



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Evolución experimental y análisis de QTL para el
éxito de apareamiento en condiciones de alta
temperatura en el modelo *Drosophila*.**

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

Lic. Leonel Daniel Stazione

Director de Tesis: Dr. Fabián Marcelo Norry

Co-director de Tesis: Dr. Pablo Daniel Sambucetti

Consejero de Estudios: Dr. Juan César Vilardi

Lugar de Trabajo: Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, e Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires, CONICET (IEGEB), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Buenos Aires, 2020.

Evolución experimental y análisis de QTL para el éxito de apareamiento en condiciones de alta temperatura en el modelo *Drosophila*.

Resumen

El estrés térmico puede afectar la reproducción y supervivencia de pequeños ectotermos tales como insectos.

Se investigó la capacidad de apareamiento de *Drosophila* como un insecto modelo en a elevada temperatura. Primero, se estudió dicho carácter en *Drosophila buzzatii* mediante selección artificial, evaluando respuestas directas y correlacionadas en otros caracteres incluyendo fecundidad, longevidad y resistencia al coma por calor (RCC) y frío (RCF). Segundo, se realizó un mapeo de loci de carácter cuantitativo (QTL) en *D. melanogaster* para latencia del cortejo (T1), tiempo total de cópula (T2) y éxito de apareamiento (T3).

El éxito de apareamiento en elevada temperatura respondió exitosamente a la selección, redujo RCF y aumentó RCC. La longevidad se redujo y la fecundidad incrementó. Se identificaron siete, seis y cinco QTL para T1, T2 y T3, respectivamente. Algunos QTL co-localizaron entre los caracteres. Se identificaron correlaciones genéticas negativas de T1 y T2 con T3 y positiva de T1 con T2. Se identificó que T2 está negativamente asociado al nivel de expresión del gen *hsc70-3*, como también lo está T3 con otros genes (*Catsup*, *Dcd* y *Trap1*).

El éxito de apareamiento en alta temperatura es un blanco de selección térmica y su evolución puede influenciar la reproducción, la longevidad y la termotolerancia al frío y al

calor. Los QTLs del éxito de apareamiento co-localizan parcialmente con QTL de termotolerancia identificados previamente, sugiriendo que el éxito del apareamiento en alta temperatura depende de múltiples genes. Este estudio indica que la evolución de la reproducción en elevada temperatura no es independiente de la termotolerancia al calor y frío en insectos pequeños como *Drosophila*.

Palabras clave: *Drosophila*, selección artificial, apareamiento, loci de carácter cuantitativo (QTL), estrés térmico, longevidad, fecundidad, termotolerancia.

Experimental evolution and QTL analysis for mating success under high temperature conditions in the *Drosophila* model.

Abstract

Thermal stress can affect both reproduction and survival of small Ectotherms like insects.

Mating ability was investigated in *Drosophila* as a model insect at elevated temperature. First, mating success was studied with artificial selection in *Drosophila buzzatii*, testing direct and correlated responses in other traits including fecundity, longevity, and knockdown resistance for heat (KRH) and cold (KRC). Second, a QTL mapping was carried out in *Drosophila melanogaster* for courtship latency (T1), copulation extent (T2) and mating success (T3).

Mating at elevated temperature successfully responded to selection, reduced KRC and increased KRH. Longevity was reduced and fecundity increased. Seven, six and five QTL were identified for T1, T2 and T3, respectively. Some QTL co-localized across traits. Negative genetic correlations were identified for T1 with T2 and T3 whereas T1 and T2 were positively correlated. T2 was found to be negatively associated to expression level of the candidate gene *hsc70-3*, as well as T3 was negatively associated to expression data for *Catsup*, *Dcd* y *Trap1*.

Mating success at high temperature is a target of thermal selection and its evolution can influence reproduction, longevity and heat and cold thermotolerance. QTLs for mating success at high temperature partially co-localize with thermotolerance QTL previously

identified, suggesting that mating success at high temperatures depends on multiple loci. This study indicates that evolution of reproduction at high temperatures is not independent of heat and cold tolerance in small insects like *Drosophila*.

Key words: *Drosophila*, artificial selection, mating, quantitative trait loci (QTL), thermal stress, longevity, fecundity, thermotolerance.

Agradecimientos

Este trabajo es el resultado de muchos años de esfuerzo y compromiso con la labor diaria dentro y fuera del laboratorio. Quiero agradecerles en primer lugar y especialmente a mis directores, Pablo y Fabián por haberme dado la posibilidad de ingresar al laboratorio G.E.R.E.S y desarrollar esta tesis. No me queda más que agradecerles el apoyo, acompañamiento y disponibilidad en los momentos en los que necesité de su ayuda. Les agradezco la confianza depositada en mi trabajo y, sobre todo, la libertad brindada desde el comienzo para llevar a la práctica mis ideas.

Quiero agradecer también, al resto de mis compañeros de laboratorio Federico y Miguel, por los momentos compartidos y el aporte a mi formación.

Quiero darle las gracias a la Universidad de Buenos Aires por haberme dado la posibilidad de formarme como biólogo, por brindarme un lugar donde trabajar e investigar y por acompañar, complementariamente mi formación como persona.

Durante estos años nada de lo conseguido hubiese sido posible sin el apoyo de toda mi familia. Quiero agradecer a mis hermanos y hermanas, por ser parte de este proceso.

Agradecerle a mi abuela por creer incondicionalmente en mí.

A Camila, por representar todo lo que necesito.

En mis agradecimientos haré una mención más que especial para mis padres. Ellos son y serán la razón de mis logros. Gracias a ambos por sus esfuerzos diarios durante toda mi formación. Por enseñarme, aconsejarme y acompañarme siempre.

Este trabajo fue financiado por subsidios de CONICET (PIP11220130100083CO a FN), Universidad de Buenos Aires (a FMN) y Agencia Nacional de Promoción Científica y

Tecnológica (PICT-2015-1658 a Pablo Sambucetti y PICT-2017-1426 a Fabiàn Norry, Pablo Sambucetti y Federico Gomez).

La ciencia, mi muchacho, está compuesta de errores, pero son errores que es útil cometer, porque conducen poco a poco a la verdad.

(Viaje al Centro de la Tierra)

Julio Verne.

Índice

Capítulo 1: Introducción general	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivo general	6
1.3 Modelo de estudio	6
1.4 Selección artificial como modelo de evolución experimental	9
1.5 Estrés térmico	11
Capítulo 2: respuestas directas y correlacionadas al régimen de selección artificial para el éxito de apareamiento en alta temperatura.	13
2.1 Introducción	13
2.2 Objetivos	15
2.3 Hipótesis	15
2.4 Materiales y métodos	16
2.4.1 <i>Población base</i>	16
2.4.2 <i>Régimen de selección artificial</i>	18
2.4.3 <i>Medición del éxito en el apareamiento:</i>	19
2.4.4 <i>Medición de RCC</i>	21
2.4.5 <i>Medición de RCF</i>	23
2.5 Resultados	24
2.5.1 <i>Respuesta directa</i>	24
2.5.2 <i>Respuesta correlacionada, caracteres de termotolerancia</i>	28
2.6 Discusión	31
Capítulo 3: Fecundidad y Longevidad como caracteres correlacionados al éxito de apareamiento en alta temperatura.	37
3.1 Introducción	37
3.2 Objetivos	41
3.3 Hipótesis	41
3.4 Materiales y métodos	42
3.4.1 <i>Longevidad</i>	42
3.4.2 <i>Fecundidad</i>	44
3.5 Resultados	45

3.6 Discusión	55
Capítulo 4: Análisis de caracteres cuantitativo para el apareamiento de <i>Drosophila melanogaster</i> en alta temperatura.	60
4.1 Introducción.....	60
4.2 Objetivos	64
4.3 Hipótesis	64
4.4 Materiales y métodos	65
4.4.1 Origen y construcción de las líneas recombinantes endocriadas (RIL).....	65
4.4.2 Medición del éxito de apareamiento en las RIL.....	66
4.5 Resultados	68
4.5.1 Inicio de cópula (T1)	68
4.5.2 Tiempo de cópula (T2).....	72
4.5.3 Frecuencia de éxito de apareamiento (T3).....	76
4.5.4 Correlación de caracteres.....	80
4.6 Discusión	85
Capítulo 5: Mapeo de QTL y genes candidatos para el éxito en el apareamiento en alta temperatura en <i>Drosophila melanogaster</i>.	92
5.1 Introducción.....	92
5.2 Objetivos	95
5.3 Hipótesis	95
5.4 Materiales y métodos	96
5.4.1 Líneas RIL-SH2 y RIL-D48	96
5.4.2 Mapeo de QTL	98
5.4.3 Análisis de nivel de expresión de algunos genes candidatos	99
5.4.4 Análisis de correlación.....	101
5.5 Resultados	102
Niveles de expresión de algunos genes candidatos	108
5.6 Discusión	111
Conclusión General	119
Anexo	152

Capítulo 1: Introducción general

1.1 Introducción

El surgimiento de la era industrial trajo consigo muchos cambios. Uno de los más marcados fue el aumento en la utilización de recursos provocando grandes cambios en los sistemas biofísicos. Las sostenidas emisiones de CO₂ como producto de la explotación de la energía fósil por parte de las industrias y los transportes provocó, y se espera que siga provocando, serios incrementos en la temperatura media ambiental a lo largo de todo el planeta (IPCC 2014; 2018).

El incremento registrado en las temperaturas globales puede afectar la reproducción, abundancia, distribución y supervivencia de muchas especies animales y vegetales en los ambientes naturales contemporáneos (Hoffmann & Sgrò, 2011; Franks & Hoffmann, 2012, Walsh et al., 2019). Sin embargo, no todas las especies poseen las mismas capacidades para hacer frente a las condiciones ambientales cambiantes. Algunas especies pueden escapar de los ambientes de estrés moviéndose hacia ambientes benignos, mientras que otras tantas tienen limitaciones en su capacidad de dispersión e incluso poseen estadios inmóviles en sus ciclos de vida. Por ejemplo, las poblaciones de algunos insectos holometábolos pequeños, necesariamente deben desarrollar estrategias de adaptación “*in situ*” a las condiciones ambientales fluctuantes para evitar la extinción (Hoffmann & Sgrò, 2011; Kingsolver et al., 2011).

La adaptación al cambio climático no solo requiere que los organismos enfrenten las altas temperaturas. Las fluctuaciones térmicas abruptas y los aumentos previstos de la temperatura media global requerirán que los animales funcionen en un rango más amplio de

condiciones térmicas. Todos los animales poseen un rango específico de temperatura en el cual pueden sobrevivir y reproducirse óptimamente llevando a cabo todos los procesos celulares que permitan el mantenimiento del metabolismo. Cualquier incremento en la temperatura superior a cierto nivel crítico obliga a las poblaciones a adaptarse a dicho estrés para evitar la extinción (Kellermann et al., 2012, Sales et al., 2018). Los límites fisiológicos tolerados particularmente por cada población determinan la sensibilidad de los organismos frente al cambio climático e indican el grado de vulnerabilidad de las poblaciones (Bernardo et al., 2007; Huey et al., 2009; Williams et al., 2008). El grado de vulnerabilidad de una población radica en la distancia entre los límites fisiológicos de los individuos y las condiciones de estrés experimentadas en un determinado ambiente. Los individuos están sometidos a múltiples factores de estrés cuya influencia varía a lo largo del tiempo y del espacio determinando la distribución y abundancia de las especies (Denny et al., 2006; Helmuth, 2009). Trabajos recientes en insectos muestran que los machos expuestos a temperaturas sub-letales registran frecuentemente problemas en la reproducción tales como deficiencias en el cortejo y disminución de la fertilidad, entre otros aspectos detrimentales (Walsh et al., 2019). Teniendo en cuenta los caracteres reproductivos tanto comportamentales como fisiológicos, la sensibilidad térmica de las poblaciones podría ser mucho mayor de lo esperado con el aumento en la temperatura (Parratt et al., 2020).

Los cambios térmicos son particularmente importantes para los ectotermos. Estos animales dependen de fuentes externas de calor para controlar la temperatura corporal y, por lo tanto, están más influenciados por los cambios de las temperaturas ambientales que los animales endotermos. Frente a condiciones de estrés térmico pueden modificar la función de sus órganos para compensar los rápidos cambios ambientales mediante la combinación de tres procesos: comportamiento, plasticidad y evolución (Angilletta, 2009; Logan et al., 2015).

Sin embargo, la tasa promedio del aumento de la temperatura actual debida al cambio climático puede generar problemas para la adaptación de muchas especies a mediano plazo, lo cual podría llevar a resultados muy perjudiciales para la biodiversidad global (Hoffmann et al., 2013; Overgaard et al., 2014).

Frente a este panorama resulta fundamental que los organismos desarrollen sistemas de respuestas fisiológicas efectivas para contrarrestar los sucesivos aumentos de la temperatura global tales como las respuestas plásticas (Hoffmann et al., 2003). La plasticidad fenotípica hace referencia a la capacidad de cambiar un fenotipo específico de manera reversible y repetida a lo largo de la vida de un individuo en respuesta a un cambio en el medio ambiente (Leroi et al., 1994). Los organismos han desarrollado diversos mecanismos plásticos para poder adaptarse mejor a las condiciones térmicas cambiantes en los casos en donde el costo de la respuesta no sea mayor que los beneficios (Hoffmann, 1995; Scott et al., 1997; Scheiner & Berrigan, 1998).

La plasticidad en la respuesta de termotolerancia puede ser útil para contrarrestar en primer grado los efectos del estrés térmico para sobrevivir (Hoffmann & Parsons, 1991; Hoffmann et al., 2003). Sin embargo, las respuestas plásticas frecuentemente no son suficientes para evitar la extinción cuando la temperatura aumenta a niveles superiores a cierto umbral crítico. Además, estas respuestas fisiológicas resultan contexto-dependientes. Es decir, pueden resultar efectivas para determinadas condiciones de estrés ambiental mientras que en otros contextos pueden ser completamente insuficientes (Hoffmann & Parsons, 1991). Si bien la plasticidad fenotípica no siempre puede contrarrestar total e incluso parcialmente los daños causados por el cambio climático, una población sin capacidad de respuesta plástica podría resultar altamente vulnerable a los efectos del incremento acelerado de la temperatura.

Cuando las respuestas plásticas no son suficientes para hacer frente a los cambios en la temperatura ambiental, la selección direccional para la adaptación al estrés térmico favorecerá cambios en las frecuencias de los alelos que aportan una mayor termotolerancia ya sea cambios fisiológicos y/o comportamentales (Hoffmann et al., 2001). Por esto es importante que las poblaciones posean una alta variabilidad de base genética heredable, en caracteres de termotolerancia, que les permita evolucionar produciendo cambios en las frecuencias de los alelos frente a condiciones de estrés térmico (Angilletta et al., 2002; Flint & Mackay, 2009; Hoffmann & Sgrò, 2011; van Heerwaarden & Sgrò, 2014).

Existen caracteres relacionados con la “*aptitud*” que podrían evolucionar independientemente uno del otro. Sin embargo, es frecuente que diversos caracteres estén genéticamente correlacionados, ya sea por “pleiotropía” o “ligamiento”, de tal forma que la selección sobre un carácter podría producir efectos significativos en otros modificando conjuntamente el desempeño de los individuos en condiciones ambientales cambiantes (Hoffmann & Parsons, 1991; Hoffmann & Willi, 2008). De hecho, las correlaciones genéticas entre caracteres bajo selección pueden, en algunos casos, restringir la adaptación incluso cuando la heredabilidad es alta (Sgrò & Hoffmann, 2004; Sadowska et al., 2005; Martins et al., 2019).

La determinación de los caracteres relacionados con la aptitud, sensibles a los cambios térmicos y la cuantificación de la capacidad que poseen distintas poblaciones para tolerar y responder a los efectos del estrés térmico en estos rasgos, resultan de gran interés en los estudios de adaptación térmica (Moritz et al., 2013). Se sabe que bajo condiciones de estrés térmico el nivel de actividad de los organismos se ve ampliamente afectado, pudiendo resultar en falla al momento de aparearse (Miwa et al., 2018). Los rasgos reproductivos son factores determinantes de la distribución y abundancia de las especies en ambientes terrestres

(Rohmer et al., 2018). Por ello se considera que la evolución, persistencia y distribución de las poblaciones no está determinada únicamente por la capacidad de tolerar los límites térmicos, sino también por las capacidades reproductivas. Algunos trabajos recientes han puesto en evidencia de que temperaturas de estrés en insectos causan fuertes efectos en el desempeño reproductivo (Sales et al., 2018; Saxon et al., 2018). El éxito de apareamiento es un rasgo particularmente relacionado al éxito reproductivo en animales de reproducción sexual (Brooks & Endler, 2001). El éxito del apareamiento en condiciones de temperatura elevada puede ser un blanco directo de selección para la adaptación a distintas temperaturas ambientales (Dolgin et al., 2006; Sambucetti & Norry, 2015). Ello resulta trascendente dado que el desempeño reproductivo de los individuos suele verse afectado a temperaturas que suelen ser inferiores a las consideradas como críticas para la supervivencia (Parratt et al., 2020). Por ello se puede suponer que la distribución y persistencia de las poblaciones naturales están principalmente definidas por la tolerancia a los límites térmicos reproductivos. En el presente trabajo se propone estudiar el efecto de la temperatura ambiental sobre el éxito en el apareamiento como así también elucidar sus bases genéticas. El principal objetivo es el de aportar al entendimiento de cómo pueden evolucionar las poblaciones naturales frente al incremento de la temperatura ambiental. Para esto se utilizó a *Drosophila* como organismo modelo, el estrés térmico como modelo de estrés y la selección artificial como un modelo de evolución experimental.

Consideramos de suma importancia incluir una discusión sobre el calentamiento global y asumir el compromiso constante de aportar al conocimiento de los sistemas de respuestas al estrés térmico y los efectos de los aumentos y fluctuaciones de la temperatura en los caracteres que influyen directamente a la aptitud o “*fitness*”.

1.2 Objetivo general

Como objetivo general se plantea elucidar la base genética del éxito en el apareamiento, su relación con la temperatura ambiental y las posibles correlaciones con otros caracteres relacionados al *fitness* del individuo.

Se utilizará *Drosophila* como modelo de estudio.

