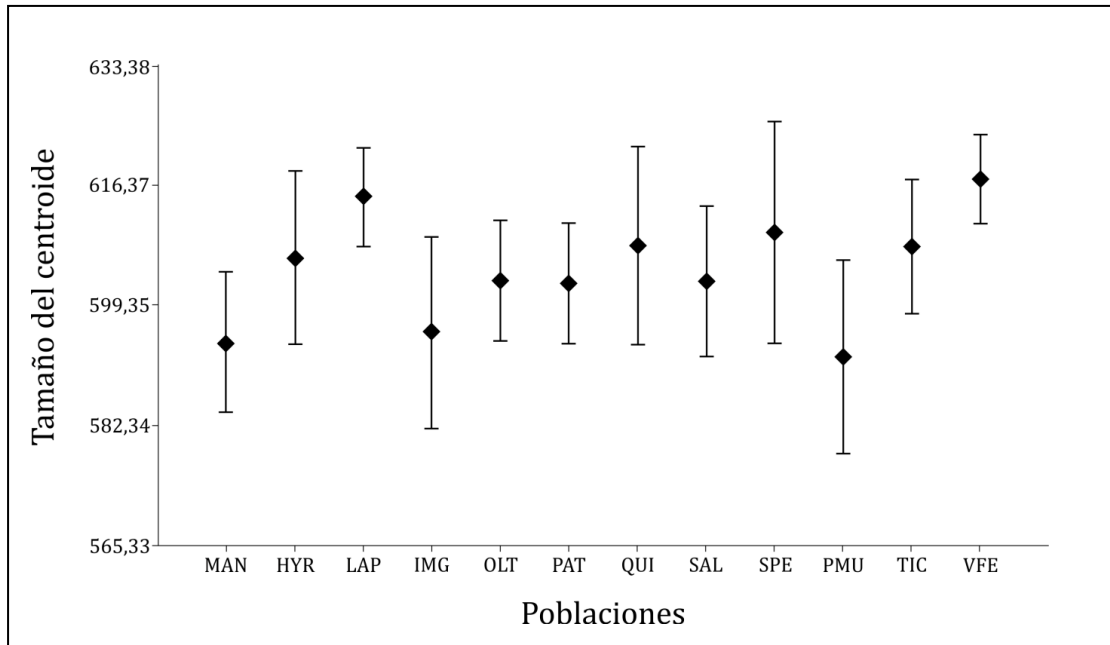


Figura 2. Valor medio del tamaño del ala e intervalos de confianza (95%) en cada una de las poblaciones analizadas.

En los ANCOVAs *post hoc* para la Estructura A, los parámetros FDa ($F_{(11,138)}=2.85$; $p=0,0012$), PERaC ($F_{(11,138)}=2.62$; $p=0,0044$) y PERaL ($F_{(11,138)}=2.62$; $p=0,0041$) resultaron significativos para el factor Población. La covariable TC solamente fue significativa para FDa ($F_{(1,138)}=10.34$; $p=0,0005$). Por consiguiente, exploramos cómo se relacionan estas últimas variables. La FDa fue inversamente proporcional al tamaño del ala y, aunque el coeficiente de correlación fue significativo, su valor fue bajo ($r=-0,26$; $p = 0,001$; Figura 3).

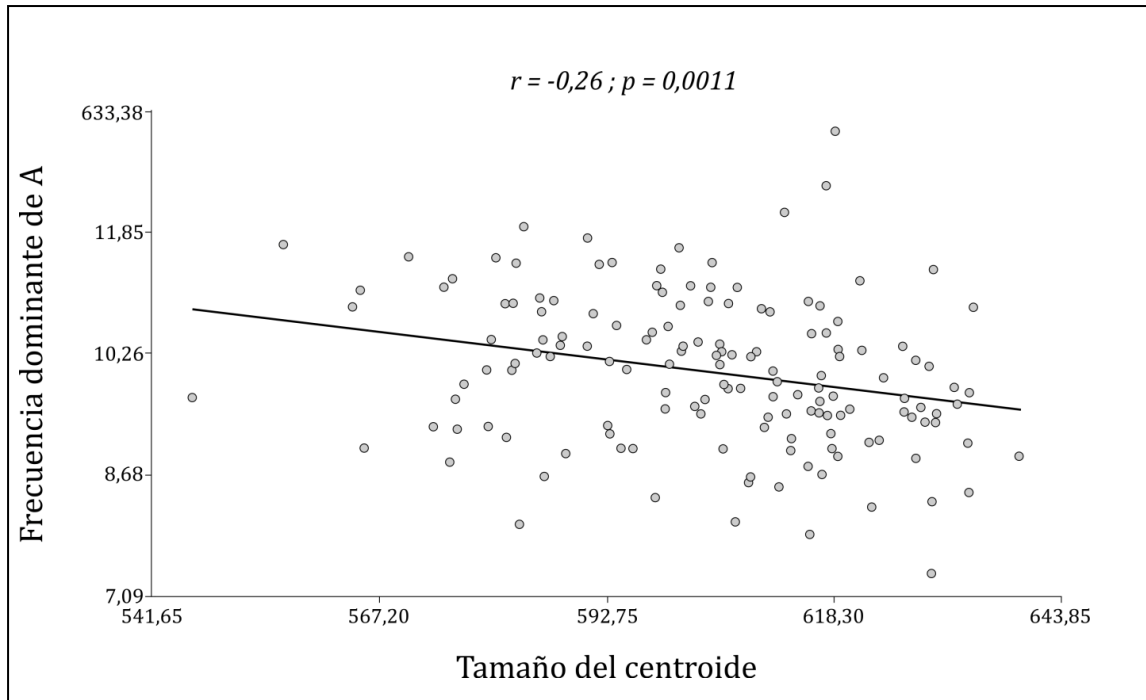


Figura 3. Correlación entre la frecuencia dominante de la estructura A del canto (en Hertz) y el tamaño del ala (en pixeles).

Por último, la única variable que resultó significativa en los ANOVAs *post hoc* para la Estructura B fue FDb ($F_{(11,141)}=3,29; p=0,0007$).

Los dos primeros ejes del análisis discriminante utilizando todas las variables significativas (Vol, FDa, PERaC, PERaL y FDb) explican el 60,6 % de las diferencias entre las poblaciones (Figura 4). El primer eje estuvo principalmente afectado por la frecuencia (FDa=-0,54) y el período corto (PERaC=0,51) de los pulsos de la estructura A y la frecuencia de los pulsos de la estructura B (FDb=-0,58). Por su parte, el segundo eje estuvo principalmente afectado por el volumen (Vol =-0,68) y por los parámetros espectrales de ambos tipos de estructuras (FDa=0,57; FDb=-0,60).

