Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Evolución correlacionada con la adaptación a altas concentraciones de defensas antiherbivoría en el modelo cactus-*Drosophila*

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

Santiago Oscar Bouzas

Director de tesis: Dr. Ignacio María Soto

Directora de tesis: Dra. Valeria Paula Carreira

Consejero de Estudios: Dr. Juan José Fanara

Lugar de trabajo: Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Fecha de defensa: 26-05-2021

Ciudad de Buenos Aires

Evolución correlacionada con la adaptación a altas concentraciones de defensas antiherbivoría en el modelo cactus-*Drosophila*

Resumen

El sistema cactus-levadura-*Drosophila* es un modelo paradigmático en el estudio de la ecología evolutiva y química. El sistema biológico está compuesto por tres interactores básicos: 1) Miembros de la familia *Cactaceae*, los cuales cumplen el rol de hospedadores; 2) Una comunidad de microorganismos que inician el proceso de descomposición, donde las levaduras cobran especial importancia y 3) especies cactófilas del género *Drosophila* (Diptera), las cuales se desarrollan en los bolsillos necróticos generados en los tejidos de los cactus hospedadores. Las especies nativas *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae* se distribuyen en áreas desérticas del norte del país. Aunque ambas especies se crían en tejidos necróticos de cactus de los géneros *Opuntia* (tunas) y *Trichocereus* (cactus columnares), exhiben cierto grado de especificidad de nicho. Muchas especies en el género *Trichocereus* se encuentran enriquecidas en alcaloides, químicos que funcionan como defensas antiherbivoría; mientras que en el género *Opuntia* estas defensas son más débiles, con diferente composición alcaloidea y en concentraciones mucho menores. Por lo tanto, cada género de cactus representa un ambiente químicamente diferente para las larvas de *Drosophila* que se crían en sus tejidos necróticos. El estudio de distintos caracteres en individuos de ambas especies de *Drosophila* criados en el cactus columnar permitió conocer el efecto detrimental de los componentes químicos de éste en el *fitness* de las moscas, lo cual sugiere un rol importante del componente alcaloideo en el patrón de uso de hospedador de las mismas. La exposición de individuos a altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* siguiendo determinados protocolos de selección, permitió generar cepas tolerantes de ambas especies de *Drosophila*. En este proyecto, nos propusimos usar estas herramientas generadas previamente con el fin de atender dos objetivos generales. El primero, busca estudiar caracteres que, sin ser blanco directo de la selección, responden a la misma de manera correlacionada. A través del segundo objetivo buscamos explorar las bases genéticas de la adaptación a los aleloquímicos de *T. terscheckii*. Particularmente, evaluamos el efecto de la adaptación sobre la conformación alar, la estabilidad de desarrollo y los costos en el *fitness* ante la cría en hospedadores alternativos, el efecto de la adaptación sobre la relación fecundidad-longevidad y el rol de la familia de monooxigenesas P450 en la detoxificación de estos aleloquímicos. Entre los resultados más relevantes observados a lo largo de esta tesis podemos mencionar:

-Una implicancia parcial de la familia P450 en la detoxificación de los aleloquímicos de *T. terscheckii* en ambas especies de *Drosophila*.

-Un costo en el *fitness* por la adaptación al régimen selectivo, evidenciado ante la cría en hospedadores alternativos en la cepa tolerante de *D. buzzatii*.

-Un cambio de la conformación alar en ambas especies de *Drosophila* como consecuencia del proceso adaptativo.

-Una tendencia a baja inestabilidad del desarrollo (estimada a través de la asimetría fluctuante) en la cepa tolerante de *D. buzzatii*.

-Una disminución de la fecundidad y un incremento de la longevidad en los machos de la cepa tolerante de *D. buzzatii*.

En conclusión, podemos decir que el proceso selectivo generó, no solo cepas de moscas tolerantes al estrés químico impuesto, sino que también modificó a las poblaciones experimentales en múltiples formas, afectando caracteres morfológicos y de historia de vida, la performance en hospedadores alternativos, la estabilidad del desarrollo y probablemente otros caracteres no abordados en esta tesis. De esta manera, la presente tesis hace énfasis en la complejidad de los procesos adaptativos y la integralidad de los organismos.

Palabras clave: Caracteres correlacionados – Evolución experimental – *Drosophila* – Tolerancia a aleloquímicos

Evolution correlated with the adaptation to high concentrations of antiherbivory defenses in the cactus-*Drosophila* system

Abstract

The cactus-yeast-*Drosophila* system is a paradigmatic model in the study of evolutionary and chemical ecology. This biological system is composed by three basic interactors: 1) *Cactaceae* family members, which play the host role; 2) a microorganism assembly that initiates or participates in the decomposition process, where the yeast community gains special importance and 3) different cactophilic species of the *Drosophila* genus (Diptera), which grow in necrotic pockets generated in the host cactus tissues. The native species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* distribute in desert areas of the north of our country. Although both species breed in necrotic cacti tissues of the *Opuntia* (prickly pears) and *Trichocereus* (columnar cacti) genera, they exhibit a certain degree of niche specificity. Many species in the *Trichocereus* genus are alkaloids enriched, chemicals that function as an herbivory defense, while in the *Opuntia* genus the chemical composition is weaker, with different alkaloids composition and in much lower concentrations. Hence, each host cacti genus represents a different chemical environment for *Drosophila* larvae which breed in necrotic tissues. The study of different traits in individuals of both *Drosophila* species raised in the columnar cacti allowed us to know the detrimental effect of its chemical components on the flies fitness, which suggests an important role of the alkaloid component in their resource utilization pattern. The exposition of individuals to high concentrations of allelochemicals of *T. terscheckii*, following artificial selection protocols, led to the aquisition of tolerant lines of both species of *Drosophila*. In this project, we proposed to use these previously generated tools to address two general objectives. The first one is to study characters which have not been directly targeted by selection, but have responded to it in a correlated manner. Meanwhile, the second objective aims to explore the genetic basis of the adaptation to *T. terscheckii* allelochemicals. Particularly, we assessed the adaptation effect on wing conformation, developmental stability and fitness costs of the adaptation on the alternative host exploitation, the adaptation effect on the fecundity-longevity relation and the P450 monooxygenase family role on the detoxification of these allelochemicals. Thus, among the most relevant results found in the course of this thesis we may mention:

- A partial implication of the P450 family was found in the detoxification of *T. terscheckii* allelochemicals in both *Drosophila* species.

- A fitness cost due to adaptation to the selective regime was identified in the *D. buzzatii* tolerant strain, evidenced through the breeding in alternative resources.

-In both *Drosophila* species, a wing conformation change was observed as an adaptative process consequence.

-In the *D. buzzatii* tolerant strain, a tendency to low fluctuating asymmetry values was observerd.

-In the *D. buzzatii* tolerant strain, a decrease in fecundity and an increase in male longevity was detected.

In conclusion, we can say that the selective process generated not only tolerant fly strains to the imposed chemical pressure but also it modified the experimental populations in multiple ways, thus affecting morphological and life history traits, performance in alternative hosts, developmental stability and most likely other traits not taken into account in this thesis. Hence, this thesis highlights the adaptative process complexity and the integrality of the organisms.

Keywords: Correlated traits – Experimental evolution – *Drosophila* – Tolerance to alelochemicals

Agradecimientos

Durante 6 años de trabajo, tuve la fortuna de contar con la compañía fundamental de varias personas de las que me nutrí para poder desarrollar la presente tesis, siendo por lo tanto esta, un proyecto colectivo. Es por eso, que a forma de agradecimiento quiero hacer una pequeña referencia a elles.

Nacho Soto y Vale Carreira mostraron su apoyo incondicional en todo el proceso de la tesis. Conté con su presencia en el trabajo de mesada, diseño y desarrollo de experimentos, análisis de datos, trabajo de campo, escritura, discusiones teóricas, consejos, mates, cervezas, comidas y apoyo anímico. Por lo tanto, es un orgullo haber estado bajo su dirección y más aún al poner esta en perspectiva.

Mis viejes y mi hermana fueron una fuente constante de apoyo y cariño imposible de poner en palabras sobre todo en los momentos de absoluta oscuridad.

Mis compañeres del Laboratorio de biología integral de sistemas evolutivos y el Laboratorio de evolución fueron un apoyo cotidiano y necesario con quienes tuve la suerte de compartir alegrías, penurias, tertulias, cultura, luchas, amistad, anécdotas variopintas y colaboración laboral. Elles son, Ale Saint-Esteven, Lucas Kreiman, Flor Barbarich, Nico Moreyra, Nacho Stefa, Momo Flaibani, Mariana Sabio, Nico Lavagnino, Dani Ortiz, Lauti Bennardo, Felipe Cabrera, Sole Llanes, Daniel Poveda Martínez, Vicky Ortiz, Franco Divito, Nahue Cabrera, Gonza Sabaris, Gonza Rodríguez-Rizk, Julián Mensch, Dani Peluso, Lucía Turdera, Edu Soto, Betu Colines, Ignacio Satorre, Pablo Milla Carmona, Pato Iglesias, Johnma Rondón y Pía Pacheco.

Otra persona muy importante en el desarrollo de la tesis fue Mariela Escobar, compañera de vivencias que supo ser una fuente inmensa de contención y cariño. La amistad y compañía de Walter Tetzlaff también fueron claves para la vida en una nueva

ciudad dando lugar a anécdotas inolvidables. Con mucha amabilidad, Pablo Schilman supo brindar su tiempo, colaboración laboral y consejos durante la fase experimental. Amigues de la infancia como Florencia Vassallo y Martín Carchano supieron brindar gran apoyo y contención durante el periodo de escritura en un contexto distópico en el que una pandemia nos llevó a cambiar la forma de vida.

El desarrollo de Sci-Hub por parte de Alexandra Elbakyan facilitó en enorme medida el acceso a artículos científicos en la última década haciendo de la academia un ambiente más justo. En última instancia, agradezco profundamente a todas las personas que mediante su trabajo hicieron y hacen posible la existencia de instituciones como la universidad pública y gratuita y el CONICET. Sin ellas, me hubiera sido imposible llegar a esta instancia.

A mis padres

A mi hermana

Índice

Capítulo I: *Drosófilas cactófilas y la adaptación a defensas antiherbivoría*

Resumen - 12 -

La resistencia a defensas antiherbivoría en insectos - 13 -

Las Drosófilas cactófilas - 15 -

El sistema cactus-levadura-*Drosophila* - 19 -

Drosophila koepferae* y *Drosophila buzzatii - 20 -

La genética de la adaptación de caracteres complejos - 22 -

La resistencia a defensas antihervoboría en *Drosophila* - 25 -

Caracteres implicados en el proceso adaptativo - 28 -

La evolución experimental para la tolerancia a alcaloides - 30 -

Desarrollo de las cepas experimentales - 31 -

Constitución de la población base y protocolo de cría - 31 -

Evolución experimental - 36 -

Capítulo II: *Rol de la familia génica P450 en la tolerancia a los aleloquímicos de Trichocereus terscheckii*

Resumen - 39 -

Introducción - 40 -

Objetivos - 43 -

Hipótesis - 43 -

Materiales y métodos - 44 -

Diseño experimental - 44 -

Prueba Piloto - Efecto del PBO en la viabilidad - 44 -

Ensayo de Inhibición de las P450 - 45 -

Análisis estadísticos - 45 -

Resultados - 46 -

Prueba Piloto - Efecto del PBO en la viabilidad - 46 -

Ensayo de inhibición de las P450 - 48 -

Drosophila buzzatii - 48 -

Drosophila koepferae - 53 -

Discusión - 55 -

Capítulo III: *Costo de la adaptación en la performance asociado al salto de hospedador*

Resumen - 61 -

Introducción - 62 -

Objetivo - 64 -

Hipótesis - 64 -

Materiales y métodos - 64 -

Diseño experimental - 65 -

Análisis estadísticos - 68 -

Resultados - 68 -

Drosophila buzzatii - 68 -

Drosophila koepferae - 75 -

Discusión - 78 -

Capítulo IV: *Efecto de la selección y recursos alternativos en la morfología alar y estabilidad del desarrollo*

Resumen - 83 -

Introducción - 84 -

Objetivos - 88 -

Hipótesis - 88 -

Materiales y métodos - 89 -

Cuantificación de la morfología alar - 89 -

Análisis de patrones alométricos entre el tamaño y la conformación del ala - 91 -

Asimetría fluctuante del tamaño del ala - 91 -

Correlación entre la performance y los niveles de asimetría fluctuante - 92 -

Resultados - 92 -

Drosophila buzzatii - 92 -

Tamaño alar - 92-

Conformación alar - 92 -

Asimetría fluctuante del tamaño de ala - 96 -

Correlación Indice de Performance-Asimetría Fluctuante - 100 -

Drosophila koepferae - 100 -

Tamaño alar - 100-

Conformación alar - 100 -

Asimetría fluctuante del tamaño del ala - 102 -

Correlación Indice de Performance-Asimetría Fluctuante - 103 -
Discusión - 105 -

Capítulo V: *Efecto de la tolerancia a aleloquímicos en la longevidad y fecundidad*

Resumen - 109 -
Introducción - 110 -
Objetivos - 113 -
Hipótesis - 114 -
Materiales y métodos - 114 -
Cría en jardín común - 114 -
Longevidad - 115 -
Fecundidad - 115 -
Análisis estadísticos - 115 -
Resultados - 116 -
Drosophila buzzatii - 116 -
Longevidad - 116 -
Fecundidad - 118 -
Correlación fecundidad-longevidad - 119 -
Drosophila koepferae - 119 -
Longevidad - 119 -
Fecundidad - 120 -
Correlación fecundidad-longevidad - 121 -
Discusión - 121 -
Conclusiones generales - 127 -
Bibliografía - 129 -

Capítulo I: Drosófilas cactófilas y la adaptación a defensas antiherbivoría

Resumen

Estudios de genómica y transcriptómica llevados adelante recientemente en *Drosophila* sugieren una naturaleza compleja y poligénica de la tolerancia a defensas antiherbivoría. Para indagar más en el fenómeno utilizamos el sistema cactus-levadura-*Drosophila*, un modelo ampliamente estudiado en ecología evolutiva. El mismo se compone de tres interactores: Cactáceas, las cuales funcionan como sustrato para el desarrollo de la necrosis, una comunidad de microorganismos (especialmente levaduras) que inician el proceso de descomposición y distintas especies de *Drosophila* que se alimentan de las levaduras y se crían en las necrosis vegetales. *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae* son especies autóctonas que se distribuyen en las zonas desérticas del norte del país. Ambas especies explotan cactáceas de los géneros *Opuntia*, *Cereus* y *Trichocereus*, aunque exhiben diferencias en el grado de especialización. Mientras *D. buzzatii* explota preferentemente cactáceas del género *Opuntia, D. koepferae* se asocia mayoritariamente a cardones. Hace varios años se desarrollaron cepas de ambas especies de *Drosophila* bajo un protocolo de evolución experimental. Las mismas evolucionaron en medios con altas concentraciones de aleloquímicos de *Trichocereus terscheckii* adaptándose a los mismos.

Bajo la hipótesis de que la base genética involucrada en este fenómeno evolutivo es compleja, exploramos el aspecto pleiotrópico de la misma poniendo a prueba si la adaptación a la presencia de aleloquímicos de *T. terscheckii* provocó indirectamente, cambios evolutivos en otros caracteres. Por lo tanto, en la presente tesis, nos proponemos caracterizar la adaptación a aleloquímicos de *T. terscheckii* en las cepas de selección de ambas especies de *Drosophila* ahondando en sus bases genéticas, componentes del *fitness* y respuestas correlacionadas.

La resistencia a defensas antiherbivoría en insectos

A lo largo de por lo menos 300 millones de años de coevolución con las plantas, los insectos fitófagos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia ante las defensas químicas de las mismas (Després et al. 2007). Entre los diferentes métodos de defensa desplegados se encuentran la evasión, la detoxificación por vía enzimática, el secuestro de fitotoxinas y la acumulación de mutaciones en los sitios blanco de los metabolitos secundarios (Zunjarrao et al., 2020). La evasión de los aleloquímicos de la planta constituye una de las primeras opciones de defensa de los insectos fitófagos. A través de detección por vía gustativa, olfativa o visual, los insectos son capaces de evitar tanto la ingestión de fitotoxinas como la oviposición en plantas que las contengan. En el mismo sentido, algunos tejidos libres de toxinas o con menor concentración de las mismas sirven de alimento para ciertas especies de insectos. Como ejemplo, se ha observado que la especie de áfido *Myzus persicae* evita la ingestión de la nicotina presente en xilema usando el floema como fuente de alimento (Zunjarrao et al., 2020).

La resistencia a través de la detoxificación, se encuentra mediada por enzimas que se encargan de convertir compuestos tóxicos en formas menos toxicas. El proceso de detoxificación suele darse en dos fases, la fase I involucra la hidrólisis u oxidación de metabolitos secundarios mientras que la fase II conjuga los productos de la fase I con compuestos endógenos. Entre las familias de enzimas detoxificadoras más relevantes se encuentran las monooxigenasas citocromo P450, esterasas, UDP glucosiltransferasas (UGTs) y glutatión S-transferasas (GSTs) (Zunjarrao et al., 2020). Las P450, son enzimas con función detoxificadora fase I. Gracias a su capacidad para reconocer múltiples sustratos, son enzimas extremadamente versátiles que juegan un rol importante en las estrategias de defensa de diversas especies tanto de hábito generalista como especialista (Zunjarrao et al., 2020). Además, se ha observado que la evolución de aleloquímicos ha generado un aumento de genes de P450. Estudios filogenéticos en lepidópteros sugieren una activa duplicación génica de estas enzimas luego de eventos de especiación y especialización (Calla et al., 2017). Otro grupo de enzimas relacionadas a defensas antiherbivoría son las esterasas, particularmente las encargadas de catalizar la hidrólisis de esteres carboxílicos (carboxilesterasas) por lo que son detoxificadoras fase I. Si bien los mecanismos de acción de este grupo enzimático en la detoxificación de metabolitos secundarios de las plantas no han sido suficientemente estudiados, se ha observado su sobreexpresión en respuesta a fitotoxinas. A modo de

ejemplo, se ha observado un incremento en la actividad de estas enzimas en respuesta al consumo de *Nicotiana tabacum* en el áfido *M. persicae* (Cabrera-Brandt et al., 2010; Zunjarrao et al., 2020). Las glutatión-S-tranferasas, por su parte, son enzimas encontradas en todos los organismos aerobios y responsables de múltiples procesos, principalmente en los de detoxificación fase II. Las mismas, tienen una amplia especificidad de sustrato por lo que participan en la resistencia a un amplio rango de xenobióticos. Se ha observado la participación de las GSTs en la detoxificación de glucosinolatos en el drosofílido *Scaptomyza flava* y el lepidóptero *Trichoplusia ni* (Howe & Herde, 2015; Zunjarrao et al., 2020). Finalmente, las UDP glucosil-transferasas pertenecen también a la clase de enzima de detoxificación fase II. Este grupo de enzimas se encarga de transferir restos de azucares a un amplio rango de metabolitos secundarios de plantas. Particularmente, se encarga de conjugar el grupo glucósido con otros químicos facilitando su excreción haciéndolos más hidrofílicos (Enayati et al., 2005; Heidel-Fischer & Vogel, 2015).

Otro método de defensa de insectos fitófagos a los metabolitos secundarios de plantas es el secuestro de los mismos. Este proceso asiste al consumo, transferencia y concentración de fitoquímicos, modificados o no, para ser almacenados en diferentes tejidos o la hemolinfa del insecto. Una vez secuestrados, los aleloquímicos pueden tener diferentes destinos como la defensa ante predadores, pigmentación en el adulto, producción de feromonas y protección ante la radiación UV (Carroll et al., 1997; Zunjarrao et al., 2020). Un grupo de enzimas clave en el secuestro de los metabolitos secundarios de las plantas son los transportadores ABC. Como ejemplo, se ha observado un incremento en la expresión de la proteína transportadora de salicina ABCC en las glándulas defensivas de larvas del coleóptero *Chrysomela populi*. De esta manera, esta enzima transportadora estaría involucrada en la acumulación de salicina en las células de la glándula defensiva (Strauss et al., 2014). Por otro lado, la mutación de los sitios blanco sobre los que actúan los metabolitos secundarios constituye otro método de resistencia en insectos. De esta manera, el desarrollo de una mutación en el receptor de una determinada fitotoxina impide la unión de los mismos. Un ejemplo bien documentado de este tipo de adaptación son las mutaciones en las Na^+/K^+ ATPasas. En este caso, los cardenólidos presentes en la familia de plantas Apocynaceae inhiben la función de las Na^+/K^+ ATPasas impidiendo bombeo de sodio. Por lo tanto, las mutaciones en este receptor confieren resistencia a los cardenólidos logrando mantener

el bombeo de sodio (Vasić et al., 2008; Zunjarrao et al., 2020). Este tipo de resistencia se ha observado en diversas especies de insectos entre los que se encuentran lepidópteros del género *Danaus*, hemípteros (*Ocopeltus fasciatus*), *D. melanogaster* y coleópteros del género *Chrysochus* (Holzinger & Wink, 1996; Moore & Scudder, 1986; Zunjarrao et al., 2020).

Si bien la mutación de los sitios blanco de fitotoxinas es un método que confiere una gran resistencia al organismo, esta suele ser muy específica. De esta manera, estrategias adaptativas como la detoxificación mediante enzimas o el secuestro de fitotoxinas toman mayor relevancia evolutiva ya que confieren resistencia a un rango más amplio de aleloquímicos vegetales (Panini et al., 2016). Teniendo en cuenta estos sistemas de resistencia, a partir de 160 especies de insectos, se ha estudiado la relación entre la cantidad de genes de enzimas de detoxificación presentes en el genoma con el tipo de alimentación, el rango de los hospedadores y la complejidad química de los mismos (Rane, Ghodke, et al., 2019). De esta manera, teniendo en cuenta las familias enzimáticas GSTs, esterasas y P450, se observó una mayor cantidad de genes en insectos de hábito omnívoro en comparación con los de hábito carnívoro y herbívoro. Por otro lado, también se observó una tendencia, salvo excepciones, a un mayor número de estos genes en insectos polífagos que en oligófagos o monófagos. Además, como patrón general, se observó que las especies de insectos expuestas a dietas más complejas, como la alimentación de material vegetal verde y en descomposición, tienden a albergar mayor número de estos genes que las especies con dietas más simples constituidas por néctar, savia, semillas, polen o sangre (Rane, Ghodke, et al., 2019).

Las Drosófilas cactófilas

El género *Drosophila* incluye algunas de las especies más utilizadas como modelo en estudios biológicos. El mismo está compuesto por aproximadamente 2.000 especies distribuidas en los subgéneros *Sophophora* y *Drosophila* (O'Grady & DeSalle, 2018). Este último es el más diverso y contiene, entre otros, al grupo *Drosophila repleta*, originado de la radiación *virilis-repleta* hace unos 20-30 millones de años (Throckmorton, 1975). El grupo *D. repleta* se encuentra constituido por 106 especies (O'Grady & DeSalle, 2018) las cuales son, en su mayoría, de hábito cactófilo (Fig. 1.1). En ese sentido, este grupo, al igual que otras especies de artrópodos, utilizan los tejidos

de Cactáceas como sustrato de cría y alimentación. Dado su gran contenido de agua, estos tejidos constituyen uno de los pocos sustratos que pueden considerarse más benignos para la cría de las larvas ante la adversidad de los ambientes xéricos. La distribución original del grupo *D. repleta* es bastante extensa, siendo aproximadamente desde la latitud 35º Sur a la 35º Norte del continente americano (Markow & O'Grady, 2008). Una de las radiaciones originadas en el grupo *repleta* dio lugar al complejo *D. buzzatii* conformado por los clusters *Drosophila martensis, Drosophila stalkeri* y *Drosophila buzzatii* (Ruiz & Wasserman, 1993). A este último lo constituyen al menos siete especies sinmórficas: *Drosophila gouveai, D. serido, D. antonietae, D. seriema, D. borborema, D. koepferae* y *D. buzzatii*. Este clúster es considerado monofilético ya que las especies que lo componen comparten los re-arreglos cromosómicos *Xabc 2abmnz7 3b* (Ruiz & Wasserman, 1993). Su distribución abarca un eje noreste-suroeste denominado "diagonal árida" compuesta por vegetación xerofítica y localizada entre el Amazonas y el bosque atlántico (Prado & Gibbs, 1993). Este corredor incluye: 1) el dominio morfoclimático Caatinga en Brasil, 2) el dominio de Chaco, el cual se extiende por gran parte de Argentina, sur de Bolivia, Oeste de Paraguay y parte del Mato Grosso en Brasil y 3) el dominio Cerrado, el cual se extiende a lo largo de las planicies centrales de Brasil (Fig. 1.2) (Manfrin & Sene, 2006).

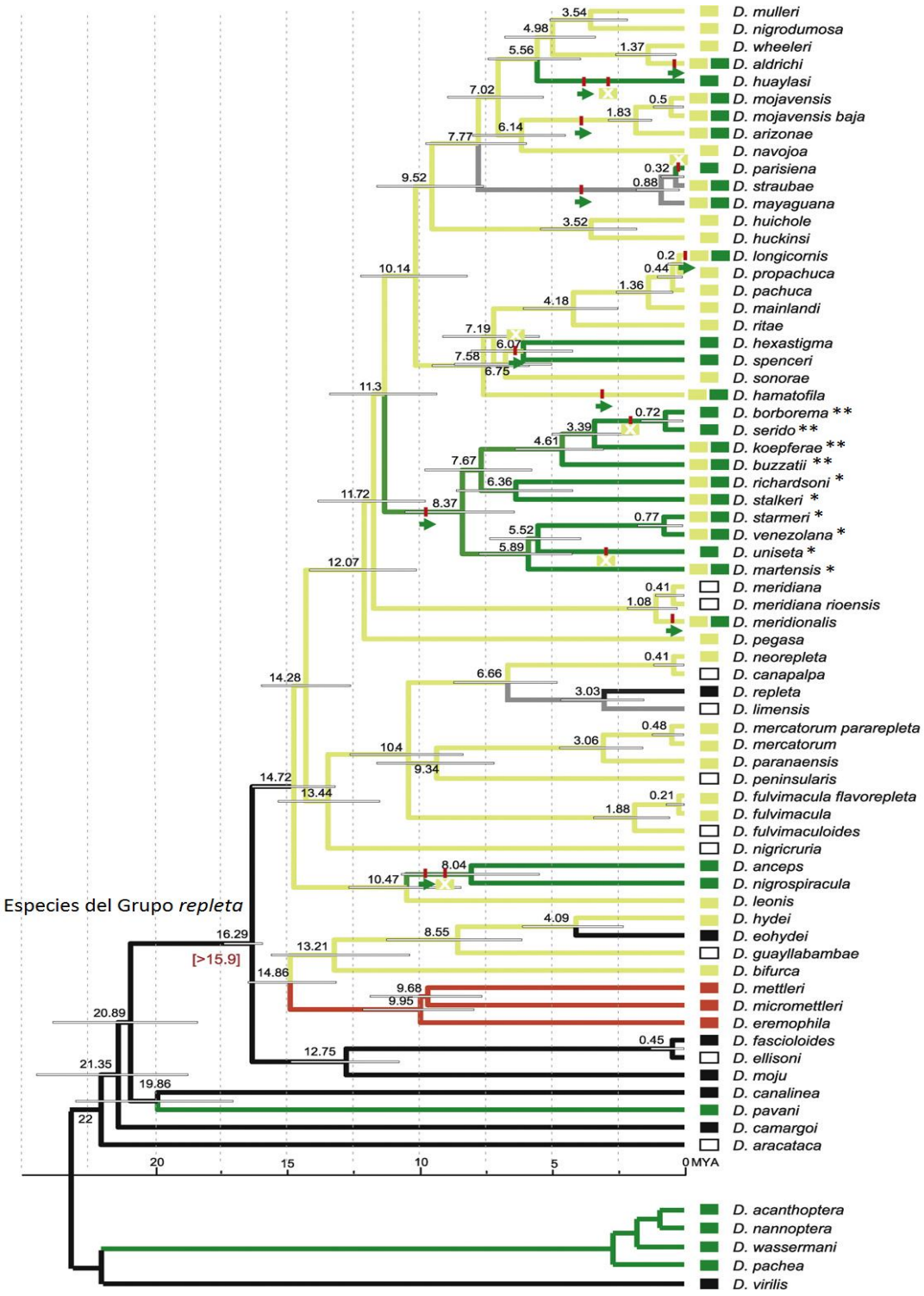


Figura 1.1: Hipótesis filogenética, tiempo de divergencia y uso de hospedadores del grupo *Drosophila repleta* (modificado de Oliveira *et al*., 2012). ■: Cardón; ■: Opuntia; ■: suelo; ■: otros; □: desconocido. ➔: + Cardón ☒: - Opuntia *Complejo *D. buzzatii*; **Cluster *D. buzzatii.*

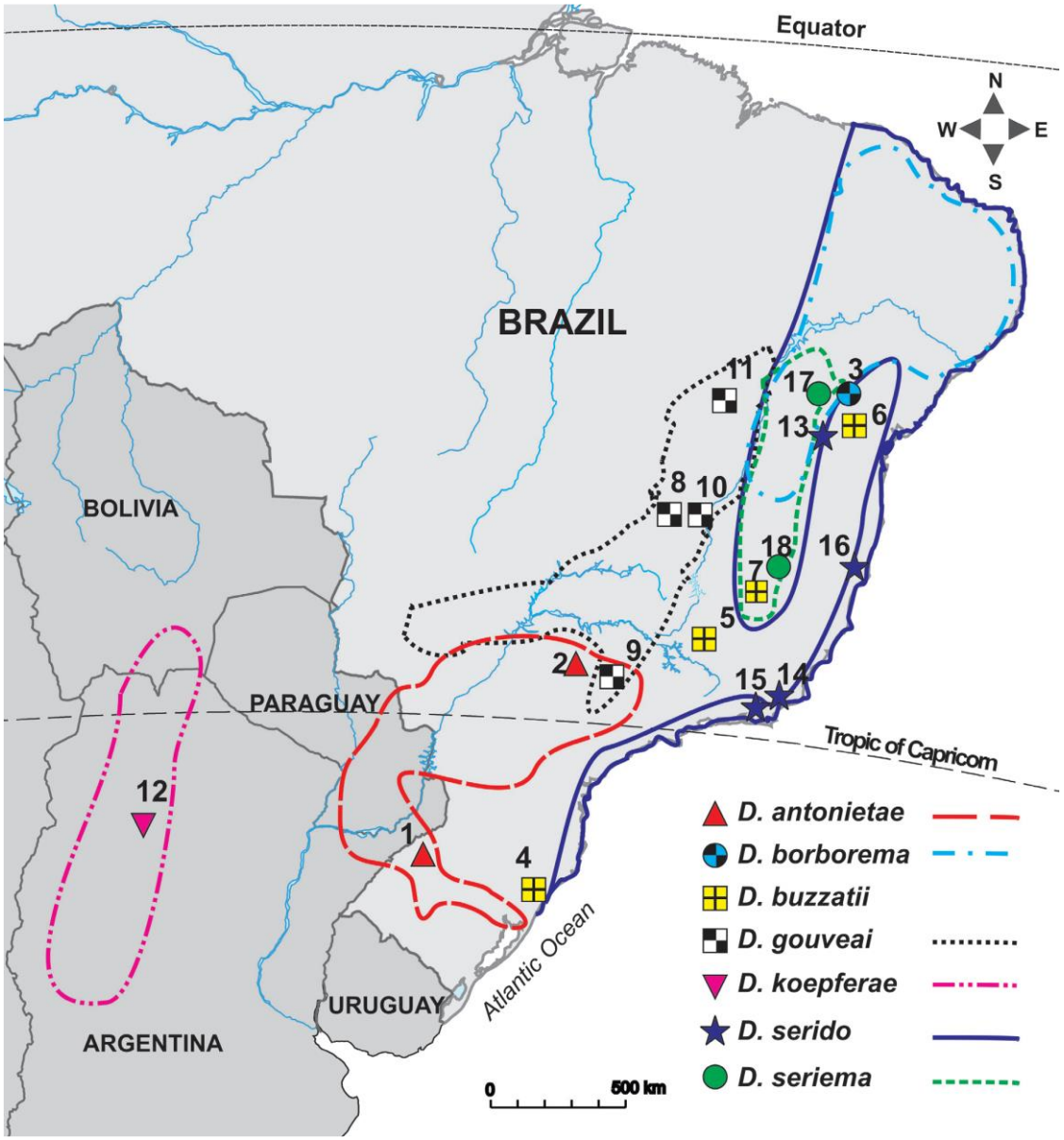


Figura 1.2: Distribución geográfica de las especies del clúster *D. buzzatii* (*D. buzzatii* no se encuentra delimitada debido a que se encuentra en toda la región; Oliveira, *et al*., 2012).

El sistema cactus-levadura-Drosophila

El sistema cactus-levadura-*Drosophila* es uno de los modelos más abordados en la ecología evolutiva. El mismo, está constituido por la interacción de comunidades de cactáceas, microorganismos y drosofílidos (Fogleman & Danielson, 2001). La dinámica de este sistema suele comenzar con la formación de una necrosis o bolsillo de descomposición en el tejido del cactus. La edad, el estado general de la planta y las heridas producidas en la misma favorecen el desarrollo de las necrosis (Fogleman & Danielson, 2001). De esta manera, el tejido del cactus se convierte en sustrato para el crecimiento de comunidades de bacterias y levaduras las cuales conforman el componente microorganísmico del sistema, cuya composición suele ser cactus específica (Foster & Fogleman, 1993; Starmer et al., 1990). Finalmente, la necrosis es colonizada por una diversa comunidad de artrópodos entre las que se encuentran las especies de *Drosophila*, la cual suele variar entre estaciones y también es específica del cactus hospedador (Castrezana & Markow, 2001).

Si bien este sistema puede encontrarse en diferentes ecosistemas a lo largo de todo el Neotrópico, fue inicialmente descripto en el desierto de Sonora en la década del 1940 siendo objeto de estudio desde entonces (Fogleman & Danielson, 2001). Los actores principales en este sistema en particular incluyen 4 especies de *Drosophila* y 5 especies de cactáceas. La distribución geográfica de estas últimas hace de la Baja Península y la región continental del desierto sectores ecológicamente relevantes para estos drosofílidos. En ese sentido, tres de las especies de *Drosophila* cambian de hospedador entre estas regiones debido a la configuración de las distribuciones de las cactáceas. *Drosophila nigrospiracula* utiliza como hospedador a *Carnegiea gigantea* en la región continental y *Pachycereus pringlei* en la Baja Península mientras que *D. mojavensis* se cría en *Stenocereus gummosus* en Baja Península y *Stenocereus thurberi* en ambos sectores del desierto de Sonora. *Drosophila pachea*, por otro lado, utiliza como hospedador a *Lophocereus schottii*, el cual se distribuye en ambos sectores del desierto. Finalmente, *Drosophila mettleri* explota los mismos hospedadores que *D. nigrospiracula* con la particularidad de que utiliza únicamente los exudados de las necrosis en el suelo como medio de cría (Fellows & Heed, 1972; Heed, 1977).

Drosophila koepferae y Drosophila buzzatii

D. koepferae y *D. buzzatii*, son objeto de estudio en la presente tesis. Estas especies, que pertenecen al cluster *buzzatii*, son las especies con mayor distribución en Argentina y las más estudiadas. *D. koepferae*, se distribuye en el centro-oeste y noroeste de Argentina, así como también en el sur de Bolivia, mientras que la distribución de *D. buzzatii* es más amplia coincidiendo con toda la distribución del clúster *buzzatii* (Fig. 1.2) (Manfrin & Sene, 2006). Además, *D. buzzatii* ha colonizado otros continentes siguiendo a su hospedador *Opuntia ficus-indica*, incluyendo Europa, África y Oceanía (Carson & Wasserman, 1965). A pesar del solapamiento en la distribución de ambas especies, no se han reportado eventos de hibridación en la naturaleza, aunque se han obtenido híbridos entre *D. koepferae* y *D. buzzatii* a nivel experimental (Carreira et al., 2008; E. M. Soto et al., 2008; I. M. Soto et al., 2007). Si bien el nicho ecológico de ambas especies se encuentra parcialmente solapado, *D. koepferae* se cría principalmente en necrosis de cactus columnares de los géneros *Trichocereus* y *Cereus* y solo ocasionalmente en cladodios de tunas del género *Opuntia*. A la inversa, *D. buzzatii* se cría principalmente en especies del género *Opuntia* y en menor medida en cactus columnares, habiéndose reportado su emergencia incluso de frutas comerciales como el melón (Fanara et al., 2016; Hasson et al., 1992).

En algunas de las regiones de simpatría entre *D. koepferae* y *D. buzzatii*, las especies de cactus dominantes son la tuna *O. sulphurea* y el cardón *Trichocereus terscheckii* (Fig. 1.3) (Soto et al., 2012). Dada su diferencia de tamaño, las necrosis generadas en cladodios de *Opuntia* suelen ser más efímeras, aunque se encuentran en mayor abundancia que las generadas en cactus columnares (Etges, 1993). Se discute que esta diferencia en la disponibilidad de recursos influye en las estrategias de oviposición, así como también en el tiempo de desarrollo de *D. koepferae* y *D. buzzatii* (Fanara et al., 1999).

La comunidad de microorganismos responsables de generar y mantener la fermentación de los tejidos dañados de los cactus, presentes en las necrosis, también ha comenzado a ser estudiada. La composición de las comunidades de levaduras en las necrosis de *O. sulphurea* y *T. terscheckii* ha mostrado un patrón anidado con ocho especies encontrándose en tejidos de la tuna, mientras que solo cuatro de estas se encuentran en el cardón (Mongiardino-Koch et al., 2015). Esta disposición podría

deberse, por un lado, a la función de *D. koepferae* y *D. buzzatii* como vectores de dispersión de levaduras entre ambas especies de cactus y, por otro, a las diferencias en la composición química de los tejidos de los cardones (Mongiardino-Koch et al., 2015). En ese sentido, a nivel nutricional, la composición de grasas totales en *O. sulphurea* mostró ser mayor que la de *T. terscheckii* (Padró, 2016). Además, si bien ambas especies de cactáceas son ricas en ácidos grasos de cadena larga (Carreira et al., 2014; Padró & Soto, 2013), algunos ácidos grasos de cadena media (Capróico, Caprílico y Cáprico) son exclusivos de *T. terscheckii* (Padró, 2016). Estos ácidos grasos, son conocidos por generar efectos tóxicos en la cría de especies de *Drosophila* cactófilas, pudiendo estar relacionados con la explotación diferencial de recursos por parte de los insectos (Fogleman & Heed, 1989). Por otro lado, desde un punto de vista toxicológico, ambas especies de cactáceas difieren considerablemente en su composición alcaloidea. Los tejidos de *T. terscheckii* contienen alcaloides feniletilamínicos entre los que se destacan la trichocereina y mescalina en proporciones 5:1 (Reti & Castrillón, 1951). En el caso de *O. sulphurea*, cuantitativamente, el contenido de alcaloides es un orden de magnitud menor que en *T. terscheckii*, siendo estos además cualitativamente distintos, de identidad similar a la prolina y de muy baja a nula toxicidad (Padró, 2016). De esta manera, teniendo en cuenta las características nutricionales y toxicológicas de ambas cactáceas, *T. terscheckii* se presenta como un hospedador más complejo para su explotación por parte de insectos cactófilos. En ese sentido, la cría de *D. buzzatii* en medios con presencia de la fracción alcaloidea de *T. terscheckii* ha mostrado impactar en caracteres estrechamente relacionados al *fitness*, el patrón de venación alar, el nivel de pigmentación de las alas y la estabilidad del desarrollo (Corio et al., 2013; Mongiardino-Koch et al., 2012; Padró et al., 2014). Por otro lado, y como fue indicado por observaciones hechas en la naturaleza, *D. koepferae* muestra una tolerancia mayor a la cría en medio con presencia de esta fracción alcaloidea, sugiriendo un rol preponderante de estos metabolitos secundarios en el patrón de uso de hospedadores por parte de ambas especies de *Drosophila* (Soto et al., 2014).