1.3 Modelo de estudio

Drosophila es un género perteneciente a la familia Drosophilidae. Su ciclo de vida es de alrededor de 10 a 12 días a 25°C con una longevidad media adulta de aproximadamente dos meses a 25 °C en poblaciones no endogámicas. El ciclo de vida involucra cuatro fases: huevo, larva (tres estadios distintos), pupa y adulto (figura 1). Además, es un organismo termoconformador cuyo pequeño tamaño corporal posee la temperatura que tiene el ambiente. Esto lo convierte en un organismo altamente sensible a la temperatura ambiental, razón por la cual es ampliamente utilizado para el análisis de las respuestas evolutivas a temperaturas que les resultan extremas (ej., Maynard Smith, 1956; Hollingsworth & Bowler, 1966; David et al., 1983; Hoffman & Parsons, 1991; Norry et al., 1994; Hoffmann & Sgro, 2011). También presenta claras ventajas respecto a otros animales de laboratorio, debido a su corto ciclo de vida, el bajo costo económico para la cría y mantenimiento; y su simple manipulación en el laboratorio. Atributos por los cuales habilita estudiar experimentalmente diversos caracteres relacionados con el *fitness*, entre ellos caracteres reproductivos y del ciclo de vida (ej., Loeschcke et al., 1997; Weeks et al., 2002; Hoffmann et al., 2002; Norry et al., 2004; Morgan & Mackay, 2006). También es un excelente modelo para el estudio de los

distintos caracteres reproductivo ya que presentan cortejos sexuales muy complejos en donde el macho es el que realiza el mayor gasto energético mientras que la hembra adopta una postura selectiva (Partridge et al, 1987). Las feromonas que producen las hembras atraen a los machos los cuales en primer lugar hacen vibrar sus alas produciendo un zumbido y realizan un curioso baile de cuerpo y alas, seguido por la lamida de la genitalia en el ritual de apareamiento (Partridge et al, 1987).

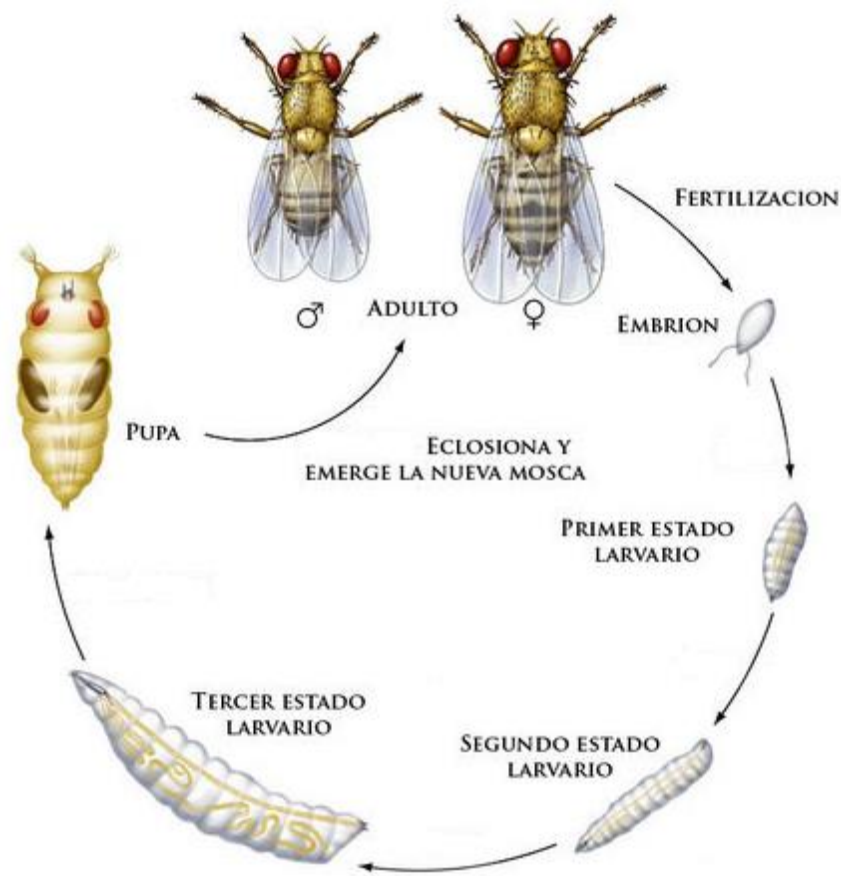


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, desde el estadio de embrión hasta el de individuo adulto.

En este estudio se utilizaron dos especies del género *Drosophila* para llevar a cabo los objetivos específicos detallados más adelante. Dichas especies son *D. melanogaster* y *D. buzzatii*.

Drosophila melanogaster (subgénero *Sophophora*, grupo *melanogaster*, subgrupo *melanogaster*) es una especie de distribución cosmopolita y fue adoptada como modelo de experimentación genética por el científico norteamericano Thomas Hunt Morgan a principios del siglo XX a partir de sus investigaciones con moscas mutantes. Desde entonces, *D. melanogaster* ha sido la especie más ampliamente utilizada como organismo modelo para estudios genéticos. *Drosophila melanogaster* es un buen organismo modelo para estudiar la base genética de la termotolerancia en ectotermos (ej., Loeschcke et al., 1997; Weeks et al., 2002; Hoffmann et al., 2002; Norry et al., 2004; Morgan & Mackay, 2006). Por ejemplo, en esta especie han sido descubiertas las proteínas de la respuesta al estrés por calor, o “*heat-shock proteins*”. Habita amplias zonas desde tropicales hasta templadas en la mayoría de los continentes, evidenciando su capacidad para adaptarse a diferentes climas. Su genoma ha sido totalmente secuenciado y excelentemente anotado (Adams et al., 2000; FlyBase Consortium 2003).

Drosophila buzzatii (subgrupo *mullieri*, complejo *buzzatii*, cluster *buzzatii*), por otra parte, es una especie cactófila que habita principalmente zonas áridas y semiáridas desde bajas hasta altas elevaciones de Argentina y ha colonizado el viejo mundo en tiempos históricos (e.g., Fontdevila et al., 1988; Hasson et al., 1992; Sorensen et al 2005a; Norry et al 2006). Esta especie es cactófila porque se encuentra principalmente asociada a cactus, principalmente del género *Opuntia* (Fontdevila et al., 1988). Los tejidos en descomposición de dichos cactus son usados como sitios de alimentación y cría por *D. buzzatii*. La conocida ecología de esta especie cactófila que habita en diferentes altitudes con diferentes regímenes

térmicos hace de la misma un buen modelo de estudio para la adaptación térmica (Sorensen et al 2005a; Sambucetti et al 2005; Norry et al 2006; Sambucetti & Norry 2015). Además, posee un alto recambio generacional. Esto representa una ventaja importante a la hora de construir líneas de selección en el laboratorio, dado que se necesita de un alto número de generaciones sucesivas para llevar a cabo el protocolo. En este trabajo abordamos la temática mediante el empleo de la técnica de selección artificial para el éxito de apareamiento y su correlación con otros caracteres relacionados al *fitness* en *D. buzzatii*.

1.4 Selección artificial como modelo de evolución experimental

La distribución y abundancia de las especies en la naturaleza está fuertemente afectada por el componente genético de los individuos. Los distintos ambientes que puede habitar un organismo están determinados por su capacidad genética para adaptarse a dichos ambientes. El entendimiento de como los organismos pueden adaptarse al estrés por calor resulta fundamental para predecir qué caracteres son importantes para la adaptación al cambio climático y la degradación del hábitat producto del aumento en las temperaturas globales (Etterson & Shaw, 2001).

En este contexto, la técnica de selección artificial constituye una herramienta útil para estudiar la capacidad de una determinada especie para adaptarse a nuevas condiciones ambientales. Entre los factores más importantes que influyen en la selección artificial podemos mencionar la variación genética existente en la población base como así también las correlaciones genéticas entre los rasgos que están bajo selección (Antonovics et al., 1976). Resulta importante tener en cuenta que la correlación genética entre dos caracteres fenotípicos puede ser causada por *pleiotropía*, en donde un mismo locus afecta a dos o más

caracteres en forma simultánea, o por *desequilibrio de ligamiento*, en donde dos caracteres están afectados por dos loci distintos que a su vez mantienen una fuerte asociación no aleatoria entre los alelos presentes en ellos (Falconer & Mackay, 1996). Las correlaciones genéticas son importantes porque la selección artificial de un carácter provoca un cambio evolutivo en un carácter neutral correlacionado, o altera la respuesta a la selección en un carácter correlacionado que está bajo selección directa. Es decir, la evolución no adaptativa de un carácter puede ocurrir debido a genes compartidos con el rasgo efectivamente seleccionado (Lande & Arnold, 1983). Las correlaciones genéticas pueden ser positivas y en ese caso la selección para incrementar el valor de un carácter no solo incrementará el valor de ese carácter sino también de los caracteres positivamente correlacionados con el mismo. Sin embargo, existen casos donde las correlaciones genéticas entre caracteres son negativas (ej., Sgrò & Hoffmann, 2004; Gomez et al., 2016). Dentro del último caso (correlación genética negativa), se denomina “*trade-off*” si hay una respuesta antagónica entre los caracteres seleccionados (Lande & Arnold, 1983; Sgrò & Hoffmann, 2004).

Estudios previos sobre las consecuencias de la selección artificial en distintos caracteres reproductivos demostraron que no es suficiente con estudiar la respuesta directa, sino que resulta necesario además considerar el efecto en múltiples caracteres relacionados al *fitness* del individuo (Partridge, 1980; Lande & Arnold, 1983; Moore, 1994). En este trabajo utilizamos la selección artificial para el éxito en el apareamiento cuando la temperatura es elevada, para evaluar las respuestas directas y correlacionadas a la resultante selección en *Drosophila buzzatii*.

1.5 Estrés térmico

La temperatura es uno de los factores más relevantes en la dinámica poblacional de los cambios ecológicos y evolutivos ya que puede determinar la distribución geográfica de la especie. A menudo, la fisiología de los organismos se encuentra directamente afectada por la temperatura ambiental. Frente a cambios en la temperatura resulta adaptativo que los individuos desplieguen estrategias fisiológicas y comportamentales (inactividad, migración) que le confieran la capacidad de hacer frente al estrés térmico. Por definición, “*estrés ambiental*” es la situación que experimenta un individuo cuando al menos una variable ambiental tiene un valor diferente al óptimo para dicho individuo o especie (Hoffmann & Parsons, 1991). En un sentido amplio, cualquier aspecto del ambiente que sea diferente al óptimo para el organismo será un estrés para dicho organismo. El estrés ambiental ha jugado un rol fundamental como determinante de la evolución de los organismos a lo largo de la historia de la vida en nuestro planeta (Hoffmann & Parsons, 1991). La temperatura extrema es uno de muchos otros posibles agentes de estrés ambiental. El estrés por temperatura puede provocar daños reduciendo temporalmente la probabilidad de supervivencia y/o fertilidad, pero una condición de estrés sostenida en el tiempo más allá de cierto valor crítico provoca daños permanentes y la muerte de los individuos más sensibles. La resistencia a las altas temperaturas delimita el rango de temperatura corporal que las poblaciones pueden soportar para poder sobrevivir (Fry, 1957). El estudio del estrés térmico tiene un gran interés evolutivo ya que establece los límites de la distribución geográfica de las especies y tiene el potencial de causar extinciones masivas, como ha ocurrido en diferentes eras geológicas (Hoffmann & Parsons, 1991).

Estudios previos demostraron que la termotolerancia es un carácter genéticamente variable en poblaciones naturales (Hoffmann et al., 2003). La respuesta universal que todos los organismos experimentan frente al estrés térmicos, como así también a otras formas de estrés, es la inducción de la síntesis de las denominadas—“*heat-shock proteins*”, o Hsps (Feder & Hofmann, 1999). Estas proteínas son las principales constituyentes de la respuesta primaria al estrés térmico. Tienen típicamente la función de chaperón molecular, asistiendo en el mantenimiento celular de las estructuras funcionales de proteínas fundamentales para el funcionamiento del metabolismo celular (Parsell et al., 1993; Sørensen et al., 2003). También cumplen funciones de “limpieza de casa” en la célula participando en vías de degradación de proteínas dañadas por el estrés que no pueden ser reparadas (revisado en Sørensen et al., 2003; Tower, 2009). Varios estudios en *Drosophila*, han demostrado que exposiciones a temperaturas de estrés generalmente inducen la síntesis de Hsps, lo cual está asociado a un incremento en la sobrevivencia que de otro modo no se hubieran expresado ante dicho estrés (ej., Lindquist, 1981; Welte et al., 1993; Krebs & Loeschcke, 1994; Feder et al., 1996; Sørensen et al., 2003).

Capítulo 2: respuestas directas y correlacionadas al régimen de selección artificial para el éxito de apareamiento en alta temperatura.

2.1 Introducción

Se conoce que las altas temperaturas pueden afectar a la reproducción, abundancia y distribución de las especies en los ambientes naturales contemporáneos bajo temperaturas de estrés (Hoffmann & Sgrò, 2011; Franks & Hoffmann, 2012). Además, la capacidad de los individuos para responder a condiciones ambientales perjudiciales tales como las altas temperaturas resulta de gran relevancia para la adaptación a los cambios climáticos (Deutsch et al., 2008; Kellermann et al., 2009; Kellermann et al., 2012; Kingsolver et al., 2011; Franks & Hoffmann, 2012; Huey et al., 2012; van Heerwaarden et al., 2016; Rebaudo & Rabbi, 2018). Diversos caracteres relacionados al *fitness* del individuo, incluyendo al éxito de apareamiento en altas temperaturas, pueden ser blancos fenotípicos de la selección para la adaptación térmica (Hoffmann et al., 2003a; Kellermann et al., 2009; Sambucetti & Norry, 2015).

El estrés térmico afecta los niveles de actividad de los organismos y pueden resultar en fallas al momento de aparearse (Miwa et al., 2018). Sin embargo, el éxito de apareamiento en altas temperaturas puede resultar un carácter clave para la adaptación a las temperaturas ambientales. En ambientes naturales de elevadas temperaturas (cálidas), el éxito de apareamiento puede evolucionar como respuesta a la temperatura ambiental a la cual esté sometida la población (Fasolo & Krebs, 2004; Dolgin et al., 2006), donde la capacidad para aparearse bajo condiciones térmicas estresantes podría ser determinante para el éxito

reproductivo. Por lo tanto, la selección para el éxito del apareamiento a temperaturas elevadas, puede significar un componente importante de la selección para la adaptación a condiciones de estrés ambiental.

En los insectos pequeños, la resistencia al coma por calor (RCC) y la recuperación al coma por frío (RCF) representan fenotipos ecológicamente relevantes para la adaptación térmica en la etapa adulta (reproductiva) del ciclo de vida (Huey et al., 1992; Gibert et al., 2001; Hoffmann et al., 2002, 2003b; Morgan & Mackay, 2006; Norry et al., 2007; Rako et al., 2007). En *D. melanogaster*, RCC y RCF muestran clinas latitudinales opuestas atribuibles a la adaptación térmica en la costa este de Australia (Hoffmann et al., 2002). RCC y RCF se encuentran negativamente correlacionados en un locus de rasgos cuantitativos (QTL) q

ue afecta a ambos rasgos en el medio del cromosoma 2 en *D. melanogaster*, lo que indica que podría existir desequilibrio de ligamiento o pleiotropía en los loci determinantes de éstos caracteres (Morgan & Mackay, 2006; Norry et al., 2007, 2008; ver también Loeschcke et al., 2011 para un ensayo de campo). En esta especie, otra región del genoma que involucra la inversión cromosómica *3-R-Payne* también se observa implicada en un “*trade-off*” entre la resistencia al frío y al calor (Anderson et al., 2003). Sin embargo, la selección artificial para RCC no tuvo respuestas correlacionadas en RCF en *D. buzzatii* (Sambucetti et al., 2010). Además, la selección para RCF no tuvo respuestas correlacionadas sobre RCC en esta misma especie (Bertoli et al., 2010). También, se obtuvieron resultados similares de asociación nula en las respuestas de selección correlacionadas para RCF y la supervivencia después del estrés por calor en *D. melanogaster* (Gerken et al., 2016; Mori & Kimura, 2008). Sin embargo, *Drosophila* y otros insectos pueden adaptarse constantemente a su entorno en el campo, donde la resistencia al calor puede correlacionarse negativamente con la resistencia al frío (Overgaard & Sørensen, 2008; Condon et al., 2015). Es posible que

la selección para la adaptación a ambientes cálidos, incluido el éxito de apareamiento a altas temperaturas, pueda afectar la RCF de manera perjudicial, como se espera de cualquier posible compensación entre la adaptación al frío y al calor en moscas adulta.

Aquí, se utiliza la selección artificial en el éxito de apareamiento a alta temperatura para evaluar sus posibles efectos en *D. buzzatii*. La selección artificial es una herramienta útil para evaluar no solo la respuesta directa a la selección sino también cualquier posible respuesta correlacionada en otros rasgos que pudieran verse afectados por la selección.

2.2 Objetivos

Evaluar las respuestas a la selección artificial sobre el éxito de apareamiento en condiciones de alta temperatura en el insecto modelo *Drosophila buzzatii*. El éxito de apareamiento puede evolucionar como respuesta correlacionada a la selección sobre la resistencia a altas temperaturas. Sin embargo, se desconoce si los efectos de la temperatura ambiental pueden tener efectos directos sobre el éxito de apareamiento específicamente. Así también, se propone evaluar las posibles respuestas correlacionadas a la selección sobre otros caracteres estrechamente vinculados al fitness como la termotolerancia. Particularmente RCC y RCF.

2.3 Hipótesis

La selección para el éxito apareamiento en alta temperatura aumenta también la tolerancia al calor. Bajo esta hipótesis, se espera que el éxito de apareamiento en alta temperatura evolucione como respuesta a la selección artificial en *D. buzzatti*. Como resultado de esto, se

espera una respuesta correlacionada de la resistencia al estrés por calor. Por otro lado, se espera además una respuesta correlacionada al estrés por frío dado que éstos caracteres se encuentran involucrados en un *trade-off* ligado a un QTL sobre el cromosoma 2 de *D. melanogaster* (Norry et al., 2008; Morgan & Mackay, 2006).

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Población base

Se estableció una población de laboratorio a partir de individuos pertenecientes a dos poblaciones naturales que representan los extremos de una clina altitudinal del Noroeste argentino previamente estudiada (Sørensen et al., 2005a; Norry et al., 2006; Sambucetti et al., 2006). La colecta de los ejemplares se realizó en abril del 2009 en dos poblaciones (Fig 1), una de baja altitud (Chumbicha, 401 msnm; 28°53'S, 65°16'W) y otra de alta altitud (Quilmes, 1855 msnm; 26°28'S, 66°02'W).



Figura 1. Mapa de las regiones donde se sitúan los puntos geográficos de ambas poblaciones colectadas.