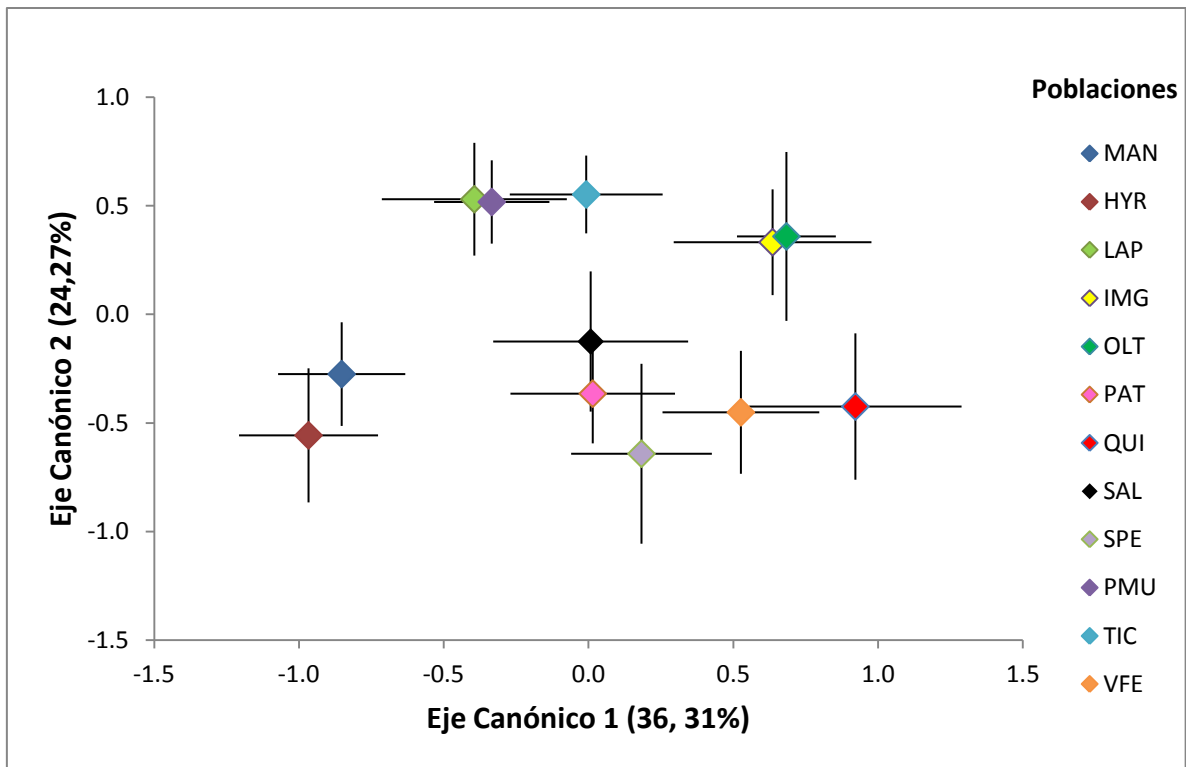


Figura 4. Medias (y errores estándar) para cada población de los dos primeros ejes resultantes del análisis discriminante utilizando los parámetros del canto que mostraron diferencias significativas. Entre paréntesis se indica la proporción de varianza explicada por cada Eje Canónico.

4.3.2. Diferenciación Genética entre las poblaciones

4.3.2.1. Resultados de los análisis de ADN mitocondrial

Se observó un bajo nivel de variación genética para este marcador y un total de 21 haplotipos (Figura 5). La diversidad haplotípica promedio (H_d) fue 0,41 y la diversidad nucleotídica promedio (π) fue 0,00077. Todas las poblaciones, excepto MAN y QUI, tuvieron haplotipos únicos. Los valores de los estadísticos que describen la variación del ADN mitocondrial (ADNmt) en cada población se muestra en la Tabla 4.

Posición de inicio desde el extremo 5'

	11	73	81	87	96	99	129	135	150	183	225	234	345	390	393	448	565	570	582	666	681	717
H1	G	T	A	A	T	A	T	A	C	C	T	T	T	T	C	T	G	T	G	G	T	A
H2	A
H3	.	A
H4	.	.	G	T	G
H5	.	.	.	G	C
H6	C
H7	G
H8	C
H9	G
H10	T
H11	T
H12	C	A
H13	C
H14	A
H15	C
H16	C
H17	C
H18	C
H19	A	.	.	.
H20	A	.	.
H21	C

Figura 5. Sitios variables del fragmento de 723pb del gen COI para los 21 haplotipos encontrados en las 98 muestras de *D. buzzatii* analizadas a lo largo de su distribución en Argentina.

Tabla 4. Diversidad genética por población, incluyendo ADN mitocondrial y microsatélites. Número de individuos analizados (n); número de sitios segregantes (S), Número de haplotipos (H), Diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (π). Valores promedio de: heterocigosis esperada (He), heterocigosis esperada utilizando pseudoréplicas (He_{pr}), número de alelos (Na), riqueza alélica (R) y Variación en la longitud de repetición (V).

	Diversidad mitocondrial					Diversidad nuclear					
	n	S	H	Hd	π	n	He	He_{pr}	V	Na	R
Global	98	21	21	0,43	0,00077	134	0,80	0,79	12,25	14,82	7,58
MAN	8	0	1	0,00	0,00000	12	0,84	0,80	11,24	6,41	7,31
HYR	8	3	4	0,64	0,00104	9	0,82	0,78	12,10	5,03	6,23
LAP	8	4	4	0,64	0,00138	12	0,81	0,79	11,90	6,29	7,09
IMG	7	2	3	0,67	0,00105	11	0,79	0,76	11,00	5,64	6,66
OLT	8	3	4	0,64	0,00104	12	0,83	0,81	11,07	6,44	6,92
PAT	8	3	4	0,64	0,00104	12	0,83	0,80	24,72	6,74	7,44
QUI	8	0	1	0,00	0,00000	8	0,78	0,74	6,76	4,58	6,13
SAL	9	3	4	0,58	0,00092	12	0,82	0,79	12,34	6,47	7,17
SPE	9	3	4	0,58	0,00094	9	0,78	0,74	8,54	5,07	6,71
PMU	9	3	3	0,42	0,00092	13	0,75	0,73	8,97	5,73	5,87
TIC	8	1	2	0,25	0,00053	12	0,82	0,79	13,19	6,65	7,70
VFE	8	4	4	0,64	0,00163	12	0,87	0,85	11,63	6,76	7,44

No se encontraron diferencias significativas entre poblaciones ($F_{ST}=0,013$; $p=0,066$). Los valores de las distancias F_{ST} estimadas entre pares de poblaciones se pueden ver en la Tabla 5. Ninguna de las comparaciones resultó significativa. Además, muchos valores fueron negativos, lo cual apoya la evidencia de que existe una mayor variación dentro (98,72%) que entre (1,28%) las poblaciones.

Tabla 5. Diferenciación genética entre las poblaciones. Por encima de la diagonal: valores de F_{ST} estimados a partir de microsatélites y por debajo de la diagonal: valores de F_{ST} estimados a partir de ADN mitocondrial.

	MAN	HYR	LAP	IMG	OLT	PAT	QUI	SAL	SPE	PMU	TIC	VFE
MAN		0,017	0,016	0,034	0,020	-0,002	0,025	0,013	0,037	0,032	0,006	0,031
HYR	-0,014		0,029	0,039	0,029	0,022	0,030	0,049	0,047	0,039	-0,005	0,025
LAP	-0,000	-0,006		0,053	0,042	0,013	0,038	0,028	0,036	0,035	0,018	0,043
IMG	-0,036	0,025	0,029		0,043	0,038	0,073	0,048	0,067	0,047	0,030	0,042
OLT	-0,000	0,001	-0,000	0,021		0,022	0,048	0,025	0,046	0,053	0,014	0,025
PAT	-0,000	-0,032	-0,000	0,018	0,000		0,029	0,013	0,035	0,028	0,009	0,008
QUI	0,135	0,065	0,098	0,068	0,059	0,049		0,056	0,032	0,046	0,017	0,058
SAL	-0,000	0,002	0,000	0,024	0,000	0,000	0,075		0,051	0,036	0,021	0,029
SPE	-0,000	0,001	0,000	0,021	0,000	0,000	0,059	0,000		0,051	0,027	0,046
PMU	-0,000	-0,014	-0,000	0,036	-0,000	0,000	0,135	0,000	-0,000		0,022	0,036
TIC	-0,014	0,000	-0,004	0,031	-0,045	0,005	0,060	0,001	0,004	-0,014		0,026
VFE	-0,014	0,000	-0,006	-0,027	-0,039	0,003	0,065	-0,002	0,001	-0,014	-0,046	

Los índices D de Tajima y F_s de Fu fueron negativos y significativos (-2,53; $p=0,001$ y -31,49; $p=0,000$; respectivamente). Por otro lado, la red de haplotipos obtenida con PopART (Leigh & Bryant 2015) arrojó una típica forma de estrella (Figura 6).