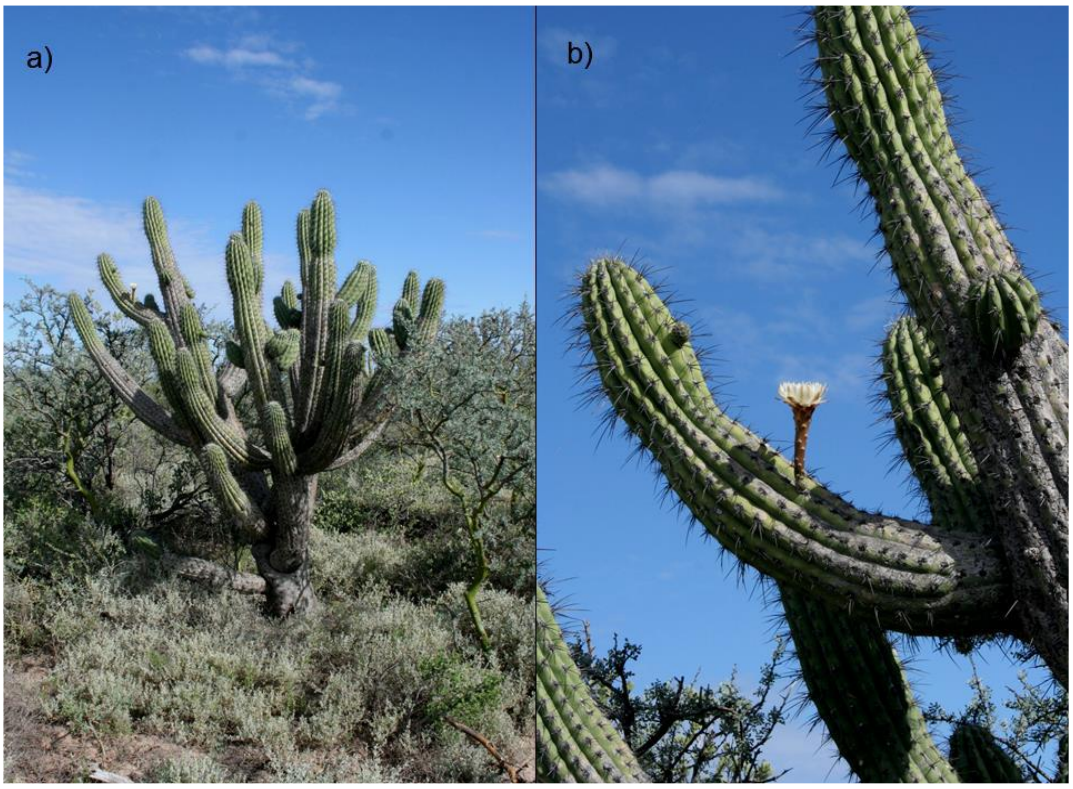


Figura 1.3: Imágenes de *Trichocereus terscheckii*. **a)** Espécimen de cinco metros de altura en la reserva provincial de San Agustín del Valle Fértil, provincia de San Juan. **b)** Detalle del brazo florecido (Padró & Soto 2013).

La genética de la adaptación de caracteres complejos

Una de las virtudes del modelo Cactus- *Drosophila*- Levaduras es que permite estudiar el fenómeno de la adaptación y la evolución frente a desafíos ecológicos multifactoriales. Es un modelo no sólo ecológico sino también de genética evolutiva. Muchos caracteres de gran interés en biología evolutiva como los morfológicos, de historia de vida, metabólicos y fisiológicos son complejos en el sentido de que su base genética se encuentra constituida por muchos genes con un patrón complejo de interacciones entre ellos y con el ambiente durante la ontogenia (Sella & Barton, 2019). Los procesos a nivel genético mediante los cuales se da un cambio adaptativo en caracteres complejos han sido fuente de debate en genética evolutiva. Históricamente, esta temática ha sido abordada por dos escuelas independientes en esta disciplina: la genética molecular de poblaciones y la genética cuantitativa. La primera, pone el foco en la adaptación mediante “saltos selectivos” mientras que la segunda afirma que este

proceso se da a través de cambios sutiles de frecuencias alélicas en muchos loci (Barghi et al., 2020).

La genética de poblaciones trabaja desde la dinámica de loci particulares sin tanto foco en el fenotipo. En este escenario, la selección sobre un carácter resulta en una selección direccional sostenida incluso a nivel de los loci de manera tal que se puede observar adaptación fenotípica a nivel genotípico. Por lo tanto, como marca distinguible en este paradigma, se espera un aumento drástico de las frecuencias de uno o varios loci. Si estos cambios de frecuencia se dan en intervalos cortos de tiempo, emergen patrones en las regiones ligadas del genoma conocidos como huellas de barrido selectivo que pueden ser suaves o fuertes (Höllinger et al., 2019). La genética cuantitativa, por el contrario, aborda la adaptación fenotípica desde la ventaja que le otorga el cambio del carácter al individuo. A nivel genético, se entiende como un fenómeno colectivo que no se reduce únicamente a la contribución de loci particulares. Por lo tanto, en este escenario, la adaptación de un carácter poligénico puede entenderse como producto de muchos cambios pequeños y correlacionados en los loci (Höllinger et al., 2019). Sin embargo, en el marco del rápido desarrollo de la genómica y de métodos como el *genome-wide association study* (GWAS) en los últimos años, diversos estudios han intentado reconciliar estos paradigmas tomando elementos de ambos (Barghi et al., 2020; Boyle et al., 2017; Csilléry et al., 2018; Pritchard et al., 2010). Por lo tanto, los escenarios propuestos por la genética de poblaciones y la genética cuantitativa no son necesariamente excluyentes uno del otro. De esta manera, el proceso adaptativo de un carácter complejo, podría pensarse como uno en el que alelos con efectos fenotípicos grandes aumentarían su frecuencia rápidamente hasta la fijación mientras que la respuesta adaptativa restante se explicaría por cambios de frecuencia sutiles en muchos loci de efecto individual menor (Pritchard & Rienzo, 2010). En este contexto, una propuesta interesante desarrollada recientemente es el “modelo omnigénico” (Boyle et al., 2017). En este escenario, el valor de un carácter está determinado por la expresión de algunos “genes centrales” en tejidos relevantes. Estos genes tendrían roles interpretables a nivel biológico en el carácter. Sin embargo, la expresión de estos genes centrales sería sutilmente afectada por el nivel de expresión de los demás genes en ese tejido y por lo tanto por cualquier variante que afecte la expresión de estos. Como ejemplo, podría pensarse en efectos sutiles al compartir maquinaria celular o un cruce en las vías de regulación de ARN y proteínas (Boyle et al., 2017; Sella & Barton, 2019).

Para acercarse a la comprensión del proceso adaptativo en un carácter poligénico es relevante identificar los factores que podrían influirlo. Una de las propiedades inherentes a los caracteres poligénicos es la redundancia genética. Esta, hace referencia a que un mismo fenotipo puede corresponder a un número mayor de genotipos, por lo que estos genotipos son redundantes con respecto al fenotipo que producen. De esta manera, un mismo óptimo adaptativo puede desencadenar distintas respuestas adaptativas a nivel genotípico. En ese sentido, partiendo de una población inicial, los individuos que la constituyen pueden alcanzar el óptimo adaptativo a partir de diferentes combinaciones alélicas. Por lo tanto, si la mayoría de los individuos portan los mismos alelos beneficiosos, se observará un aumento brusco de las frecuencias alélicas en la respuesta adaptativa. Sin embargo, si los individuos tienden a portar diferentes combinaciones de alelos beneficiosos los cambios en las frecuencias alélicas serán sutiles (Barghi et al., 2020). Otros factores de gran relevancia en la comprensión del proceso adaptativo de caracteres complejos son las frecuencias alélicas iniciales. De esta manera, alelos con una frecuencia inicial alta tendrán mayor probabilidad de aumentar su frecuencia y contribuir a la respuesta adaptativa en comparación a alelos con menor frecuencia inicial. Sin embargo, este efecto tiende a ser más pronunciado en poblaciones de tamaño pequeño o moderado mientras que se diluye en poblaciones grandes (Barghi et al., 2020). La distancia al nuevo óptimo adaptativo constituye también, un factor relevante para entender la adaptación en caracteres complejos. En ese sentido, una cercanía al óptimo adaptativo requeriría un aumento de frecuencia en pocos loci mientras que un óptimo más lejano involucra la participación de un mayor número de loci o reestructuraciones genéticas más complejas. Por lo tanto, dependiendo de todos estos factores, las respuestas a la selección pueden ser muy distintas variando desde un aumento brusco en la frecuencia alélica en pocos loci hasta cambios sutiles en muchos de estos (Barghi et al., 2020). Por otro lado, teniendo en cuenta la dinámica del proceso adaptativo en caracteres complejos a través del tiempo, este suele estar representado por tres fases. En la primera se observa un aumento de la frecuencia de los alelos que participan en la adaptación hasta alcanzar el óptimo. La segunda fase se encuentra representada por el efecto de la deriva génica en los alelos involucrados produciendo fenotipos subóptimos. Finalmente, en la tercera fase los alelos tenderán a la fijación o la extinción mediante selección (Barghi et al., 2020).

La resistencia a defensas antiherbivoría en Drosophila

La adaptación de los insectos fitófagos, incluyendo las especies de *Drosophila*, a las diversas defensas químicas desplegadas por sus hospedadores es un carácter en el que participan distintas familias enzimáticas. Recientemente, se ha realizado una comparación entre familias de enzimas que suelen tener implicancia en el metabolismo de xenobióticos involucrados en la defensa antiherbivoría, entre los genomas de 14 especies de *Drosophila* de habito ecológico variado. Entre las diferentes estrategias de alimentación, se encuentran especies cactófilas con diferentes hospedadores tanto de tunas como columnares, generalistas de frutas en descomposición, generalistas de fruta fresca, especialistas en la fruta tóxica *Morinda citrifolia*, en la corteza en descomposición y alimentación a partir de flores. De esta manera, se tuvieron en cuenta las familias enzimáticas P450s, carboxil-esterasas, GSTs, UGTs y ABCs previamente mencionadas (Rane, Clarke, et al., 2019). Entre los resultados más interesantes, aparecieron patrones que parecen reflejar una asociación causal entre el tamaño de estas familias génicas con la estrategia de alimentación. El mayor número de P450s, esterasas, GSTs y UGTs se observó en la especie generalista de frutas frescas *D. suzukii* en comparación a las otras especies estudiadas (Fig. 1.4). En este caso, el mayor número de genes en estas familias de enzimas podría deberse a la exposición de las larvas a una amplia variedad de aleloquímicos en los tejidos de fruta fresca que podría diferir de los presentes en sustratos en descomposición a los que se exponen las demás especies. Por otro lado, se observó que *D. sechellia* y *D. yakuba*, las cuales pueden alimentarse de la fruta tóxica *M. citrifolia*, contienen un mayor número de genes de P450s, esterasas, GSTs y UGTs que *D. melanogaster*, la cual carece de esta capacidad (Fig. 1.4). Por lo tanto, los ácidos grasos de cadena media que confieren toxicidad a *M. citrifolia* podrían explicar, en parte, este mayor número de genes detoxificantes. Además, las tres especies cactófilas pertenecientes al clúster mojavensis (*D. arizonae*, *D. mojavensis* y *D. navojoa*), las cuales tuvieron una rápida divergencia y especialización en sus hospedadores, tienen menos genes de ese tipo que las especies cactófilas filogenéticamente menos relacionadas *D. aldrichi* y *D. buzzatii* (Fig. 1.4). Si bien estos resultados sorprenden debido a la complejidad de los aleloquímicos presentes en el tejido necrótico de los cactus, los genes que faltarían en las tres especies del clúster *mojavensis* no son los mismos en términos generales, lo cual podría estar relacionado

con la especialización particular de cada una a sus hospedadores (Rane, Clarke, et al., 2019).

%	Especies	Número total de genes					Número en clados de detoxificación			
		ABCs	CCEs	GST	P450	UGT	ABCs	CCEs	GST	P450
Drosophila	*D. mojavensis*	50	41	29	84	28	20	17	19	56
	D. arizonae	52	39	28	72	17	21	18	18	48
	D. navojoa	49	32	21	66	18	19	12	13	43
	D. aldrichi	83	40	37	92	31	35	17	24	55
	D. buzzatii	53	47	30	87	27	27	19	18	57
	D. hydei	195	49	34	86	26	97	19	22	52
	D. repleta	66	39	28	92	25	28	17	18	61
	D. virilis	59	42	32	86	31	23	17	21	55
	D. grimshawi	60	35	32	93	28	25	16	21	63
Sophophora	*D. sechellia*	61	41	41	96	38	22	20	27	65
	D. melanogaster	56	34	37	87	34	22	16	25	58
	D. yakuba	59	43	42	94	41	22	22	28	61
	D. suzukii	70	54	43	101	53	30	29	29	67
	D. elegans	104	36	39	85	29	45	17	27	55

Figura 1.4: Mapa de calor mostrando el número total de genes de cada una de las cinco familias estudiadas y el número en los clados detoxificadores de las ABCs, CCEs, GSTs y P450s en 14 especies de *Drosophila* (Rane *et al.* 2019a).

Los patrones de expresión génica constituyen otra herramienta de gran utilidad al momento de entender las bases genéticas de la resistencia a fitotoxinas por parte de los insectos herbívoros. Además, permiten caracterizar la respuesta plástica de los mismos a diferentes estímulos ambientales siendo esta de gran relevancia evolutiva en, por ejemplo, la colonización de nuevos hospedadores. Análisis de RNAseq en adultos de *D. sechellia* expuesta a ácido octanoico, una de las fitotoxinas presentes en su hospedador *M. citrifolia*, mostraron un aumento en la expresión de genes relacionados con la morfogénesis y el desarrollo de la cutícula entre los que se encuentran genes de las familias *Osiris* y *Tweedle* (Lanno et al., 2017; Lanno et al., 2019). Asimismo, se observaron evidencias de selección positiva en estas familias génicas en poblaciones de la isla Mayotte de la especie generalista *D. yakuba* que también utiliza *M. citrifolia* como hospedador. Estas observaciones son consistentes con un evento de evolución convergente de resistencia a los aleloquímicos de *M. citrifolia* (Etges, 2019; Yassin et al., 2016). Estudios de RNAseq realizados en el drosofílido *Scaptomyza flava* expuesto a variantes de su hospedador *Arabidopsis thaliana* con y sin glucosinolatos revelaron la

expresión diferencial de genes vinculados con la coagulación de la hemolinfa, la morfogénesis y la estructura cuticular. En este caso, también se encontraron genes de las familias *Osiris* y *Tweedle* entre los diferencialmente expresados sugiriendo un rol en los mecanismos de resistencia a fitotoxinas similar al observado en *D. sechellia* (Etges, 2019). En el caso de las drosofilas cactófilas, estudios de RNAseq mostraron expresión diferencial de genes P450, carboxilesterasas, una GST y seis UGTs entre poblaciones de *D. mettleri* que explotan *Opuntia* y las que explotan *C. gigantea* (Hoang et al., 2015). Por otro lado, se ha observado la inducción de P450s tanto en larvas como adultos de las especies *D. nigrospiracula*, *D. mettleri* y *D. mojavensis* ante la alimentación a base de tejido de cactus fermentado (Danielson et al., 1994). Análisis de transcriptómica realizados en *D. mojavensis* derivada de poblaciones que usan *S. thurberi* como hospedador, mostraron una variación en la expresión del 13% de los genes codificantes al ser criadas en *S. gummosus* y *S. thurberi*. Las funciones biológicas de los genes diferencialmente expresados son bastante variadas incluyendo oxido-reducción, metabolismo de carbohidratos y energético, respuesta a toxinas abióticas y funciones estructurales, entre otras. Sin embargo, también se vieron involucradas familias de enzimas detoxificadoras como las GSTs, UGTs y P450 (Etges, 2019; Matzkin, 2012, 2014). Además, en *D. mojavensis*, se ha observado que el hospedador influye en la variación transcripcional a nivel de la respuesta a la desecación, la temperatura, el tiempo de desarrollo, la variación a lo largo del ciclo de vida del organismo e incluso el aislamiento reproductivo siendo, por lo tanto, de gran relevancia a nivel evolutivo (Etges et al., 2015, 2016, 2017; Rajpurohit et al., 2013; Smith et al., 2013). Finalmente, teniendo en cuenta a las drosófilas cactófilas sudamericanas, se ha ahondado en la respuesta de expresión génica de *D. buzzatii* a los alcaloides presentes en su hospedador secundario *T. terscheckii* en contrapartida con su hospedador primario *O. sulphurea* (De Panis et al., 2016). De esta manera, a partir de análisis de RNAseq, se ha observado una expresión génica diferencial muy marcada entre hospedadores en la cual estuvo implicado el 28% de los genes codificantes. Entre los genes diferencialmente expresados se encuentran proteínas cuticulares, otras implicadas en funciones de oxidación-reducción, en procesos de desarrollo, neurobiológicos y enzimas detoxificantes como esterasas, GSTs, P450, UGTs y alcohol deshidrogenasas (De Panis et al., 2016).

Caracteres implicados en el proceso adaptativo

A partir de los resultados detallados previamente, podemos pensar en la adaptación a la química de las cactáceas por parte de las especies de *Drosophila*, como un proceso complejo y altamente poligénico, que actúa a diferentes niveles del fenotipo del organismo afectándolo en modo integral. Además, si definimos a un carácter fenotípico como cualquier característica mensurable de un organismo, podríamos pensar en infinitos caracteres potencialmente medibles, por lo que el carácter se vuelve un constructo arbitrario. Por el contrario, el número de genes codificantes presentes en un organismo es finito, de tal manera que se espera que los genes tiendan a ser pleiotrópicos (Sella & Barton, 2019). Por lo tanto, a lo largo de un proceso adaptativo complejo como el de las poblaciones de drosófilas cactófilas evolucionando en presencia de los aleloquímicos de sus hospedadores, se espera que se vean implicados múltiples caracteres.

Los caracteres implicados en el proceso adaptativo pueden pensarse como módulos del *fitness* organizados jerárquicamente. De esta manera, en el nivel más alto de esta jerarquía, se encontrarían el mismo *fitness* o la viabilidad. A su vez, estos caracteres son el resultado de otros caracteres que se encuentran en un nivel más basal de esta jerarquía, y así de manera sucesiva hasta llegar a los genes implicados en cada momento y tejido. De manera inversa, la selección sobre un determinado carácter va a estar determinada por la selección sobre los caracteres en el nivel jerárquico superior (Fig. 1.5) (Barghi et al., 2020; Sella & Barton, 2019). Sin embargo, si bien en toda adaptación se espera una optimización del *fitness* o de los caracteres que se encuentran en los mayores niveles jerárquicos como la viabilidad, estos caracteres no proveen suficiente información sobre cómo y por qué se dio el proceso adaptativo. Por lo tanto, son los caracteres que se encuentran en niveles más basales de la jerarquía los que podrían revelar los mecanismos que subyacen al incremento del *fitness*. Además, teniendo en cuenta mecanismos anteriormente abordados como la redundancia genética, para alcanzar un mismo óptimo adaptativo, podrían darse diferentes respuestas a nivel genético e incluso a nivel de los caracteres más basales en la jerarquía (Fig. 1.5) (Barghi et al., 2020). Un ejemplo de este fenómeno son las poblaciones humanas del Tíbet y Etiopía adaptadas a grandes alturas en comparación con poblaciones andinas adaptadas a un ambiente similar. En las primeras, parecería observarse una adaptación a nivel de la regulación de la producción de eritrocitos, mientras que en las poblaciones andinas se

observan señales selectivas en genes asociados al desarrollo y funcionamiento del sistema cardiovascular. De esta manera, aunque en ambos casos la presión ambiental es similar, se desarrollaron dos soluciones evolutivas distintas. Sin embargo, existe la posibilidad que la presión de selección no sea ejercida sobre los caracteres anteriormente descriptos sino en otro carácter en un nivel jerárquico superior, como el suministro de oxígeno a grandes alturas (Barghi et al., 2020). En ese sentido, la covarianza genética entre caracteres dificulta la distinción de los que se encuentran bajo presión selectiva de los caracteres que covarían como producto del desequilibrio de ligamiento o pleiotropía en la respuesta adaptativa. Por lo tanto, la investigación sobre procesos adaptativos suele focalizarse en caracteres para los cuales existe una teoría previa acerca de su rol adaptativo (Barghi et al., 2020).

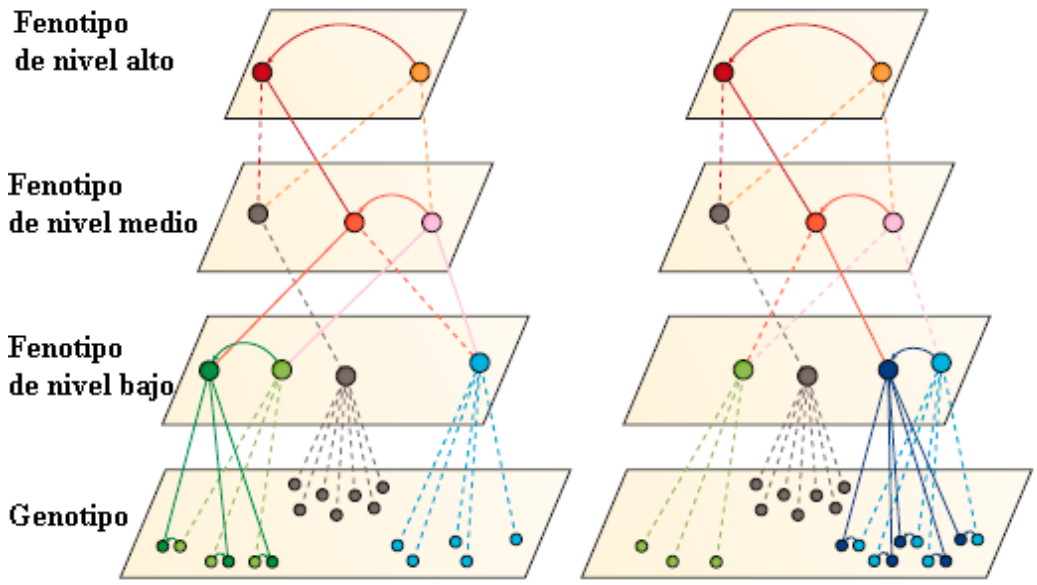


Figura 1.5: Caracteres fenotípicos organizados jerárquicamente en dos individuos de diferentes poblaciones adaptados al mismo ambiente a través de los mismos caracteres en el nivel fenotípico alto e intermedio, pero con diferencias en el nivel fenotípico bajo y el genotipo (Barghi *et al.* 2020).

La correlación genética entre caracteres puede, además, restringir el proceso adaptativo como en la pleiotropía antagonista, cuando un gen afecta dos o más caracteres en direcciones adaptativas opuestas generando un compromiso (*trade-off*). Este proceso, entre otros, ofrece una explicación de por qué la selección es incapaz de optimizar múltiples caracteres de manera simultánea, de tal manera que la optimización

de una función puede devenir en una disminución del *fitness* a causa de cambios correlacionados en otras funciones (Mauro & Ghalambor, 2020). En el contexto de la "pleiotropía universal", en el cual toda mutación en cualquier locus tiene un efecto potencial directo o indirecto en cada carácter, se espera que se presenten más compromisos en organismos complejos que en los simples. De esta manera, se genera un costo asociado a la complejidad del organismo (Mauro & Ghalambor, 2020). La magnitud de la complejidad de las correlaciones entre caracteres existentes en un organismo se evidencia, por ejemplo, en ratones seleccionados para un comportamiento de alta actividad en el uso de la rueda de ejercicio. En este caso, fueron afectados diversos componentes del fenotipo, desde morfológicos y fisiológicos hasta del sistema neuro-endocrino (Castro & Garland, 2018; Garland et al., 2016; Hiramatsu & Garland, 2018). Sin embargo, la correlación genética entre caracteres no constituye en todos los casos un factor de restricción de la evolución adaptativa ya que, en ciertos escenarios, puede incluso potenciarla (Ketterson et al., 2009). A partir de un estudio reciente, se observó que los comportamientos "agresivo" y "audaz" en el pez *Gasterosteus acuelatus* compartirían una base biológica (Aubin-Horth et al., 2012). Por lo tanto, si pensamos en una presión ambiental que favorezca ambos comportamientos, se facilitaría el cambio adaptativo debido a la base biológica compartida. Sin embargo, si a partir de un cambio ambiental la presión de selección solo favoreciera uno de los comportamientos, se generaría un compromiso entre ambos restringiendo el cambio adaptativo (Mauro & Ghalambor, 2020).

La evolución experimental de la tolerancia a alcaloides

Los experimentos de selección constituyen una herramienta poderosa en la biología evolutiva siendo, por ejemplo, uno de los argumentos centrales de Charles Darwin en El Origen de las Especies (Darwin, 1859). La manipulación del proceso de selección natural en condiciones controladas ha contribuido a una mejor comprensión de los procesos evolutivos (Scheiner, 2002). Además, este tipo de experimentos constituye una fuente de información de gran relevancia en el estudio de caracteres complejos, ayudando en la búsqueda de sus componentes genéticos y de sus efectos en el *fitness* (Hill & Caballero, 1992).

A modo general pueden distinguirse dos tipos de experimentos de selección: la selección artificial y la evolución experimental o selección natural de laboratorio (Fuller et al., 2005). En la selección artificial, el experimentador elige los individuos que actuaran como parentales de la siguiente generación según expresen ciertos valores en caracteres específicos. Por lo tanto, en este caso el experimentador constituye el agente directo de selección pudiendo determinar el carácter afectado por la misma, además de su intensidad, entre otros parámetros (Fuller et al., 2005). La otra forma de experimento de selección lo constituye la evolución experimental. En este caso, los cambios evolutivos en las poblaciones experimentales se generan por las condiciones (ambientales, demográficas, sociales, etc.) impuestas por el experimentador (Kawecki et al., 2012). Si bien se controlan las fuerzas que actúan como agentes selectivos a través de regímenes con ciertas características, no se eligen los caracteres bajo selección, así como tampoco se controla su intensidad y consistencia (Fuller et al., 2005).

Si bien en muchos casos los experimentos de selección permiten entender cómo se adapta una población experimental a ciertas condiciones ambientales, son también una gran herramienta para el estudio de las correlaciones y compromisos que puedan existir entre componentes del *fitness* o entre condiciones ambientales (Flatt, 2020; Kawecki et al., 2012).

Desarrollo de las cepas experimentales

Constitución de la población base y protocolo de cría

Las cepas experimentales de la presente tesis fueron desarrolladas en el marco de investigaciones previas que buscaban probar la posibilidad de ambas especies cactófilas de *Drosophila* de evolucionar hacia mayores capacidades de detoxificación y tolerancia a metabolitos secundarios de cactáceas (Padró, 2016).

Con el fin de establecer una población experimental de base de cada especie, se realizó un muestreo de poblaciones naturales en diez localidades del noroeste argentino durante el verano del 2013. El área de muestreo incluye dos unidades biogeográficas principales: la región del Monte, rica en cactáceas del género *Trichocereus* y el Chaco Seco, donde predominan cactáceas del género *Opuntia* (Cabrera, 1976). En la región del Monte se colectaron tanto ejemplares de *D. buzzatii* como de *D. koepferae* mientras que

en la región del Chaco únicamente se encontró *D. buzzatii*. A partir de las hembras fecundadas se establecieron 46 isolíneas de *D. koepferae* y 43 de *D. buzzatii* (para mayores detalles consultar (Padró et al., 2018).

Las poblaciones base generadas antes del inicio del proceso selectivo se establecieron mezclando un número igual de individuos de cada isolínea (aproximadamente 2000 adultos por especie) con el fin de maximizar la variabilidad genética. Estas condiciones de cría en masa se mantuvieron durante 3 generaciones antes del inicio del experimento de evolución experimental. Luego, grupos de aproximadamente 200 hembras fecundadas de estas poblaciones fueron distribuidas al azar en 9 frascos con uno de los tres regímenes selectivos (3 poblaciones réplica por régimen). Los regímenes consistieron en un Control (100% puré de papa, medio *standard* de *Drosophila*), un régimen de selección Moderado y uno Alto (50% y 75% de polvo de clorénquima de *T. terscheckii*, respectivamente). Para estos tratamientos, se extrajo el clorénquima (rico en aleloquímicos) de brazos de *T. terscheckii*, se trozó en porciones de tamaño similar los cuales se secaron en estufa durante 78 horas a 50ºC. Una vez secos, se molieron los trozos hasta lograr un fino polvo al igual que con el puré de papa (medio *Standard*) para lograr una textura similar. Los tres regímenes selectivos fueron hidratados de igual manera con agua destilada y solución antifúngica (Nipagin, 0,02 g/v). A su vez, se incorporó extracto de levadura *ad libitum* (40g/L), con el fin de simular el aporte proteico en la naturaleza y así evitar un factor de selección debido a la deficiencia de este macronutriente. En cada generación, se transfirieron 200 individuos vírgenes a un frasco de oviposición común durante 72 horas para comenzar la siguiente generación. Las poblaciones experimentales fueron mantenidas bajo densidades controladas durante 20 generaciones discretas. Cada 5 generaciones en *D. buzzatii* y en las generaciones 0, 6, 13 y 20 en *D. koepferae*, se midieron los caracteres viabilidad larval, tiempo de desarrollo y tamaño alar con el fin de hacer un seguimiento de la evolución de componentes del *fitness* (Padró et al., 2018). La viabilidad, sirve como componente directo del *fitness* temprano y por lo tanto un buen estimador de la adaptación al régimen selectivo. Por otro lado, el tiempo de desarrollo y el tamaño alar funcionan como caracteres relacionados a componentes del *fitness* adulto como el éxito reproductivo, la dispersión, la longevidad y la tolerancia al estrés, entre otros (Santos et al., 1988; Sgró & Hoffman, 2004).

A partir del experimento de evolución experimental, se observó que tanto *D. buzzatii* como *D. koepferae* respondieron a la selección a través de un aumento de la viabilidad. Sin embargo, la respuesta a la selección fue especie específica ya que mientras *D. buzzatii* optimizó la viabilidad en la concentración Moderada de aleloquímicos de *T. terscheckii*, *D. koepferae* hizo lo propio en la concentración más extrema (Fig. 1.6). Esta diferencia en la respuesta entre especies podría estar relacionada con el hábito ecológico de cada especie, siendo *D. koepferae* la que explota con más frecuencia el cardón. Por otro lado, en ambas especies se observó una extensión en el tiempo de desarrollo como respuesta a la selección además de un aumento no lineal del tamaño alar (Fig. 1.6) (Padró et al., 2018).

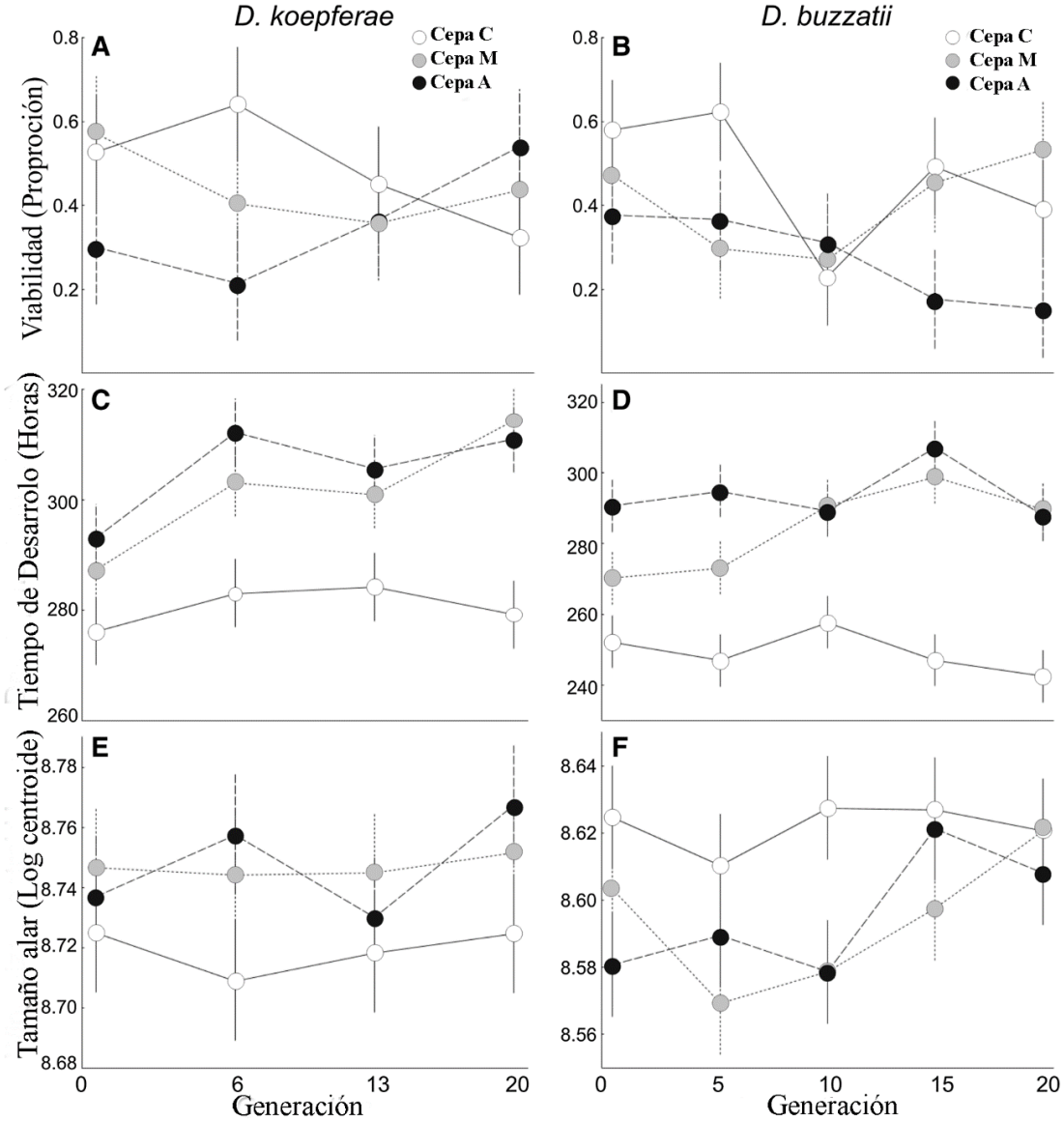


Figura 1.6: Evolución experimental de la viabilidad (a, b), el tiempo de desarrollo (c, d) y el tamaño alar (e, f) en *D. koepferae* y *D. buzzatii* en los regímenes selectivos Control (C), Moderado (S) y Alto (H) con intervalo de confianza del 95%. (Padró *et al.* 2018).

Luego de 20 generaciones de evolución experimental, se realizó una estimación del cambio en la tolerancia al estrés químico. Para esto, se midió la viabilidad larval de cada cepa en medios de cría *standard* con tres dosis de alcaloides purificados de *T. terscheckii*. Estas concentraciones consistieron en 10 mg/g (concentración natural), 20 mg/g y 30 mg/g. A partir de estos ensayos, en *D. buzzatii* se observó una caída de la viabilidad en la población Control mientras que las cepas seleccionadas no mostraron diferencias. Por otro lado, la cepa Control de *D. koepferae* mostró una reducción de la viabilidad, aunque esta no fue significativa mientras que en las cepas seleccionadas tampoco se observaron diferencias (Fig. 1.7). Estos resultados, indicarían una adaptación genética a la presencia de alcaloides como respuesta directa de la selección (Padró et al., 2018).

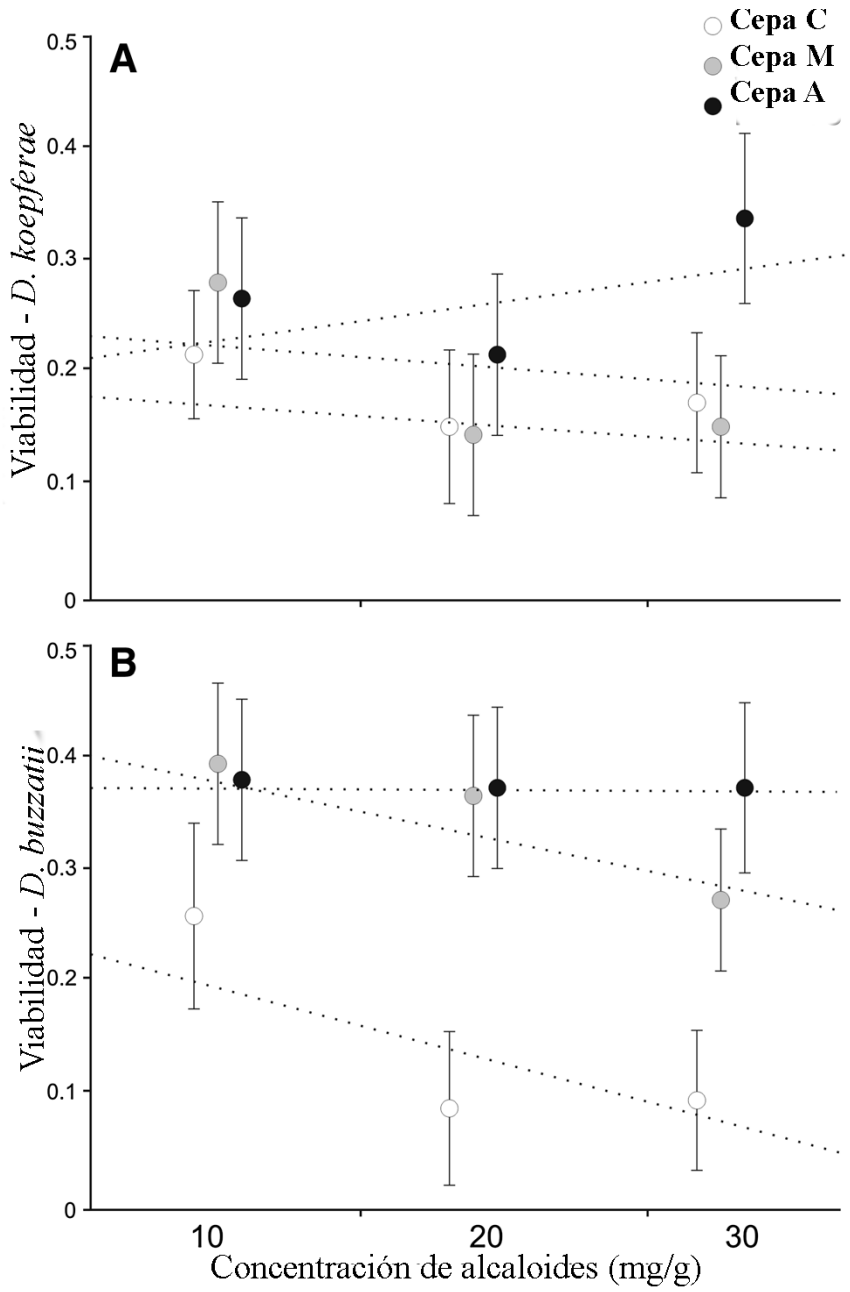


Figura 1.7: Viabilidad larval (media e intervalo de confianza) a través de dosis incrementales de alcaloides de *T. terscheckii* en las poblaciones experimentales de a) *D. koepferae* y b) *D. buzzatii*. (Padró *et al.* 2018).

Con el fin de evaluar si los regímenes selectivos generaron cambios en la norma de reacción en las cepas de selección, se midieron la viabilidad y el tiempo de desarrollo de todas las cepas en cada uno de los medios selectivos. En términos generales, las poblaciones seleccionadas de ambas especies tendieron a una mayor viabilidad y un mayor tiempo de desarrollo que las cepas Control, aunque estas diferencias solo fueron consistentes en el tiempo de desarrollo de *D. buzzatii*. Además, en ambas especies, las

cepas seleccionadas mostraron diferencias con el Control en la viabilidad y el tiempo de desarrollo al criarse en el medio *Standard* salvo en la cepa Moderada de *D. koepferae* (Fig. 1.8). Teniendo en cuenta estos resultados, no se encontró evidencia de posibles costos asociados a la adaptación entendidos como cambios en la norma de reacción a nivel de la viabilidad y el tiempo de desarrollo ante la cría en otros regímenes selectivos (Padró et al., 2018).

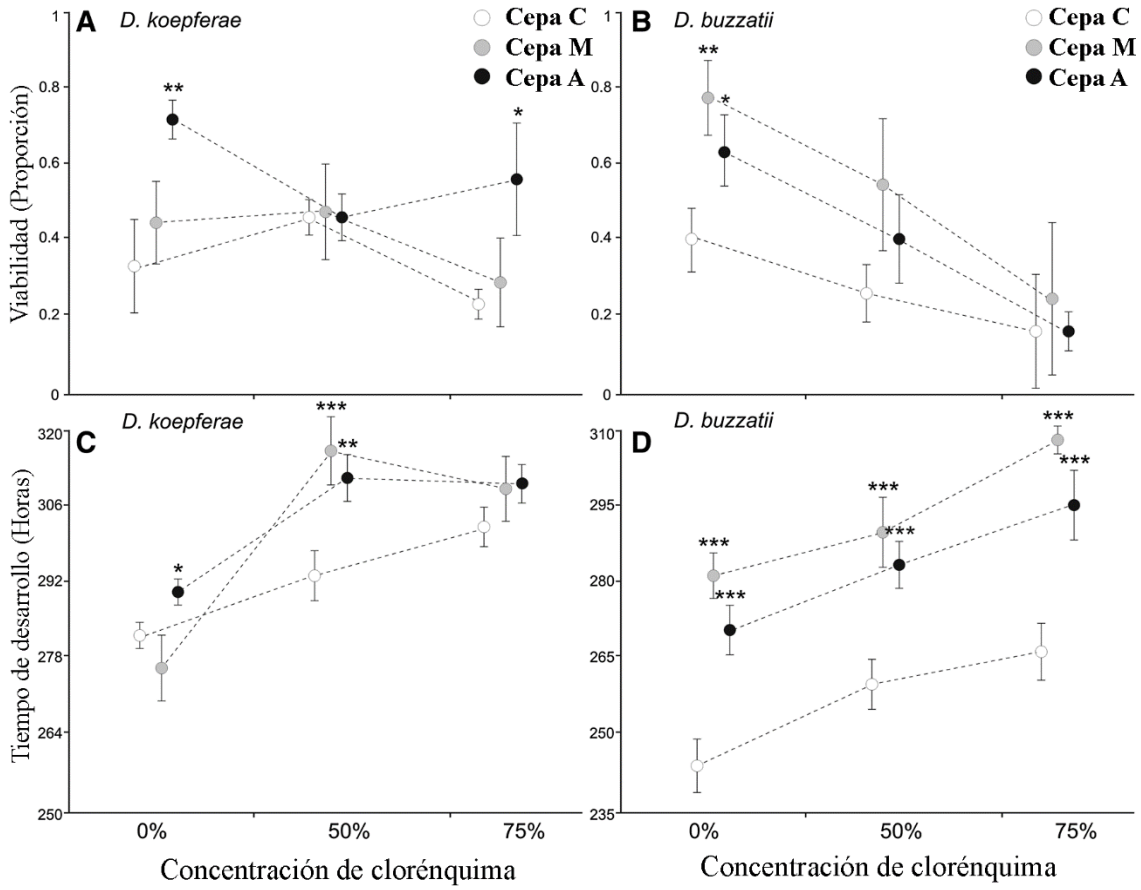


Figura 1.8: Normas de reacción de caracteres de historia de vida en cepas experimentales criadas en medios con diferentes concentraciones de clorénquima de *T. terscheckii*. Se observan las diferencias significativas de las cepas de selección en relación al Control en cada ambiente (Padró et al., 2018). Dunnet test: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 (Padró *et al.* 2018).