Cuarenta moscas, de cada una de las dos poblaciones, se colocaron en botellas de vidrio de 125 ml que contenían 40 ml de medio de cultivo deshidratado a base de papa con agua, nipagin y levadura (en adelante, cultivos estándar). Se realizaron diez cultivos, con 20 moscas vírgenes de cada sexo de cada población por separado. Para controlar los posibles efectos de la adaptación de laboratorio en la respuesta de nuestro régimen de selección térmica (Orozco-Terwengel et al., 2012), los cultivos se mantuvieron durante 10 generaciones antes del cruce masivo entre ambas poblaciones. Posteriormente la población en masa (cruza de ambas poblaciones iniciales) se mantuvo durante otras cinco generaciones

antes del inicio del régimen de selección. Los individuos experimentales para el régimen de selección y control fueron moscas vírgenes de la generación F5 del cruce entre los cultivos de laboratorio mencionados anteriormente (es decir, la generación de laboratorio G15) que surgió de los cultivos estándar a 25°C bajo un ciclo luz/oscuridad de 12:12 h.

Las moscas de la población base se dividieron en dos conjuntos. Un conjunto fueron las líneas de control, en tres réplicas, denominadas C1, C2 y C3. El otro conjunto corresponde a moscas seleccionadas artificialmente para el éxito de apareamiento a alta temperatura, en tres réplicas, denominadas S1, S2 y S3. Cada línea replicada se mantuvo en cuatro botellas de cultivo estándar a 25°C en un ciclo luz/oscuridad de 12:12 h.

2.4.2 Régimen de selección artificial

Las moscas para cada generación de selección se obtuvieron de 4-5 botellas estándar por cada réplica con 30 machos y 30 hembras por botella. Se las dejó oviponer durante cuatro días y luego se retiraron de las botellas. Las moscas vírgenes que emergieron de estos frascos (recolectadas dentro de las 5 horas) fueron sexadas mediante una ligera anestesia con CO₂ y colocadas en viales estándar con alimentos frescos. Aproximadamente 100 hembras vírgenes más 100 machos vírgenes de 3-4 días de edad, se colocaron en una botella de vidrio de 500 ml (35 x 9 cm) con 50 ml de medio de cultivo fresco (puré de papas instantáneo con agua, nipagin y levadura como medio de cultivo) a 33°C en una incubadora térmica durante 4 horas para permitir la copulación de cada línea réplica S. Luego, las hembras se transfirieron separadamente a nuevos viales con medio de cultivo estándar a 25°C durante cinco días y sus descendientes se recogieron posteriormente en masa de todos los viales como

progenitores de la próxima generación. El éxito de apareamiento fue seleccionado a altas temperaturas y el régimen de selección se aplicó en generaciones alternas para permitir la recuperación del tamaño poblacional. En total se realizaron quince eventos de selección.

Las líneas control (C1, C2, C3) se obtuvieron como líneas S con la única diferencia de que no se aplicó ningún protocolo de selección. Cada línea C se mantuvo con al menos 80 moscas de cada sexo en cada generación, con 4 botellas de cultivo por línea replicada.

Una vez que se completó esta etapa de selección para el éxito de apareamiento en condición de estrés térmico (G15), varios caracteres fueron medidos en todas las líneas (S y C) para poner a prueba posibles repuestas directa y correlacionadas a la selección para CCR. En primer lugar, se midió la respuesta directa de la selección al éxito de apareamiento. Posteriormente se midieron caracteres de termotolerancia como son la resistencia al coma por calor (RCC) y a resistencia al coma por frío (RCF) como posibles respuestas correlacionadas.

2.4.3 Medición del éxito en el apareamiento:

Una vez finalizada la última generación de selección, la medición del éxito de apareamiento se realizó a 25°C y 33°C en una incubadora térmica. Las moscas experimentales se criaron en botellas estándar colocando 15 machos y 15 hembras por botella, con 4 botellas estándar por línea replica (S1, S2, S3, C1, C2 y C3). Las botellas se colocaron a 25°C bajo un período de 12:12h luz/oscuridad. Se obtuvieron moscas vírgenes experimentales como se describió anteriormente. El éxito de apareamiento a cada temperatura se evaluó en competencia entre

las réplicas de ambas líneas (S vs C) en cajas de plástico transparente (20 x 12 x 10 cm), usando una red de tela delgada como tapa. Se colocaron dos platos pequeños (2 cm de diámetro) que contenían alimentos a base de papa estándar más levadura dentro de cada caja para estimular el cortejo y el apareamiento (Fig 2). Cuarenta individuos (proporción de sexos 1: 1) de una línea replica S y una C fueron liberados dentro de la caja de apareamiento, lo que hace un total de 80 individuos. Estas combinaciones fueron aleatorizadas para que todas las líneas S replicadas compitieran con todas las líneas C replicadas. Todas las moscas vírgenes de cada línea se marcaron 1 h antes de la liberación dentro de la jaula para permitir su posterior identificación, transfiriendo moscas a viales con 0,15 mg de polvo micronizado fluorescente y agitando ligeramente. Los colores del polvo se asignaron aleatoriamente a las diferentes líneas y cambiaron entre las repeticiones del experimento.

Se observaron las moscas durante las siguientes 4 horas entre la 1:00 p.m. y las 5:00 p.m. Los pares en cópula se recogieron de la caja utilizando un tubo aspirador. Cada par se colocó en un vial vacío y se congeló a -20°C antes la identificación del color de cada mosca con un aumento de 10X. Las cajas de apareamiento se replicaron 10 veces para cada línea réplica S.

Las diferencias en el éxito de apareamiento entre las líneas S y C se analizaron con una prueba de *Chi cuadrado* para cada sexo y cada tratamiento térmico (25°C y 33°C). Para este análisis se agruparon las líneas réplicas en dos grupos S vs C.

También se realizaron análisis de Modelos Lineales Generalizados (GLM) con función de enlace logit para ambos tratamientos térmicos, utilizando Línea (S vs C) y Sexo como factores fijos y Réplicas dentro de Línea como factor aleatorio. Como variable dependiente se utilizó el número de apareamientos. Los análisis se llevaron a cabo con el

software InfoStat (Di Rienzo et al., 2017), como interfaz de la plataforma R versión 3.4.1 (R Core Team, 2017).



Figura 2. Instrumento utilizado para la medición del apareamiento.

2.4.4 Medición de RCC

La resistencia al coma por calor (RCC) se midió en las líneas S y C con aproximadamente 30 machos y 30 hembras de 4 a 5 días de edad, en una generación después de la generación de selección G15. La medición se realizó mediante la utilización de una columna de “Knockdown” (Huey et al., 1992), que consiste en un cuerpo vertical de vidrio de 5 x 62.5

cm (Fig 3). Este dispositivo cuenta con un espacio entre un tubo interno y otro externo, lugar por el cual se hizo circular agua caliente proveniente de un baño termostático mantenido a $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ a través de una bomba de circulación. Dentro del tubo interno se introdujo un termómetro para registrar la temperatura a la cual estaban sometidas las moscas ($37.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Los individuos fueron liberados en la columna por el extremo superior del tubo interno y seguido de esto se comenzó a contar el tiempo transcurrido utilizando un cronómetro. En el orificio inferior de la columna se ubicó un vial colector.

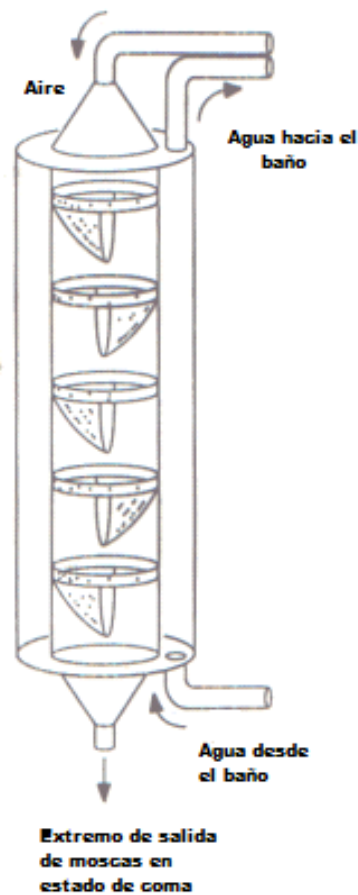


Figura 3. Esquema del dispositivo utilizado para la medición de la resistencia al coma por calor (RCC).

Frente a las altas temperaturas los individuos entran en un estado de coma y comienzan a caer por la columna hasta el vial colector. De esta manera se puede medir la capacidad que poseen las moscas de cada línea de soportar las altas temperaturas. Se registró la cantidad de individuos que caían desmayados en estado de coma al tubo colector en función del tiempo. Para esto se realizó un recambio de vial colector cada 30 segundos de manera constante finalizando el recambio con la caída del último individuo presente en la columna. Las mediciones se realizaron entre las 11:00 a.m. y las 4:00 p.m., para evitar variaciones circadianas y se repitieron tres veces en días diferentes; finalmente se promedió el valor medio de cada medición replicada para obtener la estimación final de RCC para cada línea. El rasgo se midió en moscas que no recibieron ningún pre-tratamiento por exposición al calor, así como en moscas que estuvieron expuestas a un pre-tratamiento de calor durante una hora a 36°C, 22 horas antes de la medición de RCC.

2.4.5 Medición de RCF

Se identificó el sexo de moscas de 3 días de edad bajo una ligera anestesia con CO₂. Treinta moscas por sexo y línea se transfirieron inmediatamente a viales vacíos y se colocaron durante 20 horas dentro de una caja térmica que contenía hielo granizado (0°C) dentro de una habitación fría a 4 °C. Después de 20 h, todas las moscas volvieron a 25°C. El tiempo RCF se cuantificó en segundos como el tiempo hasta que un individuo pudo pararse sobre sus patas (Norry et al. 2008). Las mediciones de RCF se realizaron entre las 11:00 a.m. y las 3:00 p.m., se replicaron dos veces en días diferentes y se promediaron para cada línea. La RCF se

midió en moscas que no recibieron pre-tratamiento de frío, así como en moscas que fueron pre-tratadas en frío por 2 h a 4 ° C, 22 h antes de la medición.

Los valores obtenidos tanto para RCC y como para RCF se analizaron con ANOVA, utilizando Línea (S vs C), Efecto del Pre-tratamiento y Sexo como factores fijos y Réplica dentro de Línea como factor aleatorio. Además, se analizaron los efectos del pre-tratamiento para ambas líneas (S y C) por separado en ambos caracteres, a través de ANOVA utilizando Línea (con vs sin pretratamiento) y Sexo como factores fijos y Réplicas dentro de Línea como factor aleatorio (Ver análisis en Anexo). Todos los datos obtenidos de las mediciones de RCC y RCF se transformaron por raíz cuadrada para cumplir con los supuestos estadísticos de la homogeneidad (prueba de Levene, $p > 0.05$) y la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk, $p > 0.05$) de las varianzas. Los análisis se llevaron a cabo con el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2017), como interfaz de la plataforma R versión 3.4.1 (R Core Team, 2017).

2.5 Resultados

2.5.1 Respuesta directa

Los resultados obtenidos muestran que el éxito de apareamiento en alta temperatura respondió significativamente al régimen de selección artificial. Las pruebas de *Chi cuadrado* a 33°C mostraron que el éxito de apareamiento resultó significativamente mayor en las líneas S que en las líneas C para ambos sexos en la generación G15 de selección (Tabla 1, Fig 4a). Mientras que el análisis de GLM reveló diferencias significativas en el éxito de apareamiento entre las líneas S y C, sin diferencias entre los sexos (Tabla 2, Fig 5). En contraste, a 25°C

las diferencias significativas en la medición del éxito del apareamiento resultaron dependientes del sexo. Las pruebas de *Chi cuadrado* realizadas mostraron que los machos de las líneas S resultaron más exitosos para aparearse que los machos controles (Tabla 1, Fig 4b). El análisis de GLM mostró que la interacción sexo por línea era altamente significativa a esta temperatura (Tabla 2). Por lo tanto, se realizó un análisis de efecto simple para evaluar el éxito del apareamiento para cada sexo por separado. En los machos, el éxito de apareamiento fue significativamente mayor en las líneas S que en las líneas C, mientras que no hubo diferencias significativas entre las hembras S y C (Fig 5, GLM con línea como factor fijo: $F_1 = 13.21$ *** para machos, $F_1 = 0.89$ para hembras; *** $P < 0.001$).

Tabla 1. Prueba de *Chi cuadrado* para analizar las diferencias en el número de apareamiento entre las líneas (S vs C). El análisis se realizó agrupando el número total de individuos apareados por línea. La prueba se realizó para cada sexo y cada tratamiento térmico (25°C y 33°C) por separado.

<i>Temperaturas</i>	<i>Sexo</i>	<i>Líneas</i>		χ^2
		<i>S</i>	<i>C</i>	
25°C	<i>Machos</i>	133	81	12.64***
	<i>Hembras</i>	97	117	1.87
33°C	<i>Machos</i>	182	88	26.25***
	<i>Hembras</i>	176	94	24.9***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

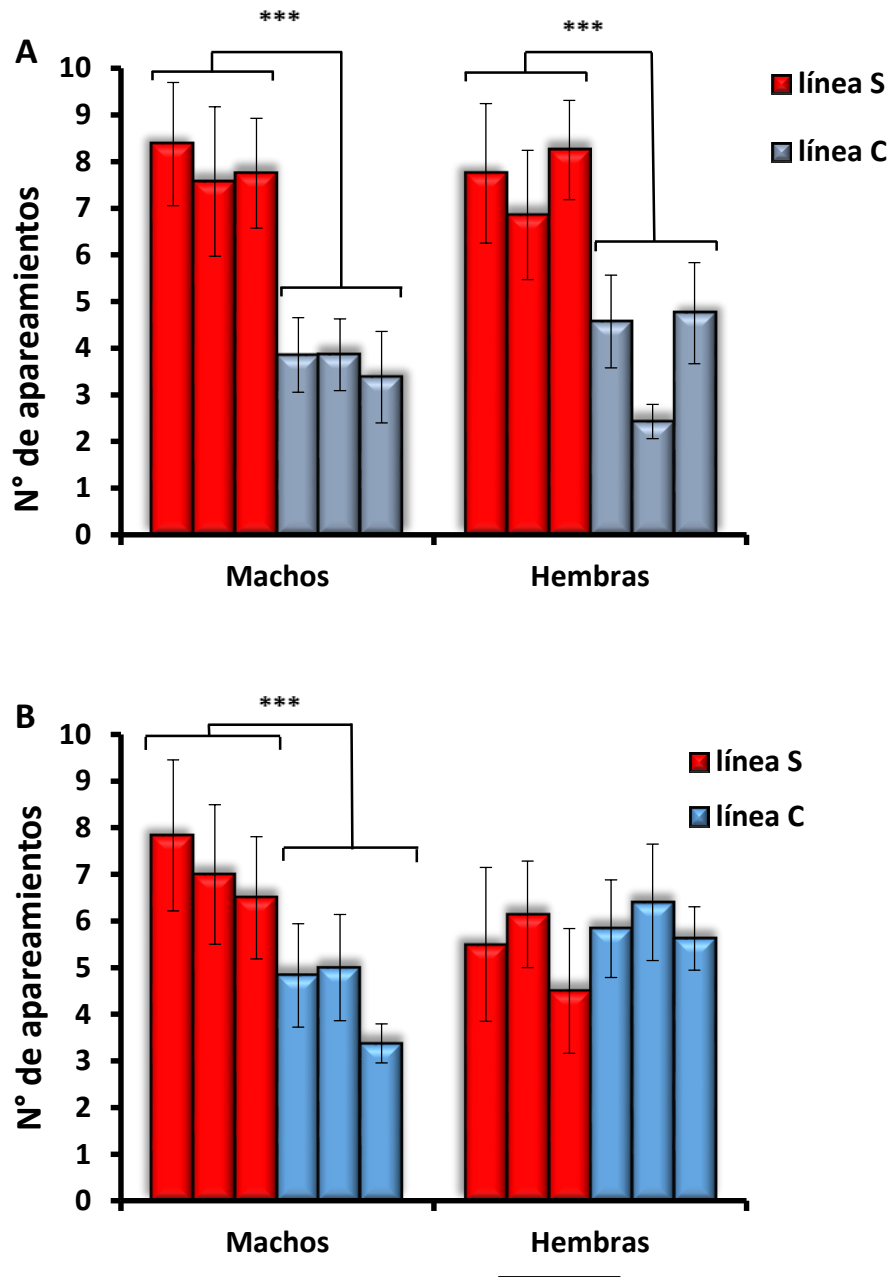


Figura 4. Valores medios (\pm Error estándar) del número de apareamientos observados en las seis réplicas pertenecientes a las líneas S y C de *D. buzzatii* para cada sexos por separado en dos tratamientos térmicos distintos 33°C (a) y 25°C (b). Los asteriscos indican diferencias significativas (***) $p < 0.001$

Tabla 2. Análisis de Modelos Lineales Generalizados (GLM) para la respuesta directa a la selección del éxito de apareamiento en alta temperatura. El análisis se realizó utilizando Línea (S vs C) y Sexo como factores fijos y Réplica dentro de Línea como factor aleatorio, en cada una de las dos temperaturas experimentales (25°C y 33°C).

	33°C		25°C	
	<i>gl</i>	χ^2	<i>gl</i>	χ^2
<i>Línea</i>	1	55.25***	1	3.87
<i>Sexo</i>	1	0.03	1	0.25
<i>Línea x Sexo</i>	1	0.3	1	10.76**

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

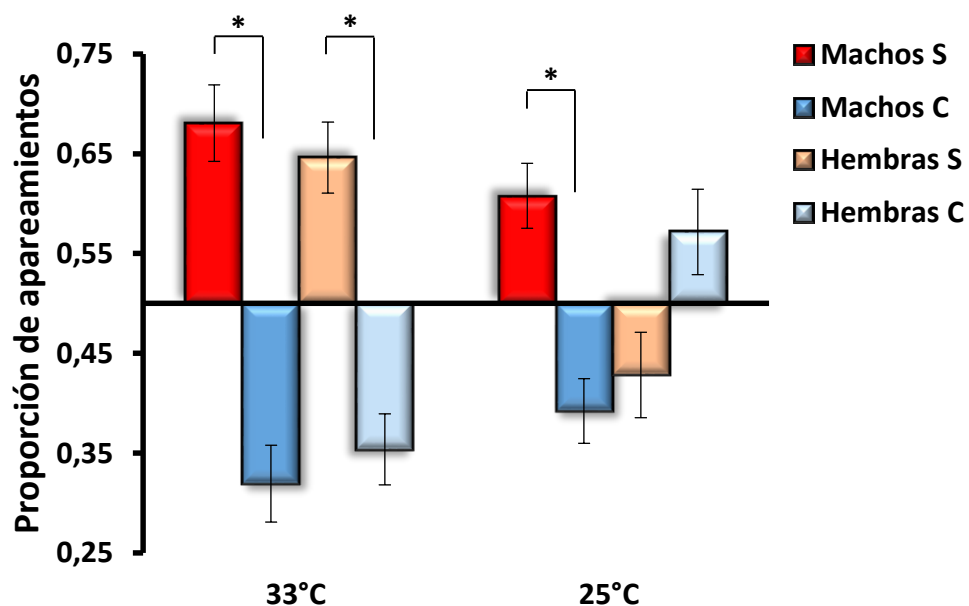


Figura 5. Valores medios (\pm Error estándar) de las proporciones de apareamiento correspondiente a la suma de las líneas réplicas como respuesta al régimen de selección artificial en altas temperaturas (33°C) y a temperatura ambiente (25°C) en las líneas S y C de *D. buzzatii* para cada sexo por separado. Los asteriscos indican diferencias significativas (*p < 0.05)

2.5.2 Respuesta correlacionada, caracteres de termotolerancia

Seguidamente se realizó la medición de RCC y RCF como posibles caracteres correlacionados con el éxito de apareamiento:

La resistencia al coma por calor mostró diferencias significativas entre las líneas como respuesta correlacionada a la selección artificial (Fig 6). El análisis de ANOVA realizado para los datos obtenidos mostró diferencias significativas entre las líneas S y C, mientras que el pre-tratamiento en alta temperatura no presentó efectos significativos (Tabla 3, Fig 6). Sin embargo, al analizar el efecto del pre-tratamiento térmico por separado para las líneas S y C, mediante análisis de ANOVA se observó un efecto beneficioso estadísticamente significativo en las líneas S, dado que las moscas seleccionadas que recibieron el pre-tratamiento aumentaron la RCC respecto a las que no lo recibieron (Tabla 1 anexo).