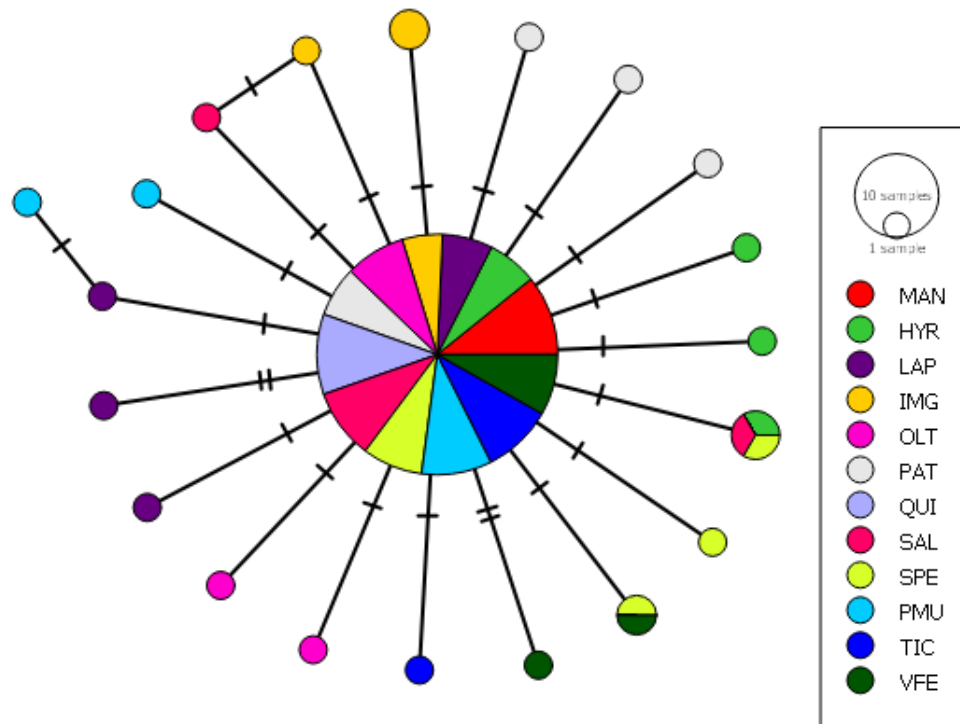


Figura 6. Red de haplotipos para las 98 secuencias de COI de *Drosophila buzzatii*. Cada círculo representa un haplotipo y su tamaño es proporcional a su frecuencia en el set de datos. Cada línea transversal indica un paso mutacional y cada color una población.

La mayor variación dentro que entre poblaciones, la red de haplotipos en forma de estrella y los valores negativos y significativos de los índices D de Tajima y F_s de Fu, apoyan la idea de una expansión poblacional reciente para las poblaciones Argentinas.

4.3.2.2. Resultados del estudio con marcadores nucleares

La diversidad genética por población se resume en la Tabla 4. Se observó una moderada riqueza alélica, en promedio 7,58 alelos por locus; con rangos que variaron entre 5,87 y 7,44 en cada población. Los F_{st} pareados variaron entre -0,005 y 0,073 (Tabla 5.). Ningún par de poblaciones difirió significativamente.

4.3.3. Comparación entre divergencia genética, acústica y distancia geográfica

Ningunas de las matrices de distancias genéticas (F_{ST} linearizados) mostró una correlación significativa con la matriz de distancia geográfica (COI: $r=-0,16$; $p=0,72$; Microsatélites: $r=0,18$; $p=0,16$). Por lo tanto, no obtuvimos evidencia a favor de un patrón de aislamiento por distancia. Las diferencias observadas en la señal acústica entre poblaciones (distancias de Mahalanobis al cuadrado) tampoco estuvieron correlacionadas con las distancias geográficas ($r=0,13$; $p=0,23$) o con las distancias genéticas (COI: $r=0,40$; $p=0,11$; microsatélites: $r=-0,05$; $p=0,57$).

4.3.4. Fuerzas diversificadoras del canto de cortejo

Los valores Q_{ST} pareados para cada uno de los parámetros del canto que resultaron significativos (ver “Divergencia poblacional en la señal acústica”) se detallan en las tablas S3.1-S3.3 (Material suplementario).

Las pruebas de Mantel demostraron que existe una correlación positiva entre los valores Q_{ST} pareados para PERaC y los valores F_{ST} pareados estimados con el marcador mitocondrial ($r=0,80$; $P=0,0045$; Figura 7a), pero no con microsatélites ($r=0,27$; $p=0,13$; Figura 7b). Además, es posible observar varios puntos que no difieren en cuanto a su diferenciación genética mitocondrial ($F_{ST} \text{ COI} = 0$), pero que muestran variación en PERaC (Figura 7a). Para los restantes parámetros del canto, ninguna correlación entre F_{ST} y Q_{ST} resultó significativa (todos los valores de $r < 0,27$; todos los valores de $p > 0,12$).

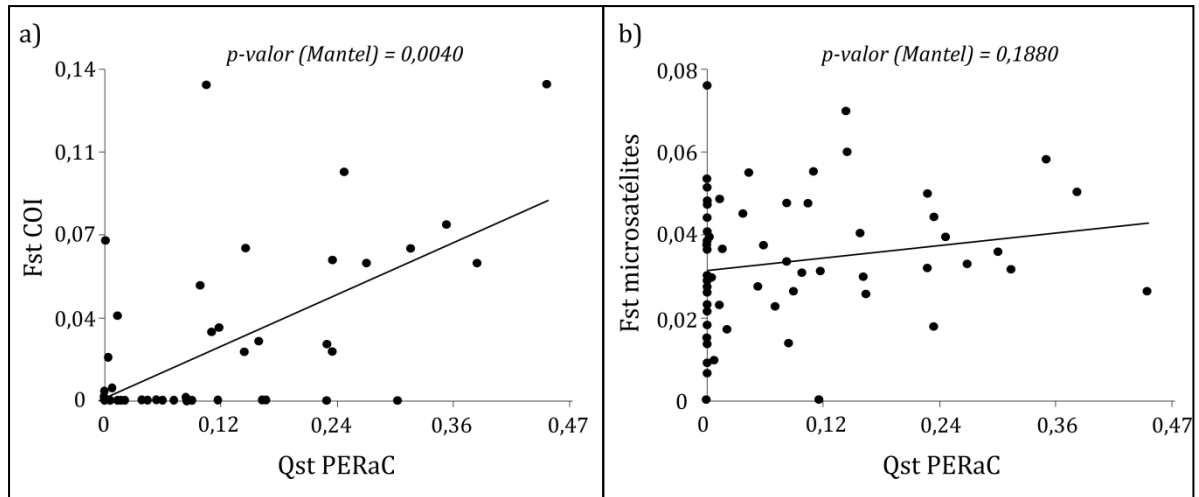


Figura 7. Relación entre la diferenciación inter-poblacional en el período corto de la estructura A del canto (PERaC) y la diferenciación genética mitocondrial (COI, izquierda) y nuclear (microsatélites, derecha).

Estos resultados sugieren que la deriva genética neutral no es una explicación suficiente para los patrones de divergencia acústica observada.

Los valores medios y los intervalos de confianza (IC) del 95% para los parámetros del canto que mostraron diferencias interpopulacionales se muestran en la Figura 8. Las líneas de puntos definen el IC del 95% para el F_{ST} medio estimado para microsatélites y las líneas continuas el IC del 95% para el F_{ST} medio de COI.

El IC para el Q_{ST} medio de PERaL se superpuso con los IC de los F_{ST} medios calculados para COI y microsatélites. Además, observamos que el IC para el Q_{ST} medio de Vol también se solapa con el IC del F_{ST} medio estimado para microsatélites aunque no con el de COI. Estos resultados indican que la variación interpopulacional de PERaL y Vol es compatible con lo esperable bajo neutralidad (deriva genética). Sin embargo, los IC para las medias de los valores Q_{ST} de FDA, FDb y PERaC no muestran solapamiento con los IC de los F_{ST} medios estimados para microsatélites y COI. Esto último sugiere que la diferenciación en estos parámetros de la señal acústica es superior a lo que podría esperarse sobre la base de diferenciación genética a nivel de loci cuya variación se supone neutra. En consecuencia, la diferenciación en FDA, FDb y PERaC entre las señales acústicas de las poblaciones no sería compatible con lo esperado bajo un modelo de equilibrio

mutación-deriva genética y podría explicarse como resultado de selección direccional. Esto es evidente incluso para la matriz de Q_{ST} de PERaC que fue la única que correlacionó significativamente con la matriz de Fst de COI.