Evolución experimental

Tal como se describió anteriormente, en ambas especies de *Drosophila* se observó una respuesta adaptativa a la cría en medio enriquecido con aleloquímicos de *T. terscheckii*. En ese sentido, se observó un incremento de la viabilidad a lo largo de las generaciones de selección en el régimen Moderado en *D. buzzatii* y Alto en *D.*

koepferae (Fig. 1.6) (Padró et al., 2018). Teniendo en cuenta la respuesta a la selección en ambas especies, se decidió juntar las tres réplicas de cada régimen selectivo en una sola constituyéndose así las 3 cepas por especie de *Drosophila* utilizadas en la presente tesis. De esta manera, a pesar de no contar con réplicas de cada régimen selectivo, se pudo evitar la depresión por endocría de las cepas aumentando la variabilidad genética de las mismas. Además, reducir el número de cepas por especie de nueve a tres, hace posible el planteo de nuevos objetivos y su correspondiente manejo experimental. Para la fusión de las réplicas, se tomaron aproximadamente 200 individuos adultos de cada una y se criaron juntas en medio *Standard* durante tres generaciones discretas para continuar luego con el protocolo de selección. Las nuevas cepas se mantuvieron durante 20 generaciones bajo las mismas condiciones de selección anteriormente detalladas antes de iniciar los experimentos.

Si bien la optimización de la viabilidad de la cepa Moderada de *D. buzzatii* y Alta de *D. koepferae* permite observar el proceso adaptativo de manera directa, esto no es necesariamente informativo sobre cómo se produjo dicho proceso o sus consecuencias indirectas. En ese sentido, un abordaje del fenotipo en múltiples niveles, considerando diferentes componentes del *fitness* y sus bases genéticas, permitiría una comprensión más integral de una adaptación compleja y altamente poligénica como es la tolerancia a alcaloides. Por lo tanto, como objetivo general de esta tesis, nos proponemos caracterizar la adaptación a los aleloquímicos de *T. terscheckii* en las cepas de selección de *D. buzzatii* y *D. koepferae*, ahondando en sus bases genéticas, componentes del *fitness* y respuestas correlacionadas. Las particularidades del hábito ecológico de cada especie, en el sentido del uso diferencial de *T. terscheckii*, permiten además una comparación descriptiva del proceso adaptativo entre las mismas. En el caso de *D. koepferae*, la presión de selección consistió en un aumento de la concentración de los aleloquímicos a los cuales la especie ya se encuentra adaptada. Por otro lado, en *D. buzzatii*, la presión de selección supone aleloquímicos presentes en un recurso que explota con menor frecuencia. Por lo tanto, en este último caso se puede pensar en las cepas de selección de *D. buzzatii* como un ejercicio de recreación de las condiciones de salto de hospedador de *Opuntia* a cactus columnar, proceso que, en última instancia, podría llevar a la especiación por especialización ecológica.

A lo largo de los próximos capítulos, abordaremos distintos aspectos de la adaptación a altas concentraciones de los aleloquímicos de *T. terscheckii* por parte de

las cepas de selección de *D. buzzatii* y *D. koepferae* e identificaremos otros caracteres, que, no siendo blanco directo de la selección, fueron indirectamente afectados. En el capítulo II, con el fin de ahondar en las bases genéticas de la adaptación, nos proponemos evaluar el rol de la familia de enzimas detoxificadoras citocromo P450. En el capítulo III, por otra parte, pretendemos caracterizar los costos en la performance asociados a la adaptación ante la cría en hospedadores alternativos distintos de los regímenes selectivos. A nivel de caracteres morfológicos, en el capítulo IV evaluaremos el efecto del proceso selectivo y la cría en hospedadores alternativos sobre la morfología alar y la asimetría fluctuante. Finalmente, en el capítulo V, abordaremos el efecto del proceso adaptativo sobre la longevidad y fecundidad, componentes del *fitness* estrechamente relacionados en el marco de la teoría de la senescencia del soma desechable.

Capítulo II: Rol de la familia génica P450 en la tolerancia a los aleloquímicos de Trichocereus terscheckii

Resumen

La familia de las proteínas citocromo P450 es un grupo de enzimas monooxigenasas encontradas en todos los sistemas vivos. En rasgos generales, su función consiste en la inserción de un átomo de oxígeno en la molécula de sustrato facilitando su metabolización. Esta familia de enzimas ha sido asociada a sistemas de detoxificación de defensas antiherbivoría en insectos fitófagos. En ese sentido, se ha observado la implicancia de las P450 en la detoxificación de aleloquímicos de cactáceas en especies de drosófilas cactófilas norteamericanas. Mediante el uso de PBO, un inhibidor de esta familia enzimática, nos propusimos evaluar el rol de las P450 en la detoxificación de los aleloquímicos de *T. terscheckii* en las cepas de selección de *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Para esto, se criaron las cepas de selección artificial, tolerantes a concentraciones Moderadas de aleloquímicos de *T. terscheckii*, en presencia y ausencia del inhibidor de P450 PBO, para así estimar caracteres de historia de vida. Particularmente se midieron la viabilidad larval y el tiempo de desarrollo. A partir de estos ensayos, en *D. buzzatii*, se observó una caída de la viabilidad larval en presencia de PBO en la cepa Control (C) mientras que las cepas de selección Moderada (M) y Alta (A) no fueron significativamente afectadas. En el tiempo de desarrollo, se observó un aumento del mismo ante la inhibición de las P450 en las cepas C y A, pero no se observaron cambios en la cepa M. En *D. koepferae*, se observó una caída significativa de la viabilidad larval en las cepas C y M en presencia de PBO, mientras que la cepa A no se vio afectada. En el tiempo de desarrollo, por otro lado, se observó un aumento del mismo en las cepas C y A, mientras que la cepa M no se vio afectada. A diferencia de sus respectivos controles, las cepas adaptadas de ambas especies de *Drosophila* no vieron afectada su viabilidad larval ante la inhibición de las P450. El proceso adaptativo en ambas especies habría supuesto un cambio a nivel de otros mecanismos de detoxificación diferentes a las P450 como podrían ser otras familias de enzimas detoxificantes (ADHs, GSTs, UGTs y esterasas). Respecto a los resultados sobre el tiempo de desarrollo, las diferencias entre especies podrían deberse, a un mayor nivel de correlación genética entre viabilidad y tiempo de desarrollo en *D. buzzatii* que en *D. koepferae*.

Introducción

La familia de las proteínas citocromo P450 es un grupo de enzimas monooxigenasas encontradas en todos los sistemas vivos. En términos generales, su función monooxigenasa puede entenderse como la inserción de un átomo de oxígeno en la molécula del sustrato, involucrando a su vez la reducción de oxígeno molecular a agua mediante un electrón aportado por NADPH (Ahmad et al., 1986) (Fig. 2.1). La composición aminoacídica de estas proteínas es muy variada, habiendo únicamente un aminoácido absolutamente conservado entre ellas, la cisteína, que funciona como ligando de la ferroprotoporfirina IX (hemo), grupo prostético en su sitio catalítico (Feyereisen, 2012; Schuler, 1996). Además, pueden reconocerse 5 motivos bastante conservados a lo largo de la proteína en secuencias de insectos (Fig 2.2). Sin embargo, más allá de la gran variabilidad en sus secuencias se observa, sobre todo en sus formas solubles, una conformación tridimensional bastante conservada (Feyereisen, 2012).

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$

Figura 2.1: Reacción de la función monooxigenasa de la familia de proteínas P450 donde RH es el sustrato.

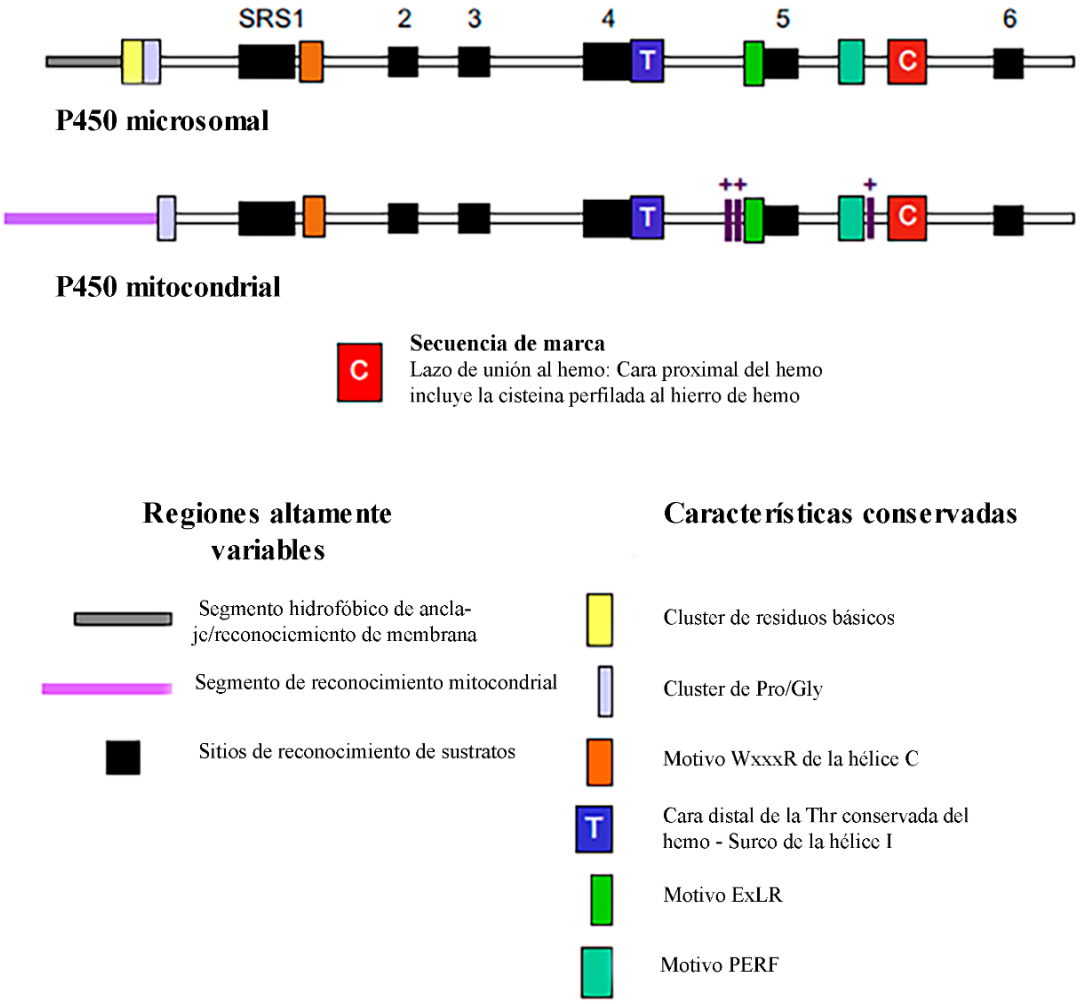


Figura 2.2: Regiones conservadas y variables de proteínas P450 en su estructura primaria (secuencia) (Feyereisen 2012).

Las P450 tienen un rol fundamental en el metabolismo de un gran número de compuestos tanto endógenos como exógenos. Su increíble capacidad para metabolizar un variado número de sustratos se debe, por un lado, a la gran cantidad de isoformas de P450 y, por el otro, a la amplia especificidad de sustrato de algunas de las isoformas (Scott & Wen, 2001). Asimismo, se ha observado que la expresión de muchos componentes de esta familia multigénica es sensible a la presencia inductores. Los inductores pueden ser endógenos como es el caso de la hormona de insectos ecdisoma, o exógenos como ciertos xenobióticos como el fenobarbital o ciertas fitotoxinas como los alcaloides de las cactáceas (Danielson et al., 1997; De Panis et al., 2016; Scott et al., 1998).

Particularmente en insectos, esta familia génica es muy diversa y tiene relevancia en diferentes procesos como el metabolismo de compuestos endógenos entre los que se encuentran hormonas y feromonas (Hodgson, 1983). Estas enzimas, localizadas en el retículo endoplasmático de los insectos, se encargan de convertir compuestos lipofílicos a variantes más hidrosolubles facilitando así su posterior metabolización o excreción por parte del insecto (Frank & Fogleman, 1992). Además, es un mecanismo mediante el cual se genera resistencia a insecticidas, uno de los mayores obstáculos para el control de pestes tanto en la industria agrícola como en asuntos sanitarios (Scott et al., 1998). En insectos fitófagos, varios sistemas de detoxificación han sido asociados con el metabolismo de los aleloquímicos generados por las plantas como defensa contra la herbivoría. Es aquí donde las monooxigenasas citocromo P450 adquieren un rol muy importante junto con otros sistemas enzimáticos como las glutatión S-transferasas, UDP-glicosiltransferasas y esterasas (Bock, 2016; Després et al., 2007). El rol de la familia en la detoxificación de metabolitos secundarios ha sido documentado en diversos casos (Schuler, 2011; Scott et al., 1998). Un ejemplo representativo de la importancia de estas enzimas en la capacidad de herbivoría es la correlación observada entre el grado de especialización de diferentes especies de lepidópteros y la actividad de las P450 en sus glándulas salivales, siendo esta notoriamente más alta en especies polifágicas que en las oligofágicas (Krieger et al., 1971). En el sistema cactus-*Drosophila* del desierto de Sonora, se ha comprobado el rol de las P450 en la metabolización de aleloquímicos de ciertos hospedadores por parte de las especies de *Drosophila*. Este sistema se encuentra compuesto por cuatro especies de *Drosophila* y cinco especies de cactus columnares. Tres de estas especies de cactus, *Carnegia gigantea* (Saguaro), *Lophocereus schotii* (Senita) y *Pachycereus pringlei* (Cardón) son ricas en alcaloides isoquinolínicos que actúan como disuasivos naturales a la herbivoría para especies de insectos no adaptadas (Danielson et al., 1997; Frank & Fogleman, 1992; Meyer & Fogleman, 1987). Mientras que las especies *Stenocereus gummosus* (Agria) y *Stenocereus thurberi* (*Organ pipe*) contienen otras defensas químicas como ácidos grasos de cadena media, glicosidos triterpenos y dioles de esteroles (Fogleman & Abril, 1990). A partir de ensayos realizados en las especies *D. mettleri* y *D. mojavensis* criadas en Saguaro y *Organ pipe* con un compuesto que inhibe la función de las P450 (PBO, ver más adelante) se ha descripto una reducción drástica de la viabilidad en Saguaro, pero no así en *Organ pipe*. Estos resultados, sugieren un rol importante de las P450 en la detoxificación de los alcaloides que contiene Saguaro,

mientras que esto no es evidente para las defensas químicas no relacionadas a alcaloides que contiene *Organ pipe* (Frank & Fogleman, 1992).

Dada la importancia de las P450 en la adaptación de insectos fitófagos a sus respectivos hospedadores y los antecedentes previamente mencionados en especies de drosófilas cactófilas del hemisferio norte, es que en este capítulo nos propusimos determinar la posible implicancia de esta familia enzimática en el sistema cactus-*Drosophila* local evaluando si es la actividad de esta familia de genes la que otorga la tolerancia a altas concentraciones de tejido de cactus a nuestras cepas desarrolladas en el laboratorio. Para ello, diseñamos un experimento que involucra el uso de butóxido de piperonilo (PBO) como inhibidor. El PBO es un derivado sintético del benzodioxol usado como sinergista de insecticidas ya que intensifica las propiedades activas de la piretrina, los piretroides, las rotenonas y los carbamatos, inhibiendo la actividad de detoxificación de las enzimas microsomales en insectos. En este sentido, la habilidad del PBO para inhibir la función del sistema de citocromo P450 lo convierte en una valiosa herramienta de investigación que permite ahondar en el conocimiento de las bases genéticas asociadas a la detoxificación de aleloquímicos.

Objetivos

-Evaluar la posible implicancia de la familia multigénica citocromo P450 en la capacidad de detoxificación desarrollada en ambas especies de *Drosophila*.

-Evaluar una posible diferencia en el rol de las P450 entre las cepas como resultado de la tolerancia a aleloquímicos adquirida por selección artificial en ambas especies de *Drosophila*.

Hipótesis

-La familia de enzimas citocromo P450 participa en la detoxificación de los aleloquímicos presentes en el clorénquima de *T. terscheckii* en ambas especies de *Drosophila* estudiadas.

-El rol de las enzimas citocromo P450 en la detoxificación de los aleloquímicos de *T. terscheckii* difiere entre regímenes selectivos en ambas especies de *Drosophila* estudiadas.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Tanto en la prueba piloto como en el ensayo de inhibición de las P450, cien parejas de moscas sexualmente maduras de cada cepa se dispusieron en cajas de puesta (cajas de acrílico transparente conteniendo placas de Petri con agar 2%) y se les dejó 24 horas para permitirles oviponer. Las placas fueron luego retiradas, inspeccionadas para constatar la presencia de huevos y reservadas durante otras 24 horas hasta su eclosión y presencia de larvas de estadio I. Entonces, se "sembraron" grupos de 50 larvas de primer estadio en tubos que contenían 5 gramos del medio de cría según el tratamiento (ver a continuación). De cada combinación Cepa x Tratamiento se realizaron 4 tubos (réplicas) para la prueba piloto y 5 réplicas para el ensayo de inhibición en cada especie de *Drosophila*.

A partir de cada réplica se estimaron la viabilidad larval y el tiempo de desarrollo. La viabilidad larval fue medida en cada tubo (réplica) como la proporción de adultos que emergen con respecto al número de larvas de primer estadio originalmente sembradas (50). El tiempo de desarrollo fue medido como la cantidad de días transcurridos desde el momento en el cual las larvas de primer estadio fueron sembradas en los tubos hasta la emergencia de la pupa. Para esto, los tubos fueron revisados cada 4 horas durante las 12 horas de luz y los adultos emergidos fueron recogidos, contados y sexados.

Prueba Piloto- Efecto del PBO en la viabilidad

Dada la importancia de ciertas proteínas de la familia P450 en procesos fisiológicos vitales para el insecto, concentraciones muy elevadas de PBO pueden llevar a una reducción en la viabilidad, incluso en ausencia de estrés químico. Por lo tanto, para identificar un posible efecto sobre la viabilidad larval atribuible exclusivamente al PBO, y determinar una concentración de trabajo óptima, se midió la viabilidad larval de

la cepa Control (no expuesta a los aleloquímicos de *T. terscheckii* en el protocolo de selección) en concentraciones crecientes de PBO. Para preparar el medio de cría correspondiente a cada tubo se pesó 1g de puré de papa en polvo, el cual se hidrató con 5 mL de agua destilada con solución antifúngica (Nipagin 1.8g/L) y extracto de levadura (40g/L). En el proceso de hidratación se agregaron, según el tratamiento: 0, 0.5, 1, 5 y 10 mg/de PBO por cada gramo de medio *standard* seco. Los resultados de estos ensayos preliminares (ver más adelante) permitieron elegir la concentración de 3 mg PBO/g de medio estándar seco para los siguientes experimentos.

Ensayo de Inhibición de las P450

Con el fin de caracterizar la implicancia de las P450 en la tolerancia de las cepas de selección de ambas especies de *Drosophila*, se expuso a las mismas a las defensas químicas de *T. terscheckii* inhibiendo la función de las P450 mediante el uso de PBO, para posteriormente usar la viabilidad larval y el tiempo de desarrollo (ver diseño experimental) como indicadores del *fitness*. Esto se llevó a cabo mediante la cría de las cepas de selección Control (C), Moderada (M) y Alta (A) de ambas especies de *Drosophila* en dos tratamientos:

-Tratamiento sin PBO (por tubo): 0.5 g de polvo de clorénquima de *T. terscheckii* y 0.5 g de polvo de puré de papa (medio *Standard*) hidratado con 4 mL de agua destilada con solución antifúngica (Nipagin 1.8g/L) y extracto de levadura (40g/L).

-Tratamiento con PBO (por tubo): 0.5 g de polvo de clorénquima de *T. terscheckii* y 0.5 g de polvo de medio *Standard* hidratado con 4 mL de agua destilada con solución antifúngica (Nipagin 1.8g/L) y extracto de levadura (40g/L) y con 3 mg/µL de PBO.

Análisis estadísticos

Viabilidad larval: Se usaron Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMM) con una distribución binomial usando *logit* como la función de enlace (Zuur et al., 2009). Se consideró a la cepa y la presencia de PBO como variables explicatorias. Adicionalmente, las réplicas fueron incluidas como variables aleatorias para controlar la sobredispersión (Harrison, 2015). El GLMM se ejecutó usando el paquete *lme4* (Bates

et al., 2013). Los contrastes entre tratamientos fueron realizados mediante comparaciones múltiples de Tukey usando el paquete *multcomp* (Hothorn et al., 2008).

Tiempo de desarrollo: Con el fin de comparar las distribuciones de tiempo de desarrollo entre los tratamientos en ausencia y presencia de PBO para cada cepa, se realizaron pruebas pareadas utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Los análisis se ejecutaron usando el paquete *lattice* en el entorno R.

Resultados

Prueba Piloto - Efecto del PBO en la viabilidad

Los datos de viabilidad obtenidos para cada especie en relación a las dosis de PBO se muestran en las figuras 2.3 y 2.4. La función que describe mejor la distribución de los datos muestra una disminución significativa ($p<0.05$) de la viabilidad larval entre las concentraciones de 1 y 5 mg. PBO/g medio seco en ambas especies (Fig. 2.3 y 2.4). En particular, la viabilidad larval fue menor al 50% en los tubos conteniendo 5 mg PBO/g peso seco. A partir de estos resultados, se decidió estimar la concentración máxima de PBO que no afecte la viabilidad mediante interpolación lineal entre las concentraciones 1 y 5 mg. PBO/g medio seco llegando por lo tanto a 3 mg. PBO/g medio seco para los ensayos de inhibición de las P450.

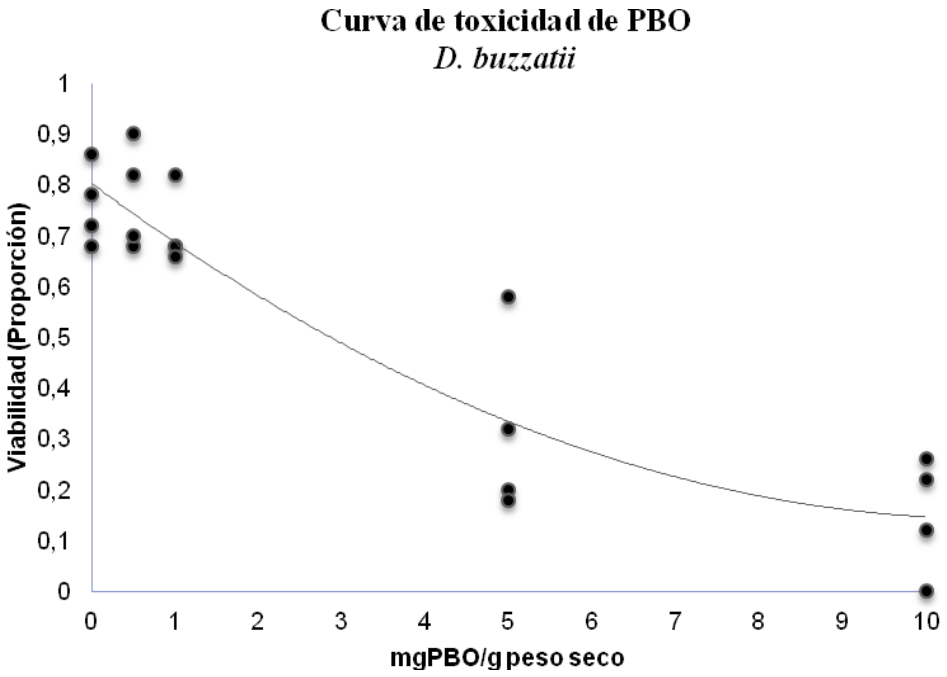


Figura 2.3: Viabilidad larval de la cepa Control de *D. buzzatii* en concentraciones crecientes de PBO.

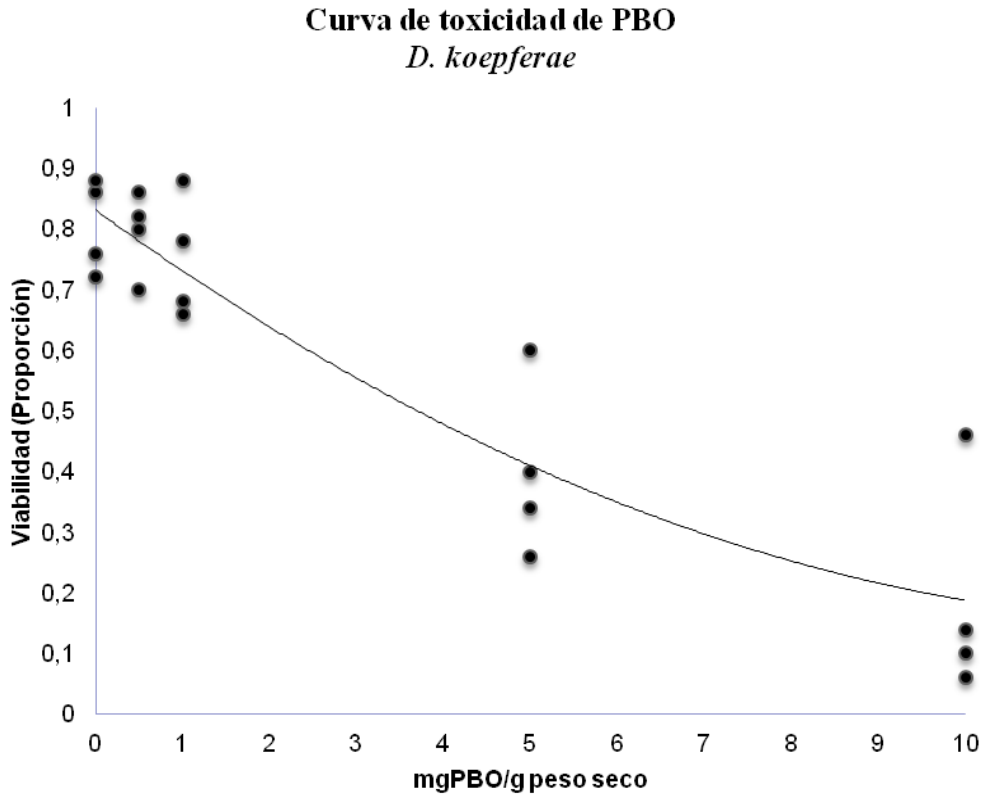


Figura 2.4: Viabilidad larval de la cepa Control de *D. koeferae* en concentraciones crecientes de PBO.

Ensayo de inhibición de las P450

Drosophila buzzatii

La tabla 2.1 incluye los valores de las medias y desvíos estándar para la viabilidad larval y el tiempo de desarrollo. En los análisis de GLMM para viabilidad se observó un efecto significativo del factor PBO y la interacción entre los factores Cepa y PBO (Tabla 2.2). En los contrastes a posteriori de Tukey, se observó una reducción de la viabilidad de un 36% en la cepa C ($p<0.01$) por el tratamiento con PBO. Por otro lado, la cepa A no evidenció una reducción significativa de la viabilidad en el tratamiento con PBO ($p=0.06$), en el mismo sentido, la viabilidad en la cepa M no fue afectada ($p=0.99$; Fig. 2.5).

En cuanto al tiempo de desarrollo, el test de pruebas pareadas de Kolmogorov-Smirnov mostró un cambio significativo en las distribuciones de los valores en las cepas C y A ($p<0.01$ en ambos casos) en presencia de PBO. En el caso de la cepa C, en ausencia de PBO, la emergencia de los individuos se concentró en el día 12 (aproximadamente 60%) y en menor medida en el día 11 con aproximadamente 30% de los emergidos. Por otro lado, en presencia de PBO los individuos emergidos se concentraron en el día 12 y 13 con cerca de 50% y 30% de los emergidos respectivamente por lo que tiende a un tiempo de desarrollo más prolongado. En la cepa A, en ausencia de PBO, los individuos emergidos se encuentran principalmente en el día 12 y 11 con más de un 50% y 30% respectivamente y en menor medida en el día 13 con aproximadamente un 10% de los emergidos. Sin embargo, en presencia de PBO los emergidos se concentran principalmente en los días 12 y 13 con más de 40% y 30% respectivamente y en menor medida en los días 11 y 14 con un 10% de emergidos tendiendo, por lo tanto, a un mayor tiempo de desarrollo. Por otro lado, para la cepa M no se observó un cambio significativo en la distribución de valores del tiempo de desarrollo al inhibir a las P450 ($p=0.48$; Fig. 2.6).

Tabla 2.1: Valores medios con desvío estándar de viabilidad (proporción) y tiempo de desarrollo (días) en ausencia y presencia de PBO en *D. buzzatii* y *D. koepferae*.

Especie	**Carácter**	**Cepa**	**Tratamiento**			
			Sin PBO	N	**Con PBO**	N
D. buzzatii	Viabilidad	Control	0,836 (0,12)	5	0,535 (0,16)	5
		Moderada	0,69 (0,06)	5	0,672 (0,05)	5
		Alta	0,76 (0,04)	5	0,548 (0,20)	5
	Tiempo de desarrollo	Control	11,86 (0,59)	209	12,74 (0,93)	108
		Moderada	12,21 (0,79)	138	12,41 (0,88)	167
		Alta	11,91 (0,73)	190	12,61 (0,99)	137
D. koepferae	Viabilidad	Control	0,8 (0,07)	5	0,544 (0,13)	5
		Moderada	0,612 (0,07)	5	0,388 (0,24)	5
		Alta	0,468 (0,01)	5	0,372 (0,08)	5
	Tiempo de desarrollo	Control	13,53 (0,54)	200	14 (0,64)	136
		Moderada	13,41 (0,63)	153	13,75 (0,91)	97
		Alta	12,94 (0,91)	117	14,52 (1,2)	93

Tabla 2.2: Resultados de los análisis de GLM para viabilidad con Cepa y PBO como variables explicatorias en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Los p fueron calculados

Especie	Fuente de variación	GL	X^2
D. buzzatii	Cepa	2	0,9563
	PBO	1	16,6331***
	Cepa x PBO	2	7,6975*
D. koepferae	Cepa	2	24,5977***
	PBO	1	20,5977***
	Cepa x PBO	2	3,3492

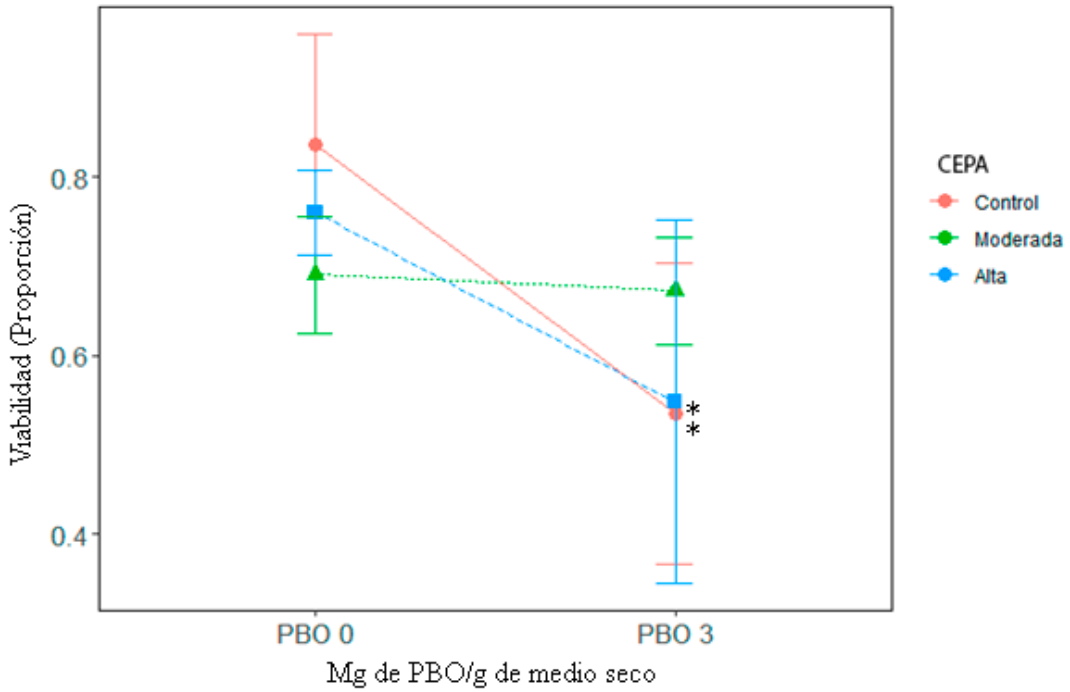


Figura 2.5: Valores medios con desvío estándar de la viabilidad larval en presencia de aleloquímicos de *T. terscheckii* con y sin PBO en las tres cepas de selección de *D. buzzatii*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las medias en cada Cepa.

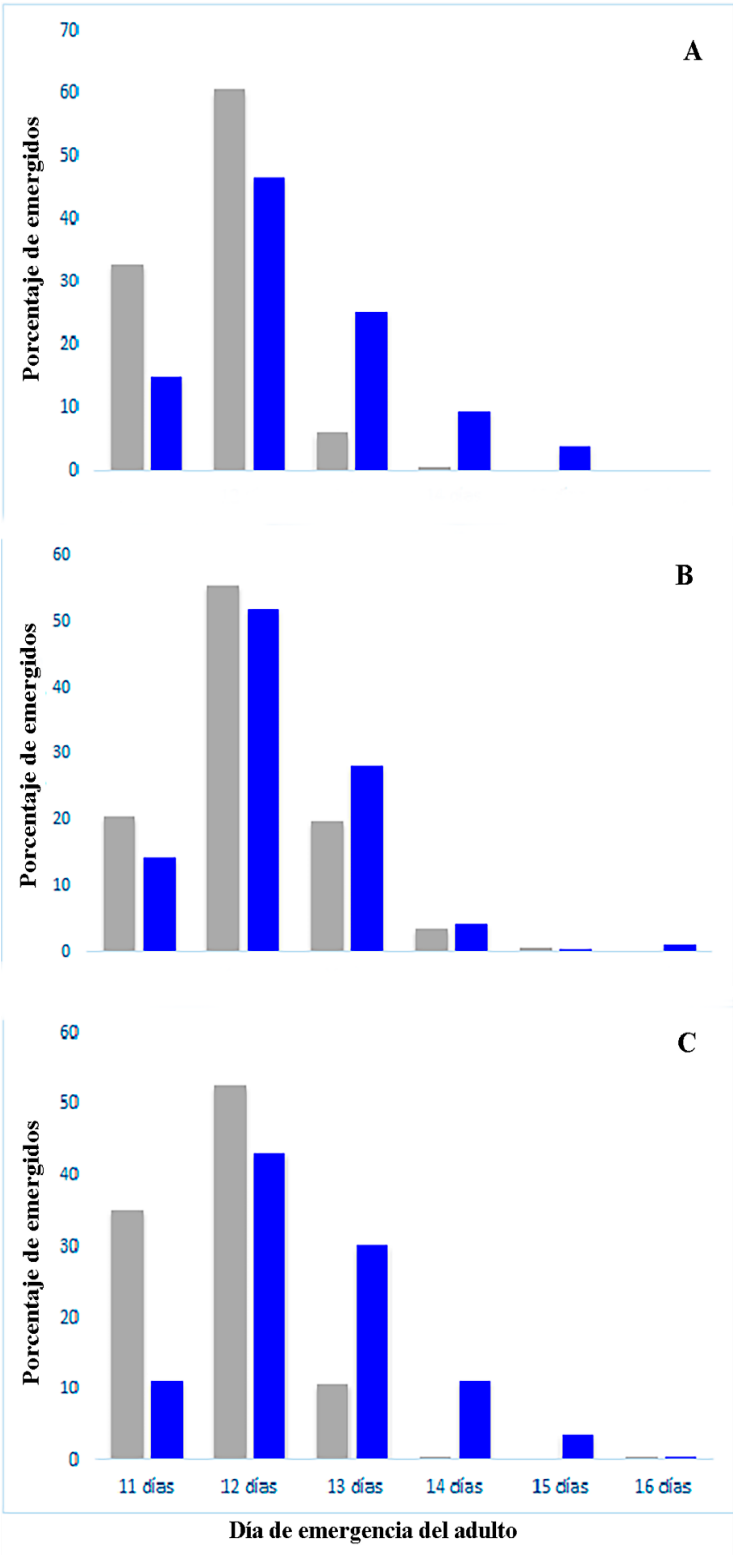


Figura 2.6: Porcentaje de adultos emergidos de *D. buzzatii* por día para las cepas de selección Control (A), Moderada (B) y Alta (C) en ausencia (gris) y presencia (azul) de PBO.

Drosophila koepferae

La tabla 2.1 incluye los valores de las medias y desvíos estándar para la viabilidad larval y el tiempo de desarrollo. Los análisis de GLM sobre la viabilidad revelaron un efecto significativo de los factores Cepa y PBO mientras que la interacción entre estos factores no fue significativa (Tabla 2.2). Los contrastes a posteriori de Tukey determinaron una marcada reducción de la viabilidad de las cepas C y M en presencia de PBO ($p<0.01$ en ambos casos). En la cepa C la reducción fue de un 32% mientras que en el caso de la cepa M fue de 36,6%. Sin embargo, la viabilidad en la cepa A no fue significativamente afectada por el tratamiento con PBO ($p=0.8$; Fig. 2.7).

Por otro lado, el tiempo de desarrollo mostró un patrón diferente a lo observado para la viabilidad. El tratamiento de PBO generó un cambio significativo en las distribuciones en las cepas C y A ($p<0.01$ en ambos casos). En el caso de la cepa C, cerca del 70% de los individuos emergieron al día 13 en ausencia de PBO mientras que en presencia de este inhibidor el pico de emergencia, que incluyo más del 60% de los individuos, ocurrió en el día 14. De esta manera, la presencia del PBO parecería haber retrasado el tiempo de desarrollo. En la cepa A, en ausencia de PBO, más del 50% de los emergidos se concentran en el día 13 y aproximadamente un 30% en el día 12. Sin embargo, en presencia de PBO, los emergidos se distribuyeron principalmente en los días 13, 14 y 15, con aproximadamente un 30% cada día, además de más del 10% en el día 16 mostrando una tendencia a un mayor tiempo de desarrollo. Por otro lado, para la cepa M no se observó un cambio significativo en la distribución de valores del tiempo de desarrollo al inhibir a las P450 ($p=0.06$; Figura 2.8).

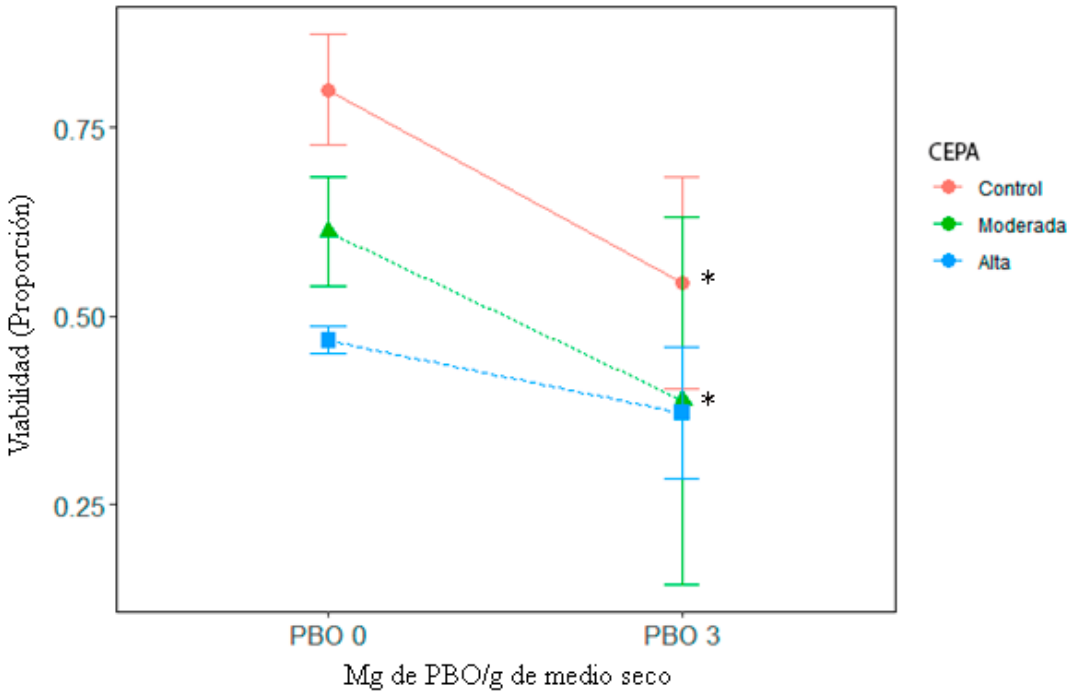


Figura 2.7: Valores medios con desvío estándar de la viabilidad larval en presencia de aleloquímicos de *T. terscheckii* con y sin PBO en las tres cepas de selección de *D. koepferae*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las medias en cada Cepa.