Tabla 3. ANOVA para RCC, con Línea (S vs C), Efecto del Pre-tratamiento y Sexo como factores fijos y Réplica dentro de Línea como factor aleatorio. Todos los valores corresponden a estadístico F.

Factor		
	gl	F
<i>Línea</i>	1	15.66***
<i>Efecto Pre-tratamiento</i>	1	3.43
<i>Sexo</i>	1	3.04
<i>Línea x Efecto Pre-tratamiento</i>	1	2.55
<i>Línea x Sexo</i>	1	0.26
<i>Efecto Pre-tratamiento x Sexo</i>	1	0.75
<i>Línea x Efecto Pre-tratamiento x Sexo</i>	1	0.01

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

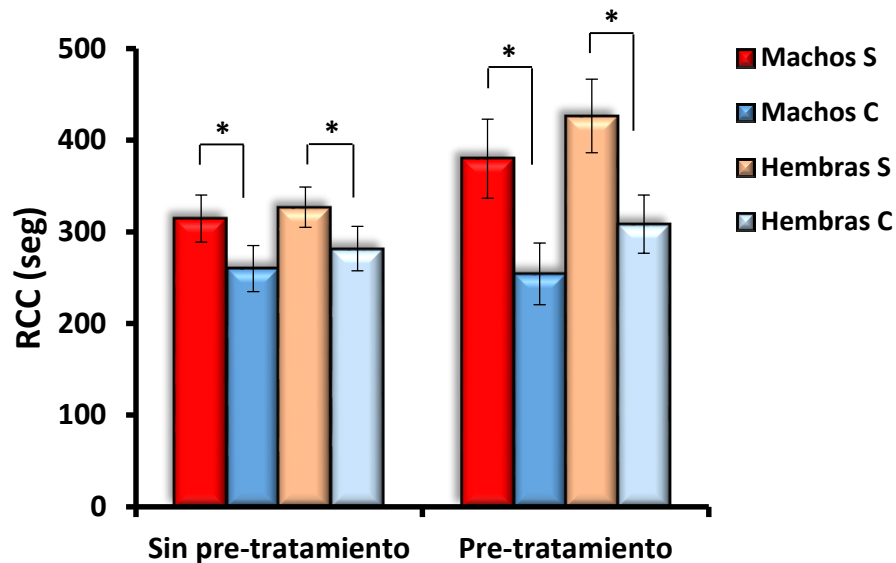


Figura 6. Valores medios (\pm Error estándar) de la RCC como respuesta correlacionada a la selección para el éxito de apareamiento en altas temperaturas en las líneas S y C de *D. buzzatii* para cada sexo por separado, en las mediciones sin el pre-tratamiento como así también en las mediciones donde se aplicó el pre-tratamiento. Los gráficos para cada línea réplica se muestran en el Anexo (Fig 1 anexo). Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0.05$)

El tiempo de recuperación al coma por frío fue más largo en las líneas S que en las líneas C, con y sin un pre-tratamiento de exposición al frío (Fig 7). El análisis de ANOVA realizado para los datos obtenidos mostró que existen diferencias significativas entre las líneas, dado que las líneas S resultaron menos resistentes al estrés por frío que las líneas C (Tabla 4, Fig 7). Esta respuesta se opuso a la tendencia observada para RCC. Las líneas S resultaron más resistentes a altas temperaturas mientras que mostraron mayor sensibilidad en bajas temperaturas, lo que podría sugerir una relación de *trade-off* entre RCC y RCF. El

análisis también reveló un efecto significativo del pretratamiento por frío tanto en las líneas S como en las líneas C. Para ambas líneas el efecto del pre-tratamiento resultó beneficioso disminuyendo significativamente el tiempo de recuperación del coma frío (Tabla 4, Tabla 2 anexo, Fig 7).

Tabla 4. ANOVA para RCF, con Línea (S vs C), Efecto del Pre-tratamiento y Sexo como factores fijos y Réplica dentro de Línea como factor aleatorio. Todos los valores corresponden a estadístico F.

Factor	<i>gl</i>	<i>F</i>
<i>Línea</i>	1	84.59***
<i>Efecto Pre-tratamiento</i>	1	244.77***
<i>Sexo</i>	1	22.63***
<i>Línea x Efecto Pre-tratamiento</i>	1	0.0002
<i>Línea x Sexo</i>	1	0.0004
<i>Efecto Pre-tratamiento x Sexo</i>	1	0.02
<i>Línea x Efecto Pre-tratamiento x Sexo</i>	1	0.21

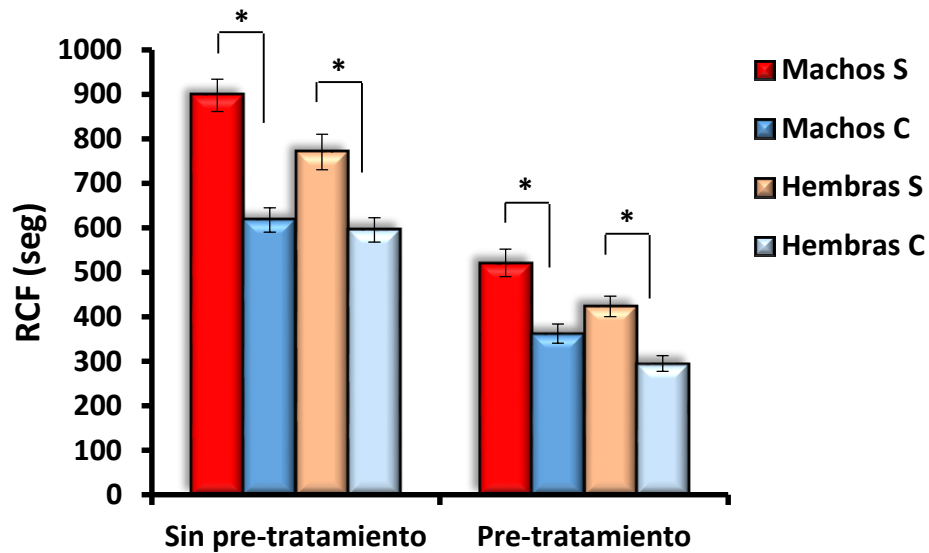


Figura 7. Valores medios (\pm Error estándar) de la RCF como respuesta correlacionada a la selección para el éxito de apareamiento en altas temperaturas en las líneas S y C de *D. buzzatii* para cada sexo por separado, en las mediciones sin el pre-tratamiento como así también en las mediciones donde se aplicó el pre-tratamiento. Los gráficos para cada línea réplica se muestran en el Anexo (Fig 2 anexo). Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0.05$)

2.6 Discusión

El éxito de apareamiento en alta temperatura aumentó fuertemente después de 15 generaciones de selección artificial en nuestra población experimental de *Drosophila buzzatii* (Fig 5). Este resultado muestra que el éxito de apareamiento bajo estrés térmico puede ser un blanco directo de la selección a temperaturas de estrés. Es importante destacar que el régimen de selección tuvo un efecto negativo sobre la resistencia al frío, aumentando el tiempo de recuperación del coma en ambos sexos (Fig 7), como así también se registró un efecto positivo sobre la resistencia al calor, aumentando la RCC (Fig 6). Estos resultados podrían

sugerir una relación de *trade-off* entre RCC y RCF a través del éxito del apareamiento a alta temperatura.

Además de las respuestas antagónicas observadas para RCC y RCF en las líneas seleccionadas, los resultados también revelaron la presencia de variación genética aditiva y una heredabilidad significativa para el éxito del apareamiento a alta temperatura en ambos sexos. El papel de la selección sobre el apareamiento en la adaptación de las poblaciones a condiciones nuevas o fluctuantes es un tema complejo (Candolin & Heuschele, 2008). Se sabe que la competencia por el apareamiento demanda un gran costo. En este sentido la selección artificial podría favorecer el *fitness* reproductivo de los individuos e influenciar la variabilidad poblacional de tal forma que resulte beneficiosa frente a nuevas condiciones ambientales y acelere el proceso de adaptación de la población en general. Sin embargo, los costos y beneficios de la selección podrían influir indirectamente en distintas condiciones ambientales dependiendo de la plasticidad poblacional. Los resultados de este trabajo sugieren que la selección para el apareamiento a alta temperatura también puede influir en el éxito del apareamiento a temperatura benigna, pero no en ambos sexos. Específicamente, cuando se estudió el apareamiento a 25°C, la diferencia entre las líneas S y C no solo fue específica del sexo (solo en los machos) sino que también resultó mucho menor que cuando fue estudiado a 33°C. Estudios previos han reportado diferencias similares entre sexos a temperatura benigna (Singh y Punzalan, 2018). Además, este hallazgo es consistente con la hipótesis bien conocida de que la selección para el apareamiento resulta más fuerte en machos que en hembras, según lo predicho por la teoría de la selección sexual (Andersson, 1994; Brooks & Endler, 2001; Darwin, 1871; Janicke et al., 2016). En *D. buzzatii*, la selección para la RCC también aumentó significativamente el éxito de

apareamiento en los machos a altas temperaturas, mientras que no tuvo impacto en la RCF (Sambucetti & Norry, 2015; Sambucetti et al., 2010). En este estudio se observó que la selección para el éxito de apareamiento a alta temperatura puede tener consecuencias importantes en la adaptación a ambos extremos de la escala térmica, al aumentar no solo la RCC sino también la RCF, lo que sugiere un posible *trade-off* entre la resistencia al calor y la resistencia al frío como resultado de la selección para el éxito de apareamiento en altas temperaturas. Como se mencionó anteriormente, los estudios de QTL mostraron un *trade-off* entre la RCC y la RCF asociado a un QTL en el medio del cromosoma 2 en diversas poblaciones de mapeo en *D. melanogaster* (Morgan & Mackay, 2006; Norry et al., 2007, 2008). Sin embargo, esta asociación no fue encontrada en experimentos de selección artificial tanto para la RCC como para la RCF en *D. buzzatii* (Bertoli et al., 2010; Sambucetti et al., 2010; Mori & Kimura, 2008; Gerken et al., 2016). En este estudio, se encontró una correlación negativa entre RCC y RCF como una respuesta correlacionada a la selección para el éxito del apareamiento en condiciones de estrés térmico. A diferencia de los estudios de selección artificial previos en *D. buzzatii* donde la relación de *trade-off* entre RCC y RCF no fueron encontradas (Bertoli et al., 2010; Sambucetti et al., 2010), nuestra población base se estableció a partir de un cruce masivo entre dos poblaciones que representan los extremos de una clina altitudinal. La amplia variación genética inicial presente en este diseño mostró que las respuestas antagonistas correlacionadas entre la RCC y la RCF pueden evolucionar como resultado de la selección artificial. Es posible que las respuestas correlacionadas a la selección sobre la RCC y la RCF pudieran ser el resultado de ligamiento en lugar de pleiotropía, ya que cierto grado de desequilibrio de ligamiento podría haberse generado como producto del cruzamiento entre las poblaciones de alta y baja altitud para construir nuestra población base. Sin embargo, a esta población híbrida se le permitió aparearse al azar durante

5 generaciones antes del inicio de la selección, permitiendo así la recombinación, y se produjeron muchas más rondas de recombinación a lo largo del régimen de selección, con la consecuente caída del posible desequilibrio de ligamiento generado. Por lo tanto, se puede sugerir que las respuestas correlacionadas entre la RCC y la RCF en este estudio son el resultado de pleiotropía o genes carácter-específicos, muy estrechamente ligados, como se sugiere en estudios de QTL en la especie *D. melanogaster* (Morgan & Mackay, 2006; Norry et al., 2007, 2008). Posibles efectos sobre las respuestas correlacionadas de los polimorfismos de inversión cromosómicas pueden descartarse dado que todas las inversiones detectables citológicamente son altamente polimórficas en la población de Chumbicha (Soto et al., 2010), una de las dos poblaciones cruzadas para establecer nuestra población base. Esta población fue seleccionada en estudios previos para la RCC y la RCF y no respondieron correlacionadamente a la selección en cada uno de estos rasgos (Bertoli et al., 2010; Sambucetti et al., 2010), lo que indica que tanto RCC como RCF no están ligados por inversiones polimórficas.

La sensibilidad a la temperatura en la fisiología del apareamiento puede operar a través de diversos sensores de calor que involucran múltiples sistemas relevantes en diferentes contextos (Miwa et al., 2018; Ni et al., 2013). En *Drosophila*, por encima de los 26°C el éxito de apareamiento disminuye con el aumento de la temperatura, incluso si se realizan intentos de cortejo en los machos, y la copulación cesa por encima de los 36°C (Miwa et al., 2018). Recientemente, Miwa et al. (2018) encontraron que la activación artificial de las neuronas sensibles al calor ("*células calientes*") en algunos órganos sensoriales de las hembras impide la cópula incluso a temperaturas permisivas por debajo de 32°C. Además, la pérdida mutacional de la proteína termorreceptora GR28b.d hace que las

hembras copulen incluso a 36°C (Miwa et al., 2018). Distintos tipos de moléculas podrían mediar las respuestas conductuales frente a temperaturas de estrés, facilitando la expresión independiente de distintas respuestas termosensoriales (Ni et al., 2013), que tal vez afecten también la RCC y la RCF como respuestas correlacionadas a la selección artificial. Aunque el gen *gr28b.d* no está incluido en los QTL para RCC y RCF en *D. melanogaster* (Norry et al., 2008), no se puede descartar la complejidad de las interacciones epistáticas.

En las respuestas correlacionadas a la selección, el pre-tratamiento por calor tuvo un efecto significativo solo en las líneas S, aumentando la RCC (Tabla 1 anexo, Fig 6), lo que sugiere que la sensibilidad al calor está implicada en la respuesta de selección. Con respecto al pre-tratamiento por frío, éste mejoró la RCF con una magnitud similar en todas las líneas S y C (Tabla 4; Tabla 2 anexo; Fig 7), lo que indica que dicha respuesta plástica de sensibilidad al frío fue en gran medida independiente de nuestro régimen de selección. Estos resultados son consistentes con lo sugerido en estudios previos de que las respuestas plásticas resultan mayores para los límites térmicos inferiores que para los superiores (Overgaard et al., 2011; Schou et al., 2017; Sgrò et al., 2016) La capacidad de *Drosophila* para responder a pre-tratamientos por calor se asocia con bajas tasas de síntesis de Hsps (Johnson et al., 2009), y la selección para la resistencia al calor generalmente reduce la expresión de Hsp70 (revisado en Sørensen et al., 2003). La falta de un efecto significativo del pre-tratamiento sobre la RCC en las líneas C podría depender del tiempo de exposición al calor utilizado en este estudio, mientras que las diferencias observadas para la RCC entre las líneas S y C fue más evidente después de aplicar el pre-tratamiento de calor (Fig 6). Es interesante que la plasticidad en la RCC (es decir, la plasticidad para los límites térmicos superiores) cambió como respuesta correlacionada a la selección para el éxito de apareamiento en alta

temperatura. También se encontraron recientemente efectos beneficiosos de pre-tratamientos por calor que mejoran el éxito del apareamiento a corto plazo a altas temperaturas en *D. melanogaster* (Stazione et al., 2019). Esta respuesta plástica es de relevancia ecológica en insectos pequeños que viven en ambientes térmicos fluctuantes, donde las exposiciones previas a un estrés por calor leve podrían mejorar el éxito de apareamiento a temperaturas elevadas. Además, se ha visto que la exposición previa al estrés por calor y frío también aumenta la capacidad de localizar alimentos y recursos en el campo (Kristensen et al., 2007; Loeschcke & Hoffmann, 2007). A medida que las condiciones climáticas mundiales vayan cambiando más rápidamente de lo estimado previamente (IPCC, 2018), la persistencia de las poblaciones animales expuestas al estrés climático a menudo dependerá de las respuestas debidas a plasticidad fenotípica como las mencionadas anteriormente, además de las respuestas evolutivas (Deutsch et al., 2008; Franks & Hoffmann, 2012; Huey et al., 2012; Kingsolver et al., 2011).

Los resultados expuestos en este capítulo muestran por primera vez una relación clara entre el éxito del apareamiento bajo estrés por calor y RCC, con las líneas S siendo más sensibles al frío que las líneas C (es decir, un mayor tiempo de RCC después de seleccionar el éxito del apareamiento a 33°C). Además, la selección para el éxito del apareamiento en altas temperaturas reveló una asociación de *trade-off* entre RCC y RCF, que fue sugerida previamente por estudios de QTL pero que no se encontró en experimentos de selección artificial sobre la RCC y la RCF en poblaciones de bajas altitudes. Estos resultados nos ayudan a comprender la complejidad de las correlaciones genéticas entre los rasgos de adaptación térmica.

Capítulo 3: Fecundidad y Longevidad como caracteres correlacionados al éxito de apareamiento en alta temperatura.

3.1 Introducción

Los rasgos reproductivos son factores determinantes de la distribución de las especies en ambientes terrestres. El éxito de apareamiento es uno de los rasgos más estrechamente relacionado con el *fitness* reproductivo (Brooks & Endler, 2001). Como fuera discutido en capítulos anteriores, el éxito del apareamiento en alta temperatura puede ser un blanco directo de selección para la adaptación a la temperatura ambiental (Dolgin et al., 2006; Sambucetti & Norry, 2015). La relación entre caracteres reproductivos y de historia de vida es bien conocida (Le Bourg et al., 1993; Tatar et al., 1996) y diversas teorías han sido propuestas para explicar su evolución (Williams, 1957; Kirkwood, 1977), por lo que resulta importante estudiar la posible afectación de caracteres de historia de vida como respuesta a la selección sobre el éxito de apareamiento.