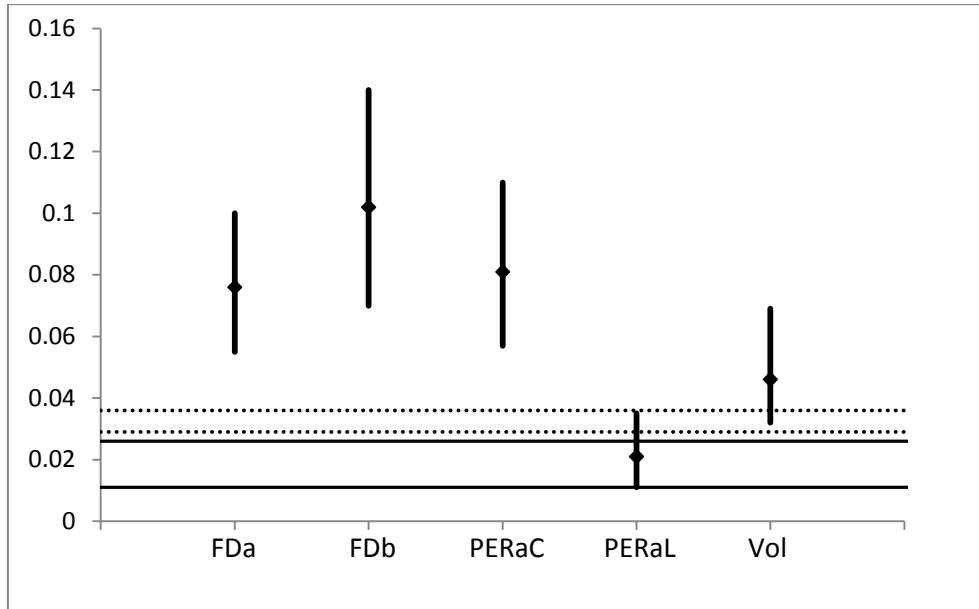


Figura 8. Medias e IC del 95% para las estimaciones de Q_{ST} pareadas de los parámetros del canto. Las líneas punteadas delimitan el IC del 95% para el Fst basado en microsatélites y las líneas continuas el IC del 95% para el Fst calculado a partir de ADN mitocondrial (COI).

No encontramos evidencias de variación correlacionada entre los Q_{ST} pareados de ninguno de los parámetros del canto analizados (todos los valores de $r < 0,28$; todos los valores de $p > 0,09$).

4.4. Discusión

En este capítulo comparamos los patrones de diferenciación interpoblacional estimados con marcadores genéticos y caracteres cuantitativos del canto en 12 poblaciones representativas del área de distribución de *D. buzzatii* en Argentina.

Nuestros resultados indican que los cantos varían entre las poblaciones y dado que utilizamos un diseño de jardín común, que nos permitió minimizar posibles efectos ambientales y maternos, podemos concluir que la diferenciación en los parámetros del canto tiene base genética. En el estudio intrapoblacional del capítulo II habíamos encontrado variación genética, diferencias entre líneas (genotipos), para todos los parámetros del canto, lo cual sienta las bases para la divergencia interpoblacional por selección o deriva genética. Sin embargo, observamos que solo cinco parámetros mostraron variación entre las poblaciones (Vol, FDa, PERaC, PERaL y FDb). El análisis discriminante reveló que un 36,31% de la variación interpoblacional de los cantos puede explicarse por diferencias en los parámetros espectrales (FDa y FDb) y en el período corto (PERaC) de los pulsos de la estructura A. La agrupación de las poblaciones con base en estos parámetros (Figura 4) no tiene un correlato en las ecorregiones (Figura 1) definidas por Cabrera & Willink (1980) y Burkart *et al.* (1999), o con la presencia de otras especies del cluster *D. buzzatii* en simpatría. En los extremos del eje canónico 1 se agrupan, por un lado, las poblaciones de Hipólito Yrigoyen (Misiones) y Manantial (Catamarca), y por el otro las de la Isla Martín García (Buenos Aires), Olta (La Rioja), Villa Quilino (Córdoba) y Valle Fértil (San Juan) (Figura 4). El resto de las poblaciones se encuentran entre ambos grupos. De las poblaciones muestreadas solo tenemos conocimiento de la presencia de especies cercanamente emparentadas (del cluster *D. buzzatii*) en simpatría en Valle Fértil (*D. koepferae*) y en la Isla Martín García (*D. antonietae*). En el resto de las poblaciones solo se recolectaron *D. buzzatii* y moscas de otras especies como *D. mercatorum*, *D. serenensis*, entre otras. A su vez, no se encontró correlación entre las matrices del canto (distancias de Mahalanobis al cuadrado) y la distancia geográfica entre las poblaciones.

Los estudios con marcadores mitocondriales y nucleares (COI y microsatélites) no detectaron estructuración genética. El análisis de la variación a

nivel del ADNmt mostró evidencias de que estas poblaciones han sufrido una expansión de rango reciente y los microsatélites sugieren un activo flujo génico entre poblaciones. Nuestros resultados están en consonancia con estudios previos basados en el análisis de los polimorfismos de restricción en el ADNmt que revelaron que las poblaciones de *D. buzzatii* de Sudamérica son genéticamente homogéneas (Rossi *et al.* 1996). Asimismo, nuestro estudio, como muchos estudios previos, mostró que la mayor parte de la diversidad se encuentra dentro de las poblaciones. Huellas de expansión reciente en esta especie también han sido encontradas utilizando la variación nucleotídica del gen esterasa A localizado en el cromosoma 2 (Gómez y Hasson 2003), del gen *Xdh* que codifica para la enzima Xantina deshidrogenasa (Piccinali *et al.* 2004) y de regiones anónimas del cromosoma 2 (Laayouni *et al.* 2003). En concordancia con estos resultados, el análisis genético-poblacional con microsatélites y COI tampoco aportó evidencias a favor de un modelo de aislamiento por distancia. Debido a que se ha registrado un incremento de las plantaciones de *O. ficus indica* en el noroeste y noreste de la Argentina en los últimos 100-150 años (Ervin, 2012), cabe preguntarse si la presión antrópica no podría haber jugado un rol importante en el proceso de rápida expansión de rango de *D. buzzatii*.

Las comparaciones entre Q_{ST} y F_{ST} pueden proporcionar una herramienta poderosa para diferenciar el rol relativo de la selección divergente y la deriva genética en la divergencia fenotípica entre poblaciones (Volis *et al.* 2005; Whitlock 2008; Lamy *et al.* 2012; Hasson *et al.* 2003; Leinonen *et al.* 2013). Las variaciones en la señal acústica (considerando todos los parámetros juntos mediante el uso de distancias de Mahalanobis al cuadrado) no estuvieron correlacionadas con las matrices de distancias genéticas mitocondriales ni nucleares. Estos resultados sugieren que las variaciones en el canto, como una unidad, no se encontrarían evolucionando conforme a lo esperado bajo la hipótesis de diferenciación estocástica (equilibrio mutación-deriva genética), sino que su destino estaría gobernado por la selección divergente. Sin embargo, los análisis de correlación entre los Q_{ST} de los parámetros individuales y los F_{ST} de ambos marcadores genéticos, revelaron que el patrón de variación en el período corto de los pulsos de la estructura A (PERaC) correlacionó con el patrón de variación del marcador COI, indicando que la diferenciación fenotípica es compatible con lo esperable bajo

neutralidad (Figura 7a). No obstante, varios puntos revelan variación en PERaC en ausencia de variación genética (Figura 7a), lo que sugiere que el equilibrio mutación-deriva genética no es una explicación suficiente para la divergencia en PERaC.

A su vez, no observamos correlaciones significativas entre ninguno de los Q_{ST} de los parámetros del canto considerados, de manera que a priori no podemos descartar la evolución independiente de estos parámetros. Esto no significa que el canto no pueda constituir una estructura fenotípica integrada dado que la selección actúa sobre la combinación de los parámetros expresados, sino que aunque esta estructura subyacente (es decir, la estructura de varianzas-covarianzas de sus componentes) podría imponer ciertas restricciones a la evolución de los parámetros individuales, también podría permitir cierta divergencia entre ellos. Esto fue propuesto para dar cuenta de la evolución del canto en el grillo *Teleogryllus commodus*. En este caso, las preferencias de las hembras difieren entre las poblaciones, de modo que los caracteres blanco de la selección muestran variación interpoblacional, pero la estructura subyacente del canto se mantiene estable entre las poblaciones (Pitchers *et al.* 2013). No obstante, existen predicciones contradictorias en cuanto al nivel de integración que existiría entre los parámetros de señales complejas, así como también entre diferentes caracteres sexuales expresados por el organismo durante la elección de pareja (Badyaev 2004). Futuros estudios empleando matrices de varianza-covarianza permitirán evaluar el grado de estabilidad de la estructura subyacente del canto en estas poblaciones.