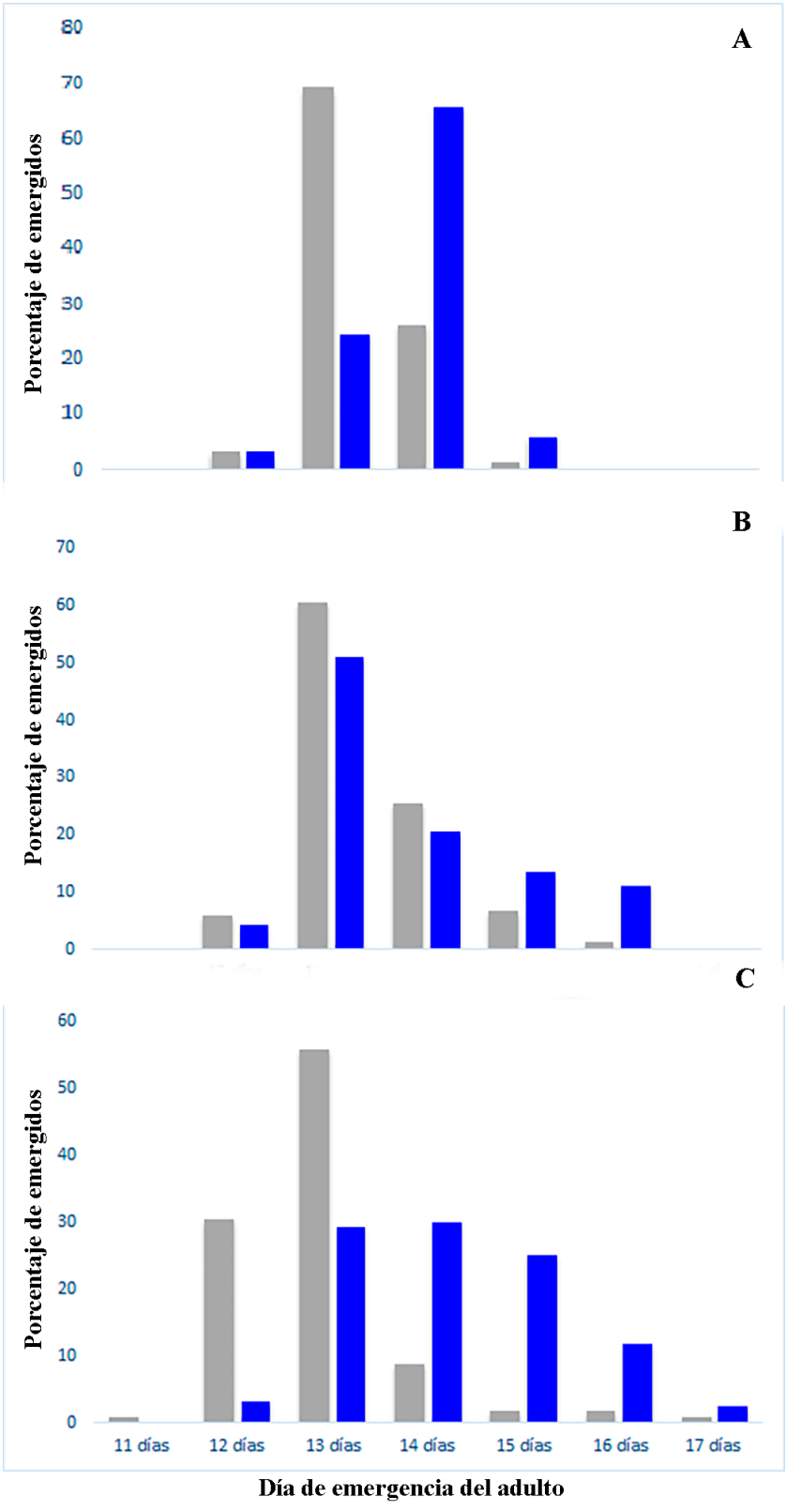


Figura 2.8: Porcentaje de adultos emergidos de *D. koepferae* por día para las cepas de selección Control (A), Moderada (B) y Alta (C) en ausencia (gris) y presencia (azul) de PBO.

Discusión

Se suprimió la función de la familia génica citocromo P450 en las cepas tolerantes con el objetivo de evaluar su contribución en este fenotipo. Esta familia génica fue previamente reportada en la detoxificación de aleloquímicos de cactus en especies de *Drosophila* del desierto de Sonora (Frank & Fogleman, 1992) pero nunca había sido evaluada en la radiación del grupo repleta en Sudamérica, un sistema que evolucionó independientemente, en el que el salto de *Opuntia* al cactus columnar se dio múltiples veces en los últimos 16 millones de años (Oliveira et al., 2012). Además, la composición química de los cactus columnares del desierto de Sonora difiere considerablemente de sus contrapartes sudamericanas correspondientes a los géneros *Trichocereus, Cereus* y *Pilosocereus*, entre otros. Los cactus columnares de Sonora, como *Carnegiea gigantea* o *Pachycereus schotti*, ejemplos del hemisferio norte de hospedadores de drosófilas cactófilas, son ricos en alcaloides derivados de la isoquinolina (Kircher et al., 1967; Ordaz et al., 1983) mientras los alcaloides de *Trichocereus* son derivados de las feniletilaminas (Ogunbodede et al., 2010; Reti & Castrillón, 1951; Trout, 2014). Estas diferencias, abren interrogantes sobre si los mecanismos de detoxificación de las defensas químicas de los hospedadores en las especies de drosófilas sudamericanas, guardan similitudes con los de las especies norteamericanas.

Nuestros resultados mostraron que la inhibición de las enzimas con PBO redujo la viabilidad en las cepas C y A de *D. buzzatii*, así como también en las cepas C y M de *D. koepferae*. Estos resultados apoyan la idea de que la familia génica citocromo P450 también participa en la resistencia a aleloquímicos en estas especies de *Drosophila*.

Ambas especies mostraron diferencias entre cepas en la reducción de la viabilidad. Para *D. buzzatii*, esta reducción fue significativa solo para las cepas C y A mientras que en *D. koepferae* las cepas C y M fueron las afectadas. Estas diferencias entre cepas parecen ser una consecuencia directa de los regímenes selectivos y la tolerancia adquirida. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio con caracteres relacionados al *fitness* como la viabilidad y el tamaño alar usando las mismas cepas mostraron que *D. buzzatii*, en términos poblacionales, alcanza su mayor *performance* en el régimen selectivo M, mientras que la especialista en cactus columnares *D. koepferae* tuvo su mejor respuesta en el régimen A (Padró et al., 2018). En este caso, son los mismos regímenes selectivos los que mostraron la mejor respuesta a un medio enriquecido en

aleloquímicos en ausencia de la función de las enzimas P450. Esto no solo es una manifestación de la tolerancia adquirida a esta presión química, sino que, además, probablemente indique que la evolución de la tolerancia a estos aleloquímicos ha involucrado otros componentes genéticos y vías de detoxificación complementarias y/o alternativas. Estudios recientes de *genome-wide expression* en *D. buzzatii* criada en medios enriquecidos en alcaloides mostraron un incremento en la expresión no solo de la familia P450 sino también de otras familias génicas como las alcohol deshidrogenasas, glutatión-S-tranferasas, UDP glucosil-transferasas y esterasas, ya conocidas por sus funciones de detoxificación (De Panis et al., 2016). Estos resultados proveen una evidencia importante de posibles blancos de la selección en estas cepas tolerantes y una comprobación a nivel fenotipo de la tolerancia adquirida con independencia de las P450.

Una respuesta plástica en la expresión génica debido a un medio de cría estresante podría haber jugado un rol importante en los datos obtenidos. Sin embargo, las diferencias observadas entre los distintos regímenes selectivos y la respuesta particular de las cepas tolerantes en cuanto a la viabilidad apoyan la idea de una evolución direccional de la variación genética involucrada en la detoxificación de aleloquímicos como consecuencia de la selección artificial. Este escenario complejo presenta a la tolerancia a aleloquímicos en ambas especies como un carácter multifactorial, con respuestas especie-específicas que bien podrían dar cuenta de sus hábitos ecológicos e historia evolutiva donde la huella de la selección experimental es diferenciable ya que ha trabajado sobre sustratos genéticos distintos.

Los ensayos de tiempo de desarrollo ratifican lo observado en los ensayos de viabilidad. En ellos se observó un cambio significativo de distribución de los valores de emergencia de la pupa en presencia de PBO en las cepas C y A de ambas especies, desplazándose hacia valores mayores. Esta respuesta puede ser considerada como un indicador de reducción del *fitness*, entendiéndose en este caso el aumento del tiempo de desarrollo como una mayor dificultad en la metabolización de los aleloquímicos de *T. terscheckii* a causa de la inhibición de las enzimas P450 y, por lo tanto, un aprovechamiento menor o más lento del componente nutricional del medio.

Sin embargo, respecto a los patrones observados para la viabilidad larvaria, el comportamiento de las cepas respecto al tiempo de desarrollo fue muy diferente entre especies. En *D. buzzatii*, las cepas C y A experimentaron un aumento en el tiempo de

desarrollo en presencia de PBO. Por otro lado, el tiempo de desarrollo de la cepa M, al igual que su viabilidad, no se vio afectada por el tratamiento con PBO (Fig. 2.6). Esta cepa podría disponer de otros mecanismos más eficientes para metabolizar los aleloquímicos de *T. terscheckii* adquiridos en el proceso selectivo que, dada su intensidad, pudo permitir una adaptación más fina y robusta respecto a lo observado por la cepa A.

En el caso de *D. koepferae*, las cepas C y A fueron las que experimentaron el incremento en los valores de tiempo de desarrollo medio en presencia de PBO. De esta manera, a diferencia de lo observado en la cepa mejor adaptada de *D. buzzatii*, la cepa A de *D. koepferae* no habría compensado de forma similar la ausencia de las funciones enzimáticas de las P450. Además, llamativamente, la cepa M de *D. koepferae* no se vio afectada en el tiempo de desarrollo como consecuencia del PBO mostrando también una respuesta diferente que en la viabilidad (Fig. 2.8).

La relación entre viabilidad y tiempo de desarrollo ha sido previamente propuesta como inversamente correlacionada. Según este razonamiento, individuos de desarrollo lento se expondrían mayor tiempo a parásitos y predadores en un recurso efímero como las necrosis de los cactus limitando por lo tanto su supervivencia larvaria (Folguera et al., 2008). Estudios previos del vínculo entre viabilidad y tiempo de desarrollo en *D. melanogaster* (Zwaan et al., 1995) y *D. buzzatii* (Fernandez-Iriarte & Hasson, 2000) no han encontrado relación entre estos caracteres. Sin embargo, análisis de correlación realizados recientemente entre ambos caracteres en *D. buzzatii* y *D. koepferae* han detectado una correlación que puede variar con el ambiente. En ese sentido, se han observado diferencias en la correlación para *D. koepferae* según se críe en *T. terscheckii* o en *O. sulphurea*, mientras que en *D. buzzatii* la asociación no varía con el medio de cría. Particularmente, *D. koepferae* no mostró una correlación significativa entre estos caracteres cuando fue criada en *T. terscheckii* mientras que *D. buzzatii* si (Tabla 2.3) (Soto et al., 2017). En ese sentido, si bien en este estudio la cantidad de réplicas no es suficiente para generar índices de correlación entre viabilidad y tiempo de desarrollo con una potencia confiable, observamos también un patrón de cambio conjunto entre estos caracteres ante el tratamiento con PBO en las cepas de selección de *D. buzzatii* mientras que en *D. koepferae* la respuesta entre los mismos parece ser más independiente. Estos diferentes patrones observados en las especies estudiadas, podrían estar relacionados con una diferencia en la correlación genética

entre los caracteres estudiados; es decir, estos podrían presentar un mayor grado de pleiotropía en *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. Por lo tanto, en *D. buzzatii*, la viabilidad y el tiempo de desarrollo responderían de forma similar ante la presión de selección y el tratamiento de PBO, no así en *D. koepferae*.

	D. koepferae				*D. buzzatii*			
	VL	TD	TA	TE	VL	TD	TA	TE
VL	-----	0.355*	-0.219*	0.158	-----	0.376*	-0.157	0.085
TD	0.141	-----	-0.345*	0.524*	0.351*	-----	-0.093	0.291*
TA	-0.044	0.109	-----	-0.303*	-0.162	-0.131	-----	-0.284*
TE	0.107	0.339*	-0.285*	-----	0.136	0.411*	-0.330*	-----

Tabla 2.3: Patrones de correlación entre caracteres de historia de vida en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Coeficientes de correlación de Pearson entre tiempo de emergencia (TE) y caracteres relacionados al *fitness*: viabilidad larval (VL), tiempo de desarrollo (TD) y tamaño alar (TA). Los valores arriba de la diagonal corresponden al recurso de cría *O. sulphurea* y debajo de la diagonal a *T. terscheckii*. *p<0.05 (Soto et al. 2017).

Por otro lado, como ya fue descrito, las defensas químicas de los hospedadores en el sistema cactus-*Drosophila* del desierto de Sonora se diferencian en su composición con respecto a la de los aleloquímicos estudiados en la presente tesis. Sin embargo, a partir de los ensayos realizados, confirmamos que en ambos casos se encuentran componentes de la familia de enzimas P450 implicados en el proceso de detoxificación de las defensas químicas de sus hospedadores. Si bien esto no es llamativo en términos de que las P450 se encuentran presentes en todos los sistemas vivos conocidos (Nelson & Strobel, 1987), nos proporciona información valiosa en cuanto a los mecanismos que permitieron la radiación de las drosófilas cactófilas en el continente americano; aportando este conocimiento para el sistema local que evolucionó de manera paralela e independiente a su contraparte norteamericana. En este sentido, nuevos estudios ayudarán a generar un conocimiento más acabado del rol de esta familia enzimática en la colonización de nuevos hospedadores ocurrida en la historia

evolutiva del sistema cactus-*Drosophila*. En particular, estudios a nivel genético en las cepas utilizadas en la presente tesis, podrían ser de gran ayuda para identificar loci con roles preponderantes en la detoxificación de los aleloquímicos de *T. terscheckii*, tanto en *D. buzzatii* como en *D. koepferae*. Esto permitiría comparar estos loci con posibles ortólogos ya identificados en el sistema norteamericano y estudiar su evolución de forma tal de evaluar convergencias y paralelismos.

Capítulo III: Costo de la adaptación en la performance asociado al salto de hospedador

Resumen

El proceso coevolutivo entre plantas e insectos abarca 300 millones de años de interacciones ecológicas y adaptaciones. La mayoría de las especies de insectos fitófagos se encuentra altamente especializada y utilizan una pequeña fracción de las plantas a su disposición. Una de las hipótesis más aceptadas para explicar esta tendencia a la especialización es el principio denominado en inglés *Jack of all trades-master of none*. Según el mismo, los genotipos que desarrollan una performance alta en un determinado hospedador tendrán un menor desempeño en otro por la existencia de compromisos genéticos. Sin embargo, las evidencias sobre la existencia de estos compromisos no son abundantes. A través de la cría en diferentes hospedadores presentes dentro del rango de distribución de ambas especies de *Drosophila* estudiadas, nos propusimos evaluar la existencia de este compromiso en la performance asociada a los hospedadores. De esta manera, nos proponemos evaluar las diferencias de performance entre las cepas desarrolladas en los diferentes regímenes selectivos. A partir de estos ensayos, en D. *buzzatii* se observaron mayores valores de performance en la cepa Control que en las cepas de selección Moderada y Alta. Por lo tanto, el proceso selectivo parecería haber generado un costo al criarse en nuevos ambientes, lo cual se condice con lo predicho por la teoría *Jack of all trades-master of none*. En *D. koepferae*, por el contrario, no se observaron diferencias entre regímenes lo que indicaría una ausencia de costo ante la cría en nuevos ambientes. Esta diferencia entre especies, podría estar relacionada con las diferencias en el hábito ecológico entre las mismas. Dado que el proceso selectivo en *D. buzzatii* supuso la exposición a defensas químicas de un hospedador que explota con menos frecuencia que *D. koepferae*, podría haberse generado un mayor grado de compromiso genético. Por otro lado, se observaron diferencias de performance entre hospedadores observándose mayores valores en *T. terscheckii* de San Juan y *O. sulphurea* en ambas especies de *Drosophila* mientras que en *T. pasacana* también se observaron performances relativamente altas en *D. koepferae*. Además, se observaron llamativas diferencias entre *T. terscheckii* de San Juan y de Jujuy.

Introducción

Las relaciones entre plantas e insectos han sido una de las asociaciones más abordadas en el estudio de los procesos coevolutivos. Estas se manifiestan de múltiples formas y cuentan con una vasta historia: las primeras evidencias de fitofagia por parte de insectos obtenidas a partir de material vegetal fosilizado datan del Carbonífero tardío, hace aproximadamente 300 millones de años (Gullan & Cranston, 2005). Los insectos son los herbívoros primarios en muchos ecosistemas y constituyen un eslabón fundamental en la cadena trófica de los mismos. De acuerdo a la variación en la amplitud de hospedadores utilizados por cada especie, se las suele clasificar en: i) monófagas, las cuales explotan un taxón particular de plantas; ii) oligófagas, las cuales utilizan un número reducido de estas y iii) polífagas, que explotan diversos grupos de plantas (Gullan & Cranston, 2005). Si bien estas categorías, así como la dicotomía especialista-generalista, son de utilidad para referirse a grandes grupos; la variación de la amplitud de hospedadores elegidos por cada especie de insecto se asemeja más a un gradiente continuo (Ali & Agrawal, 2012). Como patrón general, la mayoría de las especies de insectos fitófagos se encuentran altamente especializadas y utilizan una pequeña fracción de las plantas que tienen a disposición. De hecho, reportes previos afirman que menos del 10% de las especies estudiadas utilizan más de tres familias de plantas como hospedador (Bernays & Graham, 1988; Futuyma & Moreno, 1988; Jaenike, 1990).

Una de las hipótesis más aceptadas para explicar esta tendencia a la especialización es el principio denominado en inglés *Jack of all trades-master of none* (McArthur, 1972). Según el mismo, los genotipos que desarrollan una performance alta en un determinado hospedador, tendrán un menor desempeño en otro. Por lo tanto, la adaptación de una especie de insecto a un nuevo hospedador implicaría un costo en la performance o, dicho de otro modo, existiría un compromiso (*trade-off*) en el desempeño entre plantas hospedadoras (Ali & Agrawal, 2012; Garcia-Robledo & Horvitz, 2011; Remold, 2012). A pesar de esto, las evidencias de estos compromisos no son abundantes y en la mayoría de los casos no se conocen los mecanismos que operan detrás de los mismos. En contrapartida, son frecuentes los casos en los que no se detectan compromisos en el desempeño entre hospedadores o incluso se encuentran correlaciones positivas entre los mismos (Agrawal, 2000; Garcia-Robledo & Horvitz, 2011). En este sentido, estas observaciones pueden referirse a grupos de insectos de

hábitos más generalistas, en los cuales podrían estar implicados otros procesos. Un ejemplo de esto, considerando a las defensas químicas de las plantas como un actor preponderante en sus interacciones con insectos fitófagos (Futuyma & Agrawal, 2009), es la teoría de la zona adaptativa (Ehrlich & Raven, 1964). La misma, predice que una adaptación a un hospedador particular correlacionaría positivamente con la adaptación a hospedadores filogenéticamente cercanos, dada la probable similitud en las defensas químicas entre los mismos. Por otro lado, un marco teórico que complementa lo dicho anteriormente es la evolución de la plasticidad de los genotipos, el cual ha mostrado ser de gran relevancia para entender el desarrollo de nuevas interacciones planta-insecto (Garcia-Robledo & Horvitz, 2011). En este escenario de genotipos con historia de adaptación previa, el nivel de plasticidad de un genotipo puede ser determinante en la cría en un hospedador alternativo ya que le confiere una mayor posibilidad de sortear las nuevas dificultades que se presenten, como son las defensas químicas de las plantas. Una de las herramientas que ha mostrado gran utilidad en el abordaje de compromisos y costos en el *fitness* de insectos fitófagos entre diferentes plantas hospedadoras son los experimentos de selección artificial. Mediante la selección de algún carácter en particular, estas técnicas permiten detectar con mayor facilidad las posibles asociaciones con otros caracteres o las diferencias en la respuesta de un mismo carácter entre diferentes ambientes (Agrawal, 2000; Cortese et al., 2002; Fry, 1990).

Tal como se detalló anteriormente, el hábito ecológico difiere mucho entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Mientras *D. koepferae* se cría mayoritariamente en cactus columnares como las demás especies pertenecientes al *serido sibling set*, *D. buzzatii* es la única especie del clúster que utiliza preferencialmente las tunas como hospedador (Manfrin & Sene, 2006). Diferentes especies de tunas, entre ellas *Opuntia sulphurea*, han mostrado ser un medio de cría muy apropiado en condiciones de laboratorio para ambas especies de *Drosophila*, especialmente *D. buzzatii*, observándose viabilidades altas y valores bajos de tiempo de desarrollo (Soto et al., 2014). Si bien *D. buzzatii* explota facultativamente cardones, y por lo tanto se encuentra adaptada en cierta medida a la cría en los mismos, son las poblaciones experimentales de esta especie las que debieron sortear mayores dificultades a la hora de adaptarse a las condiciones de selección impuestas debido a su particular intensidad. Al igual que en *T. terscheckii*, trabajos previos han reportado la presencia de componentes alcaloidíferos de la familia de las feniletilaminas en varias especies de cardones del género *Trichocereus* (Meyer &

McLaughlin, 1980; Trout, 2014). La semejanza en la química de estas especies de cardones las convierte en un modelo muy atractivo para la simulación de saltos hacia hospedadores filogenéticamente cercanos. Adicionalmente, las diferencias en el nivel de especialización en el uso de cardones por parte de *D. buzzatii* y *D. koepferae*, así como las respuestas especie-específicas de las cepas tolerantes a la selección artificial (Padró et al., 2018), abren interrogantes sobre los posibles costos en el *fitness* ante la cría en hospedadores alternativos. Por lo tanto, en el presente capítulo nos proponemos evaluar si el proceso adaptativo de las cepas de selección de ambas especies de *Drosophila* supuso un costo en la performance al ser criadas en hospedadores distintos a sus respectivos regímenes selectivos.

Objetivo

-Evaluar la existencia de un costo o compromiso genético derivado del proceso adaptativo observado como un menor *fitness* o una degradación de componentes del *fitness* en las cepas tolerantes cuando son criadas en hospedadores que no constituyeron el medio selectivo.

-Evaluar el efecto de la cría en hospedadores distintos al régimen selectivo sobre la performance en ambas especies de *Drosophila*.

Hipótesis

-El proceso selectivo generó un costo o compromiso genético en la performance ante la cría en hospedadores distintos al régimen selectivo.

-La cría en hospedadores distintos al régimen selectivo tuvo efectos en la performance en ambas especies de *Drosophila*.

Materiales y métodos

Se estimó el desempeño de las cepas de selección en clorénquima fresco de seis hospedadores diferentes de cactus presentes en la zona de distribución de *D. buzzatii* y *D. koepferae* (Fig. 3.1).

Los hospedadores utilizados fueron:

- *Opuntia sulphurea* (Op sul): Constituye la única especie de tuna utilizada como recurso en este ensayo. Es un arbusto que se distribuye en la región fitogeográfica del Monte seco y está especialmente asociada a espacios abiertos (Carreira et al., 2014). En algunas regiones, es el hospedador principal de *D. buzzatii* y es explotado secundariamente por *D. koepferae*.
- *Trichocereus terscheckii*: Se distribuye en el centro-noroeste de Argentina y el sur de Bolivia donde es de las especies de cardón más abundantes. Es uno de los principales hospedadores de *D. koepferae* y es explotado con menos frecuencia por *D. buzzatii*. En el presente ensayo utilizaremos dos poblaciones de esta especie como recurso, una muestreada en la provincia de San Juan (Tt SJ) y otra muestreada en la provincia de Jujuy (Tt Ju). Los ejemplares de la primera población constituyen la fuente original del clorénquima utilizado en los regímenes selectivos.
- *Trichocereus pasacana* (T pas): Presente en la región de la Prepuna (Argentina, Bolivia y Chile), de condiciones climáticas áridas con 150 ± 70 mm de precipitación anual. Los individuos a grandes alturas suelen presentar una capa densa de pelusa blanca como protección contra las heladas y la radiación solar (Anderson, 2001).
- *Trichocereus volcanensis* (T vol): Presenta una distribución en parches, pero con relativa abundancia local en praderas y bosques de Yungas de gran altura en el noroeste argentino (Anderson, 2001).
- *Trichocereus tarijensis* (T tar): Se distribuye en el noroeste argentino y el sur de Bolivia. Se la asocia a praderas de grandes alturas, de sedimento rocoso, junto con el ya mencionado *T. pasacana*.

Diseño experimental (Fig. 3.1)

Para cada cepa, se dispusieron aproximadamente cien parejas de moscas sexualmente maduras en cajas de puesta conteniendo placas de Petri con agar 2% y se las dejó durante 24 horas para permitir la oviposición. Las placas fueron luego retiradas y dejadas 24 horas para la eclosión de los huevos. Entonces, se sembraron grupos de 50 larvas de primer estadio por tubo, los cuales contenían 5 gramos de medio de cría. Para

cada combinación de cepa y cactus se obtuvieron 5 réplicas. Este protocolo se realizó para ambas especies de *Drosophila*.

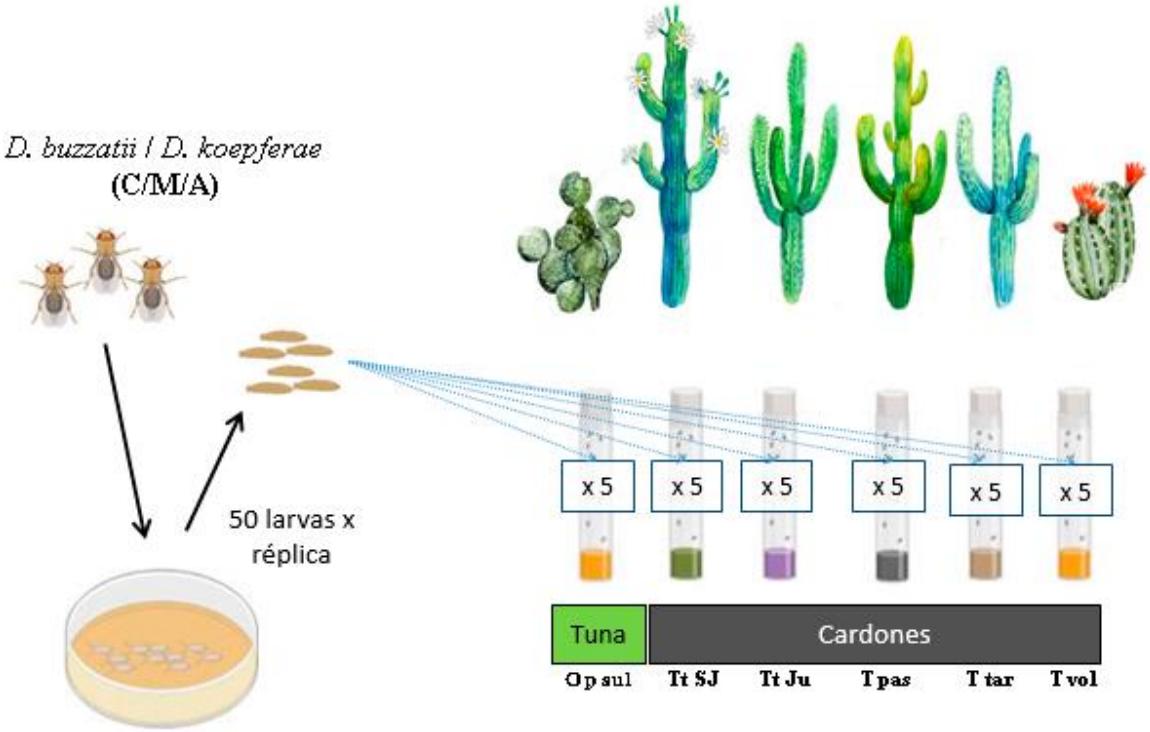


Figura 3.1: Diseño experimental utilizado para estimar el desempeño de las cepas de selección de ambas especies de *Drosophila* en los diferentes recursos de cría. Op sul (*Opuntia sulphurea*), Tt SJ (*Trichocereus terscheckii* San Juan), Tt Ju (*Trichocereus terscheckii* Jujuy), T pas (*Trichocereus pasacana*), T tar (*Trichocereus tarijensis*), T vol (*Trichocereus volcanensis*).

Como estimador del *fitness* se calculó un índice de performance (IP) utilizando tres caracteres relacionados al mismo: la viabilidad larval (VL), el tiempo de desarrollo (TD) y el tamaño alar (estimador del tamaño corporal, TA).

La viabilidad, es un componente del *fitness* temprano ya que se trata de la proporción de larvas que sobreviven hasta el estadio adulto y constituye, por lo tanto, el componente más directo del *fitness*. El tiempo de desarrollo es un componente de gran relevancia en el *fitness*, sobre todo en especies de *Drosophila* donde los recursos de cría

suelen ser efímeros, lo cual podría resultar en una selección para alcanzar un desarrollo más rápido (Mensch et al., 2008). El tamaño alar, por otro lado, sirve de estimador del tamaño corporal, relacionado con el éxito reproductivo, la longevidad, tolerancia al calor, frío e inanición entre otras (Corio et al., 2013). Tanto el tiempo de desarrollo como el tamaño alar son, además, conocidos por encontrarse relacionados en un compromiso en *D. buzzatii* (Cortese et al., 2002; Fernandez-Iriarte & Hasson, 2000). Con estas tres variables se construyó el índice, que sirve como herramienta para realizar un abordaje más holístico de la respuesta de las cepas a los diferentes hospedadores propuestos, ya que tanto la viabilidad larval como el tiempo de desarrollo representan componentes tempranos del *fitness* mientras que el tamaño alar constituye un componente tardío del mismo.

Cada uno de los caracteres mencionados se estimó como se describe a continuación:

Viabilidad larval (VL): La viabilidad fue medida en cada tubo (réplica) como la proporción de larvas de primer estadio que llegan al estadio adulto del número de larvas originalmente sembrado.

Tiempo de desarrollo (TD): El tiempo de desarrollo fue medido como el tiempo transcurrido (en horas) desde la siembra de las larvas de primer estadio hasta la emergencia de los adultos. Para esto se contabilizó el número de adultos emergidos cada 4 horas en el periodo de luz (8AM-8 PM).

Tamaño alar (TA): Los adultos emergidos fueron separados por sexo y almacenados en alcohol 70% a -20ºC. Se removieron las alas de los machos y se montaron en portaobjetos. Para la estimación del tamaño alar se utilizaron únicamente las alas derechas. Una vez montadas, las alas fueron digitalizadas una a una mediante una cámara digital adosada a un microscopio (con 40x de aumento) y conectada a una computadora. Para cada ala se colocaron 10 puntos de referencia homólogos en las intersecciones de las venas más representativas o en su unión con el borde (Fig. 4.2). La digitalización de los *landmarks* se realizó mediante el programa tpsDIG 2.22 (Rohlf 2015). Las configuraciones de *landmarks* fueron luego superpuestas utilizando un análisis de Procrustes Generalizado (*Generalized Procrustes Analysis*, GPA). El TA se estimó a partir del tamaño de centroide que se define como la raíz cuadrada de la

sumatoria de las distancias de cada referencia anatómica al centroide de la configuración (Dryden & Mardia, 1998).

Índice de Performance (IP): El índice se conformó interpretando a nivel biológico las variables de viabilidad y tamaño alar como directamente proporcionales a la *performance* mientras que el tiempo de desarrollo se interpretó como estimador inversamente proporcional al mismo. De esta manera, se calculó el valor del IP para cada réplica con los valores medios del TA y TD a través de la siguiente fórmula:

$$IP=[VL*(TA/TD)]/IPmax$$

El IPmax corresponde al valor máximo de réplica conseguido en cada especie con el fin de realizar comparaciones relativas entre cactus y cepas (como indicadores de *fitness* relativos). Los valores de TD y TA fueron estandarizados antes de ser incluidos en la fórmula con el fin de ajustarlos a la misma escala. De esta manera, a cada valor de la variable se le resto su correspondiente media y luego se la dividió por su desvío estándar.

Análisis estadísticos

El análisis del Índice de Performance fue llevado a cabo mediante un ANOVA de dos factores. Para evaluar los costos asociados al régimen selectivo se tomaron como variables explicatorias Cepa y Cactus. Se utilizaron los paquetes *gls* (Lindstrom & Bates, 1990) y *multcomp* para las comparaciones *a posteriori*.

Resultados

Drosophila buzzatii

Costos asociados a los regímenes de selección

A modo descriptivo, se detallan los valores medios y desvíos estándar de la viabilidad, el tiempo de desarrollo y el tamaño alar en la tabla 3.1 y figura 3.2. Además, los valores medios y desvíos estándar del índice de performance se detallan en la tabla 3.2. A partir del ANOVA se observó un efecto significativo de los factores Cepa y Cactus, así como de la interacción entre los mismos, por lo que las variaciones entre

niveles no serían independientes entre factores (Tabla 3.3). Los análisis *a posteriori* revelaron que los valores del IP de la cepa C resultaron ser mayores que los de las cepas M y A ($p<0.05$ en ambos casos). Además, se observaron diferencias en la performance entre los diferentes hospedadores. Los mayores valores de performance se observaron en Tt SJ y Op sul siendo además llamativa la marcada diferencia entre Tt SJ y Tt Ju (Fig. 3.3, Tabla 3.4).

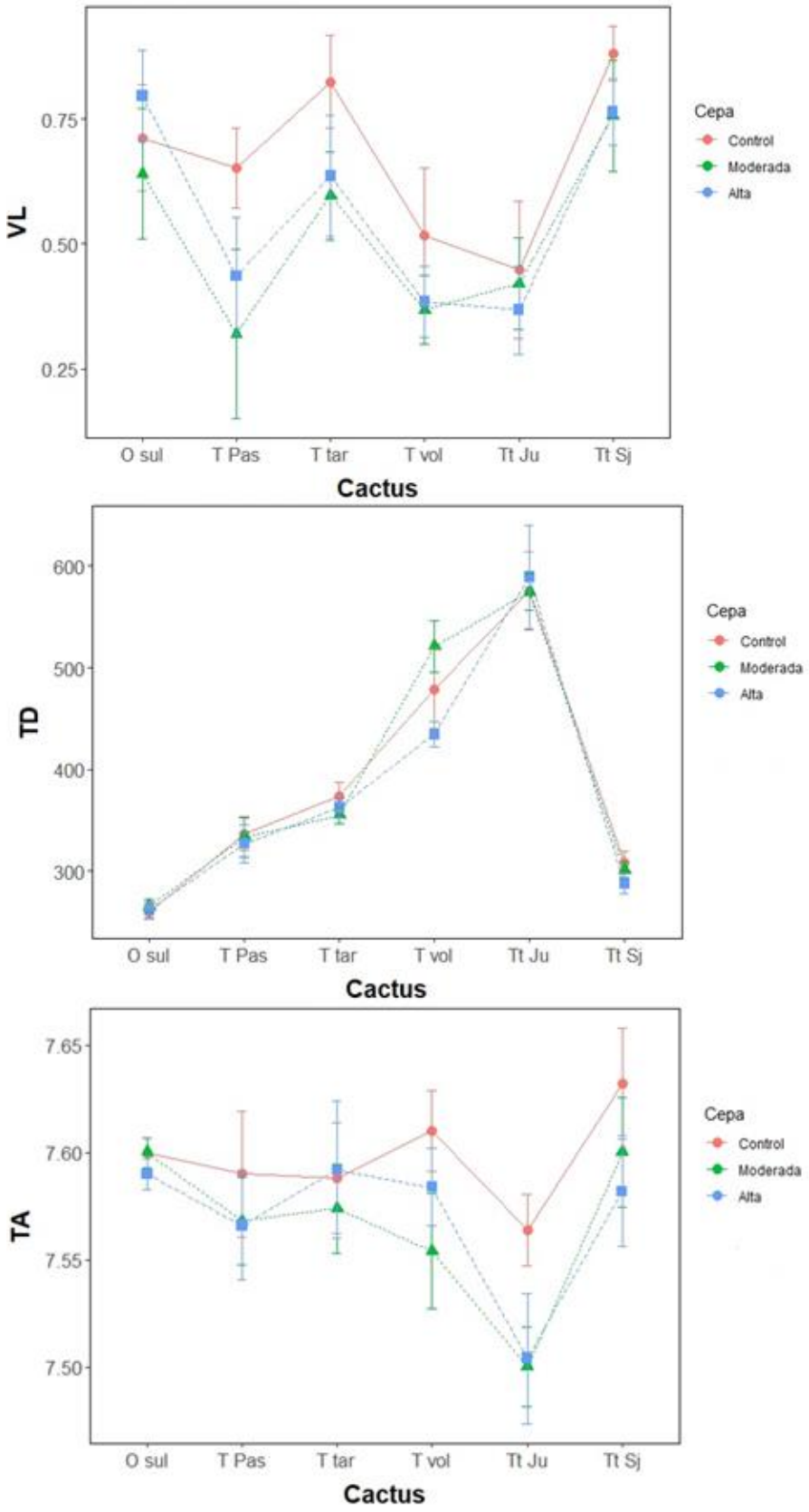


Figura 3.2: Valores medios y desvío estándar para la viabilidad larval (VL), el tiempo de desarrollo (TD) y el tamaño alar (TA) de las cepas de selección de *D. buzzatii* en los diferentes recursos de cría.

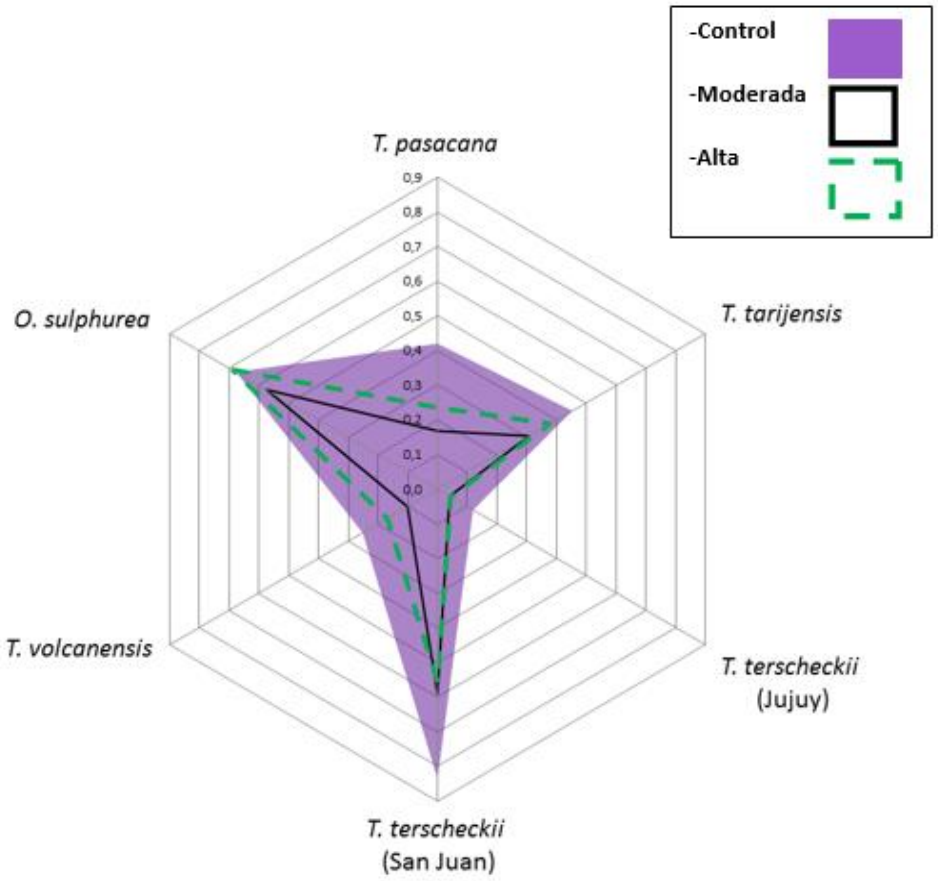


Figura 3.3: Índice de *performance* de las cepas de selección de *D. buzzatii* en los recursos nativos y alternativos.