La influencia de la relación entre la reproducción y la longevidad en las trayectorias de vida de muchas especies ha sido estudiada por larga data en varios trabajos (ej., Partridge et al., 1986; Partridge et al., 2005; Le Bourg, 2007). Estos dos rasgos están fuertemente involucrados en una conocida relación de “*trade-off*” (Rose & Charlesworth, 1980; Luckinbill et al., 1984; Rose, 1984; Zwaan et al., 1995; Sambucetti et al., 2005; Scannapieco et al., 2009; Flatt, 2011). Entre los rasgos reproductivos, la fecundidad es un rasgo determinante y aporta información sobre el estado físico de la hembra, pudiendo verse afectada por los machos y la edad de los individuos (Norry et al., 2006). Estudios anteriores

encontraron resultados interesantes mediante diseños de evolución experimental entre longevidad y fecundidad, donde la fecundidad mostró una mayor reducción en las moscas que tenían valores altos de vida media (Miyatake, 1997; Djawdan et al., 2004; Scannapieco et al., 2009). Los resultados evidencian una correlación negativa entre ambos caracteres (Zwaan et al., 1995; Rose, 1999; Partridge & Mangel, 1999; Flatt, 2011), lo cual resulta consistente con lo predicho por las teorías evolutivas del envejecimiento (Kirkwood, 1977; Kirkwood & Austad, 2000).

Antes que nada, cabe aclarar que estas teorías proponen a la fuerza de la selección natural como la principal variable a tener en cuenta para abordar, explicar y comprender el proceso de envejecimiento. En condiciones naturales resulta bastante frecuente que los individuos vivan solo una fracción del tiempo total que podrían vivir en condiciones ambientales controladas donde no existan factores extrínsecos tales como predación, hambruna, fluctuaciones y estrés térmico, entre otros. Debido a esto, en la mayoría de los casos los individuos mueren a una edad relativamente temprana. La primera teoría presentada postula que a edades avanzadas la fuerza de la selección natural es muy débil (casi ausente) como para impedir la expresión de genes con efectos deletéreos, dando como resultado una acumulación de mutaciones perjudiciales que interferirán en el desempeño del individuo tardíamente -la teoría de la acumulación de mutaciones - (Medawar, 1952). Según esta teoría, la acumulación de mutaciones perjudiciales que actúan tardíamente en la vida del individuo, durante el paso de las generaciones, y que resultan “imperceptibles” para el mecanismo de selección natural es lo que condujo al origen y evolución de la senescencia (Medawar, 1952; Partridge & Barton, 1993). La segunda teoría propone el aumento en la segregación de alelos pleiotrópicos con efectos perjudiciales a edades avanzadas pero beneficiosos en edades tempranas sobre la reproducción -la teoría de la pleiotropía antagonista- (Williams, 1957).

Como se mencionó anteriormente la selección resulta débil en edades avanzada, sin embargo, en edades tempranas opera con fuerza. De esta forma, la fuerza selectiva favorecerá a los alelos que confieran ventajas reproductivas en edades tempranas incluso cuando algunos de ellos presenten efectos perjudiciales en edades avanzadas. Este concepto es fundamental para comprender la idea del *compromiso evolutivo o trade off* entre los distintos caracteres de historia de vida. A partir del cual se puede considerar que la senescencia habría evolucionado como un subproducto de la selección natural dado que la selección de genes pleiotropicos con efectos beneficioso tempranos implica perjuicios en el desempeño del individuo en edades tardías (Zwaan, 1999). Como tercera teoría se presenta la denominada “teoría del soma desechable” (revisada en Kirkwood & Austad, 2000). En principio, todo organismo vivo experimenta ineludiblemente daños somáticos que son acumulativos y progresivos con la edad. Durante el desarrollo de la vida, la reparación de dichos daños resulta sumamente necesaria para llevar a cabo mejores desempeños que deriven en ventajas evolutivas. Sin embargo, los mecanismos de reparación involucran demandas energéticas que compiten con muchas otras funciones y en especial con la reproducción. Esta teoría propone que la senescencia ha evolucionado de tal manera que la cantidad de energía invertida en mantener y reparar el soma es suficiente para mantener vivo a un organismo el tiempo necesario para reproducirse (Kirkwood & Austad, 2000). La teoría del soma desechable tiene su fundamento en la idea de que el mantenimiento celular es costoso y que la energía disponible en un individuo es finita. Por lo cual se puede pensar nuevamente en el concepto de *trade-off*, entre algunos factores tales como la resistencia a distintos tipos de estrés, niveles de fecundidad y la longevidad. Considerando que los factores extrínsecos del ambiente hacen que los individuos se mueran tempranamente respecto a la potencialidad de vida total, según esta teoría, los organismos evolucionan de manera tal que la relación del compromiso evolutivo

sea óptima entre la reparación del soma y la reproducción. En términos evolutivos generales tomando en cuenta que los individuos se mueren a edades tempranas, resulta mucho más ventajoso aumentar la capacidad reproductiva en edades relativamente tempranas en contraposición a invertir la energía en la reparación del daño somático que sufren irremediablemente todos los organismos. De esta forma el principal determinante en la evolución de la longevidad sería el nivel de mortalidad extrínseca experimentado en condiciones naturales (Kirkwood & Austand, 2000). Tomando en cuenta lo expuesto en las tres teorías evolutivas de la senescencia si el nivel de mortalidad extrínseca es casi nulo, podría predecirse que la selección natural actuaría fuertemente incluso en edades avanzadas.

Algunos estudios también sugieren que la longevidad y la reproducción temprana a veces pueden presentarse de manera desacoplada (Kengeri et al., 2013; Khazaeli & Curtsinger, 2014; Wit et al., 2013). Además, es sabido que estos rasgos se encuentran fuertemente influenciados por factores ambientales como la temperatura (Huey et al., 1995; Sisodia & Singh, 2002; Scannapieco et al., 2009; Sambucetti et al., 2015; Stazione et al., 2017).

Se sabe que la fecundidad puede verse afectada por la presencia de machos (Serradilla & Ayala, 1983). Los machos pueden influir en la fisiología y el comportamiento de la hembra, especialmente los relacionados con el apareamiento (Averhoff & Richardson, 1976; Fowler & Partridge, 1989). Un efecto de los machos sobre la fecundidad en las hembras es el apareamiento múltiple, cuya presencia podría aumentar la fecundidad y tener efectos acumulativos sobre la vida reproductiva de las hembras (Turner & Anderson, 1983; Arnqvist & Nilsson, 2000). Además, la exposición de las hembras a los machos podría afectar directamente la longevidad de las mismas, debido al costo energético para la producción de

huevos (Partridge et al., 1987), así como a la transferencia de fluidos seminales que albergan proteínas perjudiciales para las hembras (Chapman, 2001; Wigby & Chapman, 2005).

En este capítulo se utilizaron las líneas seleccionadas para el éxito de apareamiento en alta temperatura de *Drosophila buzzatii* para evaluar la fecundidad y la longevidad como posibles respuestas correlacionadas a dicha selección.

3.2 Objetivos

Evaluar las posibles respuestas correlacionadas a la selección para el éxito de apareamiento en alta temperatura sobre otros caracteres estrechamente relacionados al “*fitness*” como son la longevidad y la fecundidad.

3.3 Hipótesis

La selección artificial para el éxito en el apareamiento bajo alta temperatura produce efectos en la capacidad de los individuos para poder aparearse más exitosamente que otros en una elevada temperatura. Pero también provoca efectos correlacionados en caracteres reproductivos y de historia de vida. Como resultado de esto, se espera una respuesta correlacionada, a la selección del éxito de apareamiento, en caracteres tales como la fecundidad y la longevidad. Además, teniendo en cuenta lo que predicen las teorías evolutivas del envejecimiento, se podría esperar una relación de *trade-off* entre los datos obtenidos para fecundidad y longevidad.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Longevidad

La longevidad se midió en cada réplica de ambos tipos de líneas (S y C) en tres condiciones térmicas diferentes: 25°C, 30°C y mediante un tratamiento cíclico. El tratamiento cíclico constó de cuatro intervalos térmicos periódicos (dos rampas de calor y dos rampas de frío, Figura 1). El primer intervalo aumentó desde 17°C a una tasa promedio de 0.045°C min⁻¹ hasta alcanzar los 25°C entre las 8.00 y las 11.00 hs. El segundo intervalo aumentó la temperatura desde 25°C a una tasa promedio de 0.039°C min⁻¹ hasta un máximo térmico de 32°C entre las 11.00 y las 16.00hs. El tercer intervalo disminuyó la temperatura partiendo desde 32°C a una tasa promedio de -0,029°C min⁻¹ hasta alcanzar los 20°C entre las 16.00 y las 21.00hs. El último intervalo disminuyó desde 20°C a una tasa promedio de -0,004°C min⁻¹ hasta un mínimo térmico de 17 ° C entre las 21.00 y las 8.00hs. El fotoperíodo utilizado consistió en 14 horas de luz (7.00 - 21.00hs) y 10 horas de oscuridad (21.00–7.00hs) (Fig 1). Para los tres tratamientos térmicos se obtuvieron individuos experimentales colocando tres botellas estándar de cada línea réplica con 30 machos y 30 hembras para que ovipongan durante 4 días. Los adultos emergidos fueron colectados, sexados bajo anestesia ligera con CO₂ y mantenidos a 25°C para todas las líneas. Luego, para cada línea réplica, se establecieron 10 viales con 10 machos y 10 hembras de un día de edad. Los individuos fueron transferidos a viales frescos cada 2 días y se examinó en todos los viales el número de individuos muertos. El número de viales se redujo gradualmente a medida que ocurrían las

mueres, y los adultos sobrevivientes se mantuvieron a una densidad lo más cercana posible a 20 por vial. Los datos de longevidad se transformaron por raíz cuadrada para eliminar la dependencia de la varianza sobre la media y se evaluaron con un ANOVA , utilizando Tratamiento térmico, Líneas (S vs C) y Sexo como factores fijos y replicas dentro de Línea como un factor aleatorio.

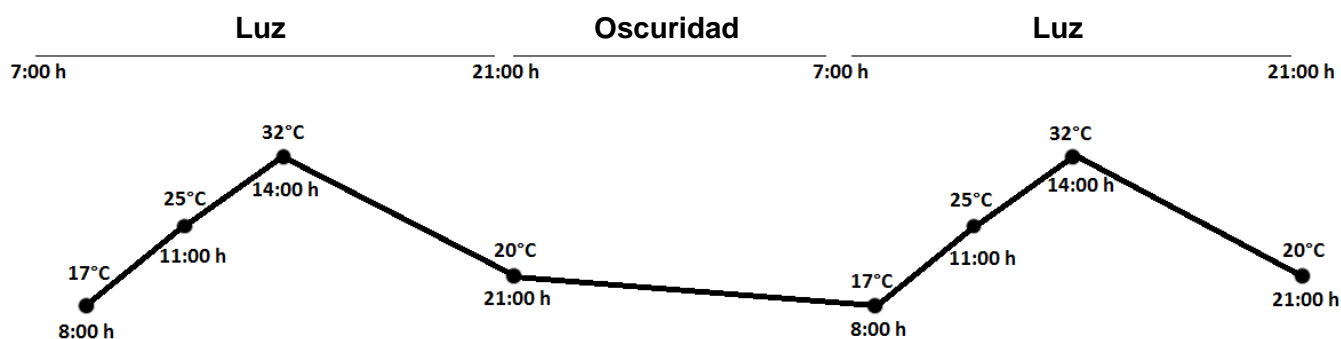


Figura 1. Esquema de rampas de temperatura empleado en el tratamiento cíclico de medición de la longevidad. El tratamiento consistió en cuatro intervalos térmicos periódicos (dos rampas de calor y dos rampas de frío), con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 14:8 horas.

Se estimó la tasa de mortalidad específica por edad $\mu(x)$ como donde $\mu(x) = -\ln(1 - qx)$, donde $qx = dx / Nx$, siendo dx el número de moscas que mueren en el intervalo x a $x + 1$ y Nx el número moscas vivas en el día x (Elandt – Johnson & Johnson, 1980; Tatar et al., 1997). El modelo de Gompertz ($\mu(x) = ae^{bx}$) proporcionó el mejor ajuste de los datos, donde a es la línea base de la tasa de mortalidad y b es el parámetro dependiente de la edad, o la tasa a la que la mortalidad se acelera con la edad (es decir, la tasa demográfica de envejecimiento, Finch et al., 1990). Ambos parámetros de mortalidad (a y b) se estimaron para cada línea y condición térmica mediante máxima probabilidad usando el programa WinModest (Pletcher, 1999) y se analizaron las diferencias entre líneas para cada sexo y condición térmica.

3.4.2 Fecundidad

La fecundidad se midió a 25°C y 30°C para todas las líneas, en dos tipos de ambientes con respecto a los sexos: Exposición constante de machos (ECM) y Exposición limitada de machos (ELM). Las moscas vírgenes se colectaron y se separaron por sexo. Los individuos utilizados en la medición tuvieron 1 día de edad. Para la condición de ECM, se colocaron una hembra virgen junto a dos machos vírgenes en viales que contenían una cuchara pequeña con agar y levadura disecada. Para la medición se contó el número de huevos puestos de las cucharas cada 2 días, cuando las cucharas se reemplazaron por otras cucharas idénticas con agar y levadura, hasta la muerte de cada hembra. Para la condición de LEM se colocaron individuos vírgenes de 1 día de edad en una botella de vidrio de 500 ml (35 x 9 cm) con 50 ml de medio de cultivo fresco (puré de papas instantáneo con agua, nipagin y levadura como medio de cultivo) a 33°C en una incubadora térmica durante 4 horas para permitir la cópula. Posteriormente las hembras se transfirieron por separado a viales que contenían una cuchara pequeña con agar y levadura. Posteriormente, se contó el número de huevos de las cucharas cada 2 días hasta la muerte de la hembra. En ambas condiciones (ECM y ELM), se establecieron 15 viales para cada línea réplica con un total de 45 viales por línea (S y C) en cada tratamiento de temperatura. Se realizaron las estimaciones para fecundidad temprana y fecundidad tardía. La fecundidad temprana se estimó como el número total de huevos puestos por una hembra durante la primera semana de vida. Mientras que la fecundidad tardía se estimó como la cantidad total de huevos puestos durante las dos primeras semanas de vida. Los datos de fecundidad temprana y tardía se analizaron mediante ANOVA utilizando

Ambiente social (ECM vs ELM), Tratamiento térmico (25°C vs 30°C) y Línea (S vs C) como factores fijos y Réplica dentro de tipo de línea como un factor al azar.

Las pruebas estadísticas utilizadas para ambos caracteres, se llevaron a cabo con el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2017).

3.5 Resultados

La Figura 2 muestra los valores medios de longevidad obtenidos en cada uno de los tres tratamientos térmicos experimentales para cada línea y sexo. Los resultados obtenidos evidencian diferencias significativas, entre las líneas, dependientes del sexo. El análisis de ANOVA realizado exhibe diferencias significativas entre las líneas, también arroja valores significativos en las interacciones con el factor sexo, lo cual evidencia una clara sexo-especificidad en los datos de longevidad (Tabla 1, Fig 2). Por esta razón se realizaron análisis de efectos simple mediante ANOVA para cada sexo por separado. Se encontraron diferencias significativas en los machos, donde los machos de las líneas C vivieron en promedio más tiempo que los de las líneas S. En el caso de las hembras no se encontraron diferencias significativas (ANOVA con [1] Tratamiento térmico, [2] Línea como factores fijos y Réplica como factor al azar dentro de Línea: [1] $F_{(2,1415)}= 1951.16^{***}$, [2] $F_{(1,1415)}= 17.77^{***}$, [1]×[2] $F_{(2,1415)}=0.11$ para los machos; [1] $F_{(2,1393)}= 63.11^{***}$, [2] $F_{(1,1393)}=0,03$, [1]×[2] $F_{(2,1393)}=0.54$ para las hembras;*** $P<0.001$; Tabla 3 anexo).

Cuando se realizaron comparaciones de LDS Fisher para evaluar el efecto de los distintos tratamientos térmicos para ambas líneas en cada sexo por separado, se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2). En todos los casos el tratamiento cíclico

tuvo un efecto beneficioso respecto al tratamiento de estrés constante dado que las moscas que fueron expuestas a fluctuación térmicas diariamente resultaron significativamente más longevas que aquellas moscas expuestas a temperatura de estrés constante a 30°C (Tabla 2; Fig 2). En el caso de los machos tanto en las líneas S como en las C se observa que los valores medios de longevidad de las moscas expuestas al tratamiento cíclico fueron significativamente mayores que el de las moscas expuestas a 30°C. Mientras que en las hembras el efecto beneficioso del tratamiento cíclico resulta aún mayor que en los machos ya que las moscas sometidas a este tratamiento no solo resultaron significativamente más longevas que las moscas sometidas a condición de estrés constante, sino que también resultaron más longevas que las moscas expuestas a temperatura benigna (Tabla 2; Fig 2).