Las comparaciones $Q_{ST}-F_{ST}$ para los cinco parámetros del canto que exhibieron variación entre poblaciones revelaron diferentes patrones de evolución. La variación en el período largo de la estructura A (PERaL) no se desvió de lo esperado bajo un modelo de equilibrio mutación-deriva genética con ambos tipos de marcadores genéticos (Figura 8). Por otra parte, el intervalo de confianza para el volumen del canto se superpuso únicamente con el patrón de variación neutral basado en microsatélites (Figura 8). Es decir, la diferenciación interpoblacional encontrada para el volumen es mayor que la esperada durante la expansión poblacional, pero puede explicarse por el flujo génico más reciente evidenciado por los marcadores microsatélites. Por último, los análisis de los

patrones de variación de los parámetros espectrales (FDa y FDb) y el período corto de la estructura A (PERaC) sugieren una rápida divergencia de estos parámetros en las señales acústicas, que podría ser consistente con un proceso de selección direccional, como la selección sexual (Figura 8).

Nuestro diseño experimental es conservador en cuanto a la inferencia de selección direccional, dado que los únicos factores que no controlamos son los efectos epistáticos y de dominancia. Estos efectos tienden a sesgar la inferencia de Q_{ST} hacia abajo, disminuyendo la potencia de la prueba para la detección de selección direccional (Whitlock 2008; Leinonen *et al.* 2013). Solo bajo ciertas condiciones la dominancia podría inflar el Q_{ST} , sin embargo, es poco probable para caracteres que involucran muchos loci (Goudet & Martin 2007; Leinonen *et al.* 2013).

El patrón de variación de PERaC mostró una correlación significativa con la variación detectada con el marcador de ADNmt, sin embargo el Q_{ST} medio excedió significativamente lo esperado bajo evolución neutral con los dos tipos de marcadores genéticos. Este resultado, en principio contradictorio, se ajusta al modelo denominado “deriva acoplada vía selección sexual” (*coupled drift via sexual selection*; Tazzyman & Iwasa 2010), que implica la acción conjunta de la deriva genética y la selección sexual. En este contexto, proponemos que las preferencias de las hembras podrían haber evolucionado por deriva genética aleatoria durante la expansión poblacional, en la cual el factor antrópico podría haber jugado un rol importante a través de la expansión de las plantaciones de tunas (Ervin 2012). En consecuencia, PERaC se habría ajustado a las preferencias específicas de las hembras de cada población. De esta manera, la deriva genética habría actuado como un proceso amplificador de la selección sexual ejercida por las preferencias de las hembras, impulsando la divergencia (Uyeda *et al.* 2009). Este mismo proceso fue propuesto para explicar el patrón de aislamiento por distancia observado para la variación en la morfología de la genitalia (estimada mediante distancias de Mahalanobis al cuadrado) en poblaciones argentinas de *D. buzzatii* (Soto *et al.* 2013). En dicho trabajo, el primer componente principal, que describe el 29,45% de la variación en conformación del aedeago, reveló un patrón similar al de PERaC. En efecto, tal y como observamos para PERaC, la variación observada para el primer componente principal de la variación en conformación del aedeago mostró

una correlación significativa con los F_{ST} estimados con el marcador de ADNmt y el valor medio excedió la variación esperada bajo el modelo neutro (los IC del 95% no se solaparon). Las distancias genéticas en ambos trabajos y la señal acústica en este estudio no mostraron aislamiento por distancia. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la genitalia de los machos es un carácter que exhibe plasticidad fenotípica cuando las moscas se crían en diferentes cactus hospedadores (Soto *et al.* 2008) y que el estudio de la variación interpoblacional no se realizó utilizando un diseño de jardín común como el que se usó en esta tesis.

Una mayor filopatría de las hembras o una mayor dispersión de los machos podrían explicar el mantenimiento de la variación interpoblacional en las preferencias de las hembras. Las especies del género *Drosophila* muestran mucha variación interespecífica en cuanto a su capacidad dispersiva y también en relación a cuál de los sexos es el que más se dispersa. Por ejemplo en *D. subobscura*, *D. pseudoobscura* y *D. pachea* se ha propuesto que los machos tienen una mayor capacidad dispersiva (Begon 1976; Powell *et al.* 1976; Serra *et al.* 1987; Markow & Castrezana 2000), en tanto que en *D. engyochracea* ocurre lo contrario, es decir, son las hembras las que más dispersan (Fontdevila & Carson 1978). En otras especies como *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mojavensis* y *D. nigrospiracula* (McKenzie 1974; Markow & Castrezana 2000; Muir *et al.* 2014) la capacidad dispersiva no es sexo específica. Sin embargo, no se han dilucidado los factores o los mecanismos que generan estas diferencias (Markow & Castrezana 2000). Cuando la capacidad dispersiva de los machos o la filopatría de las hembras es mayor, se espera mayor diferenciación genética a nivel del ADNmt respecto del ADNnu. En el caso de *D. buzzatii*, es posible que el tiempo transcurrido desde la expansión no haya sido suficiente como para detectar las huellas del patrón de dispersión en el ADNmt. El hecho de que todas las poblaciones, excepto Manantial (Catamarca) y Villa Quilino (Córdoba), hayan presentado haplotipos únicos de herencia materna podría ser indicativo de un limitado flujo genético debido a procesos conductuales como la filopatría de las hembras.

Por otro lado, la capacidad del flujo génico para inhibir adaptaciones locales va a depender de la intensidad de la selección (Endler 1973; Richardson *et al.* 2014). Se han reportado adaptaciones locales en presencia de flujo génico en anuros (Richter-Boix *et al.* 2010; Lind *et al.* 2011), lagartos (Jordan *et al.* 2005) y

peces (Saint-Laurent *et al.* 2003; Hemmer-Hansen *et al.* 2007). En el área de distribución geográfica analizada existe una alta diversidad de plantas hospedadoras, tanto del género *Opuntia* como de cactus columnares, que podrían generar algún tipo de adaptación local; sin embargo, dado que no encontramos evidencia de plasticidad fenotípica entre cactus columnares y tunas en *D. buzzatii* (Capítulo II) no esperamos que dicho factor ejerza una fuerza selectiva importante. Sin embargo, deberíamos contemplar la posibilidad de que adaptaciones locales de las hembras pudieran en forma directa o como un subproducto generar preferencias población-específicas. Por otro lado, no podemos descartar que las variaciones en los parámetros espectrales (FDa y FDb) puedan ser el resultado de efectos pleiotrópicos al estar correlacionados con otros caracteres que muestren adaptaciones locales. En este trabajo, hemos encontrado que al menos FDa muestra una correlación significativa con el tamaño de las alas (Figura 3), aunque aún corrigiendo por esta variable el parámetro excede lo esperado bajo un modelo neutro.

A excepción de la señal acústica, todos los demás caracteres medidos en *D. buzzatii* (supervivencia, tasa de desarrollo, éxito reproductivo, tamaño corporal y tamaño y conformación del ala y del aedeago) varían al criarse en diferentes cactus (Fanara *et al.* 1999; Soto *et al.* 2007; Hasson *et al.* 2009; Hurtado *et al.* 2012). Los polimorfismos cromosómicos de inversión presentan variación geográfica (Hasson *et al.* 1995; Rodríguez *et al.* 2000; Soto *et al.* 2010), además de una relación con el cactus de cría y con caracteres de historia de vida (Fernández Iriarte & Hasson 2000). Incluso se ha reportado la ocurrencia de variación clinal en diversos caracteres relacionados con la resistencia al estrés, la adaptación térmica y la historia de vida (Sørensen *et al.* 2005; Norry *et al.* 2006; Sambucetti *et al.* 2006; Sarup *et al.* 2006; Folguera *et al.* 2008). Por lo tanto, la evidencia disponible indica que la distribución de las diferentes especies de cactáceas junto con la geografía y otros factores ambientales habrían ejercido influencia sobre la evolución fenotípica de *D. buzzatii*.

Nuestro trabajo reveló que existen fuerzas selectivas lo suficientemente intensas como para generar diferenciación en la señal acústica en presencia de flujo génico. Sin embargo, son necesarios más estudios que aborden la variación

poblacional en las preferencias de las hembras por los parámetros analizados para confirmar nuestra interpretación.