Tabla 3.1: Valores medios y desvío estándar (entre paréntesis) para los caracteres estudiados: Viabilidad larval (proporción), Tiempo de desarrollo (horas) y Tamaño alar (log. del tamaño del centroide), de las cepas de selección de *D. buzzatii* en los diferentes recursos.

Cactus	**Cepa**	**Carácter**					
		Viabilidad	**N**	**Tiempo de desarrollo**	**N**	**Tamaño alar**	**N**
O. sulphurea	Control	0,713 (0,1)	5	259,46 (35,12)	178	7,60 (0,007)	13
	Moderada	0,64 (0,13)	5	265,48 (38,28)	160	7,60 (0,006)	11
	Alta	0,793 (0,09)	5	265,48 (34,57)	198	7,59 (0,008)	14
T. pasacana	Control	0,652 (0,08)	5	336,77 (35,98)	163	7,59 (0,03)	11
	Moderada	0,32 (0,16)	5	340,85 (34,21)	80	7,57 (0,02)	12
	Alta	0,436 (0,11)	5	329,73 (36,84)	109	7,57 (0,02)	11
T. tarijensis	Control	0,824 (0,09)	5	372,8 (38,14)	206	7,59 (0,02)	15
	Moderada	0,596 (0,08)	5	354,77 (36,84)	149	7,57 (0,02)	12
	Alta	0,636 (0,12)	5	361,07 (51,79)	159	7,59 (0,03)	9
T. volcanensis	Control	0,516 (0,13)	5	485,46 (60,55)	129	7,61 (0,02)	12
	Moderada	0,368 (0,06)	5	518,69 (67,16)	92	7,56 (0,03)	14
	Alta	0,384 (0,07)	5	435,75 (54,52)	96	7,58 (0,02)	12
T. terscheckii **Jujuy**	Control	0,448 (0,13)	5	581,11 (71,52)	108	7,56 (0,02)	14
	Moderada	0,42 (0,06)	5	576,3 (66,76)	103	7,50 (0,02)	12
	Alta	0,368 (0,08)	5	586,59 (74,9)	88	7,50 (0,03)	12
T. terscheckii **San Juan**	Control	0,88 (0,05)	5	307,78 (34,91)	220	7,63 (0,02)	15
	Moderada	0,756 (0,11)	5	301,84 (40,23)	189	7,60 (0,03)	10
	Alta	0,764 (0,6)	5	287,45 (35,23)	191	7,58 (0,02)	13

Tabla 3.2: Valores medios y desvío estándar (entre paréntesis) para el índice de *performance* de las cepas de selección de *D. buzzatii* y *D. koepferae* en los diferentes recursos.

Cactus	**Cepa**	**Índice de *performance***	
		D. buzzatii	***D. koepferae***
O. sulphurea	Control	0,68 (0,11)	0,5 (0,12)
	Moderada	0,58 (0,09)	0,31 (0,11)
	Alta	0,69 (0,11)	0,56 (0,15)
T. pasacana	Control	0,42 (0,10)	0,44 (0,13)
	Moderada	0,17 (0,10)	0,36 (0,16)
	Alta	0,24 (0,07)	0,37 (0,24)
T. tarijensis	Control	0,46 (0,09)	0,19 (0,03)
	Moderada	0,31 (0,07)	0,21 (0,05)
	Alta	0,38 (0,13)	0,22 (0,09)
T. volcanensis	Control	0,25 (0,08)	0,19 (0,08)
	Moderada	0,1 (0,02)	0,24 (0,06)
	Alta	0,17 (0,03)	0,19 (0,08)
***T. terscheckii* Jujuy**	Control	0,12 (0,02)	0,09 (0,04)
	Moderada	0,04 (0,02)	0,12 (0,03)
	Alta	0,05 (0,04)	0,19 (0,03)
***T. terscheckii* San Juan**	Control	0,84 (0,12)	0,66 (0,23)
	Moderada	0,59 (0,09)	0,53 (0,19)
	Alta	0,56 (0,10)	0,47 (0,24)

Tabla 3.3: Resultados de ANOVAs de dos factores del IP con Cactus y Cepa como variables explicatorias en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Especie	Fuente de variación	gl	F
D. buzzatii	Cactus	5	126.66***
	Cepa	2	29.29***
	Cactus x Cepa	10	2.18*
D. koepferae	Cactus	5	22.99***
	Cepa	2	0.3
	Cactus x Cepa	10	0.16

Tabla 3.4: p valores de los contrastes de performance entre distintos hospedadores. Los contrastes de *D. koepferae* se encuentran arriba de la diagonal mientras que los de *D. buzzatii* debajo de la misma.

Cactus	Pas	Tar	Tt Ju	Tt Sj	Vol	Op sul
Pas	----------	0,005390	0,000146	0,016927	0,005179	0,722371
Tar	0,012241	----------	0,651599	0,000127	1,000000	0,000158
Tt Ju	0,000127	0,000127	----------	0,000127	0,659791	0,000127
Tt Sj	0,000127	0,000127	0,000127	----------	0,000127	0,400091
Vol	0,018689	0,000127	0,012284	0,000127	----------	0,000156
Op sul	0,000127	0,000127	0,000127	0,997437	0,000127	----------

Drosophila koepferae

Costos asociados a los regímenes de selección

En la tabla 3.5 y la figura 3.4 se describen los valores medios y desvíos estándar de la viabilidad, el tiempo de desarrollo y el tamaño alar. Además, los valores medios y desvíos estándar del índice de performance son detallados en la tabla 3.2. A partir del análisis de ANOVA se observó un efecto significativo del factor Cactus mientras que el factor Cepa y la interacción entre ambos factores no fueron significativos (Tabla 3.3, Fig. 3.5). En los análisis *a posteriori* del factor cactus se observaron, en líneas generales, mejores performances en los hospedadores Tt SJ, Op sul e incluso T pas. Además, al igual que en *D. buzzatii*, hay una llamativa diferencia entre Tt SJ y Tt Ju (Tabla 3.4).

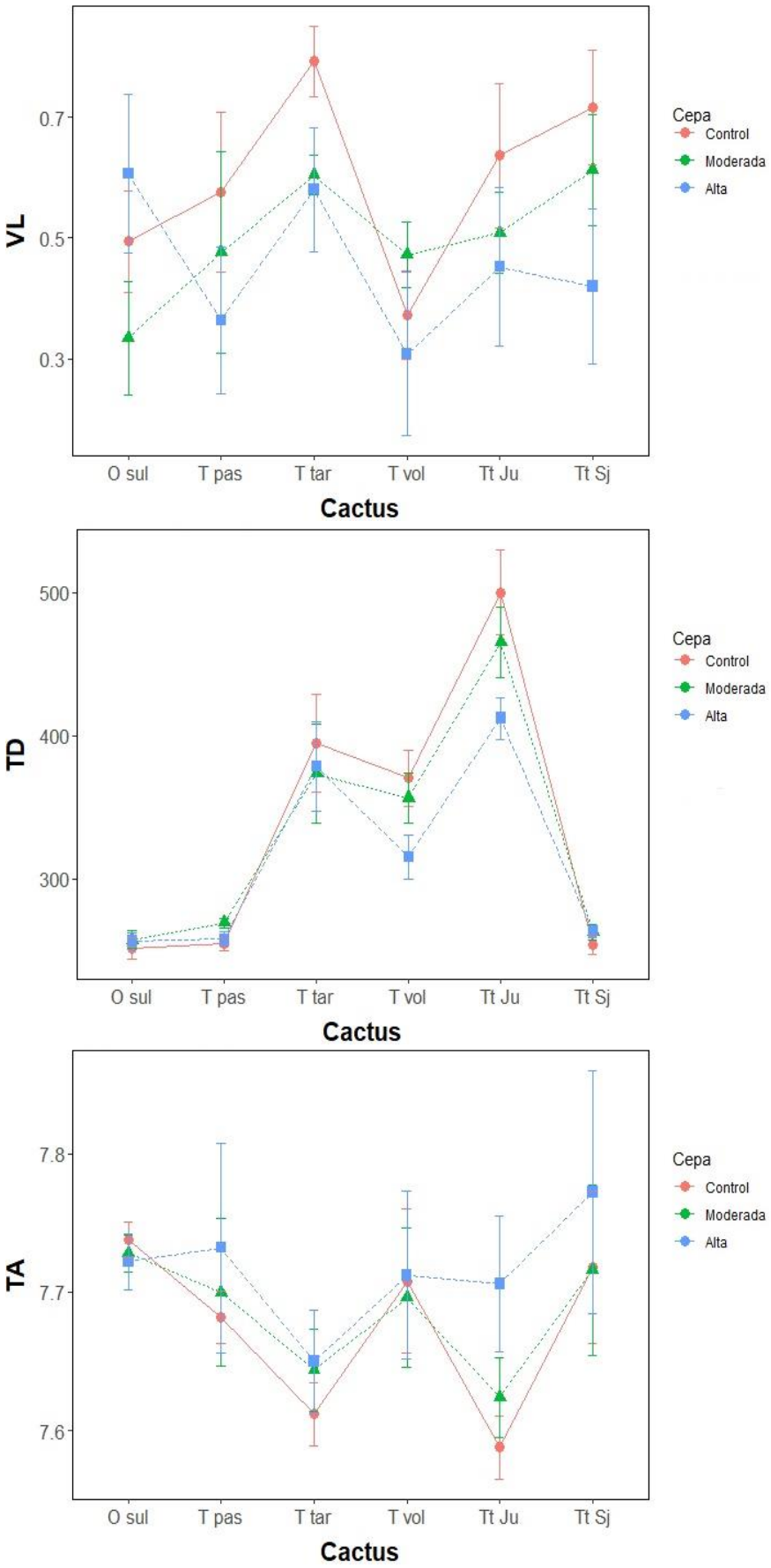


Figura 3.4: Valores medios y desvío estándar para la viabilidad larval (VL), el tiempo de desarrollo (TD) y el tamaño alar (TA) de las cepas de selección de *D. koepferae* en los diferentes recursos de cría.

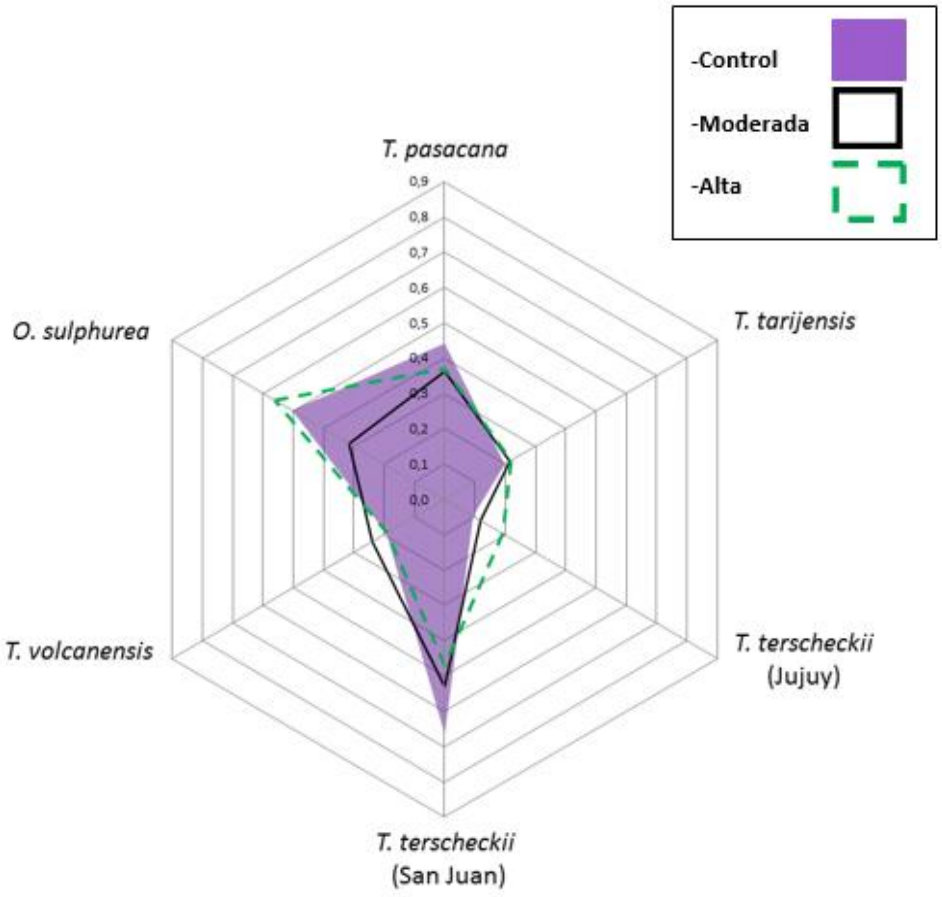


Figura 3.5: Índice de *performance* de las cepas de selección de *D. koepferae* en los recursos nativos y alternativos.

Tabla 3.4: Valores medios y desvío estándar (entre paréntesis) para los caracteres estudiados: Viabilidad larval (proporción), Tiempo de desarrollo (horas) y Tamaño alar (log. tamaño del centroide), de las cepas de selección de *D. koepferae* en los diferentes recursos.

Cactus	**Cepa**	**Carácter**					
		Viabilidad	**N**	**Tiempo de desarrollo**	**N**	**Tamaño alar**	**N**
O. sulphurea	Control	0,493 (0,08)	5	251,82 (20,69)	123	7,74 (0,02)	10
	Moderada	0,333 (0,09)	5	257,53 (18,36)	83	7,73 (0,01)	8
	Alta	0,606 (0,13)	5	256,44 (16,55)	151	7,72 (0,02)	10
T. pasacana	Control	0,576 (0,13)	5	254,55 (13,96)	144	7,68 (0,02)	12
	Moderada	0,476 (0,16)	5	270,16 (21,4)	120	7,70 (0,05)	13
	Alta	0,364 (0,12)	5	257,49 (15,97)	91	7,73 (0,08)	10
T. tarijensis	Control	0,792 (0,05)	5	395,29 (50,22)	199	7,61 (0,02)	12
	Moderada	0,604 (0,03)	5	372,98 (46,65)	151	7,64 (0,03)	7
	Alta	0,58 (0,1)	5	376,44 (47,79)	145	7,65 (0,04)	8
T. volcanensis	Control	0,372 (0,07)	5	372,77 (34,52)	93	7,71 (0,05)	10
	Moderada	0,472 (0,05)	5	357,14 (40,55)	119	7,70 (0,05)	13
	Alta	0,308 (0,13)	5	319,89 (26,54)	77	7,71 (0,06)	12
T. terscheckii **Jujuy**	Control	0,636 (0,11)	5	498,94 (47,35)	152	7,59 (0,02)	12
	Moderada	0,508 (0,06)	5	466,48 (57,93)	127	7,62 (0,03)	12
	Alta	0,452 (0,13)	5	413,87 (47,91)	115	7,71 (0,05)	12
T. terscheckii **San Juan**	Control	0,716 (0,09)	5	253,87 (19,14)	179	7,59 (0,06)	12
	Moderada	0,612 (0,09)	5	262,64 (16,13)	153	7,72 (0,06)	7
	Alta	0,42 (0,12)	5	262,52 (15,22)	103	7,77 (0,09)	11

Discusión

La dieta de la mayoría de los insectos herbívoros se encuentra restringida a una sola familia de plantas o a unas pocas especies relacionadas. De hecho, trabajos previos reportan que solo el 8% de los eventos de especiación en insectos fitófagos incluyen saltos de hospedador a una nueva familia de plantas (Futuyma & Agrawal, 2009). Exceptuando el caso de *O. sulphurea*, las especies de cactus elegidas para simular saltos de hospedador en las cepas de selección de ambas especies de *Drosophila* estudiadas,

pertenecen al género *Trichocereus*, por lo que guardan cierta similitud con la composición química de los regímenes selectivos de las cepas, siendo estos, alcaloides de la familia de las feniletilaminas (Trout, 2014). Como ya fue detallado, las respuestas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* a los distintos regímenes selectivos fueron especie-específicas. En *D. buzzatii*, los indicadores de *fitness* mostraron una respuesta favorable en el régimen Moderado de selección (Padró et al., 2018). Sin embargo, los valores del IP de la cepa M al igual que la A en los diferentes recursos fueron menores a los de la cepa C. Es decir, el proceso de adaptación al medio de cría Moderado redujo la capacidad de la cepa para explotar otros recursos. De esta manera, si bien la selección artificial en el régimen selectivo Moderado en *D. buzzatii* optimizó la variabilidad genética disponible para la cría en ese medio, parecería haber generado un costo ante el cambio ambiental. Esto podría deberse a que el proceso de adaptación a un medio de cría no tan frecuentado por *D. buzzatii* pudo traer aparejado compromisos o correlaciones genéticas negativas en la performance en otros hospedadores. Por lo tanto, aunque todos los hospedadores (excepto *O. sulphurea*) guarden similitudes en sus características químicas, la adaptación al régimen selectivo Moderado parece ser bastante específica. Esta aparente tendencia, se condice con la predicción del adagio "*Jack of all trades-Master of none*" (McArthur, 1972). Estos resultados recuerdan, además, a lo observado en experimentos de selección realizados en el ácaro de dos puntos *Tetranychus urticae*. En el mismo, el *fitness* de la cepa seleccionada a la cría en plantas de pepino fue disminuido al ser criada en plantas de zuchini, las cuales además de su parentesco, guardan similitud en la identidad de sus defensas químicas (Agrawal, 2000). Adicionalmente, la cepa M de *D. buzzatii* mostró una tendencia a menores valores tanto en VL como en TA con respecto a la cepa C, mientras que los valores de TD fueron similares. En ese sentido, los costos en el *fitness* y el aumento en la especialización parecen verse reflejados tanto en los componentes tempranos (larvarios) como tardíos (del adulto) del *fitness* que constituyen el índice de *performance*.

El caso de *D. koepferae* es distinto, ya que los valores del IP de las cepas de selección M y A no mostraron diferencias en comparación con la cepa C. Además, en esta especie, los estimadores del *fitness* mostraron una mejora en el régimen A de selección con respecto a los demás regímenes (Padró et al., 2018). Por lo tanto, el proceso adaptativo de la cepa A a su medio de cría no habría generado cambios en la capacidad para la cría en otros recursos por lo que no se observaron costos en el *fitness*.

Esta diferencia con respecto a la respuesta de la cepa adaptada de *D. buzzatii* podría tener que ver con las diferencias en hábito ecológico de las especies. En ese sentido, el régimen selectivo suponía una adaptación a mayores concentraciones de defensas químicas a las que *D. koepferae* ya se encuentra adaptada, no dando lugar a compromisos genéticos detectables ante el cambio ambiental. Sin embargo, en la respuesta de los indicadores de *fitness* que componen el IP, se observan patrones diferentes al de este último. En ese sentido, los valores de VL de la cepa A tienden a ser menores que los de la cepa C, observándose por lo tanto un costo a nivel de este carácter como producto de la adaptación. Por otro lado, en relación al TD, los valores en algunos recursos fueron menores en la cepa A mientras que en otros fueron similares a la cepa C. Asimismo, en cuanto al TA, la cepa A mostró una tendencia a mayores valores que la cepa C en algunos recursos mientras que en otros los valores fueron similares. De esta manera, no solo no parecerían existir costos en la cepa A en relación con estos dos últimos caracteres, sino que su desempeño parecería ser aún mayor que en la cepa C. De esta manera, el proceso de adaptación a las altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* parecería haber generado las condiciones para un mejor desempeño en estos caracteres en comparación con la cepa C. Estos resultados recuerdan lo predicho por la teoría de zona adaptativa de (Ehrlich & Raven, 1964), donde la adaptación a un hospedador en particular permite un buen desempeño en hospedadores similares, como lo son las especies del género *Trichocereus* utilizadas. Esta llamativa diferencia en la respuesta entre VL para con TD y TA abre interrogantes sobre si la presión de selección actuó de manera diferenciada sobre el componente genético de estos caracteres o si se trata de algún posible compromiso entre los mismos. A pesar de esto, la diferencia en las respuestas entre VL para con TD y TA terminan promediándose en el IP que muestra valores similares a los de la cepa C. Esta similitud en los valores de performance de la Cepa A para con la cepa C no se condice con lo esperado por el principio "*Jack of all trades-Master of none*" (McArthur, 1972) y al observado en su especie hermana *D. buzzatii*.

Por otro lado, la diferencia de performance entre hospedadores fue también notoria observándose mayores valores en los hospedadores Tt SJ y Op sul en ambas especies de *Drosophila*. Este patrón es en parte esperable debido al ya conocido uso de estas cactáceas por parte de ambas especies de *Drosophila*, aunque en diferente frecuencia (Soto et al., 2012). Sin embargo, llamativamente, la mayor disminución en el

desempeño de las cepas en comparación con el *T. terscheckii* colectado en San Juan se observó en la cría de la misma especie colectada en la provincia de Jujuy. Esta diferencia en el desempeño de las cepas de selección entre poblaciones de la misma especie de cardón podría estar relacionada a variaciones en la composición de metabolitos secundarios, pudiendo encontrarse en mayor concentración en la población colectada en Jujuy. Por otro lado, variaciones de la calidad nutricional del tejido entre ambas poblaciones de *T. terscheckii* podría ser otra causante de las diferencias observadas en el desempeño. Sin embargo, para entender detalladamente estas diferencias de *performance* sería necesario realizar un análisis de la composición química del clorénquima de ambas poblaciones de *T. terscheckii*. Adicionalmente, es interesante tener en cuenta la historia evolutiva y el cambio en las distribuciones de las poblaciones de *T. terscheckii* a través del tiempo. El clima desde el ultimo máximo glacial (hace aproximadamente 12.000 años) en la zona de distribución actual de este cardón fue cambiando de un ambiente frío y seco a uno de mayor temperatura y humedad. Este cambio paulatino en estas variables llevó a un retroceso y fragmentación de la distribución de las poblaciones de cardón que derivó en la configuración que observamos en la actualidad (Quipildor et al., 2018). En este sentido, mediante estudios genéticos de secuencias de ADN nuclear y cloroplástico, junto con análisis multivariados de clúster de isozimas, se han caracterizado dos unidades evolutivas bien diferenciadas a nivel latitudinal, aproximadamente al norte y al sur del eje 27ºS. Esto parece estar fuertemente controlado por factores orogénicos (Sierra del Aconquija) que terminan impidiendo el flujo génico entre las poblaciones de *T. terscheckii* que se distribuyen al norte y al sur de este eje. De hecho, se observó una marcada diferencia en la variabilidad genética de estas unidades, siendo las poblaciones del sur considerablemente más variables que las del norte, donde procesos como la deriva génica y el efecto fundador cobraron relevancia en la erosión y la reducción de la variabilidad genética (Quipildor et al., 2018). Por lo tanto, las diferencias genéticas detectadas entre estos clústers de poblaciones de *T. terscheckii* podrían verse reflejadas en diferencias a nivel fenotípico, en su composición nutricional y/o de metabolitos secundarios, lo cual terminaría influyendo en los valores de IP observados para las cepas de selección de ambas especies de *Drosophila* estudiadas.

Por otro lado, se observó una respuesta diferente en la performance entre especies en T pas. Mientras en *D. buzzatii* se observó una performance baja, en *D.*

koepferae fue bastante alta. Esta diferencia entre especies podría radicar en la diferencia de hábito ecológico siendo más habitual para *D. buzzatii* el uso de tunas mientras que para *D. koepferae* el uso de cardones. El buen desempeño de *D. koepferae* en T pas se explica principalmente por un tamaño alar considerable en un tiempo de desarrollo relativamente corto. La mayor relación filogenética entre *T. terscheckii* y T pas en comparación con T vol y T tar (Schlumpberger & Renner, 2012) podría explicar el patrón observado. Estos resultados, abren debate y aportan evidencia muy interesante sobre la amplitud del nicho ecológico en ambas especies de *Drosophila*. Estudios a campo en poblaciones de las especies de cactáceas que sirvieron de recurso en este capítulo podrían ser de utilidad para la comprensión de su rol como hospedadores en ambas especies de *Drosophila*.

Capítulo IV: Efecto de la selección y recursos alternativos en la morfología alar y estabilidad del desarrollo

Resumen

Los cambios a nivel de caracteres morfológicos constituyen una de las temáticas centrales en la biología evolutiva. El ala de *Drosophila* ha sido uno de los modelos más utilizados en el abordaje de los mecanismos del cambio morfológico debido, en parte, a su implicancia en procesos como el vuelo, la dispersión y la reproducción. Además, constituye un órgano ideal para estudios de asimetría fluctuante, la cual estima las desviaciones que ocurren al azar entre lados en rasgos bilateralmente simétricos por lo que se usa como estimador de la estabilidad del desarrollo. La asimetría fluctuante, además, se propone como indicador del *fitness* siendo inversamente proporcional al mismo. A partir de la cría en diferentes hospedadores presentes en el rango de distribución de ambas especies de *Drosophila*, nos propusimos evaluar tanto el efecto de los regímenes selectivos como de los diferentes recursos de cría sobre la conformación alar y la asimetría fluctuante. Asimismo, evaluamos la posible correlación de los niveles de asimetría fluctuante con la *performance*. En cuanto a la conformación alar, se observó un efecto significativo del régimen selectivo, de los hospedadores y de la interacción entre estos factores. En ambas especies de *Drosophila* estudiadas, los tratamientos correspondientes a los diferentes regímenes selectivos no se solaparon en el morfoespacio explorando distintas regiones del mismo. En cuanto a la asimetría fluctuante, en general no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, pero *D. buzzatii* mostró una tendencia a menores valores en la cepa M en comparación con las cepas C y A. A partir de estos resultados se puede especular que el proceso selectivo derivó en organismos con mayor estabilidad de desarrollo ante las perturbaciones ambientales impuestas por diferentes hospedadores los cuales presentarían similitudes con el agente utilizado en el proceso de selección. En *D. koepferae*, por otro lado, no se observaron tendencias claras en relación con los regímenes selectivos. En cuanto al efecto de los hospedadores, se observó una tendencia a una baja asimetría fluctuante en *T. terscheckii* de San Juan en comparación con los otros recursos en las tres cepas de selección de ambas especies de *Drosophila*. Esto podría estar relacionado con las características nutricionales y/o toxicológicas de este recurso. Finalmente, las

correlaciones entre la asimetría fluctuante y el índice de *performance* fueron de signo negativo en ambas especies de *Drosophila,* aunque no fueron significativas en el caso de *D. buzzatii*. Sin embargo, la correlación no fue tan marcada abriendo interrogantes sobre el uso de la asimetría fluctuante como indicador certero de *fitness*.

Introducción

El estudio de los mecanismos que operan en la evolución de caracteres morfológicos constituye una de las temáticas centrales de la biología evolutiva. Tanto la clasificación taxonómica de organismos como la comprensión de la biodiversidad estuvieron basadas históricamente en descripciones morfológicas. A mediados del siglo veinte se combinaron las descripciones morfológicas cuantitativas de organismos con análisis estadísticos que describían patrones de variación morfológica dando de esta manera origen a la morfometría (Adams et al., 2004). Esta, se define como el estudio de la variación morfológica y su covariación con otras variables (Dryden & Mardia, 1998). Hace alrededor de treinta años, se produjo un cambio en el modo de cuantificación y análisis de las estructuras morfológicas surgiendo métodos que capturan y analizan su geometría en el marco de la denominada morfometría geométrica (Adams et al., 2004; Rohlf & Marcus, 1993). Una de las propiedades más potentes de la morfometría geométrica es la distinción entre el tamaño y la conformación de las estructuras biológicas. La conformación se define como las propiedades geométricas que son independientes a la traslación, la rotación y el escalado de la estructura. De esta manera, dos objetos tienen la misma conformación si al ser trasladados, rotados y re escalados uno con el otro, coinciden con exactitud (Mitteroecker et al., 2013). La forma, por otro lado, se refiere a las propiedades geométricas independientes únicamente de la traslación y la rotación por lo que abarca tanto la conformación como el tamaño, es decir, es la morfología en el sentido más intuitivo. Finalmente, el tamaño o escala, es el espacio que ocupa una estructura. Debido a que no hay una única forma de cuantificarlo, es a nivel matemático, un concepto ambiguo. Una de las formas de estimación más comunes del tamaño en morfometría geométrica es la del tamaño del centroide utilizada en el capítulo III (Mitteroecker et al., 2013).

El ala de *Drosophila* ha sido uno de los modelos más utilizados para el abordaje del estudio de los mecanismos del cambio del tamaño y la forma en la naturaleza (Trotta

et al., 2006, Wolf et al., 2000). El tamaño del ala de *Drosophila* ha mostrado ser un predictor del tamaño corporal el cual, constituye un carácter interesante dada su conocida relación positiva con diversos componentes del *fitness* del adulto como el tiempo de desarrollo, la fecundidad, el éxito reproductivo y la longevidad, entre otros (Leibowitz et al., 1995; Patridge & Fowler, 1993; Santos et al., 1992; Wolf et al., 2000). En el mismo sentido, se discute que la conformación del ala también podría encontrarse relacionada con caracteres relevantes del desempeño en especies del género como la reproducción y la capacidad de vuelo (Carreira et al., 2011). Trabajos previos en *Drosophila* han sugerido que la existencia de clinas paralelas para distintos caracteres morfológicos en diferentes continentes se debe a la acción de la selección natural. En ese sentido, si bien se ha observado un aumento del largo del ala conforme aumenta la latitud, los patrones observados serían el resultado de la selección actuando sobre distintas regiones del ala, según la clina estudiada (Huey et al., 2000). A nivel experimental, se ha observado un efecto indirecto de la selección artificial, tanto sobre el tamaño como la conformación del ala de *D. buzzatii* y *D. koepferae* (Padró et al., 2019). Por otro lado, como ya se ha descripto, el medio de cría ha mostrado tener un efecto en múltiples rasgos de especies de *Drosophila* cactófilas. En cuanto a la morfología del ala, se ha observado que la cría de especies del clúster *D. buzzatii* en licuados de diferentes cactus (hospedadores primarios y secundarios), afecta el tamaño y la conformación del ala (Carreira et al., 2006; Soto et al., 2008a; 2008b). El estudio de estos patrones de plasticidad fenotípica en caracteres relacionados al *fitness* favorece la comprensión de la relevancia de las características de los hospedadores en la historia evolutiva de estas especies de *Drosophila*. En ese sentido, se observa que la cría en ciertos hospedadores como *T. terscheckii* disminuye el tamaño alar, fenómeno que también fue observado en medios de cría conteniendo únicamente la fracción alcaloidea de este hospedador (Carreira et al., 2006; Corio et al., 2013; Padró et al., 2014 Soto et al., 2008b).

El ala, como estructura par y simétrica, también ha sido utilizada como modelo para estudiar la estabilidad del desarrollo. La estabilidad del desarrollo se define como la capacidad de un organismo para producir un fenotipo predeterminado por un diseño corporal adaptativo bajo un conjunto de condiciones genéticas y ambientales específicas (Waddington, 1942). La estimación de esta capacidad del organismo para enfrentar ciertas perturbaciones ambientales a través de su ontogenia es de gran utilidad para

evaluar tanto la magnitud del estrés de un agente ambiental como así también la capacidad de los mecanismos regulatorios de su genotipo para estabilizar el desarrollo frente a las perturbaciones externas y corregirlo (Palmer & Strobeck, 1986, 1992; Van Valen, 1962). De esta manera, la inestabilidad en la ontogenia de organismos bilaterales como consecuencia de perturbaciones ambientales aleatorias impide el desarrollo perfectamente simétrico de los rasgos, generando así asimetrías entre ambos lados del individuo (Klingenberg et al., 2003). Estas asimetrías pueden presentarse de diversas formas. Una de ellas es la antisimetría, en la cual los individuos en una población son asimétricos, pero es impredecible que lado del carácter bilateral mostrara mayor desarrollo. Por lo tanto, una mitad de los individuos de la población presentara mayor desarrollo del carácter en un lado y la otra mitad en el otro, lo que conduce a una distribución bimodal (Fig. 4.1). Un ejemplo clásico de este tipo de asimetría es la diferencia de tamaño entre las pinzas de los machos del cangrejo violinista (Graham et al., 1994). Por otro lado, en el caso de la asimetría direccional, uno de los lados de un rasgo bilateral se encuentra siempre más desarrollado o es distinto que el otro. En este caso, este lado es siempre el mismo encontrándose por lo tanto una sola media desplazada hacia un lado (Fig.4.1). Un ejemplo de este tipo de asimetría, es el corazón de los mamíferos, el cual presenta un mayor desarrollo en lado izquierdo (Graham et al., 1994; Van Valen 1962). Otro tipo de asimetría es la asimetría fluctuante (AF), una de las herramientas más utilizadas para estimar la estabilidad del desarrollo. Esta estima las pequeñas desviaciones que ocurren al azar entre el lado izquierdo y derecho de rasgos bilateralmente simétricos (Van Valen, 1962). En este caso, estas desviaciones presentan una distribución normal con una media en cero (Fig.4.1) (Graham et al., 1994). La AF, además, se propone como un indicador del *fitness* cuando puede establecerse una relación inversamente proporcional al mismo (Palmer et al., 1994).

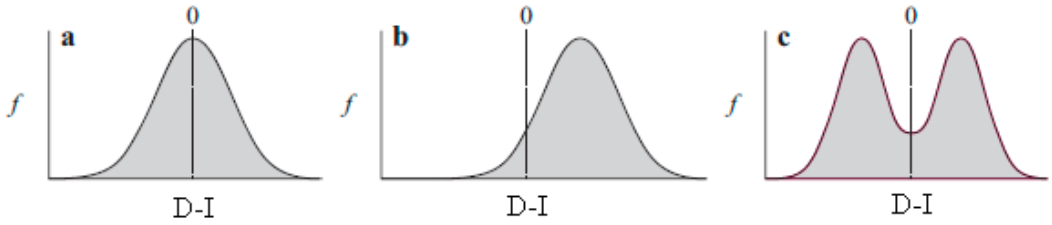


Figura 4.1: Distribuciones de frecuencia de la diferencia entre los valores del lado derecho e izquierdo de organismos bilaterales: a) AF; b) Asimetría direccional; c) Antisimetría (Ottaviano & Scapini 2010).

El ala de *Drosophila* constituye un órgano ideal que ha sido extensamente utilizado en estudios de AF (Debat et al., 2003). Las intersecciones entre sus venas funcionan como referencias anatómicas homologables de gran utilidad en la estimación de variables morfológicas. A partir de estudios de AF en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, se ha observado que el estrés ambiental generado por la cría en sus hospedadores secundarios resulta en efectos deletéreos a nivel de la estabilidad del desarrollo (Soto et al., 2008b). Específicamente, el componente alcaloidífero de *T. terscheckii*, no solo disminuye la viabilidad y el tamaño alar en *D. buzzatii*, sino que también afecta el desarrollo de los patrones de venación y melanización alar, así como la estabilidad del desarrollo (Mongiardino-Koch et al., 2012; Padró et al., 2014). Además del factor ambiental, la estabilidad del desarrollo también se encuentra afectada por perturbaciones a nivel genético como un evento de hibridación o la exposición a agentes mutagénicos (Carreira et al., 2008; Groth et al., 2018). El efecto de la selección natural también ha mostrado influir sobre la estabilidad de desarrollo observándose una disminución de la canalización en caracteres sujetos a selección direccional en poblaciones de *D. melanogaster* (Groth et al., 2018; Lack et al., 2016). Esto se debería a fallas en los mecanismos de "buffering" en el desarrollo, producto del cambio de la dirección de la selección a un nuevo óptimo adaptativo (Hill & Mulder, 2010; Maynard Smith et al., 1985). En ese sentido, se entiende por canalización a la capacidad del organismo de mantener un fenotipo constante ante perturbaciones ambientales y genéticas (Waddington 1942).

Teniendo en cuenta los antecedentes sobre los efectos diferenciales de los distintos hospedadores sobre la morfología alar y la AF en *D. buzzatii* y *D. koepferae*,

consideramos que las cepas de estas especies adaptadas a altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* constituyen un modelo ideal para evaluar los efectos del proceso selectivo y la respuesta de esta adaptación a nuevos hospedadores sobre los patrones de asimetría. De esta manera podemos evaluar si el proceso selectivo afectó la estabilidad de desarrollo a través de la AF del tamaño alar y la conformación del ala. Por otro lado, a partir de la cría en hospedadores alternativos, podemos evaluar la existencia de plasticidad fenotípica de las cepas de selección para ambos caracteres.

Objetivos

-Caracterizar el efecto de la selección artificial en la conformación alar de las cepas de ambas especies de *Drosophila*.

-Evaluar si las cepas de ambas especies de *Drosophila* presentan plasticidad fenotípica en la conformación alar respecto a la cría en los diferentes hospedadores.

-Caracterizar el efecto de la selección artificial en la AF de las cepas de ambas especies de *Drosophila*.

-Evaluar el efecto de la cría en los diferentes hospedadores sobre la AF de las cepas de ambas especies de *Drosophila*.

-Evaluar si los niveles de AF correlacionan con los valores de *Performance* en las cepas de selección de ambas especies de *Drosophila*.

Hipótesis

-El proceso selectivo afectó la conformación alar en ambas especies de *Drosophila*.

-La conformación alar presenta plasticidad fenotípica en ambas especies de *Drosophila*.

-El proceso selectivo afectó la AF en ambas especies de *Drosophila*.

-La cría en diferentes hospedadores tuvieron efecto sobre la AF en ambas especies de *Drosophila*.

- Los niveles de AF correlacionan negativamente con los del índice de performance.

Materiales y métodos

Cuantificación de la morfología alar

Especímenes adultos de cada cepa de selección de *D. buzzatii* y *D. koepferae* criados en los hospedadores Tt SJ, Tt Ju, T pas, T tar y T vol descriptos en el Capítulo III fueron preservados en alcohol 70%. Se extrajeron las alas derechas de machos, las cuales fueron montadas en portaobjetos y fijadas con DPX (Sigma-Aldrich) para ser fotografiadas luego, con una cámara digital montada en una lupa.

Posteriormente, mediante la técnica de morfometría geométrica de referencias anatómicas fijas, se digitalizaron en cada una de las alas 10 landmarks previamente definidos por Debat et al., (2003), los cuales se ubican en puntos de unión entre venas o entre estas y el borde del ala (Figura 4.2). De esta manera, se busca abarcar la mayor parte del órgano minimizando la cantidad de puntos utilizados.

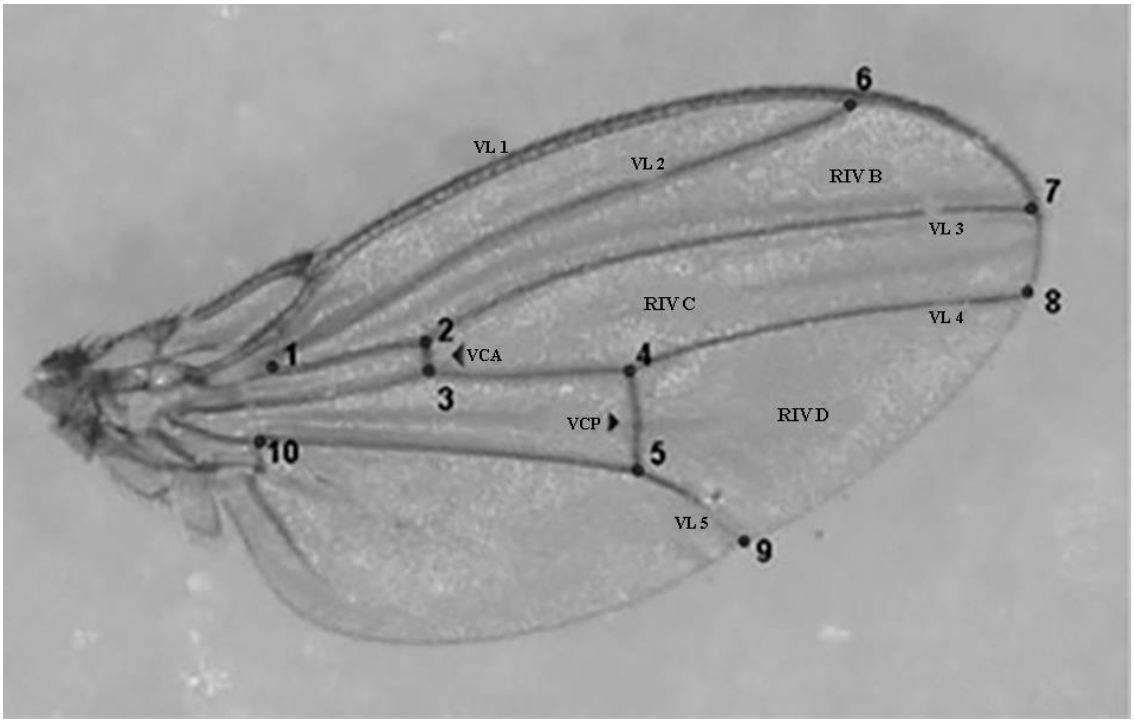


Figura 4.2: Posición de los *landmarks* en la vista dorsal del ala derecha de *Drosophila*. Venas longitudinales (VL), vena cruzada anterior (VCA), vena cruzada posterior (VCP), regiones intervenosas (RIV) (extraído de Soto et al., 2008a).