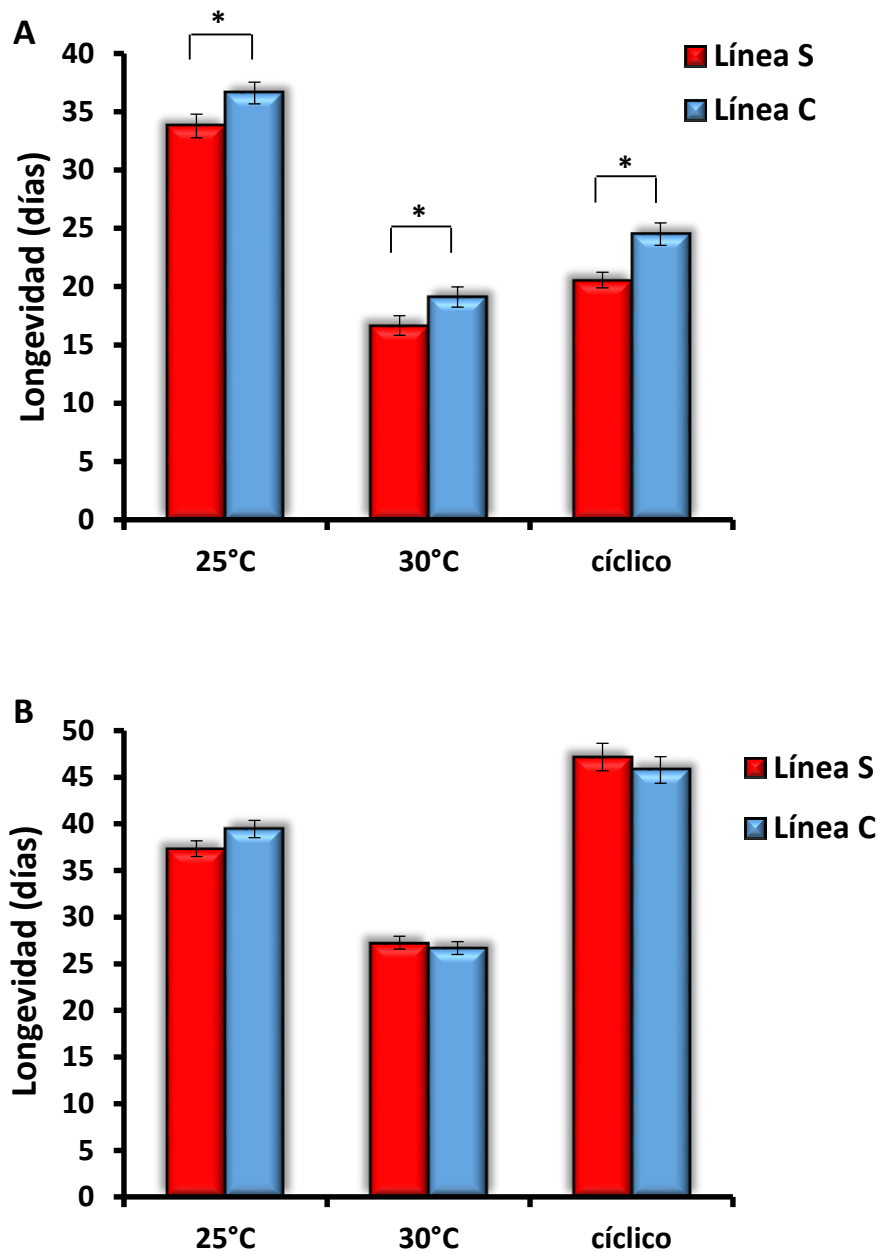


Figura 2. Valores medios (\pm Error estándar) de longevidad (días) en (A) machos y (B) hembras de *Drosophila buzzatii* a temperaturas constantes de 25°C y 30°C como así también bajo un régimen térmico cíclico para las líneas S y C. Los gráficos para cada línea réplica se muestran en el Anexo (Fig 3 anexo). Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.05$).

Tabla 1. ANOVA para longevidad (días), con Tratamiento térmico, Línea (S vs C) y Sexo como factores fijos, y Réplica dentro de Línea como factor aleatorio. Todos los valores corresponden a estadístico F.

	<i>gl</i>	<i>F</i>
Tratamiento térmico [1]	2	199.89***
Línea [2]	1	9.30**
Sexo [3]	1	444.19***
[1]*[2]	2	0.47
[1]*[3]	2	93.74***
[2]*[3]	1	6.52*
[1]*[2]*[3]	2	0.93

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Tabla 2. Comparaciones de LSD Fisher entre los distintos tratamientos térmicos empleados (25°C, 30°C y tratamiento cíclico) para cada sexo por separado. Los valores medios de longevidad con letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas (P <0.05).

Comparaciones	Machos			Hembras		
	<i>Medias</i>	<i>E.E</i>	<i>LSD Fisher</i>	<i>Medias</i>	<i>E.E</i>	<i>LSD Fisher</i>
25°C	5.75	0.07	c	6.04	0.07	b
30°C	4.03	0.06	a	5.08	0.07	a
Cíclico	4.58	0.06	b	6.58	0,07	c

La mortalidad específica por edad mostró diferencias significativas en los parámetros solo a 25°C (Tabla 3). En los machos a 25°C, la tasa de mortalidad (b) fue mayor en las líneas

C que en las líneas S, mientras que la tasa de la línea base (a) fue mayor en las líneas S que en las líneas C. En el caso de las hembras a 25°C, el parámetro (a) fue mayor en las líneas C que en las líneas S. A 30°C y con el tratamiento cíclico para ambos sexos no se encontraron diferencias de parámetros (Tabla 3; Fig4).

Tabla 3. Valores de la tasa de la línea base (a) y la tasa de mortalidad (b) para la función de mortalidad logística para machos y hembras de las líneas S y C en *Drosophila buzzatii* a 25°C, 30°C, y en un tratamiento cíclico (ver M y M). Los valores de χ^2 (d.f. = 1) se muestran para las comparaciones entre las líneas S y C.

Sexo	Temperatura (°C)	Parámetros	Líneas S	Líneas C	χ^2
Machos	25	a	0.00681	0.00329	7,28**
		b	0.05519	0.07753	4,9*
	30	a	0.00046	0.00053	3,1
		b	0.71620	0.62267	1,22
	Cíclico	a	3.22e-006	0.00003	1,94
		b	0.80179	0.61723	2
Hembras	25	a	0,00001	0,00033	4,86*
		b	0,20197	0,14167	2,46
	30	a	0.00284	0.00407	0,58
		b	0.11886	0.11157	0,14
	Cíclico	a	0.00274	0.00587	1,56
		b	0.04805	0.03602	1,82

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

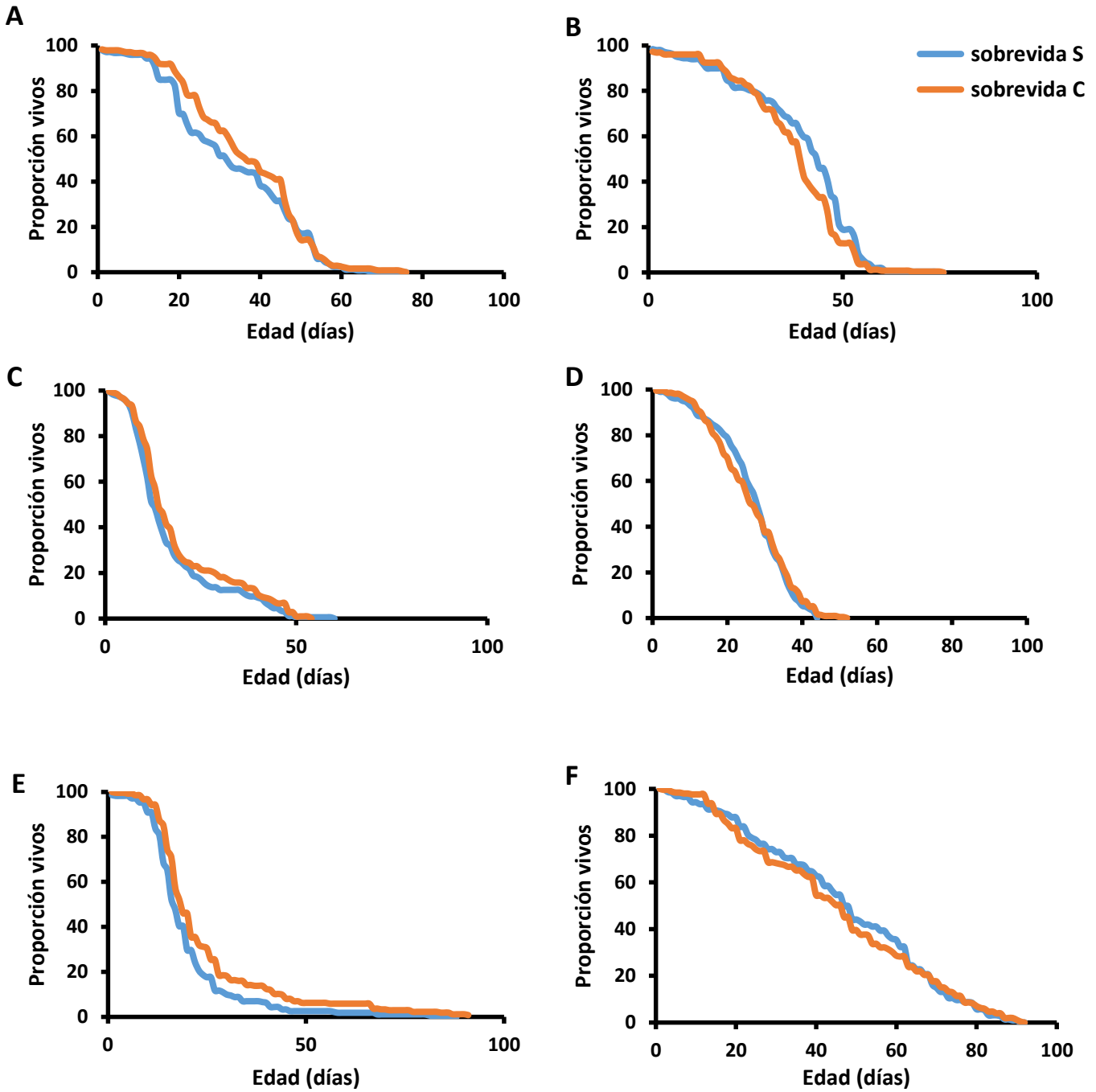


Figura 3. Curvas de supervivencia o sobrevida de (A) machos y (B) hembras a 25°C, de (C) machos y (D) hembras a 30°C y (E) machos y (F) hembras bajo un régimen térmico cíclico para las líneas S y C de *Drosophila melanogaster*.

El análisis realizado para los datos de fecundidad mediante ANOVA arrojó diferencias significativas entre los tratamientos térmicos (25°C vs 30°C) tanto para fecundidad temprana como para fecundidad tardía. Mientras que las diferencias significativas detectadas entre los ambientes sociales (ECM vs ELM) solo correspondieron a los datos obtenidos para la fecundidad temprana. Además, la interacción entre ambos factores resultó significativa tanto en las estimaciones de fecundidad temprana como tardía (Tabla 4). Debido a la significancia en las interacciones se realizaron pruebas de ANOVA particionando el análisis para ambos tratamientos térmicos como así también para ambos ambientes sexuales. Para el caso de ECM no se observaron diferencias entre las líneas, tanto para fecundidad temprana como para fecundidad tardía, en ninguna de las dos condiciones térmicas (Tabla 4 anexo; Fig 4). Sin embargo, se observó un ligero patrón con una mayor fecundidad en las líneas S que en las líneas C. En el caso de ELM los análisis mostraron diferencias estadísticamente significativas en ambas estimaciones de fecundidad (Tabla 5 anexo; Fig 4). A 30°C, las hembras de las líneas S en promedio resultaron más fecundas que las hembras de las líneas C tanto en la medición de fecundidad temprana, como así también en la fecundidad tardía. Mientras que a 25°C no se observaron diferencias significativas (Tabla 5 anexo; Fig 4). Sin embargo, aquí se observa un patrón donde las líneas S resultaron más fecundas que las líneas C (Fig 4).

Cuando se analizaron los patrones del número de huevos puestos por día para cada línea en cada tratamiento térmico por separado se puede observar que en el caso de las hembras a ECM se evidencia un efecto fuerte de la temperatura del tratamiento. Las hembras expuestas a temperatura de estrés ponen la mayoría de los huevos en los primeros cinco días de vida llegando a un pico máximo aproximadamente el tercer día de vida, mientras que las hembras expuestas a 25°C muestran un patrón de puesta de huevos más retrasado que en

condición de estrés, llegando al máximo cerca del séptimo día de vida (Fig 5). En el caso de las hembras expuestas a ELM los patrones de puesta de huevos no evidencian las diferencias cualitativas entre tratamientos que fueron observadas en el caso anterior. Es decir, las diferencias temporales en el pico máximo de puesta de huevos observadas entre los tratamientos de 30°C y 25°C en condición de presencia constante del macho parecen no ocurrir cuando la presencia del macho es limitada (Fig 5).

Tabla 4. ANOVA para la fecundidad temprana y la fecundidad tardía, utilizando Ambiente sexual, Tratamiento térmico y Línea como factores fijos y Réplica dentro de Línea como factor aleatorio. Todos los valores corresponden al estadístico F.

	Fecundidad temprana		Fecundidad tardía	
	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>
Ambiente social [1]	1	38.10***	1	0.002
Tratamiento térmico[2]	1	10.31**	1	20.83***
Línea [3]	1	1.68	1	0.27
[1]*[2]	1	110.97***	1	38.99***
[1]*[3]	1	4.97*	1	3.16
[2]*[3]	1	1.98	1	0.45
[1]*[2]*[3]	1	1.04	1	0.48

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

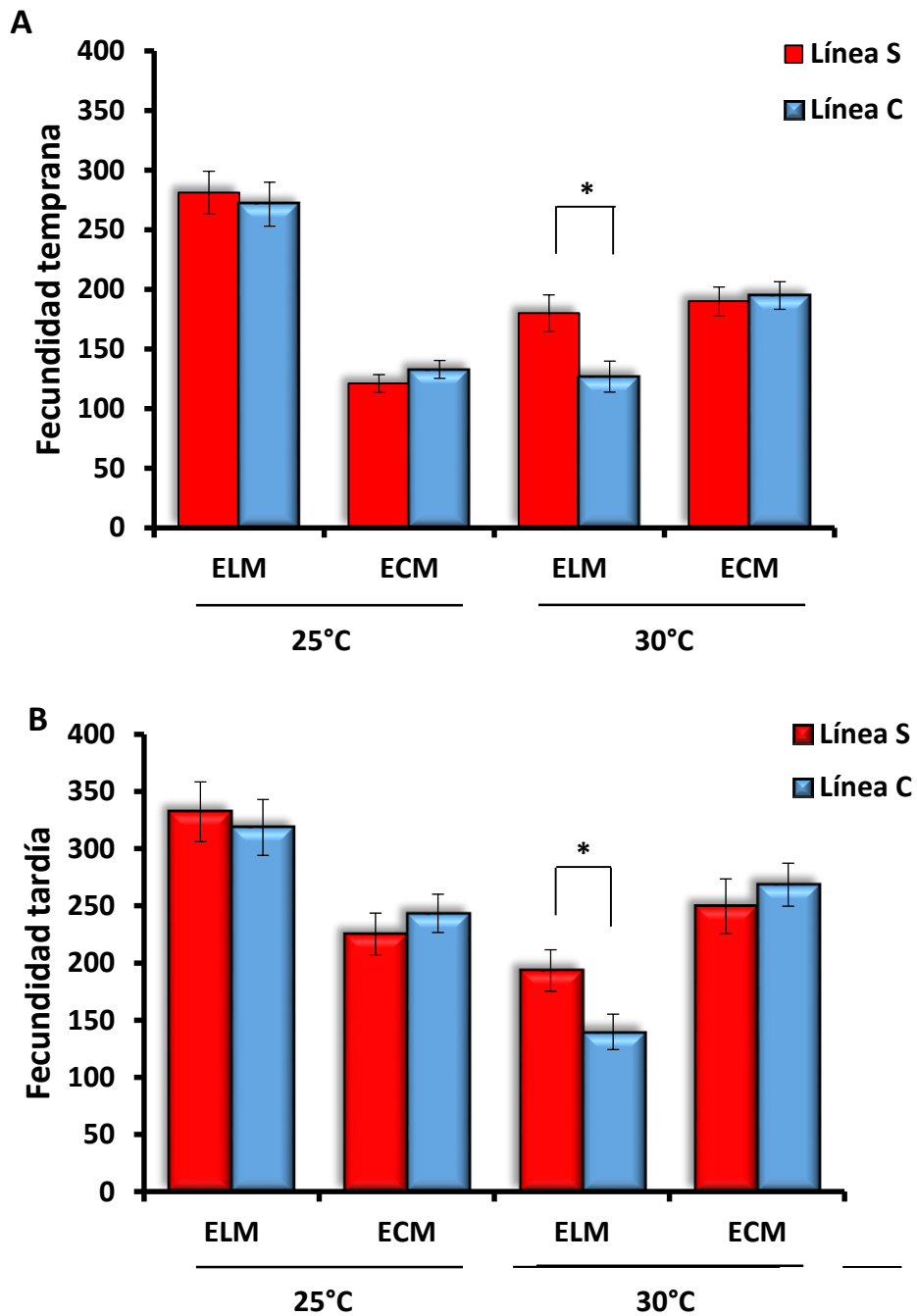


Figura 4. Valores medios (\pm Error estándar) de fecundidad temprana (A) (total de huevos puestos durante la primera semana de vida) y fecundidad tardía (B) (total de huevos puestos durante las primeras dos semanas de vida) bajo Exposición constante (ECM) y limitada (ELM) de machos en hembras de *Drosophila buzzatii* a 25°C y 30°C para las líneas S y C. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $P < 0.05$).

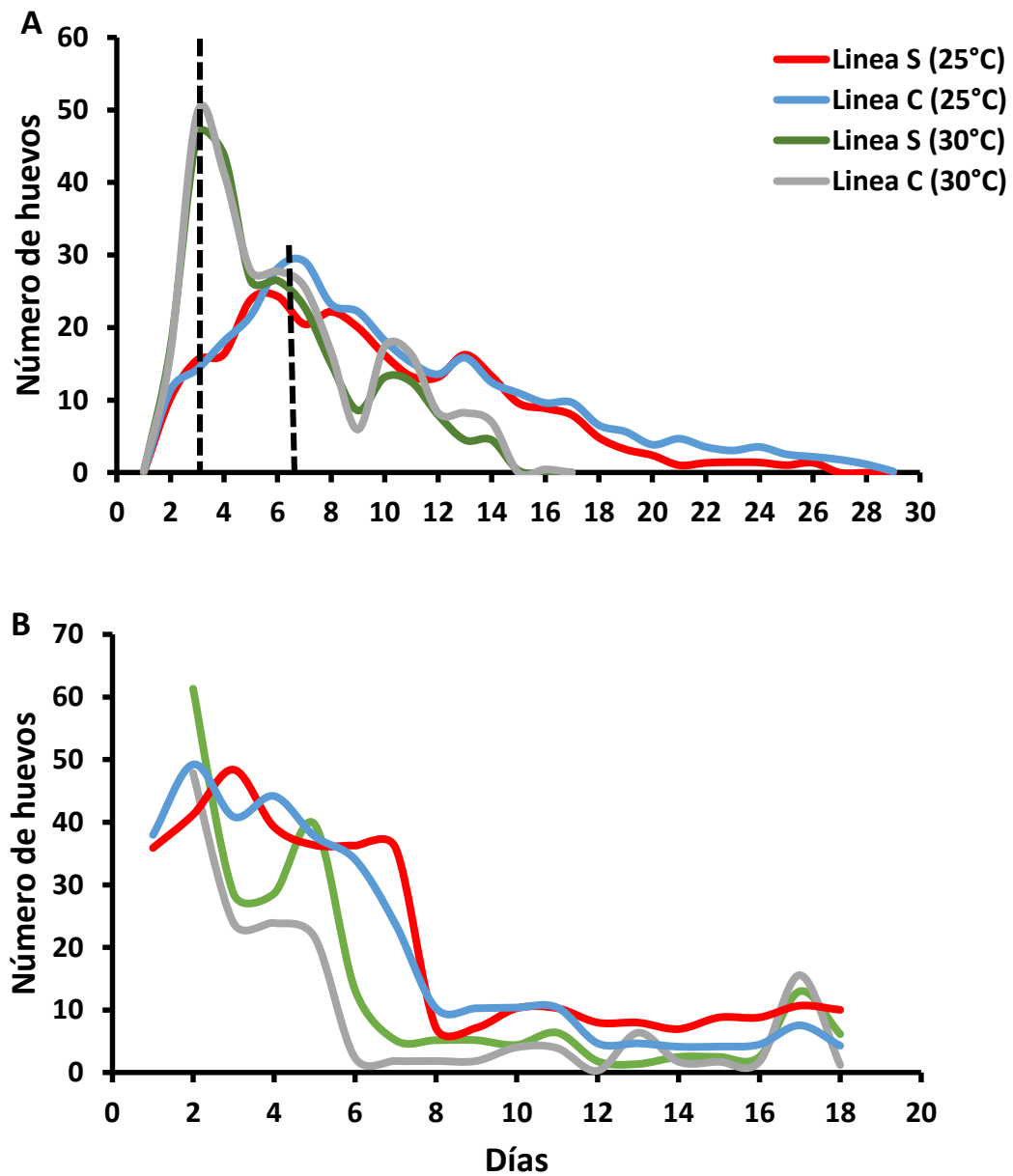


Figura 5. Número de huevos puestos por días para el conjunto total de hembras de *Drosophila buzzatii* bajo la exposición constante (A) y limitada (B) de machos a 25°C y 30°C para las líneas S y C. Las barras verticales punteadas corresponden a estimaciones cualitativas del pico de puesta de huevos en cada tratamiento térmico.