4.5. Bibliografía

- Agis M. & Schlötterer C. (2001) Microsatellite variation in natural *Drosophila melanogaster* populations from New South Wales (Australia) and Tasmania. *Molecular Ecology* **10**, 1197-205.
- Badyaev A. V. (2004) Integration and modularity in the evolution of sexual ornaments: an overlooked perspective. In: *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes* pp. 50-79. Oxford University Press.
- Barker J. S. F. (2013) Genetic history of a colonizing population: *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) in Australia. *Biological Journal of the Linnean Society* **109**, 682-98.
- Begon M. (1976) Dispersal, density and microdistribution in *Drosophila subobscura* Collin. *The Journal of Animal Ecology* **45**, 441-56.
- Bentsen C. L., Hunt J., Jennions M. D. & Brooks R. (2006) Complex multivariate sexual selection on male acoustic signaling in a wild population of *Teleogryllus commodus*. *The American Naturalist* **167**, E102-E16.
- Bioacoustics Research Program. (2011) Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software, Version 1.4. The Cornell Lab of Ornithology, New York, USA. Available at <http://www.birds.cornell.edu/raven>.
- Burkart R., Barbaro N., Sánchez R. O. & Gómez D. A. (1999) Eco-regiones de la Argentina. Programa de desarrollo institucional, componente de política ambiental. *Administración de Parques Nacionales*.
- Cabrera A. L. & Willink A. (1980) Regiones biogeográficas en América Latina. *Biogeografía de América Latina. Secretaría General de la organización de los Estados Americanos. Serie de Biología*.
- Canty A. & Ripley B. (2016) Package 'boot'. <http://up2date.hmdc.harvard.edu/CRAN/web/packages/boot/boot.pdf>.
- Dieringer D. & Schlötterer C. (2003) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* **3**, 167-9.

- Dobzhansky T., Ayala F. J., Stebbins G. L. & Valentine J. W. (1988) *Evolución*. Editorial Omega, Barcelona.
- Dray S. & Dufour A.-B. (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of statistical software* **22**, 1-20.
- Dray S., Dufour A.-B. & Thioulouse J. (2016) Package 'ade4'. Analysis of Ecological Data : Exploratory and Euclidean Methods in Environmental Sciences.
- Endler J. A. (1973) Gene flow and population differentiation. *Science* **179**, 243-250.
- Ervin G. N. (2012) Indian fig cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) in the Americas: an uncertain history. *Haseltonia* **17**, 70-81.
- Ewing A. W. & Miyan J. A. (1986) Sexual selection, sexual isolation and the evolution of song in the *Drosophila repleta* group of species. *Animal Behaviour* **34**, 421-9.
- Excoffier L. G. L. & Schneider S. (2005) Arlequin v3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* **1**, 47-50.
- Fanara J. J., Fontdevila A. & Hasson E. (1999) Oviposition preference and life history traits in cactophilic *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association with their natural hosts. *Evolutionary Ecology* **13**, 173-90.
- Fanara J. J., Hasson E., Rodríguez C., Santos M. & Fontdevila A. (1996) The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXXIII. Are *Opuntia* hosts a selective factor for the inversion polymorphism? *Heredity* **77**, 500-8.
- 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**, 1295-302.
- Fernández Iriarte P. J., Norry F. M. & Hasson E. R. (2003) Chromosomal inversions effect body size and shape in different breeding resources in *Drosophila buzzatii*. *Heredity* **91**, 51-9.
- Folguera G., Ceballos S., Spezzi L., Fanara J. J. & Hasson E. (2008) Clinal variation in developmental time and viability, and the response to thermal treatments in two species of *Drosophila*. *Biological Journal of the Linnean Society* **95**, 233-245.
- Fontdevila A. & Carson H. L. (1978) Spatial distribution and dispersal in a population of *Drosophila*. *American Naturalist*, 365-80.

- Fu Y.-X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915-25.
- Gerhardt H. C. (1991) Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour* **42**, 615-35.
- Goldstein D. B. & Schlöterer C. (1999) *Microsatellites, evolution and applications*. Ed. Oxford, , Grand Britain.
- Gómez G. A. & Hasson E. (2003) Transpecific polymorphisms in an inversion linked esterase locus in *Drosophila buzzatii*. *Molecular biology and evolution* **20**, 410-423.
- Goudet J. & Martin G. (2007) Under neutrality, $QST \leq FST$ when there is dominance in an island model. *Genetics* **176**, 1371-4.
- Goudet J., Raymond M., de Meeüs T. & Rousset F. (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**, 1933-40.
- Grace J. L. & Shaw K. L. (2011) Coevolution of male mating signal and female preference during early lineage divergence of the Hawaiian cricket, *Laupala cerasina*. *Evolution* **65**, 2184-96.
- Hall T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symposium Series* pp. 95-8.
- Hasson E. R., Fanara J. J. & Frankel N. (2003) Selection and complex multigene traits. in: *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Hasson E., Rodriguez C., Fanara J. J., Naveira H., Reig O. A. & Fontdevila A. (1995) The evolutionary history of *Drosophila buzzatti*. XXVI. Macrogeographic patterns of inversion polymorphism in New World populations. *Journal of Evolutionary Biology* **8**, 369-384.
- Hasson E., Soto I. M., Carreira V. P., Corio C., Soto E. M., Betti M. & Santos E. (2009) Host plants, fitness and developmental instability in a guild of cactophilic species of the genus *Drosophila*. In: *Ecotoxicology Research Developments* (ed E. B. Santos) pp. 89-109. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Hemmer-Hansen J., Nielsen E. E., Frydenberg J. & Loeschcke V. (2007) Adaptive divergence in a high gene flow environment: Hsc70 variation in the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Heredity* **99**, 592-600.

- Hurtado J., Soto E. M., Orellana L. & Hasson E. (2012) Mating success depends on rearing substrate in cactophilic *Drosophila*. *Evolutionary Ecology* **26**, 733-43.
- Irvin S. D., Wetterstrand K. A., Hutter C. M. & Aquadro C. F. (1998) Genetic variation and differentiation at microsatellite loci in *Drosophila simulans*: evidence for founder effects in new world populations. *Genetics* **150**, 777-90.
- Jordan M. A., Snell H. L., Snell H. M. & Jordan W. C. (2005) Phenotypic divergence despite high levels of gene flow in Galápagos lava lizards (*Microlophus albemarlensis*). *Molecular Ecology* **14**, 859-67.
- Kauer M. O., Dieringer D. & Schlötterer C. (2003) A microsatellite variability screen for positive selection associated with the “out of Africa” habitat expansion of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **165**, 1137-48.
- Klappert K. & Reinhold K. (2003) Acoustic preference functions and sexual selection on the male calling song in the grasshopper *Chorthippus biguttulus*. *Animal Behaviour* **65**, 225-33.
- 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**, 931-44.
- Lamy J.-B., Plomion C., Kremer A. & Delzon S. (2012) $QST < FST$ as a signature of canalization. *Molecular Ecology* **21**, 5646-55.
- Leigh J. W. & Bryant D. (2015) popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* **6**, 1110-6.
- Leinonen T., McCairns R. J. S., O'Hara R. B. & Merilä J. (2013) QST – FST comparisons: evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity. *Nature Reviews Genetics* **14**, 179-90.
- Librado P. & Rozas J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-2.
- Lind M. I., Ingvarsson P. K., Johansson H., Hall D. & Johansson F. (2011) Gene flow and selection on phenotypic plasticity in an island system of *Rana temporaria*. *Evolution* **65**, 684-97.
- Manfrin M. H. & Sene F. M. (2006) Cactophilic *Drosophila* in South America: a model for evolutionary studies. *Genetica* **126**, 57-75.

- Markow T. A. & Castrezana S. (2000) Dispersal in cactophilic *Drosophila*. *Oikos* **89**, 378-86.
- McKenzie J. A. (1974) The distribution of vineyard populations of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* during vintage and non-vintage periods. *Oecologia* **15**, 1-16.
- Michalakis Y. & Excoffier L. (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* **142**, 1061-4.
- Mopper S. & Strauss S. Y. (1998) *Genetic structure and local adaptation in natural insect populations*. Chapman & Hall, New York.
- Mopper S. & Strauss S. Y. (2013) *Genetic structure and local adaptation in natural insect populations: effects of ecology, life history, and behavior*. Springer Science & Business Media.
- Muir A. P., Biek R., Thomas R. & Mable B. K. (2014) Local adaptation with high gene flow: temperature parameters drive adaptation to altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology* **23**, 561-74.
- Norry F. M., Sambucetti P., Scannapieco A. C. & Loeschcke V. (2006) Altitudinal patterns for longevity, fecundity and senescence in *Drosophila buzzatii*. *Genetica* **128**, 81-93.
- Oksanen J., Kindt R., Legendre P., O'Hara B., Simpson G. L., Solymos P., Stevens M. H. H. & Wagner H. (2013) The vegan package. *Community Ecology Package* **10**.
- Pfennig D. W., Wund M. A., Snell-Rood E. C., Cruickshank T., Schlichting C. D. & Moczek A. P. (2010) Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 459-67.
- Piccinali R., Aguadé M. & Hasson E. (2004) Comparative molecular population genetics of the Xdh locus in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 141-52.
- Pitchers W. R., Brooks, R., Jennions, M. D., Tregenza, T., Dworkin, I., & Hunt, J. (2013) Limited plasticity in the phenotypic variance-covariance matrix for male advertisement calls in the black field cricket, *Teleogryllus commodus*. *Journal of evolutionary biology* **26**, 1060-1078.