Landmarks:

1- Borde interno de la unión de las venas longitudinales (VL) II y III
2- Unión entre la vena cruzada anterior (VCA) y la VL III
3- Unión entre la vena cruzada anterior (VCA) y la VL IV
4- Unión entre la vena cruzada posterior (VCP) y la VL IV
5- Unión entre la vena cruzada posterior (VCP) y la VL V
6- Borde interno de la VL I donde llega la VL II
7- Borde interno del ala donde llega la VL III
8- Borde interno del ala donde llega la VL IV
9- Unión de la VL V y el margen del ala
10- Unión de la VL V y el nacimiento de la vena cruzada (CuA2)

La digitalización de los *landmarks* se realizó mediante el programa tpsDIG 2.22 (Rohlf, 2015). Las configuraciones de *landmarks* fueron luego superpuestas utilizando un análisis de Procrustes Generalizado (*Generalized Procrustes Analysis*, GPA) (Gower, 1975; Rohlf, 1999). Este método, permite eliminar los efectos de traslación, rotación y escala, dejando el cambio de conformación como único condicionante de las diferencias entre coordenadas de *landmarks* homólogos entre los distintos especímenes.

Así la forma del ala de cada individuo se desdobló en dos variables, su tamaño y su conformación. El tamaño de ala del individuo está estimado por el tamaño de centroide que se define como la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias de cada referencia anatómica al centroide de la configuración (Dryden & Mardia, 1998). El otro componente morfológico es la conformación del ala, que incluye la posición relativa de los *landmarks* entre sí, las propiedades geométricas independientes de su posición y que está descripta por una serie de variables de conformación denominadas Deformaciones Relativas (*Relative warps*). Las mismas, se obtienen a través de un análisis de componentes principales de la matriz de varianza/covarianza de las coordenadas y constituyen parámetros específicos que permiten describir las diferencias entre conformaciones de distintos tratamientos. Los *scores* de las variables de conformación para cada ala, así como su tamaño de centroide, se obtuvieron con el programa *TPSrel* (Rohlf, 2015). Estas variables se usaron como las variables morfológicas dependientes en análisis de varianza univariados y multivariados (ANOVAs/MANOVAs) con el fin

de testear diferencias de tamaño y conformación alar con Cactus y Cepa como factores fijos.

Análisis de patrones alométricos entre el tamaño y la conformación del ala

En el caso de existir un desfasaje en el crecimiento entre distintas partes del ala al incrementarse su tamaño, esta parte del cambio conformacional sería explicada por las diferencias de tamaño entre individuos. Por lo tanto, con el fin de determinar si existe un efecto del tamaño alar sobre su conformación (es decir, una relación alométrica), se realizó una regresión multivariada entre el tamaño del centroide y las variables de conformación. Las regresiones multivariadas se realizaron teniendo en cuenta los datos de cada cepa por separado, sin embargo, al no detectarse alometría, finalmente se tomaron los datos juntos sin discriminar por el factor Cepa.

Asimetría fluctuante del tamaño del ala

Para estimar la inestabilidad del desarrollo a partir de la AF del tamaño del centroide, se seleccionaron cinco machos al azar por cada combinación de cactus y cepa. A estos individuos se les extrajeron ambas alas, las cuales fueron montadas, fotografiadas y digitalizadas mediante el procedimiento ya descripto. El posicionamiento de los *landmarks* se realizó dos veces en cada ala con el fin de estimar el error de medición (Palmer, 1994). Luego, las imágenes del ala izquierda fueron convertidas en su imagen especular para permitir la superposición de las configuraciones por el método de Procrustes.

La presencia de AF, así como de asimetría direccional, fueron testeadas a partir del diseño de ANOVA de Palmer considerando la variación inter individual (Individuo) como factor aleatorio, un factor fijo que estima la asimetría direccional (Lado) y los cuadrados medios de la interacción entre los mismos (Individuo x Lado) como estimador de AF (Palmer, 1994). Este análisis se hizo para cada cepa y cactus por separado.

$$y = \mu + \text{Individuo} + \text{Lado} + \text{Individuo x Lado} + \varepsilon$$

Siguiendo a Carreira et al., (2008), y con el fin de contrastar los niveles de AF entre cepas criadas en el mismo recurso, se realizaron pruebas de Fisher utilizando los Cuadrados Medios de la interacción Individuo x Lado y los grados de libertad del ANOVA de Procrustes del tratamiento correspondiente.

Correlación entre la performance y los niveles de asimetría fluctuante

Con el fin de evaluar si los valores de AF del tamaño alar son interpretables en términos de *fitness* (una relación que hipotéticamente es inversamente proporcional), se calculó el índice de correlación de Pearson entre esta variable y el índice de performance descripto en el Capítulo III.

Resultados

Drosophila buzzatii

Tamaño alar

En la tabla 4.1 se detallan los valores medios y desvíos estándar del tamaño alar de cada combinación de Cepa y Cactus. A partir del ANOVA, se observaron diferencias significativas en las fuentes de variación Cepa y Cactus, pero no en la combinación de ambos factores (Tabla 4.2).

Conformación alar

Se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) a partir del MANOVA realizado para la conformación alar en las fuentes de variación Cactus, Cepa y Cactus x Cepa (Tabla 4.3). En cuanto al análisis de alometría, no se observó un componente alométrico significativo ($p=0.11$) en la regresión multivariada de las variables conformacionales sobre el tamaño del ala, por lo que el tamaño y la conformación serían independientes en cuanto a la mayor parte de su variación morfológica en estos casos.

Tabla 4.1: Valores medios y desvío estándar (entre paréntesis) del Tamaño alar de las cepas de selección de *D. buzzatii* y *D. koepferae* en los diferentes recursos.

Hospedador		*Drosophila buzzatii*		*Drosophila koepferae*	
		Tamaño alar	**N**	**Tamaño alar**	**N**
***T. terscheckii* San Juan**	Control	7,63 (0,02)	15	7,59 (0,06)	12
	Moderada	7,60 (0,03)	10	7,72 (0,06)	7
	Alta	7,58 (0,02)	13	7,77 (0,09)	11
***T. terscheckii* Jujuy**	Control	7,56 (0,02)	14	7,59 (0,02)	12
	Moderada	7,50 (0,02)	12	7,62 (0,03)	12
	Alta	7,50 (0,03)	12	7,71 (0,05)	12
T. pasacana	Control	7,59 (0,03)	11	7,68 (0,02)	12
	Moderada	7,57 (0,02)	12	7,70 (0,05)	13
	Alta	7,57 (0,02)	11	7,73 (0,08)	10
T. tarijensis	Control	7,59 (0,02)	15	7,61 (0,02)	12
	Moderada	7,57 (0,02)	12	7,64 (0,03)	7
	Alta	7,59 (0,03)	9	7,65 (0,04)	8
T. volcanensis	Control	7,61 (0,02)	12	7,71 (0,05)	10
	Moderada	7,56 (0,03)	14	7,70 (0,05)	13
	Alta	7,58 (0,02)	12	7,71 (0,06)	12

Tabla 4.2: Principales resultados de los ANOVAs realizados para el tamaño alar estimada en las cepas de selección de *D. buzzatii* y *D. koepferae*. gl: Grados de

	Drosophila buzzatii		*Drosophila koepferae*	
Fuente de variación	gl	F	gl	F
Cactus	4	20**	4	30**
Cepa	2	15**	2	20**
Cactus x Cepa	8	1	8	3*

Tabla 4.3: Principales resultados de los MANOVAs realizados para la conformación alar estimada en las cepas de selección de *D. buzzatii* y *D. koepferae*. gl: Grados de libertad. *p<0.05 ** p<0.001

Especie	Fuentes de variación	gl	gl error	Wilks	F
D. buzzatii	Cactus	64	605,159	0,45	2,14**
	Cepa	32	308,000	0,18	13,38**
	Cactus x Cepa	128	1123,226	0,32	1,48**
D. koepferae	Cactus	64	534,69	0,19	4,49**
	Cepa	32	272,00	0,15	13,29**
	Cactus x Cepa	128	993,43	0,32	1,33*

En la figura 4.3 se observan los dos primeros ejes (Componentes Principales, CPs) del análisis de componentes principales que conjuntamente explican el 55.05% de la variación en la conformación alar. El CP1, separa sin solapamiento los tratamientos correspondientes a las cepas C y A de los de la cepa M. Todos los tratamientos de la cepa M y solo uno correspondiente a la cepa C toman valores positivos del CP1 lo cual se traduce en un acercamiento de los *landmarks* 1, 2 y 10 con los *landmarks* 5 y 9, y además un alejamiento de estos últimos con los *landmarks* 6, 7 y 8. Estos desplazamientos dan lugar a un aumento en el área de la región intervenosa D. Todos los tratamientos correspondientes a la cepa A y cuatro de los correspondientes a la cepa

C toman valores negativos del CP1 dando lugar a conformaciones opuestas a las descriptas para valores positivos de este eje.

El CP2, separa sin solapamientos la cepa C respecto a la cepa A para todos los tratamientos. Los correspondientes a la cepa A toman valores positivos en el CP2, donde los *landmarks* 1 y 10 se acercan con los *landmarks* 2 y 3 (VCA), dando lugar a una reducción del tamaño del área de la región proximal del ala. Los *landmarks* 4, 5 y 9 se desplazan en dirección anterior disminuyendo el área de la región interevenosa D mientras que se da un acercamiento entre los *landmarks* 7 y 8 dando lugar a una reducción del área de la región intervenosa C. Finalmente, el *landmark* 6 se mueve en dirección posterior. Por otro lado, los tratamientos correspondientes a la cepa C presentan valores negativos del CP2, mostrando por lo tanto conformaciones inversas a las descriptas para valores positivos de este eje. Los tratamientos correspondientes a la cepa M toman valores tanto negativos como positivos del CP2 solapándose con las cepas C y A.

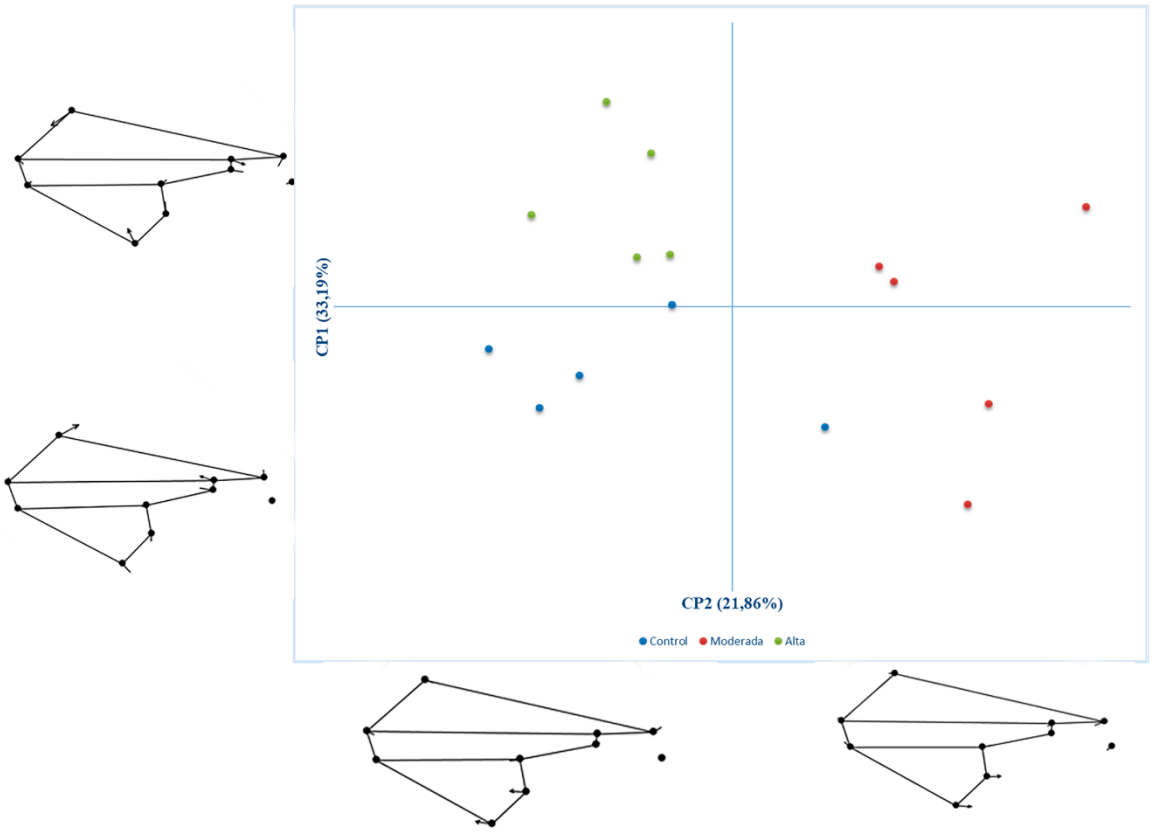


Figura 4.3: Valores medios de los dos primeros componentes principales para los tratamientos de cada cepa de selección de *D. buzzatii* en los diferentes hospedadores. Las diferencias de conformación se muestran como vectores que indican desplazamiento de los hitos de referencia con respecto a la forma media. Los módulos de estos vectores están exagerados 10 veces con fines ilustrativos.

Asimetría fluctuante del tamaño de ala

Hubo niveles detectables de AF en todas las combinaciones Cactus x Cepa mientras que no se detectó asimetría direccional en ninguno de estos casos (Tabla 4.4). A partir de los contrastes solo se observaron diferencias significativas en el recurso T. vol., donde la cepa M muestra menores niveles de AF que la cepa C (Tabla 4.5). Sin embargo, aunque en los demás contrastes las diferencias no fueron significativas, la cepa M mostró una tendencia a una baja AF en comparación con las cepas C y A, además de mostrar poca fluctuación entre recursos (Tabla 4.5). Por otro lado, las tres

cepas mostraron tendencia a una baja AF en Tt SJ en comparación con los otros recursos (Tabla 4.5) (Fig. 4.4).

Tabla 4.4: Principales resultados de los ANOVAs realizados para estudiar la AF del tamaño del ala en cada combinación Cepa x Cactus en *D. buzzatii*. gl: grados de libertad; CM: Cuadrados medios. *p<0.05 **p<0.001.

		Cepa Control			Cepa Moderada			Cepa Alta	
		gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
Tt SJ	Lado	1	0,000227	2,33	1	0,000526	2,97	1	0,000001	0,01
	Individuo	6	0,002290	23,52**	6	0,000858	4,83*	6	0,002321	15,51*
	Lado x Individuo	6	0,000097	71,09**	6	0,000177	60,78**	6	0,000150	72,33**
	Error	14	0,000001		14	0,000003		14	0,000002	
		gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
Tt Ju	Lado	1	0,000057	0,13	1	0,000101	0,41	1	0,000309	0,53
	Individuo	6	0,004795	10,79*	6	0,017142	69,87**	6	0,005503	9,36*
	Lado x Individuo	6	0,000444	53,78**	6	0,000245	78,5**	6	0,000587	150,27**
	Error	14	0,000008		14	0,000003		14	0,000004	
		gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
T tar	Lado	1	0,000133	0,26	1	0,001094	4,31	1	0,000213	0,63
	Individuo	6	0,011105	21,95**	6	0,010480	41,32**	6	0,008320	24,6**
	Lado x Individuo	6	0,000506	77,09**	6	0,000254	62,03**	6	0,000338	231,03**
	Error	14	0,000007		14	0,000004		14	0,000001	
		gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
T vol	Lado	1	0,000007	0,01	1	0,000012	0,09	1	0,000016	0,05
	Individuo	6	0,002225	3,65	6	0,005364	39,51**	6	0,005199	16,22*
	Lado x Individuo	6	0,000610	113,02**	6	0,000136	20,6**	6	0,000320	99,6**
	Error	14	0,000005		14	0,000007		14	0,000003	
		gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
T pas	Lado	1	0,000049	0,15	1	0,000154	1,09	1	0,000099	0,24
	Individuo	6	0,002218	6,89*	6	0,001124	7,96*	6	0,009786	23,14**
	Lado x Individuo	6	0,000322	107,64**	6	0,000141	38,32**	6	0,000423	200,82**
	Error	14	0,000003		14	0,000004		14	0,000002	

Tabla 4.5: Pruebas de Fisher para ambas especies de D*rosophila* contrastando niveles de AF entre las cepas de selección M y A con la Control dentro de cada recurso. *p<0.05

Contraste	*D. buzzatii*	*D. koepferae*
	F	F
T pas C--T pas M	2,28	2,89*
T pas C--T pas A	1,31	2,65
T tar C--T tar M	1,99	1,80
T tar C--T tar A	1,50	2,08
Tt Ju C--Tt Ju M	1,81	1,98
Tt Ju C--Tt Ju A	1,32	1,56
Tt SJ C--Tt SJ M	1,82	1,28
Tt SJ C--Tt SJ A	1,54	1,78
T vol C--T vol M	4,49*	1,39
T vol C--T vol A	1,90	5,23*

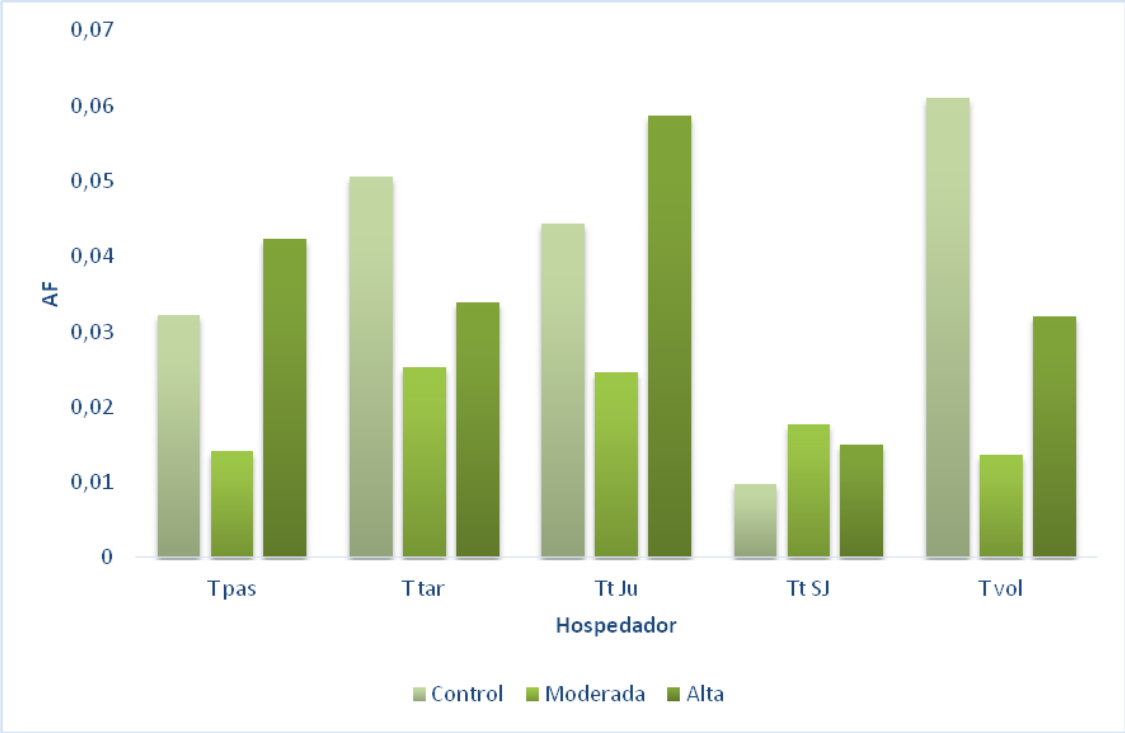


Figura 4.4: Valores medios de AF (cuadrados medios de la interacción individuos x lado) de las cepas de selección de *D. buzzatii* en los distintos hospedadores.

Correlación IP-AF

Se observó un índice de correlación de -0.39 aunque no fue significativo

Drosophila koepferae

Tamaño alar

En la tabla 4.1 se detallan los valores medios y desvíos estándar del tamaño alar de cada combinación de Cepa y Cactus. Se observaron diferencias significativas en las fuentes de variación Cepa, Cactus y la interacción de ambos factores a partir del ANOVA (Tabla 4.2).

Conformación alar

Se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) a partir del MANOVA realizado para la conformación alar entre los hospedadores, las cepas y los niveles de la

interacción (Tabla 4.3). En cuanto al análisis de alometría, no se observó un componente alométrico significativo (p=0.12), por lo que la variación del tamaño y la conformación del ala serían independientes.

La Figura 4.5 ilustra los dos primeros ejes que conjuntamente dan cuenta del 49.65 % de la variación de la conformación alar. Las tres cepas de selección quedan separadas casi sin solapamiento a lo largo del CP1. Los tratamientos correspondientes a la cepa C mostraron valores positivos para el CP1 lo cual se traduce en una mayor distancia de los *landmarks* 2 y 3 (VCA) con respecto a los *landmarks* 1 y 10, aumentando así el tamaño del área proximal del ala. Además, los *landmarks* 4, 5 y 9 se encuentran más cercanos a los 7 y 8 reduciendo así el área de las regiones intervenosas C y D. Los tratamientos correspondientes a la cepa M toman tanto valores positivos como negativos del CP1 cercanos al cero. Finalmente, la cepa A solo toma valores negativos del CP1, donde a la inversa de lo descripto para la cepa C, el área de la región proximal del ala es menor mientras que la de las regiones intervenosas C y D es mayor.

A lo largo del CP2, las distribuciones de las cepas de selección se encuentran solapadas. Sin embargo, los tratamientos correspondientes a los hospedadores Tt Ju y T tar toman valores negativos en este eje. Esto se traduce en un movimiento hacia la porción distal de los *landmarks* 1, 2, 3, 4 y 10, mientras que los *landmarks* 6, 7 y 8 se mueven en dirección anterior. Esto se traduce en un aumento de tamaño de la porción proximal del ala a costa de la distal. Por otro lado, los tratamientos correspondientes al hospedador Tt SJ toman valores positivos en el CP2 lo cual indica una conformación inversa a la ya descripta para valores negativos del este eje.

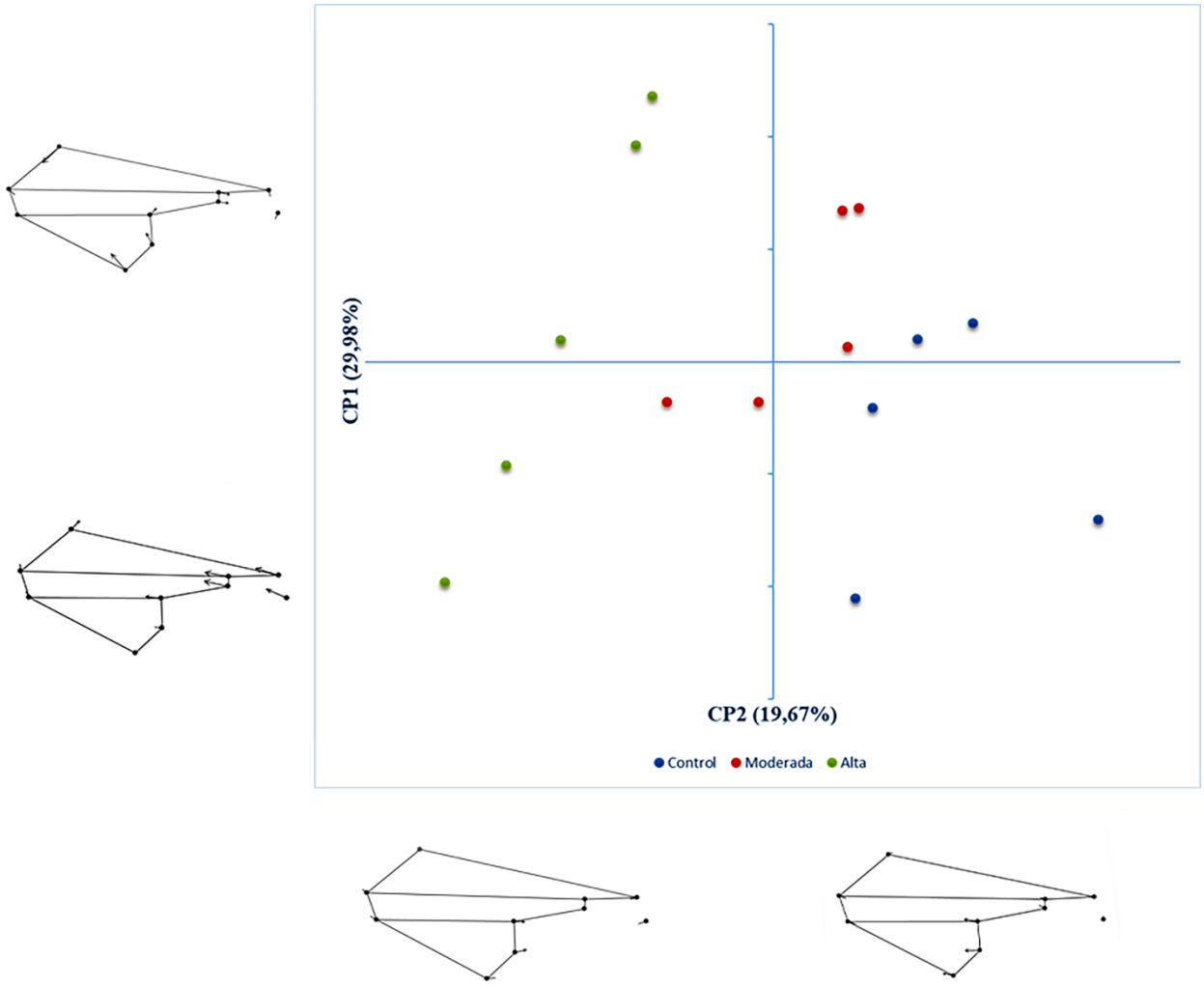


Figura 4.5: Valores medios de los dos primeros componentes principales para los tratamientos de cada cepa de selección de *D. koepferae* en los diferentes hospedadores. Las diferencias de conformación se muestran como vectores que indican desplazamiento de los hitos de referencia con respecto a la forma media. Los módulos de estos vectores están exagerados 10 veces con fines ilustrativos.

Asimetría fluctuante del tamaño del ala

Se detectó presencia de AF en todas las combinaciones Cactus x Cepa mientras que no se detectó asimetría direccional en ninguno de estos casos (Tabla 4.6). En los contrastes se observaron mayores niveles de AF en la cepa M que en la cepa C al criarse en el recurso T pas mientras que en el recurso T vol se observaron mayores niveles de AF en la cepa C que en la cepa A (Tabla 4.5). Al igual que en las cepas de *D. buzzatii*,

las tendencias mostraron una AF baja para las tres cepas al criarse en Tt SJ (Tabla 4.6) (Figura 4.6).

Correlación IP-AF: Se observó un índice de correlación significativo de -0.51.

Tabla 4.6: Principales resultados de los ANOVAs realizados para estudiar la AF del tamaño del ala en cada combinación Cepa x Cactus en *D. koepferae*. gl: grados de libertad; CM: Cuadrados medios. *p<0.05 **p<0.001.

		Cepa Control			Cepa Moderada			Cepa Alta		
		gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
Tt SJ	Lado	1	0,000103	1,53	1	0,000058	0,67	1	0,000036	0,30
	Individuo	5	0,006868	101,66**	5	0,005704	65,8**	5	0,001536	12,78*
	Lado x Individuo	5	0,000068	44,56**	5	0,000087	36,39**	5	0,000120	66,74**
	Error	12	0,000002		12	0,000002		12	0,000002	
		gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
Tt Ju	Lado	1	0,000112	0,42	1	0,000164	0,31	1	0,000288	0,68
	Individuo	5	0,039309	145,9**	5	0,012814	24,04*	5	0,006700	15,89*
	Lado x Individuo	5	0,000269	137,71**	5	0,000533	548,34**	5	0,000421	241,02**
	Error	12	0,000002		12	0,000001		12	0,000002	
		gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
T tar	Lado	1	0,003186	3,46	1	0,000452	0,89	1	0,000105	0,24
	Individuo	5	0,007106	7,72*	5	0,006006	11,75*	5	0,005256	11,88*
	Lado x Individuo	5	0,000920	1284,96**	5	0,000511	151,37**	5	0,000442	201,66**
	Error	12	0,000001		12	0,000003		12	0,000002	
		gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
T vol	Lado	1	0,000156	0,78	1	0,000087	0,32	1	0,000002	0,05
	Individuo	5	0,002400	12,09*	5	0,022925	83,23**	5	0,002056	54,25**
	Lado x Individuo	5	0,000198	95,64**	5	0,000275	130,69**	5	0,000038	15,64**
	Error	12	0,000002		12	0,000002		12	0,000002	
		gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
T pas	Lado	1	0,000034	0,26	1	0,000021	0,06	1	0,000275	0,80
	Individuo	5	0,012245	93,97**	5	0,004225	11,21*	5	0,005272	15,28*
	Lado x Individuo	5	0,000130	114,25**	5	0,000377	467,55**	5	0,000345	254,92**
	Error	12	0,000001		12	0,000001		12	0,000001	

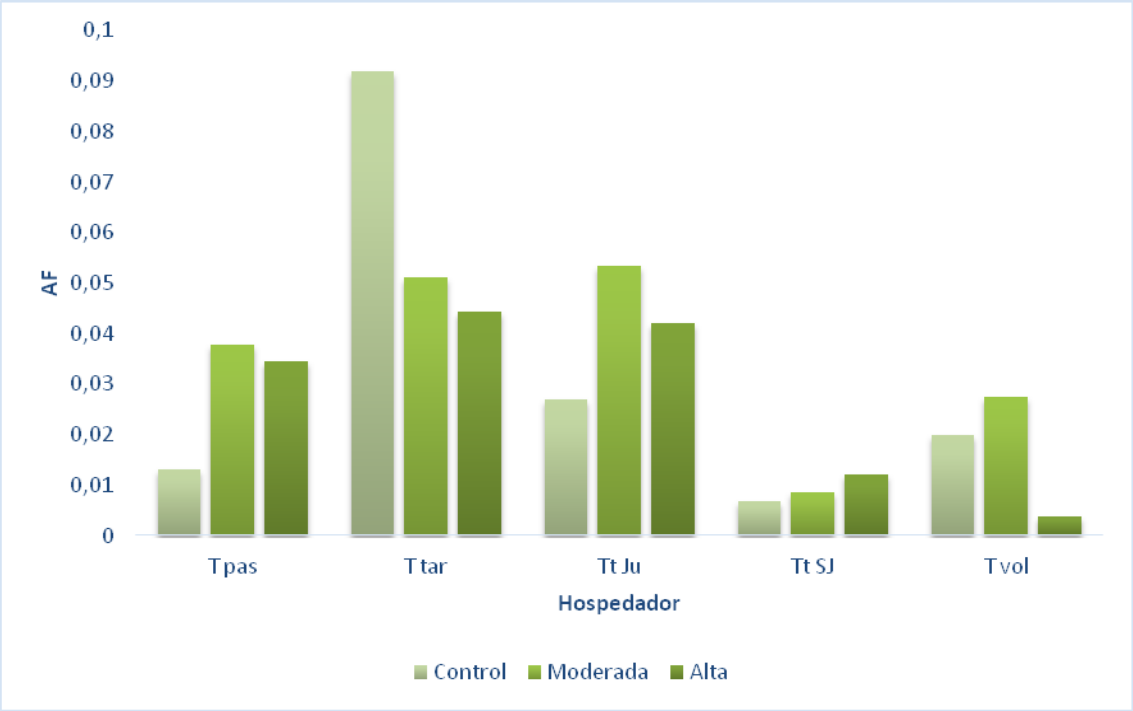


Figura 4.6: Valores medios de AF (cuadrados medios de la interacción individuo x lado) de las cepas de selección de *D. koepferae* en los distintos hospedadores.

Discusión

El efecto del tamaño del ala en la conformación ha sido ha sido reportado en diversas especies de *Drosophila*, incluyendo especies íntimamente relacionadas a *D. buzzatii* y *D. koepferae* (Debat et al., 2003; Soto et al., 2008a). Sin embargo, en el presente capítulo, no se observó una relación entre la variación del tamaño alar y la de su conformación. Esta observación, coincide con trabajos previos llevados a cabo en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, donde el componente alométrico de la variación de la conformación alar es muy pequeño o nulo (Padró et al., 2019; Soto et al., 2008b). Este escaso efecto del tamaño sobre la conformación alar podría deberse a bases genéticas relativamente diferentes para ambos componentes de la forma del ala (el tamaño y la conformación), como fue reportado en otras especies de *Drosophila* (Carreira et al., 2011).

La respuesta de la conformación alar ante la variación de hospedador mostró ser plástica lo cual se condice con lo observado previamente en la morfología alar de ambas especies estudiadas (Soto et al., 2008b). Este efecto del medio de cría sobre la

conformación alar podría tener influencia sobre ciertas funciones de este órgano como el vuelo y el canto de cortejo. En ese sentido, en *D. koepferae* se ha observado influencia del medio de cría en el canto de cortejo (Iglesias *et al.*, 2018) mientras que el éxito reproductivo en *D. buzzatii* y *D. koepferae* también estarían influenciados por el hospedador (Hurtado *et al.*, 2012). En el caso del canto de cortejo, se ha observado en *D. melanogaster* que la variación del tamaño del musculo torácico hg1 de los machos es responsable de la variación del volumen del mismo (Shirangi et al., 2013). Sin embargo, la variación de la morfología alar podría ser otro condicionante de la variación en el canto de cortejo a poner a prueba. En *D. koepferae* se observaron conformaciones diferentes a lo largo de CP2 entre los tratamientos correspondientes al hospedador Tt SJ y al de Tt Ju y T tar. De esta manera, las diferencias de conformación entre las dos poblaciones de *T. terscheckii* se suman a las diferencias fenotípicas observadas en el Índice de Performance abordado en el Capítulo III.

En el mismo sentido, los efectos de los regímenes selectivos también influencian significativamente la conformación alar en ambas especies de *Drosophila*. Tanto en *D. buzzatii* como *D. koepferae*, los regímenes selectivos no se solapan, explorando diferentes sectores del morfoespacio. En *D. koepferae*, la separación entre los regímenes selectivos se da principalmente a lo largo del CP1. Llamativamente, el orden de las cepas, de valores positivos a negativos del CP1, coincide con concentraciones crecientes de aleloquímicos de *T. terscheckii* del régimen selectivo. En ese sentido, podría pensarse en una relación entre ciertos aspectos de la conformación alar con la concentración de aleloquímicos de *T. terscheckii* en el medio de cría. Los tratamientos de la cepa C toman valores positivos del CP1, los cuales se corresponden con una mayor área proximal y una menor área distal sobre todo en las regiones intervenosas C y D. Por el contrario, los tratamientos de la cepa A toman valores negativos del CP1 presentando un área menor en la región proximal y una mayor área distal en las regiones intervenosas C y D (Fig. 4.5). Esta diferencia de respuesta entre la región proximal y distal podría estar relacionada con la modularidad existente en el ala. En ese sentido, recientemente se ha comprobado que el ala de *Drosophila* no funciona como una única estructura integrada, sino que se encuentra constituida por al menos dos módulos a lo largo de un eje próximo-distal (Muñoz-Muñoz et al., 2016). Por lo tanto, los regímenes selectivos podrían haber influenciado diferencialmente la variación genética u otros aspectos de ambos módulos dando como resultado el patrón observado. De ser así,

concentraciones crecientes de clorénquima de *T. terscheckii* en el régimen selectivo llevarían a una disminución del tamaño de la región proximal del ala y a un aumento de la región distal de la misma. Por otro lado, en trabajos previos realizados en *D. buzzatii*, *D. koepferae* y especies relacionadas se observó una mayor diferenciación interespecífica en la región intervenosa D (*landmarks* 4, 5, 8 y 9) mostrando ésta, además, la mayor parte de las respuestas plásticas ante el cambio de hospedador (Soto et al., 2008 b; Soto et al., 2008c). En ese sentido, en el presente capítulo, la conformación de la región intervenosa D mostró variación entre tratamientos en ambas especies de *Drosophila* estudiadas.

En cuanto a los niveles de AF, en *D. buzzatii*, si bien solo se observaron diferencias significativas en el recurso T. vol (Tabla 4.4), la cepa M mostró una tendencia a menores valores de AF que la C y A en casi todos los recursos restantes (salvo Tt SJ), así como también poca variación entre recursos (Fig. 4.4). Esta tendencia diferente de la cepa M con los otros regímenes selectivos parecería indicar una mayor estabilidad de desarrollo (menor AF del tamaño alar) que las otras cepas en los distintos recursos. Al ser la cepa M de *D. buzzatii* la que logró adaptarse a su medio selectivo (Padró et al., 2018, Fig. 2.5), probablemente haya adquirido una robustez a nivel genético que le permite lidiar con las perturbaciones ambientales de los diferentes recursos de cría durante el desarrollo de manera más eficaz logrando menores niveles de AF ante las diferentes perturbaciones generadas por los recursos. Sin embargo, reportes previos de experimentos de selección, muestran que el proceso selectivo puede alterar la estabilidad del desarrollo (Hayden et al., 2012; Pélabon et al., 2010). En ese sentido, un estudio en poblaciones de *D. melanogaster* seleccionadas para un mayor tamaño alar muestran una menor capacidad de canalización en la venación alar que la población Control al ser criadas en condiciones de estrés térmico (31ºC) (Groth et al., 2018). En este caso, el proceso de selección direccional reciente parecería haber desestabilizado los mecanismos de homeostasis, resultando en una reducción de la canalización de los patrones de venación alar ante la cría en temperaturas elevadas (Groth et al., 2018). Sin embargo, a diferencia de este caso, el agente selectivo de la cepa M de *D. buzzatii* y el agente estresor (los diferentes recursos de cría) guardan características similares. En ese sentido, la composición alcaloidea de *T. terscheckii* presente en gran concentración en el medio de cría de selección, son derivados feniletilamínicos al igual que los presentes en las especies de *Trichocereus* usadas como recursos de cría (Trout, 2014). De esta

manera, la selección artificial a estos aleloquímicos podría haber favorecido a una mayor homeostasis en el desarrollo ante perturbaciones ambientales similares dadas por los demás recursos de cría. En el caso de *D. koepferae*, en los contrastes se observaron mayores niveles de AF en la cepa M que en la cepa C al criarse en T. pas mientras que en T. vol se observaron mayores niveles de AF en la cepa C que en la cepa A. Tanto en los contrastes (Tabla 4.5) como a nivel descriptivo (Fig.4.6), no se observó un patrón definido. De esta manera, no parece haber un efecto claro del proceso adaptativo sobre la estabilidad de desarrollo. Por otro lado, si bien no se encontraron diferencias significativas a nivel estadístico, los menores valores de AF se observaron en el recurso nativo Tt SJ para las tres cepas de selección en ambas especies de *Drosophila* estudiadas. Estas observaciones estarían indicando una menor perturbación por parte de este recurso en el proceso ontogenético de los individuos. Esto concuerda con las respuestas de las cepas de selección de ambas especies de *Drosophila* en este recurso de cría a nivel de los estimadores de *performance* detallados en el capítulo III. De esta manera, tomando los valores de AF como indirectamente proporcionales al *fitness*, las características nutricionales y/o toxicológicas de Tt SJ parecerían no tener un efecto marcado sobre la estabilidad del desarrollo en comparación con los demás recursos.

Finalmente, en ambas especies de *Drosophila*, las correlaciones entre la AF y el IP mostraron ser inversamente proporcionales, pero con valores no tan altos. En ese sentido, si bien en el caso de *D. buzzatii* la correlación calculada no es significativa, estos valores no apoyan del todo el uso de la AF como un estimador certero de *fitness* en estas especies. Previamente, no se ha encontrado una relación inversamente proporcional entre AF y *fitness* en especies de *Drosophila* cactófilas filogenéticamente relacionadas a las estudiadas en la presente tesis (Soto et al., 2010). Además, por fuera de este modelo, se ha observado una gran heterogeneidad en los resultados de estudios de la relación entre la AF y el *fitness* generándose así interrogantes sobre el correcto uso de esta como un indicador universal de *fitness* (Lens et al., 2002).