3.6 Discusión

La selección del éxito de apareamiento mostró un efecto significativo tanto en la longevidad como en la fecundidad. Los resultados mostraron que el régimen de selección artificial tuvo un efecto negativo sobre la longevidad, disminuyendo el tiempo de vida promedio, pero solo en los machos. Se observaron efectos sobre la longevidad en los machos en todas las condiciones térmicas experimentales (25°C, 30°C y bajo el tratamiento cíclico) donde los machos de las líneas C vivieron más tiempo que los de las líneas S, mientras que entre las hembras de las líneas S y C no se encontraron diferencias significativas. En el capítulo anterior se detalló que las líneas S tuvieron mayor éxito de apareamiento que las líneas C. Los resultados del presente capítulo mostraron que las líneas con mayor éxito de apareamiento (S) resultaron menos longevas que las líneas de menor éxito (C). El hecho de que el efecto negativo sobre la longevidad haya sido observado solo en los machos podría estar asociado a los costos energéticos del cortejo sexual realizado por los machos previo a la cópula (Papadopoulos et al., 2010). Varios estudios han demostrado que la reproducción temprana puede causar una disminución en la longevidad (revisado en Kirkwood & Austand, 2000), lo que es consistente con el conocido "costo de la reproducción" postulado por la teoría de pleiotropía antagonista (Williams, 1966).

La longevidad mostró también diferencias significativas entre los tratamientos térmicos. En ambas líneas (S y C) la longevidad media fue mayor a 25°C que a 30°C. Estas diferencias podrían sugerir que bajo condiciones de estrés térmico constante los individuos requieren un mayor costo energético para el mantenimiento del metabolismo que en condiciones de temperaturas benignas (Krebs & Loeschcke, 1994; Hoekstra & Montooth, 2013). Por otro lado, los resultados mostraron que la longevidad en el tratamiento térmico

cíclico aumentó la vida media en comparación con la longevidad a 30°C en ambos sexos. En los machos, la longevidad media bajo el tratamiento cíclico fue significativamente mayor que a 30 °C pero menor que a 25°C. Mientras que en las hembras la longevidad media bajo el tratamiento cíclico mostró un fuerte aumento, siendo mayor que a 25°C y 30°C. Los resultados mostraron que el régimen térmico cíclico tuvo un efecto beneficioso que aumentó la longevidad en todas las líneas, respecto al tratamiento a 30°C constante. Estos resultados son importantes dado que los regímenes térmicos fluctuantes tienen una mayor relevancia ecológica que los regímenes constantes, ya que son más representativos de los ambientes naturales (Klepsatel et al., 2013; Manenti et al., 2016). Las poblaciones expuestas a altas amplitudes de temperatura diaria podrían experimentar un efecto de aclimatación que mejore la respuesta a posteriores exposiciones al estrés térmico, impactando también en la longevidad. Esto podría ser muy importante para la adaptación a los cambios en la temperatura ambiental ascendente, en especial bajo el actual escenario de cambio climático global (Hoffmann et al., 2003b; Bowler & Terblanche, 2008; Chown et al., 2010; Sgrò et al., 2016; Stazione et al., 2019)

La fecundidad en ECM no mostró diferencias significativas entre las líneas S vs C en ambas condiciones térmicas, tanto en la fecundidad temprana como en la fecundidad tardía. Estos resultados mostraron que la fecundidad –bajo las condiciones experimentales determinadas en este trabajo- no respondió de manera correlacionada a la selección artificial. Además, no se encontraron relaciones entre la longevidad y la fecundidad. Algunos estudios previos observaron una correlación negativa entre la esperanza de vida y la fecundidad (Luckinbill et al., 1984; Rose, 1992; Rose, 1999; Partridge & Mangel, 1999) que podría estar mediada por genes pleiotrópicos con efectos antagónicos entre éstos caracteres. Sin embargo, otros estudios no encontraron relaciones de *trade-off* entre la fecundidad y la longevidad

(Müller et al., 2001). Los resultados de este trabajo mostraron que no hubo diferencias significativas en la fecundidad entre líneas S y C, con la consecuente falta de correlación con la longevidad que sí mostró una respuesta correlacionada a la selección sobre el éxito de apareamiento. Estos resultados sugieren que las respuestas antagonistas entre estos caracteres podrían depender del carácter seleccionado y la temperatura. Siendo consistente con lo señalado por Anderson et al. (2011), donde sugieren que las compensaciones observadas son a menudo altamente condicionales. En ausencia de las condiciones necesarias, la longevidad y la fecundidad temprana podrían desacoplarse (Messina & Slade, 1999; Khazaeli & Curtsinger, 2010).

Sin embargo, en ELM, se encontraron diferencias significativas tanto en la fecundidad temprana como en la fecundidad tardía a temperatura elevada (30°C). Los resultados mostraron que el régimen de selección artificial térmica tuvo efectos positivos significativos en la fecundidad solo bajo condiciones de temperaturas estresantes. Esto demuestra que la selección artificial tuvo un efecto beneficioso sobre la respuesta de la fecundidad en las líneas S en condiciones de alta temperatura respecto a las líneas C. Además, los resultados mostraron una asociación negativa entre la longevidad y la fecundidad en esta condición térmica (30°C). Las líneas menos longevas mostraron un aumento de la fecundidad en la exposición limitada de los machos. Esto es consistente con lo predicho según las teorías del envejecimiento, mediante las cuales se propone que existe una relación de compensación entre un desempeño beneficioso en la reproducción temprana y el costo de disminución de la reproducción y supervivencia más adelante en la vida. Una posible explicación a la relación de *trade-off* evidenciada en los resultados de este trabajo, es el aumento en la segregación poblacional de alelos pleiotrópicos con efectos beneficiosos en el *fitness* en edades tempranas pero perjudiciales en edades avanzadas. Esta teoría hace foco en el concepto del

“*compromiso evolutivo*” entre los caracteres reproductivo y de historia de vida dado que la selección es débil en edades avanzadas pero fuerte en edades tempranas, por lo tanto, favorecerá a los alelos que confieran ventaja reproductiva en edades tempranas a pesar de que algunos de ellos sean perjudiciales a largo plazo (Williams, 1957; Patridge & Barton, 1993). Dicho concepto también puede ser abordado desde el compromiso energético que demanda el mantenimiento del soma en los organismos (Lithgow & Kirkwood, 1996). A lo largo de la vida el individuo experimenta inevitablemente daños somáticos acumulativos y progresivos con la edad. La reparación de estos daños suele ser costosa y puede entrar en conflicto con el uso de la energía disponible para, por ejemplo, el desempeño reproductivo, según la teoría del soma desechable. En otras palabras, es mucho más beneficioso evolutivamente utilizar esa energía en pos de aumentar la capacidad reproductiva en edades tempranas. Cabe destacar, que dentro de esta teoría se contempla que la expectativa de vida de un individuo está directamente relacionada con la disponibilidad de mecanismos que están involucrados en la reparación del soma, tales como los sistemas de la respuesta al estrés. Por ende, se podría predecir una correlación positiva entre la resistencia al estrés térmico y la longevidad. Sin embargo, nuestros resultados contradicen estas predicciones ya que las líneas que mostraron menor RCC (líneas C), exhibieron los valores de longevidad más altos. En este caso la relación entre la resistencia al estrés térmico y la longevidad resultó negativa.

Los resultados también evidencian que la temperatura tuvo un efecto apreciable en la puesta de los huevos (Fig 5). En la medición de la fecundidad en ECM se puede observar que hay diferencias en el patrón de la puesta de huevos diaria entre los tratamientos térmicos. Durante los primeros 4-5 días de vida las hembras resultaron apreciablemente más fecundas bajo temperatura de estrés que a la temperatura más benigna de 25°C. Estas diferencias no se observaron en ELM. Es sabido que la temperatura ambiental tiene fuertes efectos en la

fisiología y el desempeño comportamental de las moscas y otros ectotermos (McCabe & Partridge, 1997). Se puede sugerir que en condición de estrés el costo para el mantenimiento del soma resulta energéticamente alto, por lo cual las hembras podrían invertir estratégicamente en una mayor producción de huevos a más temprana edad. Esto estaría de acuerdo con la asociación negativa mencionada previamente entre la longevidad y la fecundidad como evidencia del *trade-off* entre estos caracteres. En este mismo sentido, las diferencias en el patrón de puesta de huevos observadas entre los tratamientos térmicos en ECM podrían estar relacionadas con los efectos producidos por un mayor traspaso de péptidos sexuales (Acps) en el fluido seminal. Estudios previos han reportado que estos péptidos poseen efectos positivos a corto plazo incrementando la fecundidad temprana (Hollis et al., 2019) y efectos perjudiciales a mediano plazo reduciendo la esperanza de vida de las hembras (Chapman et al., 1995; Wigby & Chapman, 2005). Por otro lado, en condiciones de exposición limitada de machos (ELM), el efecto producido por las Acp podría estar atenuado o incluso ausente. Esta podría ser una de las posibles causas sugeridas para explicar la ausencia de las diferencias en dichas condiciones.

Este capítulo buscó contribuir al entendimiento de las relaciones entre los rasgos reproductivos y la senescencia en *Drosophila buzzatii*. Los resultados sugieren que la fecundidad y la longevidad pueden verse afectadas por la selección artificial. Además, la relación entre los rasgos reproductivos y la expectativa de vida podría estar condicionada por el entorno social y las condiciones térmicas ambientales.

Capítulo 4: Análisis de caracteres cuantitativo para el apareamiento de *Drosophila melanogaster* en alta temperatura.

4.1 Introducción

La mayoría de los caracteres fenotípicos son variables fenotípicas que pueden ser medibles y varían en forma cuasi-continua, como el tamaño corporal, la longevidad, la duración de la cópula, entre una infinidad de tales caracteres de variación continua. Las diferencias entre los individuos observadas para este tipo de rasgos están influidas, por lo general, por diferencias en muchos loci, como así también por el ambiente. A este tipo de rasgos o caracteres se los denomina *caracteres cuantitativos* (Falconer & Mackay, 1996).

La genética cuantitativa tiene por objetivo el estudio de la herencia de las diferencias cuantitativas entre los individuos. El conocimiento de la herencia de estas diferencias resulta de gran interés en el estudio de la micro-evolución de los organismos. Resulta importante remarcar que en este tipo de herencia los genes individuales no pueden identificarse fácilmente por su segregación, dada la gran variación que presentan debido al ambiente a los numerosos loci que los afectan, por lo que no pueden observarse las proporciones mendelianas. Las diferencias observadas en los rasgos cuantitativos a nivel poblacional forman parte de una serie gradual continua desde un extremo al otro, como por ejemplo la estatura en las personas (Fig 1).

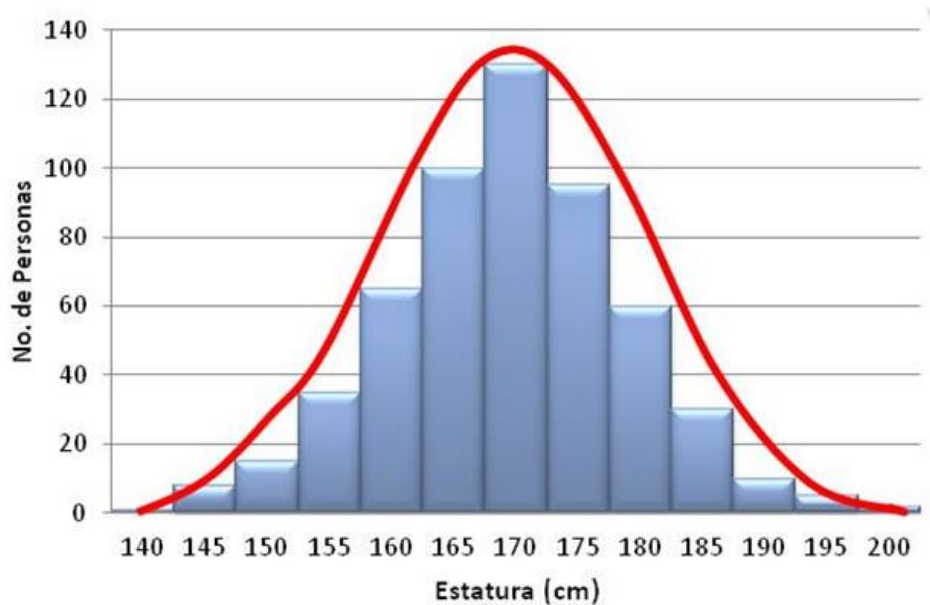


Figura 1. Curva de distribución normal para la estatura como ejemplo de rasgo cuantitativo.

El estudio de la naturaleza de las diferencias cuantitativas requiere necesariamente de la medición del carácter. La distribución de frecuencia de la mayoría de los caracteres cuantitativos se aproxima, en mayor o menor medida, a la curva normal (Fig 1). Todos los tipos de mediciones realizadas sobre los caracteres cuantitativos métricos están asociadas a un determinado *valor fenotípico* en cada individuo medido. De dicho *valor* se desprenden las propiedades que se pueden observar en relación con los caracteres cuantitativos a nivel poblacional, estas son las medias, varianzas y covarianzas.

Cuando nos referimos a caracteres cuantitativos es importante tener en cuenta que el valor fenotípico medido en el individuo está compuesto por la influencia de distintos factores tanto genéticos como ambientales. Por esto es necesario dividir el valor fenotípico en sus distintos componentes. La división principal está dada por el entendimiento de que cualquier rasgo fenotípico está influenciado naturalmente por el genotipo, pero también tiene una fuerte influencia del ambiente, entendido como causas no genéticas, al que es expuesto el individuo

durante toda su vida. Es decir, el conjunto de genes que determinan al carácter estudiado le aportan cierto valor genotípico. Sin embargo, el ambiente produce una desviación no genética de dicho valor. Se puede expresar de la siguiente manera: $P = G + E$, donde P corresponde al valor fenotípico, G al valor genotípico y E al valor de la desviación aportada por las causas no genéticas.

La genética de un carácter cuantitativo gira en torno al estudio de su variación. La variación total estará compuesta por las variaciones que aporten al carácter cada uno de sus componentes atribuibles a las distintas causas genéticas y no genéticas. Dicha variación puede expresarse como “*varianza*”. Los componentes en los cuales se puede descomponer la *varianza total* o *varianza fenotípica* (V_P) serán los mismos que los del valor fenotípico. Es decir, *varianza genética* (V_G) y *varianza ambiental* (V_E): $V_P = V_G + V_E$.

Las poblaciones en ambientes naturales se encuentran ampliamente condicionadas por los caracteres reproductivos. En particular el éxito de apareamiento es considerado un carácter cuantitativo de gran relevancia ecológica y fuerte influencia en el *fitness* reproductivo del individuo (Brooks & Endler, 2001). Trabajos previos han observado diferencias en el éxito de apareamiento entre poblaciones naturales evidenciando la existencia de variabilidad natural para este carácter (Anderson et al., 1979; Partridge et al., 1987). El éxito de apareamiento provee un aporte muy importante al *fitness* reproductivo del individuo (Partridge et al., 1985). Dentro del éxito de apareamiento se encuentran involucrados distintos tipos de caracteres morfológicos, comportamentales y fisiológicos de los individuos al momento del cortejo y la cópula. Es interesante el estudio del apareamiento en *Drosophila* dado que es un excelente modelo para indagar la arquitectura genética de los caracteres que componen el comportamiento reproductivo. El cortejo sexual de *Drosophila* está compuesto por una compleja secuencia de señales visuales y sensoriales entre machos y

hembras, tanto a nivel grupal como entre parejas (Hall, 1994; Greenspan, 1995). En un principio el macho se enfrenta a una hembra y posteriormente se posiciona detrás de ella realizando al mismo tiempo el “canto de cortejo” por medio del batido de sus alas. Luego el macho extiende su probóscide para lamer la genitalia de la hembra y posteriormente se para sobre ella con sus patas delanteras intentando efectivizar la cópula. Sin embargo, la cópula solo se logra si la hembra acepta secuencialmente las acciones del cortejo realizado por el macho. Trabajos previos han mostrado que existe una gran variación tanto dentro de una especie como entre distintas especies de *Drosophila* en relación a la ventana temporal demandada por el cortejo sexual como así también por la cópula (Markow, 1996; Greenspan & Ferveur, 2000). Se han realizado varios estudios que lograron identificar genes involucrados en el comportamiento de *Drosophila* tanto en el cortejo como en la cópula (Hall et al., 1980; Yamamoto & Nakano, 1998; Finley et al., 1998; Schutt & Nothiger, 2000) y se conoce que existe una alta variación segregante de los loci involucrados en el comportamiento y la preferencia sexual (Parsons, 1964). Sin embargo, hasta el momento se conoce bastante poco sobre la base genética del éxito de apareamiento en condiciones de estrés térmico. En este capítulo se analizó el tiempo de latencia del cortejo hasta iniciar la cópula (T1), el tiempo total de cópula (T2) y la frecuencia del éxito de apareamiento (T3) como caracteres cuantitativos relacionados al éxito de apareamiento. Además, para un mayor entendimiento se propuso estudiar las posibles asociaciones entre estos caracteres mediante el estudio de sus correlaciones fenotípicas. Las correlaciones fenotípicas pueden estar dadas por causas genéticas o ambientales. Entre las causas genéticas, la principal es la pleiotropía (Williams, 1957; Falconer & Mackay, 1996). Esta se define como la propiedad de un gen de afectar a dos o más caracteres. Otra causa genética de correlación es el ligamiento entre dos o más genes, donde dos caracteres métricos están afectados por dos genes distintos que a su

vez mantienen una fuerte asociación no aleatoria entre los alelos presentes en ellos (Falconer & Mackay, 1996). Las condiciones ambientales también pueden contribuir a las asociaciones entre caracteres. Dado que el estrés térmico posee una gran influencia en el desempeño de los individuos y afecta de forma directa al éxito de apareamiento, se propone estudiar las posibles asociaciones dependientes de la temperatura ambiental.