- Powell J. R., Dobzhansky T., Hook J. E. & Wistrand H. E. (1976) Genetics of natural populations. XLIII. Further studies on rates of dispersal of *Drosophila pseudoobscura* and its relatives. *Genetics* **82**, 493-506.
- Raeymaekers J. A. M., Van Houdt J. K. J., Larmuseau M. H. D., Geldof S. & Volckaert F. A. M. (2007) Divergent selection as revealed by PST and QTL-based FST in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations along a coastal-inland gradient. *Molecular Ecology* **16**, 891-905.
- Richardson J. L., Urban M. C., Bolnick D. I. & Skelly D. K. (2014) Microgeographic adaptation and the spatial scale of evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, **29**, 165-176.
- Richter-Boix A., Teplitsky C., Rogell B. & Laurila A. (2010) Local selection modifies phenotypic divergence among *Rana temporaria* populations in the presence of gene flow. *Molecular Ecology* **19**, 716-31.
- Rodriguez C., Piccinali R., Levy E., & Hasson E. (2000) Contrasting population genetic structures using allozymes and the inversion polymorphism in *Drosophila buzzatii*. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 976-984.
- Rossi M. S., Barrio E., Latorre A., Quezada-Díaz J. E., Hasson E., Moya A. & Fontdevila A. (1996) The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXX. Mitochondrial DNA polymorphism in original and colonizing populations. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 314-23.
- Rousset F. (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-6.
- Rozas J. (2009) DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. *Bioinformatics for DNA sequence analysis* **537**, 337-50.
- Saint-Laurent R., Legault M. & Bernatchez L. (2003) Divergent selection maintains adaptive differentiation despite high gene flow between sympatric rainbow smelt ecotypes (*Osmerus mordax* Mitchill). *Molecular Ecology* **12**, 315-30.
- Sambucetti P., Loeschcke V. & Norry F. M. (2006) Developmental time and size-related traits in *Drosophila buzzatii* along an altitudinal gradient from Argentina. *Hereditas* **143**, 77-83.
- Sarup P., Sørensen J. G., Dimitrov K., Barker J. S. F. & Loeschcke V. (2006) Climatic adaptation of *Drosophila buzzatii* populations in southeast Australia. *Heredity* **96**, 479-486.

- Schlotterer C., Vogl C. & Tautz D. (1997) Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics* **146**, 309-20.
- Serra L. L., Pegueroles G. & Mestres F. (1987) Capacity of dispersal of a colonizing species: *Drosophila subobscura*. *Genetica* **73**, 223-35.
- Shaw K. L., Ellison C. K., Oh K. P. & Wiley C. (2011) Pleiotropy, "sexy" traits, and speciation. *Behavioral Ecology* **22**, 1154-5.
- Shaw K. L. & Herlihy D. P. (2000) Acoustic preference functions and song variability in the Hawaiian cricket *Laupala cerasina*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **267**, 577-84.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. & Flook P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**, 651-701.
- Slatkin M. (1994) Gene flow and population structure. In: *Ecological Genetics* (ed L. A. Leal) pp. 3-17. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Sørensen J. G., Norry F. M., Scannapieco A. C. & Loeschcke V. (2005) Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *Journal of evolutionary biology* **18**, 829-837.
- Soto I. M., Carreira V. P., Fanara J. J. & Hasson E. (2007) Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 1.
- Soto I. M., Carreira V. P., Soto E. M., Márquez F., Lipko P. & Hasson E. (2013) Rapid divergent evolution of male genitalia among populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolutionary Biology* **40**, 395-407.
- Soto I. M., Manfrin M. H. & Hasson E. (2008) Host-dependent phenotypic plasticity of aedeagus morphology in a pair of cactophilic sibling *Drosophila* species of the *repleta* group (Diptera, Drosophilidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **46**, 368-73.
- Soto I. M., Soto E. M., Carreira V. P., Hurtado J., Fanara J. J. & Hasson E. (2010) Geographic patterns of inversion polymorphism in the second chromosome

of the cactophilic *Drosophila buzzatii* from northeastern Argentina. *Journal of Insect Science* **10**.

StatSoft, Inc. (2007) STATISTICA (data analysis software system), version 8. In: *Tulsa, USA*.

Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-95.

Tazzyman S. J. & Iwasa Y. (2010) Sexual selection can increase the effect of random genetic drift—a quantitative genetic model of polymorphism in *Oophaga pumilio*, the strawberry poison-dart frog. *Evolution* **64**, 1719-28.

Thompson J. D., Higgins D. G. & Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-80.

Uyeda J. C., Arnold S. J., Hohenlohe P. A. & Mead L. S. (2009) Drift promotes speciation by sexual selection. *Evolution* **63**, 583-94.

Volis S., Yakubov B., Shulgina I., Ward D. & Mendlinger S. (2005) Distinguishing adaptive from nonadaptive genetic differentiation: comparison of QST and FST at two spatial scales. *Heredity* **95**, 466-75.

Weir B. S. & Cockerham C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*, 1358-70.

Whitlock M. C. (2008) Evolutionary inference from QST. *Molecular Ecology* **17**, 1885-96.

Wiens J. J. (2001) Widespread loss of sexually selected traits: how the peacock lost its spots. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 517-23.

Conclusiones Generales

La diversificación de las señales acústicas es un fenómeno que ha sido documentado en diversos taxa. Sin embargo, los procesos que impulsan la divergencia de estas señales y sus consecuencias en términos de especiación son poco conocidos.

Las especies cactófilas de *Drosophila* del cluster *D. buzzatii* se suman a este grupo caracterizado por la alta diferenciación en sus cantos de cortejo. Comprender los factores que dieron forma a este complejo patrón de cantos requiere del conocimiento tanto de los factores que impulsan la variación de los parámetros acústicos como también de aquellos que los limitan en cada linaje. Esta tesis tuvo como objetivo contribuir a la comprensión de estos factores.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis sugieren:

- que la selección sexual y el uso de diferentes modalidades en la elección de pareja han jugado un importante rol moldeando diferencialmente los cantos de cortejo en cada linaje.
- que existe variación genética asociada a los cantos de cortejo de *D. buzzatii* y *D. koepferae*.
- que el recurso de cría (primario o secundario) durante el desarrollo larvario induce diferenciación en las señales acústicas de los machos de *D. koepferae*, pero no modifica las señales acústicas de los machos de *D. buzzatii*.
- que el tamaño y la conformación de las alas tienen el potencial de influir en algunos parámetros del canto de cortejo de *D. buzzatii*.
- que las poblaciones naturales de *D. buzzatii* se encuentran diferenciadas para algunos parámetros del canto y que la interacción entre la selección direccional y la deriva genética serían las responsables de estas diferencias interpoblacionales.

Material Suplementario

6.1. Capítulo I

Tabla S1.1

Resultados de las comparaciones pareadas para la variable Aceptación del Macho (AM) del Experimento 1 entre diferentes condiciones acústicas.

	♀ <i>D. buzzatii</i>		♀ <i>D. koepferae</i>		♀ <i>D. antonietae</i>		♀ <i>D. borborema</i>		♀ <i>D. venezolana</i>	
	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P
PC - Ct+	0,578	0,933	0,310	0,989	1,054	0,698	-0,581	0,937	-	NS†
PH - NP	1,714	0,293	4,773	<0,001	1,762	0,271	-0,581	0,937	-	NS†
Ct+- NP	-4,973	<0,001	-3,547	<0,01	-5,420	<0,001	-4,682	<0,001	-	NS†
PH - PC	-5,323	<0,001	6,604	<0,001	-4,804	<0,001	5,099	<0,001	-	NS†
NP - PC	-4,961	<0,001	-3,691	<0,01	-4,448	<0,001	-4,793	<0,001	-	NS†
Ct+ - PH	-5,316	<0,001	-6,681	<0,001	-6,592	<0,001	-4,793	<0,001	-	NS†

PC = *Playback* Conespecífico, PH = *Playback* Heteroespecífico, Ct+ = Control positivo, NP = Ausencia de *playback*, NS = No significativo.