Capítulo V: Efecto de la tolerancia a aleloquímicos en la longevidad y fecundidad

Resumen

La teoría del soma desechable propone un escenario para la evolución de la senescencia. Este fenómeno de la vida de los organismos habría evolucionado debido a que la energía invertida en mantenimiento y reparación del soma está bajo presiones selectivas para asegurar la vida del organismo hasta el momento de la reproducción, pero que no son suficientes para mantener las funciones vitales de manera indefinida. Por lo tanto, se predice un compromiso entre caracteres relacionados al mantenimiento somático, como la longevidad, con caracteres de índole reproductiva, como la fecundidad. Por otro lado, para diversos modelos animales se ha reportado que las manipulaciones ambientales o genéticas que incrementan la longevidad confieren una mayor resistencia a estresores ambientales impuestos. A partir de la cría en jardín común y posterior estimación de la longevidad y la fecundidad, nos propusimos evaluar el efecto del proceso adaptativo de las cepas de selección de *D. buzzatii* y *D. koepferae* sobre estos caracteres. Además, para testear de manera directa el compromiso entre longevidad y fecundidad de las hembras, estimamos la correlación entre ambos caracteres. Por un lado, no se observó correlación entre la longevidad y la fecundidad de las hembras en ninguna de las dos especies de *Drosophila* estudiadas, por lo que este compromiso no se evidenció de forma directa. Por otro lado, la cepa M de *D. buzzatii* mostró una mayor longevidad que la cepa C en machos y una menor fecundidad en hembras. A partir de estos resultados podría interpretarse que la adaptación a mayor resistencia a stress químico en la cepa M de *D. buzzatii* conllevó un aumento de la longevidad siendo esta, sin embargo, una respuesta sexo-específica. Además, la menor fecundidad que mostró esta cepa podría deberse al compromiso existente con la longevidad. En última instancia, esto podría ser consecuencia de la pleiotropía antagonista, mediante la que las variantes genéticas compartidas entre ambos caracteres habrían segregado en el proceso adaptativo dando lugar a un aumento de la longevidad y una consecuente disminución de la fecundidad. Las respuestas observadas en *D. koepferae*, por otro lado, fueron bastante diferentes. Se observó una mayor longevidad en las hembras de la cepa C que en las de las cepas M y A, mientras que en los machos se observó una mayor longevidad en la cepa M que en

las cepas C y A. Asimismo, no se observaron diferencias de fecundidad entre cepas. Por lo tanto, a diferencia de lo observado en *D. buzzatii*, el proceso adaptativo de la cepa A de *D. koepferae* no se tradujo en un aumento de la longevidad ni en una disminución de la fecundidad, efectos predecibles según la teoría del soma desechable.

Introducción

La senescencia o el declive de las funciones fisiológicas con la edad es un fenómeno de gran relevancia en biología evolutiva y se trata de abordar a partir de las teorías con enfoque evolutivo. Estas teorías pueden ser consideradas, de manera más general, como parte de la teoría de Historia de Vida, ya que busca explicar cómo los procesos evolutivos moldean el desarrollo de las capacidades vitales de los organismos optimizando el éxito reproductivo (Stearns, 2000). Las explicaciones evolutivas para la senescencia y la longevidad limitada de las especies biológicas están basadas en dos grandes teorías evolutivas: la teoría de acumulación de mutaciones (Medawar, 1946,1952) y la teoría de pleiotropía antagonista (Williams, 1957). Según la primera, la senescencia es un resultado inevitable del declive de la fuerza de la selección natural conforme avanza la edad. De esta manera, una mutación letal que afecta estadios juveniles del organismo será seleccionada en contra ya que no permitirá la reproducción del individuo, sin embargo, mutaciones letales que afecten estadios post reproducción del organismo podrían pasar a la siguiente generación. Así, en sucesivas generaciones, las mutaciones deletéreas tardías se acumularían aumentando la tasa de mortalidad en ese periodo de vida. Por otro lado, según la teoría de pleiotropía antagonista, las mutaciones deletéreas en periodos tardíos de la vida podrían ser favorecidas por la selección y ser acumuladas activamente si generaran efectos beneficiosos en periodos tempranos de la vida. Estas teorías no se contradicen, por lo que ambos procesos podrían actuar de manera conjunta (Gavrilov & Gavrilova, 2002). La principal diferencia entre estas teorías consiste en que, en la teoría de acumulación de mutaciones, las variantes génicas con efectos negativos se acumularían pasivamente en edades tardías mientras que en la teoría de pleiotropía antagonista, estas variantes serían mantenidas de manera activa en el pool génico por la selección (Le Bourg, 2001).

Una de las teorías con mayor vigencia para la comprensión de la evolución de la senescencia es la teoría del soma desechable desarrollada por Thomas Kirkwood y

colaboradores (Kirkwood & Cremer, 1982). Esta teoría es considerada por sus autores como una variante de la ya abordada teoría de pleiotropía antagonista desarrollada por Williams (Kirkwood & Holliday, 1979). La misma parte de las observaciones de que el soma es una rama lateral de la línea germinal la cual constituye la principal secuencia de la vida. Un organismo, para maximizar su *fitness* biológico, destina sus recursos energéticos a diferentes funciones metabólicas. De esta manera, en organismos, especialmente multicelulares, que se reproducen de manera repetida, la distribución óptima de energía involucra una menor inversión en reparación y mantenimiento somático del que sería necesario para mantener el soma indefinidamente. Por lo tanto, la teoría del soma desechable predice que, a lo largo de la vida del organismo, se dará una acumulación de daño somático no reparado que llevará a una paulatina degeneración del mismo y finalmente a su muerte (Kirkwood & Cremer, 1982). Sin embargo, si bien el *fitness* es maximizado en un nivel de inversión energética de mantenimiento somático menor al requerido para mantenerlo indefinidamente, el nivel óptimo de distribución energética entre actividad reproductiva y mantenimiento del soma es especie específico (Kirkwood & Cremer, 1982). En ese sentido, los organismos con esperanza de vida corta destinan más recursos a funciones reproductivas con el fin de lograr producir descendencia a lo largo de su vida, mientras que organismos con esperanza de vida larga, dirigen más energía a funciones de mantenimiento somático (Lorenzini et al., 2011). Uno de los factores de gran relevancia en esta relación reproducción-longevidad es la tasa de mortalidad extrínseca, la cual se refiere al riesgo de mortalidad independiente de la edad y que suele ser uno de los principales factores que determina la esperanza de vida en poblaciones naturales (Speakman, 2010). De esta manera, organismos con una alta tasa de mortalidad extrínseca son blanco de una presión de selección que favorece un desarrollo más rápido, una gran inversión en reproducción y por lo tanto una menor inversión en el mantenimiento del soma lo cual conlleva un mayor riesgo de mortalidad dependiente de la edad y una menor esperanza de vida (Speakman & Król, 2010).

Estas teorías evolutivas de la senescencia cuentan con apoyo empírico en diferentes poblaciones de organismos modelo incluyendo *Drosophila* (Rose, 1991, 1999; Patridge & Mangel, 1999; Kirkwood & Austad, 2000). En particular, en *D. buzzatii* y *D. koepferae* se ha observado que caracteres ligados a funciones reproductivas y de mantenimiento somático se encuentran negativamente

correlacionados. De esta manera, se ha observado para ambas especies de *Drosophila*, que poblaciones con mayor longevidad muestran una menor fecundidad temprana y viceversa, comportándose así dentro de lo esperado por las teorías evolutivas de la senescencia (Sambucetii et al., 2005). En cuanto a la variación del compromiso entre estos caracteres en ambas especies, parecerían haberse desarrollado estrategias diferentes ya que en *D. buzzatii* se observó una mayor longevidad y menor fecundidad temprana que en *D. koepferae* (Sambucetii et al., 2005). En el mismo sentido, se ha observado una variación clinal del compromiso entre fecundidad temprana y longevidad a lo largo de un gradiente altitudinal en *D. buzzatii*. En estos ensayos se observó que las poblaciones provenientes de gran altura mostraban una menor longevidad y mayor fecundidad temprana que las provenientes de menores alturas (Norry et al., 2006). En consonancia con lo postulado por la teoría del soma desechable, la variación clinal observada en el compromiso entre estos caracteres podría explicarse como una adaptación producto de una mayor probabilidad de mortalidad extrínseca en grandes alturas debido a una disminución de la temperatura ambiental (Norry et al., 2006). La relación inversamente proporcional entre estos caracteres también se observó en experimentos de selección de la longevidad en *D. buzzatii*. Cepas de esta especie que respondieron a la selección para una mayor longevidad no solo mostraron como respuesta correlacionada una menor fecundidad temprana sino también un tiempo de desarrollo más prolongado y una mayor resistencia al stress por bajas y altas temperaturas (Scannapieco et al., 2009). Además, en cepas de selección de *D. buzzatii* que respondieron mostrando una menor tolerancia al stress generada por baja y alta temperatura se observó una reducción marcada de la longevidad (Gomez et al., 2009). Por otro lado, en *D. melanogaster*, se observó una mayor longevidad en cepas seleccionadas por su tolerancia al stress por calor (Norry & Loeschcke, 2003). De hecho, se ha reportado en diversos modelos animales que manipulaciones ambientales o genéticas que incrementan la longevidad confieren una mayor resistencia a estresores ambientales impuestos (Kirkwood & Austad, 2000). Entre estos, la resistencia a stress químico también ha mostrado ser un carácter relacionado positivamente con la longevidad. Cepas de *D. melanogaster* resistentes a los alcaloides isoquinolínicos del cactus columnar Saguaro (*Carnegiea gigantea*) han mostrado un incremento considerable de la longevidad (Fogleman, 2000). Por otro lado, las diferencias entre sexos en la longevidad constituyen también una variable de gran relevancia para la comprensión de este carácter. Análisis desarrollados en *D. melanogaster* han revelado

que estas diferencias son dependientes del genotipo, la fecundidad de la hembra y el estado de apareamiento (Malick & Kidwell, 1966; Austad & Fischer, 2016). En cuanto al estado de cópula, se ha observado un costo producto del apareamiento a causa del traspaso de ciertas proteínas seminales durante la cópula reduciendo la longevidad de las hembras (Chapman et al., 1995; Wigby & Chapman, 2005). Además, a partir de estudios recientes desarrollados en 219 isolíneas de *D. melanogaster*, se observó que un 70% de las hembras vírgenes vivieron más que los machos vírgenes, aunque también se ha observado lo opuesto en menor proporción (Arya et al., 2010). En cuanto a *D. buzzatii*, a partir de estudios previos se observó una diferencia de longevidad entre sexos siendo los machos más longevos (Sambucetii et al., 2005; Scannapieco et al., 2009). Por otro lado, en *D. koepferae* se observaron patrones variables con machos más longevos en algún caso y hembras más longevas en otro (Sambucetii et al., 2005; Scannapieco et al., 2007).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, las cepas de selección de *D. buzzatii* y *D. koepfereae* adaptadas a altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* constituyen un excelente modelo para evaluar un posible efecto de esta resistencia adquirida sobre caracteres relacionados a la reproducción y la longevidad en el contexto de la teoría del soma desechable. Por lo tanto, pretendemos poner a prueba si la adaptación a altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* en las cepas resultó en un incremento de la longevidad y una consecuente reducción de la fecundidad a causa del compromiso reportado entre ambos caracteres.

Objetivos

-Evaluar si la adaptación a altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* incrementó la longevidad en ambas especies de *Drosophila*.

-Evaluar si la adaptación a altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* disminuyó la fecundidad en ambas especies de *Drosophila*.

-Evaluar si la evolución correlacionada de estos caracteres se produjo de manera paralela en ambas especies o, por el contrario, existen diferencias específicas.

Hipótesis

-La adaptación a altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* incremento la longevidad en ambas especies de *Drosophila*.

-La adaptación a altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* disminuyó la fecundidad en ambas especies de *Drosophila*.

-La evolución correlacionada de ambos caracteres producto del proceso adaptativo se produjo de forma paralela en ambas especies de *Drosophila*.

Materiales y métodos

Cría en jardín común

Aproximadamente cien parejas de moscas sexualmente maduras de cada cepa de selección de cada especie de *Drosophila* se dispusieron en cajas conteniendo placas de Petri con agar 2% durante 24 horas permitiendo la oviposición. Las placas fueron luego retiradas y reservadas durante otras 24 horas para la eclosión de los huevos. Con el fin de controlar la densidad de cría larvaria, se "sembraron" grupos de 50 larvas en viales de vidrio los cuales contenían 5 gramos de medio de cría. Este medio consistió de 0.5 g de polvo de clorénquima de *T. terscheckii* y 0.5 g de polvo de puré de papa (medio *Standard*) hidratado con 4 mL de agua destilada con solución antifúngica (Nipagin 1.8 g/L) y extracto de levadura (40 g/L). Este medio de cría funcionó como "jardín común" con el fin de igualar el efecto ambiental y evaluar así el efecto de los regímenes selectivos. Se decidió utilizar concentraciones Moderadas de clorénquima de *T. terscheckii* en el jardín común con el fin de comparar a las cepas bajo stress químico de modo tal de evidenciar las diferencias en su resistencia a las fitotoxinas presentes este recurso. Una vez emergidos los adultos, fueron separados por sexo antes de su madurez sexual tras anestesiarlos con dióxido de carbono, utilizando una lupa. Estos adultos fueron mantenidos con alimento en densidades controladas a 25ºC en ciclos de 12 horas luz/oscuridad hasta el inicio de los experimentos.

Longevidad

Para cada combinación cepa x sexo se dispuso de 10 réplicas de cada especie de *Drosophila* estudiada. Por cada réplica, cinco adultos vírgenes de entre 3 y 4 días de edad fueron colocados en un tubo con una placa de Petri adosada. A la placa de Petri, con agar 1.5 % y solución anti fúngica (Nipagin 1.8 g/L), se le agregó levadura para la alimentación de los individuos. Se cambiaron las placas cada dos días hasta el final del experimento. El conteo de los individuos muertos se llevó a cabo en tres horarios durante el ciclo de luz, 9 hs, 14 hs y 19 hs, de modo tal que se determinó la longevidad de cada individuo como el tiempo transcurrido en horas desde el inicio del experimento al momento del censo en el que se lo encontró muerto.

Fecundidad

Teniendo en cuenta un pico de actividad matutino reportado en *D. melanogaster* (Helfrich-Förster, 2000), para cada cepa, se colocaron 20 hembras vírgenes de 3 días de edad junto con 40 machos vírgenes sexualmente maduros de 3 días de edad en una botella con medio de cría *Standard* (generándose dos botellas por cepa) permitiendo cortejos y cópulas libres entre las 9 hs y las 11hs. Una vez retiradas las hembras, las mismas fueron dispuestas individualmente en tubos con una placa de Petri adosada con agar 1.5% y alimento. De esta manera, para cada cepa, se contó con 10 réplicas con una hembra fecundada cada una. Durante 24 hs se dejó oviponer a las hembras a 25ºC en ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Luego, las placas de Petri con los huevos fueron retiradas y reemplazadas por nuevas repitiéndose este procedimiento durante 8 días. Los huevos en las placas obtenidas fueron contabilizados bajo lupa y en todas las placas con huevos se encontraron larvas posteriormente. La fecundidad fue estimada como el promedio de cantidad de huevos puestos por cada hembra en los primeros 8 días en *D. buzzatii* y en los primeros 4 días en *D. koepferae*. Esta diferencia de criterios entre especies se debió a la ausencia de huevos después del día 4 en *D. koepferae*.

Análisis estadísticos

Longevidad: Los análisis de longevidad se realizaron mediante ANOVAs de dos factores en los cuales Cepa y Sexo fueron las variables explicatorias fijas. Para esto se

utilizó el paquete *gls* (Lindstrom and Bates, 1990). Para los contrastes *a posteriori* se utilizó el paquete *multcomp*.

Fecundidad: Los análisis de fecundidad se realizaron mediante ANOVAs de un factor con Cepa como variable explicatoria fija. Como antes, se utilizaron los paquetes *gls* (Lindstrom and Bates, 1990) y *multcomp*.

Correlación Fecundidad-Longevidad: Con el fin de evaluar una posible correlación entre ambos caracteres se calculó el índice de correlación de Pearson entre los datos del experimento de fecundidad y los de las hembras del experimento de longevidad. Para esto, en cada especie, se parearon los diez datos de cada Cepa de selección aleatoriamente.

Resultados

Drosophila buzzatii

Longevidad

A partir del ANOVA, se observó un efecto significativo de los factores Cepa y Sexo, así como también de la interacción entre ambas variables (Tabla 5.1). En los análisis *a posteriori*, se observó una mayor longevidad de los machos de la cepa M que los de las cepas C y A mientras que no se observaron diferencias de longevidad entre cepas para las hembras. En cuanto al factor sexo, se observó una mayor longevidad en los machos de la cepa M que en las hembras de la cepa M lo que indicaría una respuesta sexo específica. Sin embargo, no se observaron diferencias entre sexos en las cepas C y A (Fig.5.1) (Tabla 5.2).

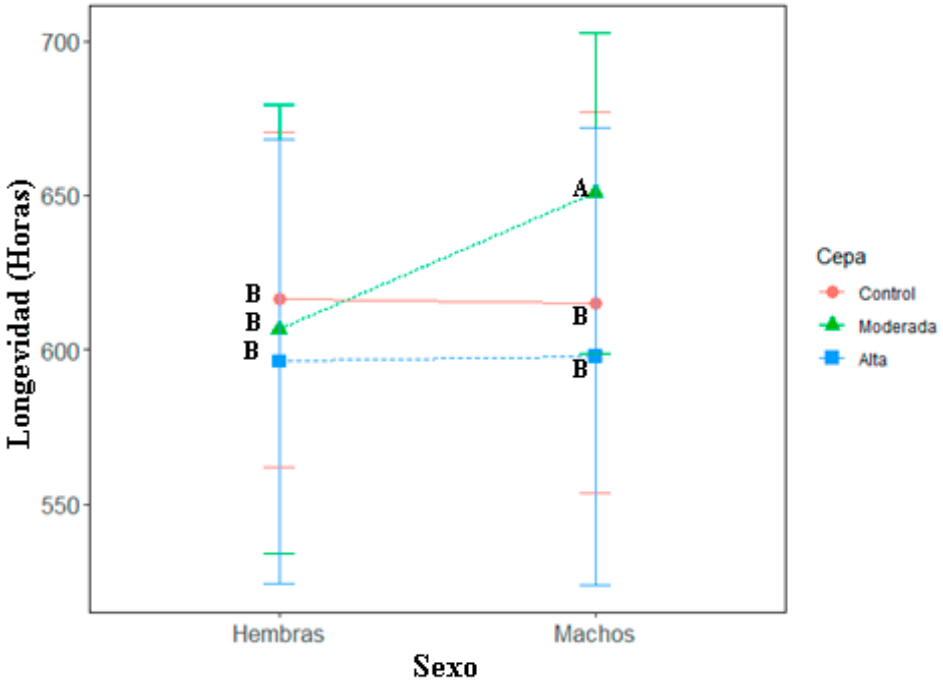


Figura 5.1: Valores medios con desvío estándar de la longevidad (en horas) para cada sexo en las tres cepas de selección de *D. buzzatii*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias.

Tabla 5.1: Principales resultados de los ANOVAs realizados para la longevidad con Cepa y Sexo como variables explicatorias en ambas especies de *Drosophila*. gl: grados de libertad. *p<0.05.

Especie	Fuente de variación	gl	F
D. buzzatii	Cepa	2	8,81*
	Sexo	1	5,45*
	Cepa x Sexo	2	4,21*
D. koepferae	Cepa	2	12,45*
	Sexo	1	84,56*
	Cepa x Sexo	2	19,88*

Tabla 5.2: Valores medios con desvío estándar (entre paréntesis) de la longevidad (en horas) en cada sexo de las tres cepas de selección de ambas especies de *Drosophila*. Las diferencias entre letras muestran diferencias entre los valores medios de los tratamientos.

	D. buzzatii			***D. koepferae***		
Cepa/Sexo	Longevidad	N	Contrastes	Longevidad	N	Contrastes
C - hembras	616,28 (54,26)	50	B	267,98 (52,23)	50	A
C - machos	615,26 (61,75)	50	B	187,35 (35,64)	48	C
M - hembras	606,62 (72,58)	50	B	242,84 (37,12)	50	B
M - machos	650,72 (51,89)	50	A	236,53 (38,12)	47	B
A - hembras	596,2 (72,12)	50	B	238,38 (44,93)	49	B
A - machos	597,74 (73,92)	50	B	195,85 (30,86)	41	C

Fecundidad

En el análisis de ANOVA se observó un efecto significativo del factor cepa (Tabla 5.3). A partir de los análisis *a posteriori*, se observó una menor fecundidad en la cepa M que en las cepas C y A mientras que no se observaron diferencias entre las cepas C y A (Fig. 5.2) (Tabla 5.4).

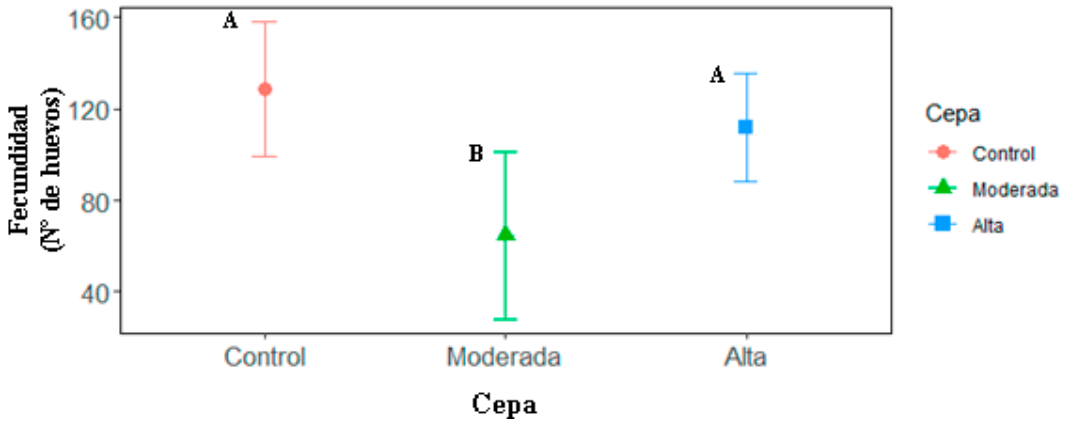


Figura 5.2: Valores medios con desvío estándar de la fecundidad (número de huevos) en las tres cepas de selección de *D. buzzatii*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias.

Tabla 5.3: ANOVAs poniendo a prueba diferencias en fecundidad entre las cepas de selección en ambas especies de *Drosophila*. gl: grados de libertad. *p<0.05.

Especie	Fuente de variación	gl	F
D. buzzatii	Cepa	2	11,72*
D. koepferae	Cepa	2	0,95

Tabla 5.4: Valores medios con desvío estándar (entre paréntesis) de la fecundidad (número de huevos) en las tres cepas de selección de ambas especies de *Drosophila*. Las diferencias entre letras muestran diferencias entre los valores medios de los tratamientos.

	D. buzzatii			***D. koepferae***		
Cepa	Fecundidad	N	Contrastes	Fecundidad	N	Contrastes
Control	128,39 (29,49)	10	A	19.55 (11,17)	10	A
Moderada	64,9 (36,55)	10	B	15.15 (10,36)	10	A
Alta	111.83 (23,86)	10	A	23.02 (15,6)	9	A

Correlación fecundidad-longevidad

El análisis de correlación de Pearson entre la fecundidad y la longevidad de las hembras fue de r=-0.03, no significativo.

Drosophila koepferae

Longevidad

A partir del ANOVA, se observó un efecto significativo de los factores Cepa y Sexo, así como también de la interacción entre ambas variables (Tabla 5.1). A partir de los contrastes *a posteriori* se observó una mayor longevidad en los machos de la cepa M que en los de las cepas C y A mientras que en las hembras se observó una mayor longevidad de la cepa C que en las cepas M y A. Por otro lado, las hembras de las cepas C y A mostraron una mayor longevidad que los machos de las cepas correspondientes

mientras que no se observaron diferencias entre sexos en la cepa M (Fig. 5.3) (Tabla 5.2).

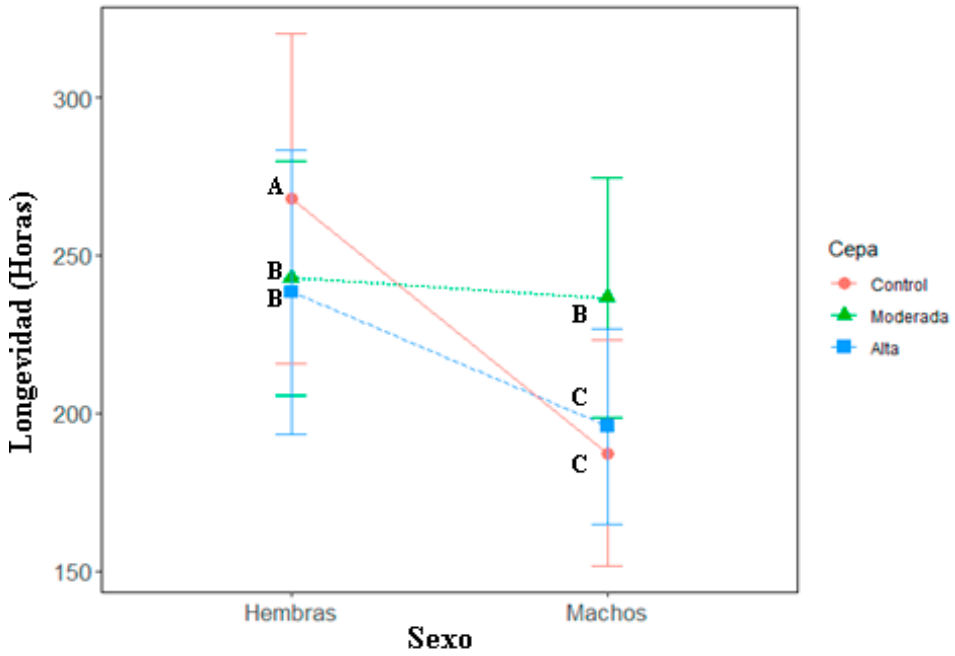
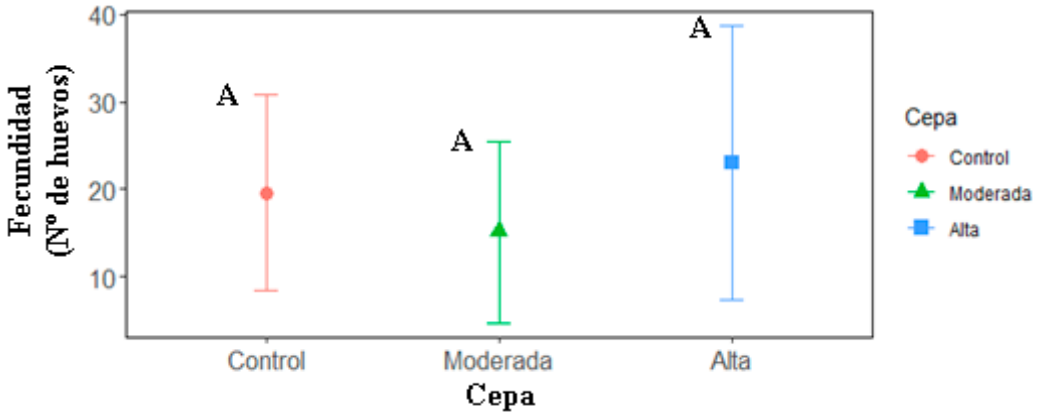


Figura 5.3: Valores medios con desvío estándar de la longevidad (en horas) para cada sexo en las tres cepas de selección de *D. koepferae*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias.

Fecundidad

Los protocolos de selección no alteraron los valores medios de fecundidad de manera significativa ya que el ANOVA no detectó diferencias entre cepas (Tabla 5.3) (Fig. 5.4).



.

Figura 5.4: Valores medios con desvío estándar de la fecundidad (número de huevos) en las tres cepas de selección de *D. koepferae*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias.

Correlación fecundidad-longevidad

El análisis de correlación de Pearson entre la fecundidad y la longevidad de las hembras fue de r=-0.07, no significativo.

Discusión

De acuerdo con las teorías evolutivas de la senescencia, en especial la teoría del soma desechable, el envejecimiento es un subproducto de la selección natural ya que se propone que la mortalidad de los individuos en la naturaleza es mayormente el resultado de causas extrínsecas y no del envejecimiento. Entonces, de manera sintética, la senescencia habría evolucionado debido a que la energía invertida en mantenimiento y reparación del soma es suficiente para prolongar la vida del organismo hasta el momento de la reproducción, pero no lo suficiente para mantenerse de manera indefinida (Kirkwood & Austad, 2000). Por lo tanto, una de las predicciones más importantes de esta teoría es un posible compromiso entre caracteres ligados a la esperanza de vida y a la reproducción como lo son la longevidad y la fecundidad. Sin embargo, a partir de los análisis de correlación entre fecundidad y longevidad de las hembras, no se observó correlación en ninguna de las dos especies. Por lo tanto, aunque

quizás por problemas de potencia las correlaciones no fueron significativas, este compromiso entre fecundidad y longevidad no fue evidente de manera directa.

En cuanto a los patrones generales en los caracteres estudiados, se observaron diferencias en la longevidad entre ambas especies de *Drosophila*. En ese sentido, a nivel descriptivo se observó una menor longevidad en *D. koepferae* que en *D. buzzatii*, lo que coincide con lo observado en trabajos previos en estas especies (Sambucetti et al., 2005; Scannapieco et al., 2007). En cuanto a la fecundidad, la respuesta observada fue también muy diferente entre especies. En el caso de *D. koepferae*, a partir de los 4 días de iniciado el experimento prácticamente no se observaron huevos mientras que en *D. buzzatii* la ovipuesta fue continua en los 8 días del experimento. Estas diferencias indican estrategias muy distintas entre especies en relación con la oviposición. Previamente, se han reportado diferencias en la fecundidad entre estas especies, observándose una mayor fecundidad en *D. koepferae* en los primeros días, aunque siendo mayor en *D. buzzatii* a lo largo de toda la vida de la hembra (Sambucetii et al., 2005). Además, estudios previos en estas especies han revelado que el periodo refractario (disminución de la predisposición a la cópula) entre cópulas en ambas es diferente siendo bastante más largo en *D. koepferae* que en *D. buzzatii* (Hurtado & Hasson, 2013). Por lo tanto, como el tiempo dispuesto en el experimento para la cópula fue el mismo en ambas especies, las hembras de *D. buzzatii* podrían haber pasado por un mayor número de eventos de cópula que las de *D. koepferae* influyendo así en las diferencias de fecundidad observadas entre especies.

Por otro lado, retomando el compromiso entre longevidad y fecundidad propuesto por la teoría del soma desechable, las comparaciones entre cepas de *D. buzzatii* para estos caracteres permiten una interpretación indirecta en torno a dicho compromiso. En ese sentido, los machos de cepa M de *D. buzzatii*, la cual respondió al régimen selectivo (Padró et al., 2018), mostraron mayor longevidad que los de la cepa C mientras que las hembras de la cepa M mostraron menor fecundidad que las de la cepa C. Por otro lado, la cepa A mostró valores similares a la cepa C en ambos caracteres (Fig. 5.1 y 5.2). De esta manera, mientras se observó un incremento en la longevidad de los machos en el proceso adaptativo en la cepa M, la fecundidad disminuyó sugiriendo un compromiso entre ambos caracteres. Esta observación coincide con trabajos previos donde se reporta un compromiso entre estos caracteres no solo en *D. melanogaster* sino más específicamente en *D. buzzatii* (Kirkwood & Austad, 2000; Norry et al., 2006;

Scannapieco et al., 2009). De esta manera, las variantes genéticas que segregaron en el proceso adaptativo e incrementaron la longevidad en machos de la cepa M parecerían estar vinculadas con la fecundidad, lo cual concuerda con lo predicho por la teoría de pleiotropía antagonista (Williams, 1957), relacionada con la del soma desechable.

Si bien se observó un incremento en la longevidad de la cepa adaptada, esta respuesta fue sexo-específica observándose únicamente en los machos (Fig. 5.1). Una respuesta similar fue observada en cepas de *D. melanogaster* seleccionadas mediante stress por calor donde se observó específicamente un incremento de longevidad en los machos (Norry & Loeschcke, 2003). Además, se han reportado en varios casos respuestas sexo-específicas de hormesis en la longevidad inducida por shock térmico en *Drosophila*, siendo esta más usual en machos. Entendiéndose hormesis como el fenómeno en el cual una exposición leve a un stress detrimental resulta beneficioso a nivel de algún carácter (Sørensen et al., 2008). Una posible explicación de esta respuesta sexo-específica es la presencia de un costo en las hembras producto de la actividad reproductiva. El costo en la reproducción es un fenómeno de central importancia en la teoría de historia de vida (Williams, 1966) el cual se pagaría en términos de reducción de la reproducción futura y la longevidad (Stearns, 1989). De esta manera, la mayor inversión energética en funciones reproductivas de las hembras en comparación con los machos de la cepa M de *D. buzzatii*, impediría el incremento de la longevidad en hembras dando como resultado la repuesta sexo-específica. Sin embargo, este dimorfismo sexual en la longevidad solo se observa en la cepa M y no en las cepas C y A (Fig. 5.1), por lo que la resistencia a aleloquímicos podría estar relacionada. En ese sentido, se ha reportado en hembras de *D. melanogaster* un compromiso entre la actividad reproductiva y la resistencia al stress. Mediante un tratamiento con metopreno, el cual estimula la producción de huevos, se observó una disminución en la resistencia a stress oxidativo e inanición (Salmon et al., 2001). Estos resultados se condicen con lo observado en *D. buzzatii*, ya que la resistencia adquirida de la cepa M tuvo un efecto negativo en la fecundidad de las hembras, lo que supone un compromiso entre ambos caracteres. De esta manera, si bien no se observaron diferencias de longevidad entre las hembras de las cepas de selección de *D. buzzatii* (Fig. 5.1), si se observó una menor fecundidad en la cepa M (Fig. 5.2). Por lo tanto, aunque la resistencia a aleloquímicos haya disminuido la fecundidad de las hembras en la cepa M, la energía invertida en reproducción sigue siendo mayor que en los machos

lo que conlleva un costo de la reproducción en la longevidad que se refleja en el dimorfismo sexual. Sin embargo, la ausencia de dimorfismo sexual en las cepas C y A se contradice con estas observaciones y con lo reportado en trabajos previos en esta especie, donde se observa mayor longevidad en machos (Sambucetti et al., 2005; Scannapieco et al., 2009). Además, al usarse individuos vírgenes, podemos descartar el costo en la longevidad de las hembras producto de la cópula, reportado en varias ocasiones en *Drosophila* (Chapman et al., 1995; Wigby & Chapman, 2005).

Por otro lado, la relación positiva entre la resistencia a un stress químico y la longevidad observada en los machos de la cepa M de *D. buzzatii* cuenta con antecedentes similares en cepas de *D. melanogaster* resistentes a los alcaloides del cactus columnar Saguaro (*Carnegiea gigantea*). En este caso, la selección a los aleloquímicos de este cactus incrementó la longevidad en comparación con las cepas control, además de aumentar la viabilidad y disminuir el tiempo de desarrollo (Fogleman, 2000). Si bien la composición alcaloidea del Saguaro y *T. terscheckiii* difiere, ya que el primero contiene alcaloides isoquinolínicos mientras que el segundo feniletilamínicos; los mecanismos de resistencia generados en las cepas de selección podrían guardar similitudes que la relacionen positivamente con la longevidad. En ese sentido, se ha observado en diferentes modelos como *Caenorhabditis elegans, Mus musculus* y *D. melanogaster* una relación positiva entre poblaciones longevas y la resistencia a diversos estresores externos (Kirkwood & Austad, 2000). Estos mecanismos, implicados en un incremento de la longevidad, estarían destinados a procesos de mantenimiento y reparación a nivel celular. De esta manera, se ha observado que el incremento de funciones como la reparación de ADN y la actividad enzimática antioxidante estaría relacionado con organismos más longevos (Kirkwood, 1989; Sohal et al., 1993). Estudios de transcriptómica en larvas de *D. buzzatii* han revelado que la cría en medios con presencia del extracto alcaloideo de *T. terscheckii* aumenta la expresión génica de dos glutatión-S-transferasas asociadas a la respuesta al stress oxidativo. Además, entre este par de genes se encuentra uno asociado a la respuesta al calor y otro asociado a la determinación de la esperanza de vida. En el mismo sentido, se observó un aumento de la expresión de una enzima antioxidante con actividad glutatión peroxidasa también asociada a la determinación de la esperanza de vida, así como a la respuesta a estimulo por daño de ADN (De Panis et al., 2016). De esta manera, la presencia de aleloquímicos de *T. terscheckii* en el medio de cría dispara

en *D. buzzatii* la expresión de genes involucrados en mecanismos relevantes para la determinación de la esperanza de vida. La respuesta plástica de estos genes en presencia de aleloquímicos de *T. terscheckii* los hace buenos candidatos a considerar como blancos de la selección en el proceso de adaptación de la cepa M de *D. buzzatii*. En ese sentido, a través de mecanismos como la asimilación genética (Waddington, 1953) o el efecto Baldwin (Baldwin, 1896), las respuestas plásticas pueden ser promotoras de cambios evolutivos (Crispo, 2007). En el caso de la asimilación genética, el nuevo óptimo adaptativo alcanzado en la respuesta plástica es luego fijado a nivel genético mientras que en el efecto Baldwin, si bien la respuesta plástica es adaptativa no es óptima por lo que es, al fin y al cabo, un cambio evolutivo el que permite alcanzar el óptimo adaptativo (Hoang et al., 2015). Trabajos previos desarrollados en *D. buzzatii* han vinculado respuestas plásticas en la longevidad con cambios evolutivos en este carácter. Cepas de selección tolerantes a altas temperaturas en *D. buzzatii* han mostrado una disminución en la capacidad de inducción de hormesis por shock térmico en la longevidad (Gomez et al., 2009). Además, se ha observado en cepas seleccionadas para una mayor longevidad de esta especie, una mayor tolerancia a altas temperaturas (Scannapieco et al., 2009). De esta manera, la respuesta plástica (hormesis) inducida por el shock térmico en la longevidad desaparece al seleccionar para mayor tolerancia al calor, carácter positivamente relacionado con la longevidad. Por lo tanto, teniendo en cuenta la respuesta plástica de *D. buzzatii* a los aleloquímicos de *T. terscheckii*, procesos similares a los anteriormente detallados podrían encontrarse implicados en la respuesta de la cepa M en la longevidad. Sin embargo, para una comprensión más acabada de las bases genéticas de la adaptación de las cepas de selección, serían necesarios análisis de secuenciación de las mismas.

Por otro lado, en *D. koepferae* se observó una mayor longevidad en las hembras de la cepa C que en las de las cepas M y A mientras que en los machos se observó una mayor longevidad en la cepa M que en la cepa C y A. Además, en las cepas C y A se observó una mayor longevidad en hembras que en machos mientras que no hubo diferencias entre sexos en la cepa M (Fig. 5.3). De esta manera, tanto en hembras como en machos, la cepa A, la cual respondió a la selección a altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* (Padró et al., 2018), no mostró mayores valores de longevidad que la cepa C siendo incluso menor en el caso de las hembras. Por lo tanto, a diferencia de lo observado en *D. buzzatii*, una mayor tolerancia a los aleloquímicos de

T. terscheckii no se relacionaría positivamente con la longevidad en *D. koepferae*. Esto, se contradice con lo esperado a partir de observaciones en diversos modelos biológicos, en las cuales la resistencia a estresores externos estaría positivamente relacionada con organismos más longevos (Kirkwood & Austad, 2000). Un ejemplo, es el aumento de longevidad en cepas de *D. melanogaster* resistentes a los aleloquímicos de Saguaro (Fogleman, 2000). En cuanto a la diferencia observada entre sexos, se observa una mayor longevidad en hembras en las cepas C y A mientras que no se observan diferencias entre sexos en la cepa M (Fig. 5.3). En ese sentido, si bien las hembras estudiadas son vírgenes, no se estaría observando un costo reproductivo en las mismas como resultado de la producción de huevos no fecundados. Estudios de longevidad realizados previamente en esta especie no fueron concluyentes en cuanto al dimorfismo sexual observándose machos más longevos en algunos casos (Sambucetii et al., 2005) y hembras más longevas en otros (Scannapieco et al., 2007). Por otro lado, en cuanto a la fecundidad, no se observaron diferencias entre cepas lo que indicaría que los regímenes selectivos no tuvieron efecto a nivel de este carácter (Fig. 5.4). Además, tomando los resultados de longevidad y fecundidad en conjunto, a diferencia de lo observado en *D. buzzatii*, no se observa una tendencia a un compromiso entre estos caracteres como es esperable según la teoría del soma desechable. Esto, se contradice con lo reportado previamente en poblaciones de esta especie, donde se ha observado un compromiso entre ambos caracteres (Sambucetii et al., 2005). Por lo tanto, la adaptación a altas concentraciones de aleloquímicos de *T. terscheckii* en *D. koepferae* no evidenció efectos predecibles según la teoría del soma desechable en la longevidad y la fecundidad.

Conclusiones generales

La evolución experimental estudia los cambios evolutivos en poblaciones artificiales o controladas como consecuencia de condiciones (ambientales, demográficas, genéticas o sociales) impuestas. La presión de selección en estos casos, actúa sobre cada carácter y gen de relevancia para el *fitness* bajo estas condiciones ambientales (Kawecki et al., 2012). Esto, hace posible el abordaje de preguntas de diversa índole, desde la comprensión del proceso de adaptación de las poblaciones a las condiciones impuestas y la evolución de caracteres correlacionados hasta, incluso, los compromisos asociados a estas adaptaciones.