† No se hicieron comparaciones pareadas porque la variable AM no fue significativa: $\chi^2_3 = 1,660$; $P = 0,646$.

Para detalles sobre los análisis estadísticos ver la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1

Tabla S1.2

Resultados de las comparaciones pareadas para la variable Tiempo de latencia a la cópula (TLC) del Experimento 1 entre diferentes condiciones acústicas con más de un 50% de aceptación del macho (AM).

	♀ <i>D. buzzatii</i>			♀ <i>D. koepferae</i>			♀ <i>D. antonietae</i>			♀ <i>D. borborema</i>			♀ <i>D. venezolana</i>		
	Z	F* (gl)	P	Z	F* (gl)	P	Z	F* (gl)	P	Z	F (gl)	P	Z	F (gl)	P
PC - Ct+	-	0,610 (1;2,99)	0,49	1,92	-	0,128	-	5,376 (1;2,99)	0,10	-	0,172 (1,56)	0,68	-	-	NS†
PH - NP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS†
Ct+ - NP	-	-	-	6,77	-	<0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	NS†
PH - PC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS†
NP - PC	-	-	-	4,93	-	<0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	NS†
Ct+ - PH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS†

PC = *Playback* Conespecífico, PH = *Playback* Heteroespecífico, Ct+ = Control positivo, NP = Ausencia de *playback*, gl = Grados de libertad, NS = No significativo.

* F y grados de libertad basados en la aproximación de Kenward-Roger (Modelos mixtos).

† No se hicieron comparaciones pareadas porque la variable TLC no fue significativa: $F_{3,102} = 0,457$; $P = 0,713$.

Para más detalles sobre los análisis estadísticos ver la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1.

Tabla S1.3

Resultados de las comparaciones pareadas para la variable Aceptación del Macho (AM) del Experimento 2 entre diferentes condiciones acústicas.

	♀ <i>D. buzzatii</i>		♀ <i>D. koepferae</i>		♀ <i>D. antonietae</i>		♀ <i>D. borborema</i>	
	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P
PC – Ct-	5,099	<0,001	0,581	0,937	5,099	<0,001	3,425	<0,01
Ct+ – NP	-4,695	<0,001	-4,793	<0,001	-4,793	<0,001	-4,669	<0,001
Ct- – NP	-0,581	0,937	0,581	0,937	0,000	1,000	0,000	1,000
Ct+ – PC	0,464	0,966	-4,793	<0,001	-0,581	0,937	-2,567	<0,05
NP – PC	-4,793	<0,001	0,000	1,000	-5,099	<0,001	-3,425	<0,01
Ct- – Ct+	-5,081	<0,001	-4,682	<0,001	-4,793	<0,001	-4,669	<0,001

PC = *Playback* Conespecífico, Ct- = Control negativo (usando machos con alas heteroespecíficos), Ct+ = Control Positivo (usando machos con alas conespecíficos), NP = Ausencia de *playback*.
Para detalles sobre los análisis estadísticos ver la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1.

Tabla S1.4

Resultados de las comparaciones pareadas para la variable Tiempo de latencia a la cópula (TLC) del Experimento 2 entre diferentes condiciones acústicas con más de un 50% de aceptación del macho (AM).

	♀ <i>D. buzzatii</i>		♀ <i>D. koepferae</i>		♀ <i>D. antonietae</i>		♀ <i>D. borborema</i>	
	<i>F</i> (gl)	<i>P</i>	<i>F</i> (gl)	<i>P</i>	<i>F</i> (gl)	<i>P</i>	<i>F</i> (gl)	<i>P</i>
CP - Ct-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ct+ - NP	-	-	-	-	-	-	-	-
Ct- - NP	-	-	-	-	-	-	-	-
Ct+ - PC	0,991 (1,53)	0,324	-	-	8,984 (1,56)	<0,01	2,169 (1,41)	0,148
NP - PC	-	-	-	-	-	-	-	-
Ct- - Ct+	-	-	-	-	-	-	-	-

PC=*Playback* Conespecífico, Ct-=Control negativo (usando machos con alas heteroespecíficos), Ct+=Control Positivo (usando machos con alas conespecíficos), NP=Ausencia de *playback*, gl = Grados de libertad.

Para detalles sobre los análisis estadísticos ver la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1.

6.2. Capítulo III

Tabla S3.1. Diferenciación fenotípica entre las poblaciones. Por debajo de la diagonal: valores de Q_{ST} para FDa y por encima de la diagonal: valores de Q_{ST} para FDb.

	MAN	HYR	LAP	IMG	OLT	PAT	QUI	SAL	SPE	PMU	TIC	VFE
MAN		0,061	0,059	0,194	0,384	0,000	0,067	0,056	0,000	0,000	0,102	0,054
HYR	0,000		0,362	0,490	0,688	0,195	0,341	0,242	0,190	0,207	0,432	0,229
LAP	0,000	0,000		0,031	0,218	0,000	0,000	0,000	0,000	0,057	0,000	0,000
IMG	0,000	0,000	0,036		0,016	0,111	0,000	0,000	0,028	0,227	0,002	0,000
OLT	0,357	0,199	0,296	0,201		0,310	0,102	0,093	0,187	0,462	0,175	0,082
PAT	0,014	0,000	0,053	0,000	0,060		0,000	0,000	0,000	0,000	0,023	0,000
QUI	0,260	0,106	0,210	0,102	0,000	0,000		0,000	0,000	0,071	0,000	0,000
SAL	0,094	0,028	0,129	0,003	0,000	0,000	0,000		0,000	0,048	0,000	0,000
SPE	0,314	0,156	0,258	0,159	0,000	0,037	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000
PMU	0,000	0,000	0,000	0,000	0,267	0,000	0,173	0,059	0,228		0,111	0,046
TIC	0,000	0,000	0,043	0,000	0,196	0,000	0,103	0,013	0,160	0,000		0,000
VFE	0,176	0,085	0,195	0,057	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,127	0,068	

Tabla S3.2. Diferenciación fenotípica entre las poblaciones. Por debajo de la diagonal: valores de Q_{ST} para PERaC y por encima de la diagonal: valores de Q_{ST} para PERaL.

	MAN	HYR	LAP	IMG	OLT	PAT	QUI	SAL	SPE	PMU	TIC	VFE
MAN		0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,009	0,000
HYR	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
LAP	0,021	0,000		0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,074	0,000	0,012
IMG	0,299	0,158	0,110		0,176	0,000	0,000	0,000	0,000	0,185	0,000	0,040
OLT	0,000	0,000	0,000	0,233		0,024	0,014	0,034	0,171	0,000	0,123	0,000
PAT	0,116	0,013	0,000	0,003	0,070		0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000
QUI	0,452	0,312	0,245	0,000	0,380	0,097		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SAL	0,000	0,000	0,006	0,227	0,000	0,084	0,349		0,000	0,008	0,000	0,000
SPE	0,000	0,000	0,000	0,143	0,000	0,017	0,267	0,000		0,183	0,000	0,046
PMU	0,082	0,000	0,000	0,014	0,043	0,000	0,103	0,058	0,000		0,100	0,000
TIC	0,000	0,000	0,000	0,117	0,000	0,007	0,233	0,000	0,000	0,000		0,030
VFE	0,227	0,088	0,038	0,000	0,164	0,000	0,144	0,161	0,083	0,000	0,052	

Tabla S3.3. Diferenciación fenotípica entre las poblaciones. Por debajo de la diagonal: valores de Q_{ST} para el volumen del canto (Vol).

	MAN	HYR	LAP	IMG	OLT	PAT	QUI	SAL	SPE	PMU	TIC	VFE
MAN												
HYR	0,000											
LAP	0,048	0,000										
IMG	0,045	0,000	0,000									
OLT	0,022	0,000	0,000	0,000								
PAT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000							
QUI	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000						
SAL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					
SPE	0,000	0,000	0,016	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000				
PMU	0,261	0,176	0,086	0,081	0,089	0,203	0,153	0,164	0,233			
TIC	0,207	0,124	0,023	0,019	0,029	0,142	0,101	0,101	0,193	0,000		
VFE	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,153	0,095	