La selección en medio de cría con concentraciones crecientes de aleloquímicos de *T. terscheckii* resultó en respuestas adaptativas especie específicas en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Mientras *D. buzzatii* optimizó caracteres estrechamente asociados al *fitness* (como la viabilidad larval y el tamaño alar) en concentraciones Moderadas de estos aleloquímicos, *D. koepferae* hizo lo propio en concentraciones más Altas de los mismos (Padró et al., 2018). En las cepas de selección estudiadas, se observó una respuesta adaptativa coherente con la descripta para las cepas parentales en el capítulo II. Esta respuesta específica en cada especie de *Drosophila* podría guardar relación con los patrones de uso de los hospedadores en la naturaleza y las potencialidades genéticas de cada especie de poder responder adaptativamente a una presión selectiva de tal magnitud. Además de las respuestas directas, el proceso adaptativo tuvo consecuencias identificables en ambas especies de *Drosophila* a nivel de ciertos caracteres como la conformación alar. Por lo tanto, en ambas especies se observó, en cierta medida, evolución correlacionada como consecuencia de la adaptación. Estas respuestas indirectas, a diferentes niveles del fenotipo, dan cuenta de lo integrativo y complejo del proceso adaptativo. Sin embargo, la presencia de costos en la performance en *D. buzzatii* y la respectiva ausencia de estos en *D. koepferae* ante el cambio ambiental es también un reflejo de la diferencia en el nivel de perturbación genética producto del proceso selectivo en cada especie, siendo esta mayor en *D. buzzatii* y dando lugar a compromisos a nivel genético en esta especie. En el mismo sentido, la tendencia observada en los niveles de AF y la respuesta en componentes del *fitness* adulto como la longevidad y la fecundidad, reflejan efectos más marcados en *D. buzzatii*.

Por lo tanto, aunque los cambios pudieron observarse en las cepas adaptadas de ambas especies de *Drosophila,* estos fueron más evidentes en *D. buzzatii*, observándose en todos los capítulos. Estas diferencias entre especies podrían estar relacionadas al hábito ecológico de cada una. De esta manera, la selección de *D. buzzatii* a concentraciones altas del clorénquima de *T. terscheckii* supuso un desafío evolutivo mayor dado su habitual uso de *Opuntia* como principal hospedador. Siendo además el uso de *Opuntia*, la condición ancestral del grupo *repleta* (Oliveira et al., 2012), se podría pensar en el proceso adaptativo de la cepa M de *D. buzzatii* como una versión simplificada de los saltos de hospedador de *Opuntia* a cactus columnar acontecidos en la historia de estos linajes. Por lo tanto, a partir de las respuestas observadas en esta cepa, se podría especular que las presiones ambientales ejercidas por un salto de hospedador afectarían de forma integral al organismo constituyendo, por lo tanto, una de las posibles causas de especiación por especialización ecológica en estas especies.

Bibliografía

Adams, D. C., Rohlf, F. J., & Slice, D. E. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution.' *Italian Journal of Zoology*, *71*(1), 5–16. https://doi.org/10.1080/11250000409356545

Agrawal, A. A. (2000). Host-Range Evolution: Adaptation And Trade-Offs in Fitness of Mites on Alternative Hosts. *Ecology*, *81*, 500–508.

Ahmad, S., Brattsten, L. B., Mullin, C. A., & Yu, S. J. (1986). Enzymes Involved in the Metabolism of Plant Allelochemicals. *En: Brattsten L.B., Ahmad S. (Eds) Molecular Aspects of Insect-Plant Associations. Springer, Boston, MA.*

Ali, J. G., & Agrawal, A. A. (2012). Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends in Plant Science*, *17*(5), 293–302. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.006

Anderson, E. F. (2001). The cactus family. *Timber Press (OR).*

Arya, G. H., Weber, A. L., Wang, P., Magwire, M. M., Serrano Negron, Y. L., Mackay, T. F. C., & Anholt, R. R. H. (2010). Natural variation, functional pleiotropy and transcriptional contexts of odorant binding protein genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *186*(4), 1475–1485. https://doi.org/10.1534/genetics.110.123166

Aubin-Horth, N., Deschênes, M., & Cloutier, S. (2012). Natural variation in the molecular stress network correlates with a behavioural syndrome. *Hormones and Behavior*, *61*(1), 140–146. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.11.008

Austad, S. N., & Fischer, K. E. (2016). Sex Differences in Lifespan. *Cell Metabolism*, *23*(6), 1022–1033. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.019

Baldwin, J. M. (1896). A new factor in evolution. *The American Naturalist*, *30*.

Barghi, N., Hermisson, J., & Schlötterer, C. (2020). Polygenic adaptation: a unifying framework to understand positive selection. *Nature Reviews Genetics*, *21*(12), 769–781. https://doi.org/10.1038/s41576-020-0250-z

Bernays, E., & Graham, M. (1988). On the Evolution of Host Specificity in Phytophagous Arthropods. *Ecology*, *69*.

Bock, K. W. (2016). The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans , insects and plants : Animal – plant arms-race and co-evolution. *Biochemical Pharmacology*, *99*, 11–17. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.001

Boyle, E. A., Li, Y. I., & Pritchard, J. K. (2017). An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. *Cell*, *169*(7), 1177–1186. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.038

Cabrera-Brandt, M. A., Fuentes-Contreras, E., & Figueroa, C. C. (2010). Differences in the Detoxification Metabolism between Two clonal Lineages of the Aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) Reared on Tobacco (*Nicotiana tabacum L.*). *Chilean Journal of Agricultural Research*, *70*(4), 567–575. https://doi.org/10.4067/s0718-58392010000400006

Cabrera, A. L. (1976). Regiones fitogeográficas argentinas. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Buenos Aires. ACME*.

Calla, B., Noble, K., Johnson, R. M., Walden, K. K. O., Schuler, M. A., Robertson, H. M., & Berenbaum, M. R. (2017). Cytochrome P450 diversification and hostplant utilization patterns in specialist and generalist moths: birth, death, and adaptation. *Molecular Ecology*, *26*(21), 6021–6035.

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*, 1275–1282. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.01078.x

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. https://doi.org/10.2985/026.019.0106

Carreira, V. P., Soto, I. M., Fanara, J. J., & Hasson, E. (2008). A study of wing morphology and fluctuating asymmetry in interspecific hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Genetica*, *133*(1), 1–11. https://doi.org/10.1007/s10709-007-9176-z

Carreira, V. P., Soto, I. M., Mensch, J., & Fanara, J. J. (2011). Genetic basis of wing morphogenesis in *Drosophila*: sexual dimorphism and non-allometric effects of shape variation. *BMC Developmental Biology*, *11*.

Carroll, M., Hanlon, A., Hanlon, T., Zangerl, A. R., & Berenbaum, M. R. (1997). Behavioral effects of carotenoid sequestration by the parsnip webworm, *Depressaria pastinacella*. *Journal of Chemical Ecology*, *23*(12), 2707–2719. https://doi.org/10.1023/A:1022506925620

Carson, H. L., & Wasserman, M. (1965). A Widespread Chromosomal Polymorphism in a Widespread Species, *Drosophila buzzatii*. *The American Naturalist*, *99*(905), 111–115. https://doi.org/10.1086/282356

Castrezana, S., & Markow, T. A. (2001). Arthropod diversity in necrotic tissue of three species of columnar cacti (Cactaceae). *Canadian Entomologist*, *133*(3), 301–309. https://doi.org/10.4039/Ent133301-3

Castro, A. A., & Garland, T. (2018). Evolution of hindlimb bone dimensions and muscle masses in house mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior. *Journal of Morphology*, *279*(6), 766–779. https://doi.org/10.1002/jmor.20809

Chapman, T., Liddle, L. F., Kalb, J. M., Wolfner, M. F., & Patridge, L. (1995). Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accesory gland products. *Nature*, *373*, 241–244.

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*(2), 342–353. https://doi.org/10.1111/bij.12036

Cortese, M. D., Norry, F. M., Piccinali, R., & Hasson, E. (2002). Direct and correlated responses to artificial selection on developmental time and wing length in *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, *56*(12), 2541–2547. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00179.x

Crispo, E. (2007). The Baldwin effect and genetic assimilation: Revisiting two mechanisms of evolutionary change mediated by phenotypic plasticity. *Evolution*, *61*(11), 2469–2479. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00203.x

Csilléry, K., Rodríguez-Verdugo, A., Rellstab, C., & Guillaume, F. (2018). Detecting the genomic signal of polygenic adaptation and the role of epistasis in evolution. *Molecular Ecology*, *27*(3), 606–612. https://doi.org/10.1111/mec.14499

Danielson, P. B., MacIntyre, R. J., & Fogleman, J. C. (1997). Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome P450s: Evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America1*, *94*, 10797–10802.

Danielson, P. B., Frank, M. R., & Fogleman, J. C. (1994). Comparison of larval and adult P-450 activity levels for alkaloid metabolism in desert *Drosophila*. *Journal of Chemical Ecology*, *20*(8), 1893–1906. https://doi.org/10.1007/BF02066231

Darwin, C. R. (1859). The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favored races in the struggle for life. *Modern Library, New York*.

De Panis, D. N., Padró, J., Furió-tarí, P., Tarazona, S., Carmona, P. S. M., Soto, I. M., & Dopazo, H. (2016). Transcriptome modulation during host shift is driven by secondary metabolites in desert *Drosophila*. *Molecular Ecology*, *25*, 4534–4550. https://doi.org/10.1111/mec.13785

Debat, V., Bégin, M., Legout, H., & David, J. R. (2003). Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution*, *57*(12), 2773–2784. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb01519.x

Després, L., David, J. P., & Gallet, C. (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology and Evolution*, *22*(6), 298–307. https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.02.010

Dryden, I. L., & Mardia, K. V. (1998). Statistical Shape Analysis. *Wiley, Chichester*.

Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution! *Evolution*, *18*, 586–608.

Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, *14*(1), 3–8. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x

Etges, W. J. (1993). Genetics of host-cactus response and life-history evolution among

ancestral and derived populations of cactophilic *Drosophila mojavensis*. *Evolution*, *47*(3), 750–767. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb01231.x

Etges, W. J. (2019). Evolutionary genomics of host plant adaptation: insights from *Drosophila*. *Current Opinion in Insect Science*, *36*, 96–102. https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.08.011

Etges, W. J., de Oliveira, C. C., Rajpurohit, S., & Gibbs, A. G. (2017). Effects of temperature on transcriptome and cuticular hydrocarbon expression in ecologically differentiated populations of desert *Drosophila*. *Ecology and Evolution*, *7*(2), 619–637. https://doi.org/10.1002/ece3.2653

Etges, W. J., De Oliveira, C., Rajpurohit, S., & Gibbs, A. G. (2016). Preadult life history variation determines adult transcriptome expression. *Molecular Ecology*, *25*(3), 741–763. https://doi.org/10.1111/mec.13505

Etges, W. J., Trotter, M. V., De Oliveira, C. C., Rajpurohit, S., Gibbs, A. G., & Tuljapurkar, S. (2015). Deciphering life history transcriptomes in different environments. *Molecular Ecology*, *24*(1), 151–179. https://doi.org/10.1111/mec.13017

Fanara, J. J., Soto, I. M., Lipko, P., & Hasson, E. (2016). First Record of *Drosophila buzzatii* (Patterson & Wheeler) (Diptera: Drosophilidae) Emerging from a Non-Cactus Host. *Neotropical Entomology*, *45*(3), 333–335. https://doi.org/10.1007/s13744-016-0373-2

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*(2), 173–190. https://doi.org/10.1023/A:1006636025623

Fellows, D. P., & Heed, W. B. (1972). Factors Affecting Host Plant Selection in Desert-Adapted Cactophilic *Drosophila*. *Ecology*, *53*(5), 850–858. https://doi.org/10.2307/1934300

Fernandez-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*.

Feyereisen, R. (2012). Insect CYP Genes and P450 Enzymes. En *Insect Molecular Biology and Biochemistry* (Vol. 450). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10008-X

Flatt, T. (2020). Life-history evolution and the genetics of fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *214*(1), 3–48. https://doi.org/10.1534/genetics.119.300160

Fogleman, J. C., & Abril, J. R. (1990). Ecological and Evolutionary Importance of Host Plant Chemistry. *En: Barker J.S.F., Starmer W.T., MacIntyre R.J. (Eds) Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila. Monographs in Evolutionary Biology. Springer, Boston, MA.*

Fogleman, J. C., & Heed, W. B. (1989). Columnar cacti and desert *Drosophila*, the chemistry of host plant specificity. *En: Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila. (Barker, J. S. F., Starmer, W. T. and MacIntyre, R. Eds.). New York, Plenum Press*.

Fogleman, J. C. (2000). Response of *Drosophila melanogaster* to selection for P450-mediated resistance to isoquinoline alkaloids. *Chemico-Biological Interactions*, *125*(2), 93–105. https://doi.org/10.1016/S0009-2797(99)00161-1

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.

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.

Foster, J. L. M., & Fogleman, J. C. (1993). Identification and ecology of bacterial communities associated with necroses of three cactus species. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(1), 1–6. https://doi.org/10.1128/aem.59.1.1-6.1993

Frank, M. R., & Fogleman, J. C. (1992). Involvement of cytochrome P450 in host-plant utilization by Sonoran Desert *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(December), 11998–12002.

Fry, J. D. (1990). Trade-Offs in Fitness on Different Hosts: Evidence from a Selection Experiment with a Phytophagous Mite. *The American Naturalist*, *136*.

Fuller, R. C., Baer, C. F., & Travis, J. (2005). How and when selection experiments might actually be useful. *Integrative and Comparative Biology*, *45*(3), 391–404. https://doi.org/10.1093/icb/45.3.391

Futuyma, D. J., & Agrawal, A. A. (2009). Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *19*, 18054–18061.

Futuyma, D. J., & Moreno, G. (1988). The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *19*, 207–233.

Garcia-Robledo, C., & Horvitz, C. C. (2011). Jack of all trades masters novel host plants : positive genetic correlations in specialist and generalist insect herbivores expanding their diets to novel hosts. *Journal of Ethnopharmacology*, *25*, 38–53. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02401.x

Garland, T., Zhao, M., & Saltzman, W. (2016). Hormones and the Evolution of Complex Traits: Insights from Artificial Selection on Behavior. *Integrative and Comparative Biology*, *56*(2), 207–224. https://doi.org/10.1093/icb/icw040

Gómez, F. H., Bertoli, C. I., Sambucetti, P., Scannapieco, A. C., & Norry, F. M. (2009). Heat-induced hormesis in longevity as correlated response to thermal-stress selection in *Drosophila buzzatii*. *Journal of Thermal Biology*, *34*(1), 17–22. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2008.09.003

Gower, J. C. (1975). Generalized procrustes analysis. *Psychometrika*, *40*, 33–51.

Graham, J. H., Freeman, D. C., & Emlen, J. M. (1994). Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. *En:Markow T.A. (Eds) Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications. Contemporary Issues in Genetics and Evolution, Vol 2. Springer, Dordrecht*.

Gravilov, L. A., & Gravilova, N. S. (2002). Evolutionary Theories of Aging and Longevity. *The Scientific World Journal*, *2*, 339–356.

Groth, B. R., Huang, Y., Monette, M. J., & Pool, J. E. (2018). Directional selection reduces developmental canalization against genetic and environmental

perturbations in *Drosophila* wings. *Evolution*, 1708–1715. https://doi.org/10.1111/evo.13550

Gullan, P. J., & Cranston, P. S. (2005). The Insects: An Outline Of Entomology. *Department of Entomology, University of California, Davis, USA*.

Harrison, X. A. (2015). A comparison of observation-level random effect and Beta-Binomial models for modelling overdispersion in Binomial data in ecology & evolution. *Peer J* 3: e1114. https://doi.org/10.7717/peerj.1114

Hasson, E., Naveira, H., & Fontdevila, A. (1992). The breeding sites of Argentinian cactophilic species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). *Rev Chil Hist Nat*, *65*(3), 319–326.

Hayden, E. J., Weikert, C., & Wagner, A. (2012). Directional Selection Causes Decanalization in a Group I Ribozyme. *PLoS ONE*, *7*(9).

Heed, W. B. (1997). A new cactus-feeding but soil-breeding species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, *79*, 649–654.

Heidel-Fischer, H. M., & Vogel, H. (2015). Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. *Current Opinion in Insect Science*, *8*, 8–14. https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.004

Helfrich-Förster, C. (2000). Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster* - Sex-specific differences suggest a different quality of activity. *Journal of Biological Rhythms*, *15*(2), 135–154. https://doi.org/10.1177/074873040001500208

Hill, W. G., & Caballero, A. (1992). Artificial selection experiments. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *23*(1), 287–310. https://doi.org/10.1146/annurev.es.23.110192.001443

Hill, W. G., & Mulder, H. A. (2010). Genetic analysis of environmental variation. *Genetics Research*, *92*(5–6), 381–395. https://doi.org/10.1017/S0016672310000546

Hiramatsu, L., & Garland, T. (2018). Mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior conserve more fat despite increased exercise. *Physiology and*

Behavior, *194*(January), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.04.010

Hoang, K., Matzkin, L., & Bono, J. M. (2015). Transcriptional variation associated with cactus host plant adaptation in *Drosophila mettleri* populations. *Insect Biochemistry*, *13*, 237–246.

Hodgson, E. (1983). The Significance of Cytochrome P-450 in Insects. *Insect Biochemistry*, *13*, 237–246.

Höllinger, I., Pennings, P. S., & Hermisson, J. (2019). Polygenic adaptation: From sweeps to subtle frequency shifts. *PLoS Genetics*, *15*(3), 1–26. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008035

Holzinger, F., & Wink, M. (1996). Mediation of cardiac glycoside insensitivity in the monarch butterfly (*Danaus plexippus*): Role of an amino acid substitution in the ouabain binding site of NA+,K + -ATPase. *Journal of Chemical Ecology*, *22*(10), 1921–1937. https://doi.org/10.1007/BF02028512

Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, *50*, 346–363.

Howe, G. A., & Herde, M. (2015). Interaction of plant defense compounds with the insect gut: New insights from genomic and molecular analyses. *Current Opinion in Insect Science*, *9*, 62–68. https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.004

Huey, R. B., Gilchrist, G. W., Carlson, M. L., Berrigan, D., & Serra, L. (2000). Rapid Evolution of a Geographic Cline in Size in an Introduced Fly. *Science*, *287*, 308–309.

Hurtado, J., & Hasson, E. (2013). Inter and intraspecific variation in female remating propensity in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Journal of Insect Physiology*, *59*(5), 569–576. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.03.007

Hurtado, J., Soto, E. M., Orellana, L., & Hasson, E. (2012). Mating success depends on rearing substrate in cactophilic *Drosophila*. *Evolutionary Biology*, *26*, 733–743. https://doi.org/10.1007/s10682-011-9529-z

Iglesias, P. P., Soto, E. M., Soto, I. M., Colines, B., & Hasson, E. (2018). The influence of developmental environment on courtship song in cactophilic *Drosophila*.

Journal of Evolutionary Biology, *31*, 957–967.

Jaenike, J. (1990). Host Specialization in Phytophagous Insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *21*, 243–273.

Kawecki, T. J., Lenski, R. E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., & Whitlock, M. C. (2012). Experimental evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, *27*(10), 547–560. https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.06.001

Ketterson, E. D., Atwell, J. W., & McGlothlin, J. W. (2009). Phenotypic integration and independence: Hormones, performance, and response to environmental change. *Integrative & Comparative Biology*, *49*, 365–379.

Kircher, T. J., Heed, W. B., Russell, J. S., & Grove, J. (1967). Senita cactus alkaloids: Their significance to Sonoran Desert *Drosophila* ecology. *Journal of Insect Physiology*, *3*, 1869–1874.

Kirkwood, T. B .L. (1989). DNA, mutations and aging. *Mutation Research/DNAging*, *219*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/0921-8734(89)90035-0

Kirkwood, T. B. L., & Holliday, R. (1979). The evolution of ageing and longevity. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, *205*(1161), 531–546. https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0083

Kirkwood, T. B. L., & Cremer, T. (1982). Cytogerontology since 1881: A reappraisal of August Weismann and a review of modern progress. *Human Genetics*, *60*(2), 101–121. https://doi.org/10.1007/BF00569695

Kirkwood, T. B. L., & Austad, S. N. (2000). Why do we age? *Nature*, *408*, 233–238.

Klingenberg, C. P. (2003). A developmental perspective on developmental instability: theory, models, and mechanisms. *En: Developmental Instability: Causes and Consequences (M. Polak, Ed), Pp. 14–34. Oxford University Press, Oxford*.

Krieger, E. D., Feeny, P. P., & Wilkinson, C. F. (1971). Detoxication Enzymes in the Guts of Caterpillars: An Evolutionary Answer to Plant Defenses? *Science*, *172*, 579–581.

Lack, J. B., Monette, M. J., Johanning, E. J., Sprengelmeyer, Q. D., & Pool, J. E. (2016). Decanalization of wing development accompanied the evolution of large

wings in high-altitude *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*, 1014–1019.

Lanno, S. M., Gregory, S. M., Shimshak, S. J., Alverson, M. K., Chiu, K., Feil, A. L., Findley, M. G., Forman, T. E., Gordon, J. T., Ho, J., Krupp, J. L., Lam, I., Lane, J., Linde, S. C., Morse, A. E., Rusk, S., Ryan, R., Saniee, A., Sheth, R. B., … Coolon, J. D. (2017). Transcriptomic analysis of octanoic acid response in *Drosophila sechellia* using RNA-sequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *7*(12), 3867–3873. https://doi.org/10.1534/g3.117.300297

Lanno, S. M., Shimshak, S. J., Peyser, R. D., Linde, S. C., & Coolon, J. D. (2019). Investigating the role of Osiris genes in *Drosophila sechellia* larval resistance to a host plant toxin. *Ecology and Evolution*, *9*(4), 1922–1933. https://doi.org/10.1002/ece3.4885

Le Bourg, E. (2001). A mini-review of the evolutionary theories of aging. *Demographic Research*, *4*(June), 1–28. https://doi.org/10.4054/demres.2001.4.1

Leibowitz, A., Santos, M., & Fontdevila, A. (1995). Heritability and Selection on Body Size in a Natural Population of *Drosophila buzzatii*. *Genetics*, *141*, 181–189.

Lens, L., Van Dongen, S., Kark, S., & Matthysen, E. (2002). Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biological Reviews*, *77*, 27–38.

Lindstrom, M. J., & Bates, D. M. (1990). Nonlinear Mixed Effects Models for Repeated Measures Data. *Biometrics*, *46*, 673–687.

Lorenzini, A., Stamato, T., & Sell, C. (2011). The disposable soma theory revisited: Time as a resource in the theories of aging. *Cell Cycle*, *10*(22), 3853–3856. https://doi.org/10.4161/cc.10.22.18302

Malick, L. E., & Kidwell, J. F. (1966). The effect of mating status, sex and genotype on longevity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *54*(1), 203–209. https://doi.org/10.1093/genetics/54.1.203

Manfrin, M. H., & Sene, F. M. (2006). Cactophilic *Drosophila* in South America: A model for evolutionary studies. *Genetica*, *126*(1–2), 57–75. https://doi.org/10.1007/s10709-005-1432-5

Markow, T. A., & O'Grady, P. (2008). Reproductive ecology of *Drosophila*. *Functional Ecology*, *22*(5), 747–759. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01457.x

Matzkin, L. M. (2012). Population transcriptomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. *Molecular Ecology*, *21*(10), 2428–2439. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05549.x

Matzkin, L. M. (2014). Ecological genomics of host shifts in *Drosophila mojavensis*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *781*, 233–247. https://doi.org/10.1007/978-94-7-7347-9_12

Mauro, A. A., & Ghalambor, C. K. (2020). Trade-offs, Pleiotropy, and Shared Molecular Pathways: A Unified View of Constraints on Adaptation. *Integrative & Comparative Biology*, *60*, 332–347.

Maynard Smith, J., Burian, R., Kauffman, S., Alberch, P., Campbell, J., Goodwin, B., Lande, R., Raup, D., & Wolpert, L. (1985). Developmental Constraints and Evolution: A Perspective from the Mountain Lake Conference on Development and Evolution. *The Quarterly Review of Biology*, *60*.

McArthur, R. H. (1972). Geographical Ecology: Patterns in the Distribution of Species. *Princeton University Press, Princeton, NJ*.

Medawar, P. B. (1946). Old age and natural death. *Modern Q*, *1*, 30–56.

Medawar, P. B. (1952). An Unsolved Problem of Biology. *H. K. Lewis, London*.

Mensch, J., Lavagnino, N., Carreira, V. P., Massaldi, A., Hasson, E., & Fanara, J. J. (2008). Identifying candidate genes affecting developmental time in *Drosophila melanogaster*: pervasive pleiotropy and gene-by-environment interaction. *BMC Developmental Biology*, *8*.

Meyer, B. N., & McLaughlin. (1980). Cactus alkaloids. XLI. Candicine from *Trichocereus pasacana*. *Planta Medica*, *38*, 91–92.

Meyer, J. M., & Fogleman, J. C. (1987). Significance of saguaro cactus alkaloids in ecology of *Drosophila mettleri*, a soil-breeding, cactophilic drosophilid. *Journal of Chemical Ecology*, *13*, 2069–2081.

Mitteroecker, P., Gunz, P., Windhager, S., & Schaefer, K. (2013). A brief review of

shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 1–8. https://doi.org/10.4404/hystrix-24.1-6369

Mongiardino Koch, N., Hasson, E., & Soto, I. (2012). Diferencias en la melanización y el patrón de pigmentación alar en *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) bajo estrés químico. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, *71*(1–2), 87–97.

Mongiardino Koch, N., Soto, I. M., Galvagno, M., Hasson, E., & Iannone, L. (2015). Biodiversity of cactophilic microorganisms in western Argentina: Community structure and species composition in the necroses of two sympatric cactus hosts. *Fungal Ecology*, *13*, 167–180. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.10.001

Moore, L. V., & Scudder, G. G. E. (1986). Ouabain-resistant Na,K-ATPases and cardenolide tolerance in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Journal of Insect Physiology*, *32*(1), 27–33. https://doi.org/10.1016/0022-1910(86)90154-X

Muñoz-Muñoz, F., Carreira, V. P., Martinez-Abadias, N., Ortiz, V., González-José, R., & Soto, I. M. (2016). *Drosophila* wing modularity revisited through a quantitative genetic approach. *Evolution*, *70*, 1530–1541.

Nelson, D. R., & Strobel, H. W. (1987). Evolution of Cytochrome P-450 Proteins1. *Biology and Evolution*, *4*(6), 572–593.

Norry, F. M., Sambucetti, P., Scannapieco, A. C., & Loeschcke, V. (2006). Altitudinal patterns for longevity, fecundity and senescence in *Drosophila buzzatii*. *Genetica*, *128*(1–3), 81–93. https://doi.org/10.1007/s10709-005-5537-7

Norry, F. M., & Loeschcke, V. (2003). Heat-induced expression of a molecular chaperone decreases by selecting for long-lived individuals. *Experimental Gerontology*, *38*(6), 673–681. https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00057-3

O'Grady, P. M., & DeSalle, R. (2018). Phylogeny of the genus *Drosophila*. *Genetics*, *209*(1), 1–25. https://doi.org/10.1534/genetics.117.300583

Ogunbodede, O., Mccombs, D., Trout, K., Daley, P., & Terry, M. (2010). New mescaline concentrations from 14 taxa / cultivars of *Echinopsis* spp . (Cactaceae) (" San Pedro ") and their relevance to shamanic practice. *Journal of*

Ethnopharmacology, *131*, 356–362. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.021

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*(3), 533–544. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.012

Ordaz, C., Ferrigni, N. R., & McLaughlin, J. L. (1983). Dehydroheliamine, a Trace Alkaloid From The Saguaro *Carnegiea gigantea* (Cactaceae). *Phytochemistry*, *22*, 2101–2102.

Ottaviano, O., & Scapini, F. (2010). Can fluctuating asymmetry in *Talitrus saltator* (montagu, 1808) (crustacea, amphipoda) populations be used as a bioindicator of stress on sandy beach ecosystems? *Oceanologia*, *52*(2), 259–280. https://doi.org/10.5697/oc.52-2.259

Padró, J. (2016). Selección artificial para la resistencia a alcaloides en especies del género *Drosophila*: Respuestas directas, correlacionadas e implicancias en los modelos de especialización ecológica. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires*.

Padró, J., Carreira, V., Corio, C., Hasson, E., & Soto, I. M. (2014). Host alkaloids differentially affect developmental stability and wing vein canalization in cactophilic *Drosophila buzzatii*. *Journal of Evolutionary Biology*, *27*(12), 2781–2797. https://doi.org/10.1111/jeb.12537

Padró, J., De Panis, D. N., Vrdoljak, J., Milla Carmona, P., Colines, B., Hasson, E., & Soto, I. M. (2018). Experimental Evolution of Alkaloid Tolerance in Sibling *Drosophila* Species with Different Degrees of Specialization. *Journal of Evolutionary Biology*, *45*, 170–181.

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.

Padró, J., Vrdoljak, J., Milla Carmona, P., & Soto, I. M. (2019). Divergent patterns of correlated evolution in primary and secondary sexual traits of cactophilic *Drosophila*. *Evolutionary Ecology*, *33*, 71–87.

Palmer, A. R. (1994). Fluctuating asymmetry analyses: a primer. *En: Markow, T.A. (Ed.), Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*, 335–364.

Palmer, A. R., & Strobeck, C. (1986). Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *17*, 391–421.

Palmer, A. R., & Strobeck, C. (1992). Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: Implications of non-normal distributions and power of statistical test. *Acta Zoologica Fennica*, *191*, 57–72.

Panini, M., Manicardi, G. C., Moores, G. D., & Mazzoni, E. (2016). An overview of the main pathways of metabolic resistance in insects. *Invertebrate Survival Journal*, *13*, 326–335.

Patridge, L., & Fowler, K. (1993). Responses and Correlated Responses to Artificial Selection on Thorax Length in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, *47*, 213–226.

Patridge, L., & Mangel, M. (1999). Messages from mortality: the evolution of death rates in the old. *Trends in Ecology & Evolution*, *14*, 438–442.

Pélabon, C., Hansen, T. F., Carter, A. J. R., & Houle, D. (2010). Evolution of Variation and Variability Under Fluctuating, Stabilizing, and Disruptive Selection. *Evolution*, *64*, 1912–1925.

Prado, D. E., & Gibbs, P. E. (1993). Patterns of Species Distributions in the Dry Seasonal Forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, *80*(4), 902. https://doi.org/10.2307/2399937

Pritchard, J. K., & Di Rienzo, A. (2010). Adaptation - Not by sweeps alone. *Nature Reviews Genetics*, *11*(10), 665–667. https://doi.org/10.1038/nrg2880

Pritchard, J. K., Pickrell, J. K., & Coop, G. (2010). The Genetics of Human Adaptation: Hard Sweeps, Soft Sweeps, and Polygenic Adaptation. *Current Biology*, *20*(4), R208–R215. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.055

Quipildor, V. B., Kitzberger, T., Maria, P. O., & Premoli, A. C. (2018). Regional climate oscillations and local topography shape genetic polymorphisms and distribution of the giant columnar cactus *Echinopsis terscheckii* in drylands of the tropical Andes. *Journal of Biogeography*, *45*, 116–126.

https://doi.org/10.1111/jbi.13106

Rajpurohit, S., Oliveira, C. C., Etges, W. J., & Gibbs, A. G. (2013). Functional genomic and phenotypic responses to desiccation in natural populations of a desert drosophilid. *Molecular Ecology*, *22*(10), 2698–2715. https://doi.org/10.1111/mec.12289

Rane, R. V., Clarke, D. F., Pearce, S. L., Zhang, G., Hoffmann, A. A., & Oakeshott, J. G. (2019). Detoxification Genes Differ between Cactus-, Fruit-, and Flower-Feeding *Drosophila*. *Journal of Heredity*, *110*(1), 80–91. https://doi.org/10.1093/jhered/esy058

Rane, R. V., Ghodke, A. B., Hoffmann, A. A., Edwards, O. R., Walsh, T. K., & Oakeshott, J. G. (2019). Detoxifying enzyme complements and host use phenotypes in 160 insect species. *Current Opinion in Insect Science*, *31*, 131–138. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.12.008

Remold, S. (2012). Understanding specialism when the jack of all trades can be the master of all. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*, 4861–4869.

Reti, L., & Castrillón, J. A. (1951). Cactus Alkaloids. I. *Trichocereus terscheckii* (Parmentier) Britton and Rose. *Journal of the American Chemical Society*, *73*, 1767–1769.

Rohlf, F. J. (2015). TpsDig, Ver. 2.22. Ecology and Evolution. *SUNY at Stony Brook*.

Rohlf, F. J.. (1999). Shape Statistics: Procrustes Superimpositions and Tangent Spaces. *Journal of Classification*, *16*, 197–223.

Rohlf, F. J., & Marcus, L. F. (1993). A revolution in Morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, *8*(4), 129–132.

Rose, M. R. (1991). Evolutionary Biology of Ageing. *(Oxford Univ. Press, New York)*.

Rose, M. R. (1999). Genetics of aging in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, *34*(5), 577–585. https://doi.org/10.1016/S0531-5565(99)00042-X

Ruiz, A., & Wasserman, M. (1993). Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity*, *70*(6), 582–596.

https://doi.org/10.1038/hdy.1993.85

Salmon, A. B., Marx, D. B., & Harshman, L. G. (2001). A Cost of Reproduction in *Drosophila melanogaster*: Stress Susceptibility. *Evolution*, *55*, 1600–1608.

Sambucetti, P., Sørensen, J. G., Loeschcke, V., & Norry, F. M. (2005). Variation in senescence and associated traits between sympatric cactophilic sibling species of *Drosophila*. *Evolutionary Ecology Research*, *7*(6), 915–930.

Santos, M., Ruiz, A., Barbadilla, A., Quezada-Diaz, J. E., Hasson, E., & Fontdevila, A. (1988). The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. Xiv. Larger flies mate more often in nature. *Heredity*, *61*(2), 255–262. https://doi.org/10.1038/hdy.1988.113

Santos, M., Ruiz, A., Quezada-diaz, J. E., Barbadilla, A., & Fontdevila, A. (1992). The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XX . Positive phenotypic covariance between field adult fitness components and body size. *Journal of Evolutionary Biology*, *5*, 403–422.

Scannapieco, A. C., Sambucetti, P., & Norry, F. M. (2009). Direct and correlated responses to selection for longevity in *Drosophila buzzatii*. *Biological Journal of the Linnean Society*, *97*, 154–159. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00948.x

Scannapieco, A. C., Sørensen, J. G., Loeschcke, V., & Norry, F. M. (2007). Heat-induced hormesis in longevity of two sibling *Drosophila* species. *Biogerontology*, *8*(3), 315–325. https://doi.org/10.1007/s10522-006-9075-1

Scheiner, S. M. (2002). Selection experiments and the study of phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology*, *15*(6), 889–898. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00468.x

Schlumpberger, B. O., & Renner, S. S. (2012). Molecular phylogenetics of *Echinopsis* (Cactaceae): Polyphyly at all levels and convergent evolution of pollination modes and growth forms. *American Journal of Botany*, *99*, 889–898.

Schuler, M. A. (2011). The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiology*, *1814*, 36–45.

Schuler, M. A. (1996). The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect

interactions. *Plant Physiology*, *112*, 1411–1419.

Scott, J. G., Liu, N., & Wen, Z. (1998). Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, *121*, 147–155.

Scott, J. G., & Wen, Z. (2001). Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science*, *57*.

Sella, G., & Barton, N. H. (2019). Thinking about the Evolution of Complex Traits in the Era of Genome-Wide Association Studies. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *20*, 461–493. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022316

Sgrò, C. M., & Hoffmann, A. A. (2004). Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity*, *93*(3), 241–248. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800532

Shirangi, T. R., Stern, D. L., & Truman, J. W. (2013). Motor Control of *Drosophila* Courtship Song. *Cell Reports*, *5*, 678–686.

Smith, G., Fang, Y., Xuan Liu, J. K., Cossins, A. R., Oliveira, C. C., & Etges, W. J. (2013). Transcriptome-Wide Expression Variation Associated With Environmental Plasticity and Mating Succes in Cactophilic *Drosophila mojavensis*. *Evolution*, *67*, 1950–1963.

Sohal, R. S., Ku, H.-H., & Agarwal, S. (1993). Biochemical Correlates of Longevity in Two Closely Related Rodent Species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *196*, 7–11.

Sørensen, J. G., Sarup, P., Kristensen, T. N., & Loeschcke, V. (2008). Temperature-induced hormesis in *Drosophila*. *Mild Stress and Healthy Aging: Applying Hormesis in Aging Research and Interventions*, 65–79. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6869-0_5

Soto, E. M., Soto, I. M., Carreira, V. P., Fanara, J. J., & Hasson, E. (2008). Host-related life history traits in interspecific hybrids of cactophilic *Drosophila*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *126*(1), 18–27. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00631.x

Soto, E. M., Goenaga, J., Hurtado, J. P., & Hasson, E. (2012). Oviposition and performance in natural hosts in cactophilic *Drosophila*. *Evolutionary Ecology*, *26*(4), 975–990. https://doi.org/10.1007/s10682-011-9531-5

Soto, E. M., Nicolás Mongiardino Koch, Carmona, P. M., Soto, I. M., & Hasson, E. (2017). Cactus-fungi interactions mediate host preference in cactophilic *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, *122*(3), 539–548. https://doi.org/10.1093/biolinnean/blx083

Soto, I. M., Carreira, V. P., Corio, C., Padró, J., Soto, E. M., & Hasson, E. (2014). Differences in Tolerance to Host Cactus Alkaloids in *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii*. *PLoS ONE*, *9*.

Soto, I. M., Carreira, V. P., Corio, C., Soto, E. M., & Hasson, E. (2010). Host use and developmental instability in the cactophilic sibling species *Drosophila gouveai* and *D. antonietae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *137*, 165–175.

Soto (b), I. M., Carreira, V. P., Soto, E. M., & Hasson, E. (2008). Wing morphology and fluctuating asymmetry depend on the host plant in cactophilic *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, *21*, 598–609. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01474.x

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*, 1–11. https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-77

Soto (a), 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.

Speakman, J. R., & Król, E. (2010). The heat dissipation limit theory and evolution of life histories in endotherms-time to dispose of the disposable soma theory? *Integrative and Comparative Biology*, *50*(5), 793–807. https://doi.org/10.1093/icb/icq049

Starmer, W. T., Lachance, M., Phaff, H. J., & Heed, W. B. (1990). The Biogeography of Yeasts Associated with Decaying Cactus Tissue in North America, the Caribbean, and Northern Venezuela. *BMC Evolutionary Biology*, *24*, 235–296.

Stearns, S. C. (1989). Trade-Offs in Life-History Evolution. *Functional Ecology*, *3*, 259–268.

Stearns, S. C. (2000). Life history evolution: Successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften*, *87*(11), 476–486. https://doi.org/10.1007/s001140050763

Strauss, A. S., Wang, D., Stock, M., Gretscher, R. R., Groth, M., Boland, W., & Burse, A. (2014). Tissue-specific transcript profiling for ABC transporters in the sequestering larvae of the phytophagous leaf beetle *Chrysomela populi*. *PLoS ONE*, *9*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098637

Throckmorton, L. H. (1975). The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. *En Handbook of Genetics, King RC (Ed). Plenum Publishing Corporation, New York, USA*, 421–469.

Trotta, V., Calboli, F. C. F., Ziosi, M., Guerra, D., Pezzoli, M. C., David, J. R., & Cavicchi, S. (2006). Thermal plasticity in *Drosophila melanogaster*: A comparison of geographic populations. *BMC Evolutionary Biology*, *6*.

Trout, K. (2014). Cactus chemistry by species. *Http://Sacredcacti.Com*.

Van Valen, L. (1962). A Study of Fluctuating Asymmetry. *Evolution*, *16*, 125–142.

Vasić, V., Momić, T., Petković, M., & Krstić, D. (2008). Na+,K+-ATPase as the target enzyme for organic and inorganic compounds. *Sensors*, *8*(12), 8321–8360. https://doi.org/10.3390/s8128321

Waddington, C. H. (1942). Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters. *Nature*, 563–565.

Waddington, C. H. (1953). Genetic Assimilation of an Acquired Character. *Evolution*, *7*, 118–126.

Wigby, S., & Chapman, T. (2005). Sex Peptide Causes Mating Costs in Female *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, *15*, 316–321.

Williams, G. C. (1957). Pleiotropy , Natural Selection , and the Evolution of Senescence. *Evolution*, *11*(4), 398–411.

Williams, G. C. (1966). Natural Selection, the Costs of Reproduction, and a Refinement of Lack's Principle. *The American Naturalist*, *100*.

Wolf, L. L., Starmer, W. T., Polak, M., & Barker, J. S. F. (2000). Genetic architecture of a wing size measure in *Drosophila hibisci* from two populations in eastern Australia. *Heredity*, *85*(January), 521–529.

Yassin, A., Debat, V., Bastide, H., Gidaszewski, N., David, J. R., & Pool, J. E. (2016). Recurrent specialization on a toxic fruit in an island *Drosophila* population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(17), 4771–4776. https://doi.org/10.1073/pnas.1522559113

Zunjarrao, S. S., Tellis, M. B., Joshi, S. N., & Joshi, R. S. (2020). Plant-Insect Interaction: The Saga of Molecular Coevolution. *En: Mérillon JM., Ramawat K. (eds) Co-Evolution of Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham.* https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_42

Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., & Saveliev, A. A. (2009). GLMM and GAMM. *En: Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R. Statistics for Biology and Health. Springer, New York, NY*.

Zwaan, B., Bijlsma, R., & Hoekstra, R. E. (1995). Artificial Selection For Developmental Time In *Drosophila melanogaster* In Relation To The Evolution Of Aging: Direct And Correlated Responses. *Evolution*, *49*.