4.2 Objetivos

Evaluar caracteres comportamentales que contribuyen al éxito de apareamiento y estudiar las posibles correlaciones entre ellos en condiciones de estrés térmico empleando dos paneles de líneas RIL (Recombinant Inbred Lines) de *D. melanogaster* que presentan una amplia variación para la resistencia al estrés por calor.

4.3 Hipótesis

La temperatura ambiental y el estrés por calor resultan ser factores importantes para caracteres del éxito de apareamiento en el insecto modelo analizado. Teniendo en cuenta el estrés térmico, se espera que los caracteres estudiados sean sensibles a las condiciones ambientales y presenten diferencias significativas entre ambos paneles de líneas RIL, dado que un panel deriva de la retrocruza al parental de alta resistencia al calor y el otro panel recombinante deriva de la retrocruza al parental de baja resistencia al calor. Además, también se evaluará la hipótesis que existen correlaciones entre los caracteres que den cuenta de posibles asociaciones comportamentales durante el cortejo y la cópula.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Origen y construcción de las líneas recombinantes endocriadas (RIL)

Las líneas utilizadas para este trabajo derivan de dos líneas parentales denominadas como SH2 y D48, provenientes de Australia y Dinamarca respectivamente, y descritas originalmente en Norry et al. (2004). Estas líneas fueron obtenidas por selección artificial para la resistencia al coma por calor (RCC) y posterior endocría. El stock SH2 fue creado a partir de la endocría de líneas réplicas que fueron seleccionadas para mayor RCC desde una población natural de Melbourne, Australia, con y sin aclimatación para el calor como pre-tratamiento (McColl et al., 1996; Norry et al., 2004). Sobre la base de un número importante de marcadores moleculares que brindaron información del genotipo, así como teniendo en cuenta los valores fenotípicos de RCC (Norry et al., 2004), la línea endocriada SH2 fue elegida de un total de 23 líneas endocriadas que presentaron una mayor resistencia al calor. La línea D48 fue elegida de un total de 42 líneas endocriadas, obtenidas por Norry et al. (2004), todas las cuales fueron de baja resistencia al calor, y fueron seleccionadas para baja RCC a partir de la décima generación de laboratorio derivada de una muestra de una población natural del Este de Jutlandia (Dinamarca).

Para la construcción de las líneas RIL el procedimiento utilizado se detalla en Norry et al (2008). Básicamente, cuatro hembras –F1- (progenie del cruce entre las líneas D48 × SH2) fueron cruzadas con 7 machos de D48, y a la progenie se les permitió aparearse al azar

durante dos generaciones. Luego de estas dos generaciones, se hicieron parejas al azar y la progenie de cada una de ellas se utilizó como parental de cada línea RIL producto de la endocria mediante el apareamiento de hermanos completos durante 15 generaciones consecutivas, obteniendo cada línea del panel “RIL-D48”. De forma similar, cuatro hembras –F1- (progenie del cruce entre las líneas D48 × SH2) fueron cruzadas con 7 machos de la línea SH2 y siguiendo el procedimiento anterior se obtuvo el *stock* de líneas denominadas “RIL-SH2”. Todas las líneas RIL fueron construidas y mantenidas a 25°C y un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas, en tubos plásticos de 80 x 20 mm conteniendo 6 ml de medio de cultivo estándar. En el presente trabajo se utilizaron 33 RIL-D48 y 35 RIL-SH2 que fueron genotipadas para una serie de marcadores moleculares.

4.4.2 Medición del éxito de apareamiento en las RIL

Todas las RIL fueron mantenidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en tubos repicados de 95 x 20 mm (de ahora en adelante tubos estándares) que contienen 6 ml de medio de cultivo preparado con puré de papas instantáneo con el agregado de con agua y nipagin (como en Gomez et al., 2020). Para obtener los parentales de los individuos experimentales, las RIL fueron expandidas por una generación para todo el *stock* utilizando 3-4 botellas estándares por RIL con 30 machos más 30 hembras por botella de cultivo. Las botellas estándar son botellas de vidrio de 125 ml que contienen 40 ml del cultivo mencionado anteriormente.

El éxito de apareamiento en las líneas se midió en moscas vírgenes de 3-4 días de edad mediante tres tratamientos térmicos distintos: 25°C, 33°C y a 33°C luego de un pre-tratamiento térmico. Dicho pre-tratamiento consistió en someter a todos los individuos a 30°C por una hora (entre 13:00 y 14:00 hs) durante los tres días previos a la medición. Para la medición, se colocaron un macho y tres hembras en tubos con medio de cultivo estándar suplementado con granos de levadura disecada y se midió el tiempo de latencia del cortejo hasta iniciar la cópula (T1) y el tiempo total de cópula, desde que comienza hasta que finaliza (T2). Esto se realizó en 20 réplicas por cada RIL. Finalmente se estimó la frecuencia de éxito en el apareamiento (T3) en cada réplica, calculando la relación entre el número total parejas que efectivamente se aparearon y el número total de parejas observadas en cada RIL.

Los datos obtenidos en la medición de los tres caracteres (T1, T2 y T3) se analizaron mediante el análisis de Modelos Lineales Generalizados (GLM) utilizando Temperatura y Panel (RIL-D48 vs RIL-SH2) como factores fijos. Para esto se implementó el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2017), como interfaz de la plataforma R versión 3.4.1 (R Core Team, 2017).

En los casos de T1 y T2 mediante pruebas de ANOVA se realizaron las estimas de la varianza genética (V_g) y ambiental (V_e), en valores absolutos o en porcentaje. El valor de V_g corresponde al valor del cuadrado medio dentro de los grupos (CMD), mientras que V_e corresponde al valor del cuadrado medio del error (CME). En cuanto a V_p , su valor se obtuvo mediante la suma de CMD y CME. También se estimó la Heredabilidad en sentido amplio (H^2) como el valor resultante de la división entre la varianza genética y la varianza fenotípica (V_p): $H^2 = V_g/V_p$, donde la V_p es la suma de $V_g + V_e$.

Se llevaron a cabo análisis de correlación entre los caracteres medidos (T1, T2 y T3) a través de los paneles de líneas RIL para cada uno de los tres tratamientos térmicos. Dichos

análisis de correlación fenotípica son estimadores de las correlaciones genéticas entre caracteres porque son las correlaciones de los caracteres a través de líneas RIL. Los análisis se hicieron para cada panel RIL por separado utilizando el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) como medida no paramétrica, mediante la implementación del software InfoStat (Di Rienzo et al., 2017)

4.5 Resultados

4.5.1 Inicio de cópula (T1)

La Figura 3 muestra la media y el error estándar de cada una de las líneas RIL de ambos paneles (RIL-D48 y RIL-SH2) para el carácter T1 en las tres condiciones térmicas empleadas: 25°C, 33°C y 33°C con un pre-tratamiento. En la Tabla 2 se muestra que la varianza genética (en %) varía entre 60% y 72%, siendo mayor en la temperatura de estrés (Tabla 2).

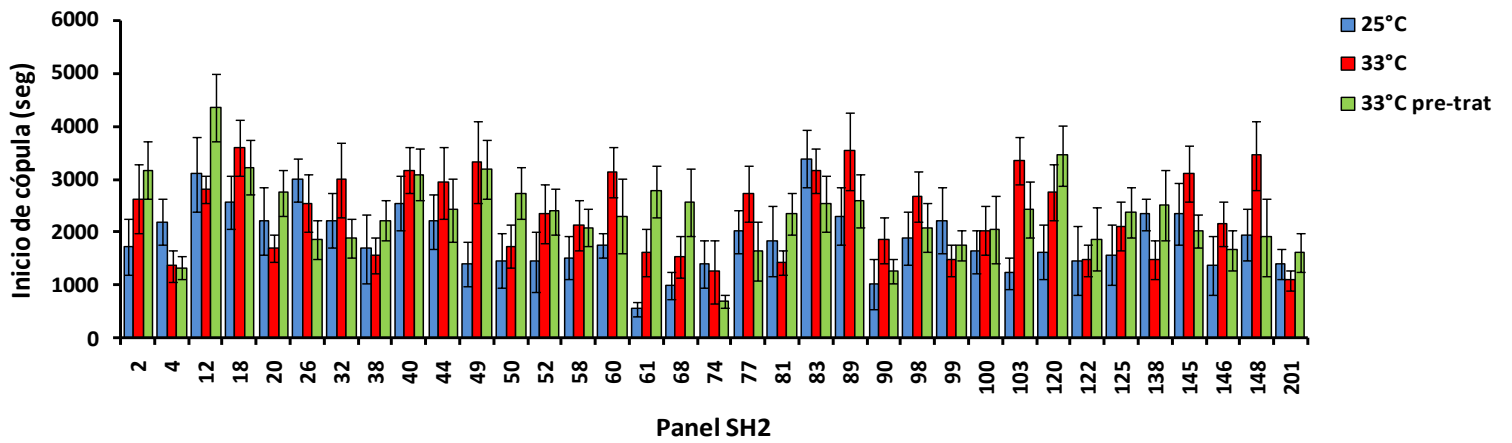
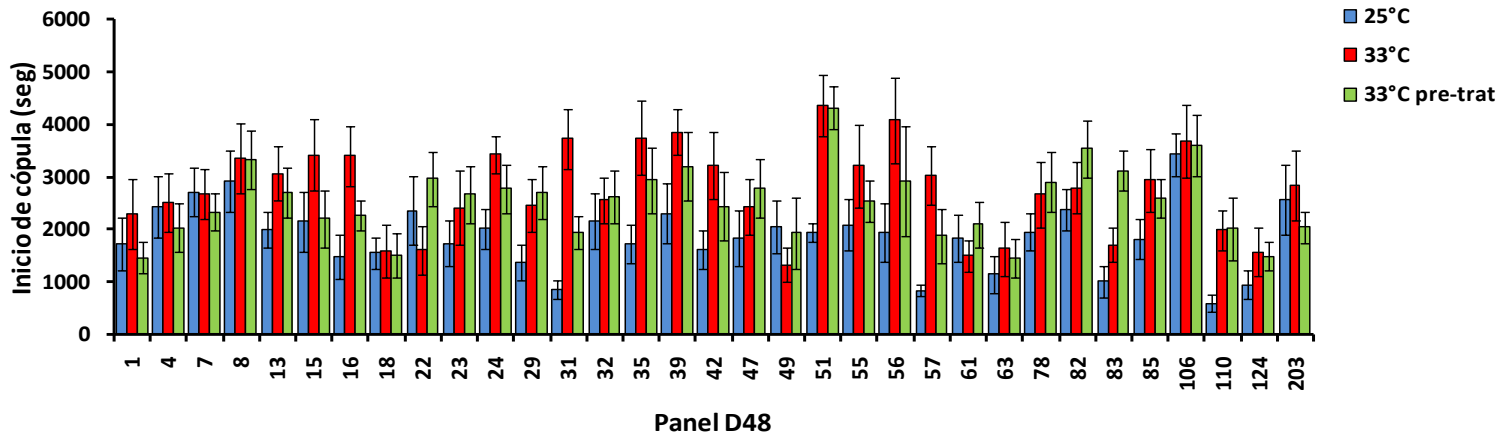


Figura 3. Valores medios y errores estándar del tiempo de inicio de cópula (T1) medido en segundos a 25°C, 33°C y 33°C con un pre-tratamiento. Los gráficos muestran las líneas de ambos paneles por separado RIL-D48 (a) y RIL-SH2 (b).

Tabla 2. Valores medios del inicio de cópula (T1), seguido de los porcentajes de las varianzas genética (%Vg) y ambiental (%Ve), como así también, la heredabilidad en sentido amplio (H²). Los valores informados corresponden a cada uno de los paneles RIL-D48 y RIL-SH2, para los tres tratamientos térmicos por separados.

Tratamiento	Panel	Medias	%Vg	%Ve	H ²
25°C	<i>D48</i>	3682.48	67.6	32.4	0.67
	<i>SH2</i>	4088.44	60.2	39.8	0.60
33°C	<i>D48</i>	5123.19	69.7	30.3	0.69
	<i>SH2</i>	4362.22	72.3	27.7	0.72
33°C pre-trat	<i>D48</i>	5172.04	65.7	34.3	0.66
	<i>SH2</i>	4944.94	65.8	34.2	0.66

Los resultados del GLM muestran que la interacción entre Temperatura y Panel fue significativa (Tabla 3) lo cual indica que las diferencias significativas entre los paneles RIL-SH2 y RIL-D48 dependen del tratamiento térmico aplicado. A 33°C se observan diferencias significativas entre los paneles dado que el tiempo promedio transcurrido hasta el inicio de la cópula fue significativamente mayor en las líneas del panel RIL-D48 respecto a las del panel RIL-SH2 (Fig 4, GLM con panel como factor fijo: $F_{(1,732)} = 7.91$, $p < 0.01$). Mientras que en el caso de los tratamientos a 25°C y 33°C con un pre-tratamiento no se observaron diferencias significativas para el carácter entre las líneas de ambos paneles (Fig 4, GLM con

panel como factor fijo: $F_{(1,749)} = 1.55$, $p > 0.05$ a 25°C ; $F_{(1,713)} = 0.12$, $p > 0.05$ a 33°C con pre-tratamiento).

También se analizó el efecto del pre-tratamiento en cada uno de los paneles por separado. Los resultados del GLM muestran que el pre-tratamiento solo tuvo efecto significativo en las líneas del panel RIL-SH2. El valor medio de T1 resultó significativamente mayor en las moscas pre-tratadas que en las moscas sometidas a la condición de estrés térmico sin un tratamiento previo (Fig 4, GLM con temperatura como factor fijo: $F_{(1, 1425)} = 15.49$, $p < 0.001$ para el panel RIL-SH2; $F_{(1, 1591)} = 0.06$, $p > 0.05$ para el panel RIL-D48).

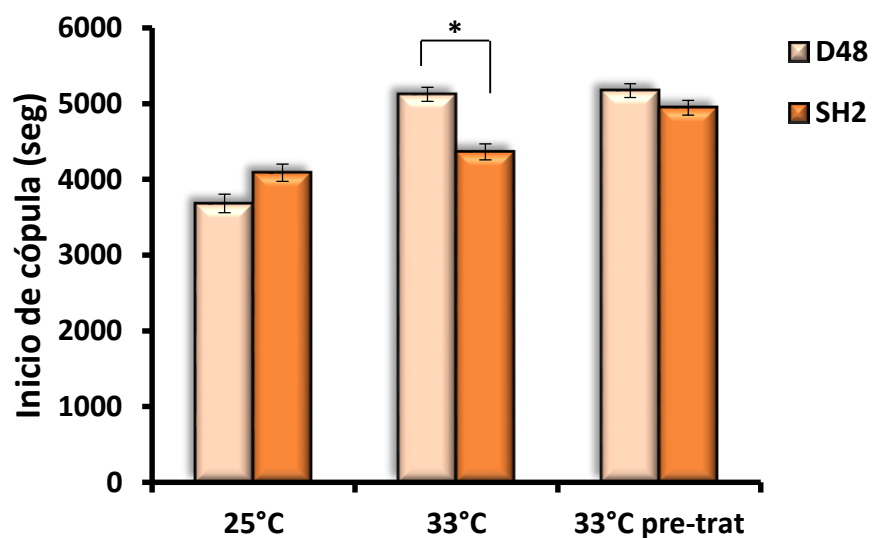


Figura 4. Valores medios (\pm Error estándar) tiempo de inicio de cópula (T1) a 25°C , 33°C y 33°C con un pre-tratamiento térmico para los paneles RIL-D48 y RIL-SH2. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.05$).

Tabla 3. Análisis de Modelos Lineales Generalizados (GLM) el tiempo de inicio de la cópula (T1).

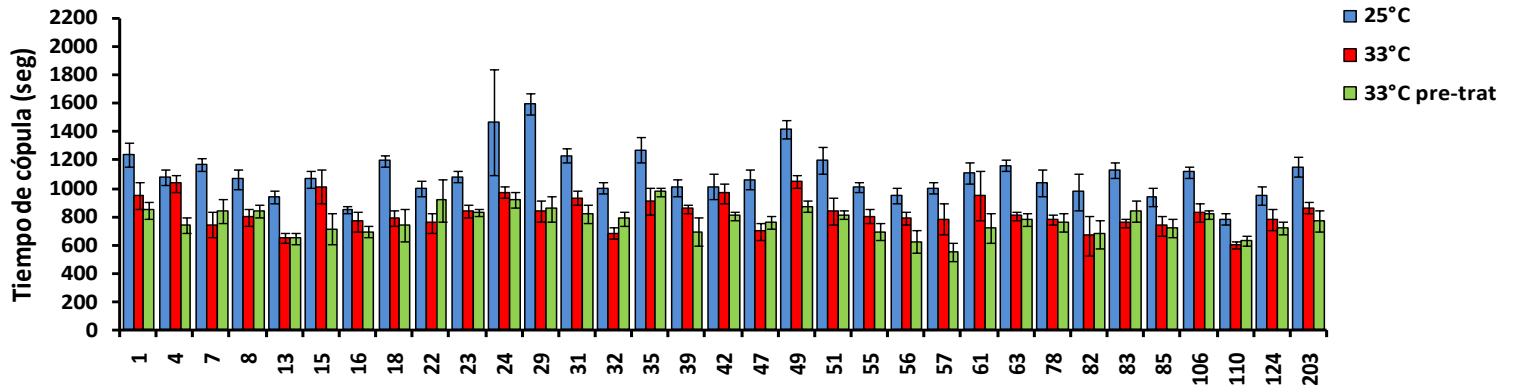
El análisis se realizó utilizando Temperatura y Panel (RIL-D48 vs RIL-SH2) como factores fijos.

<i>Factor</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>
Temperatura	2	59.72***
Panel	1	0.79
Temperatura * Panel	2	15.86***

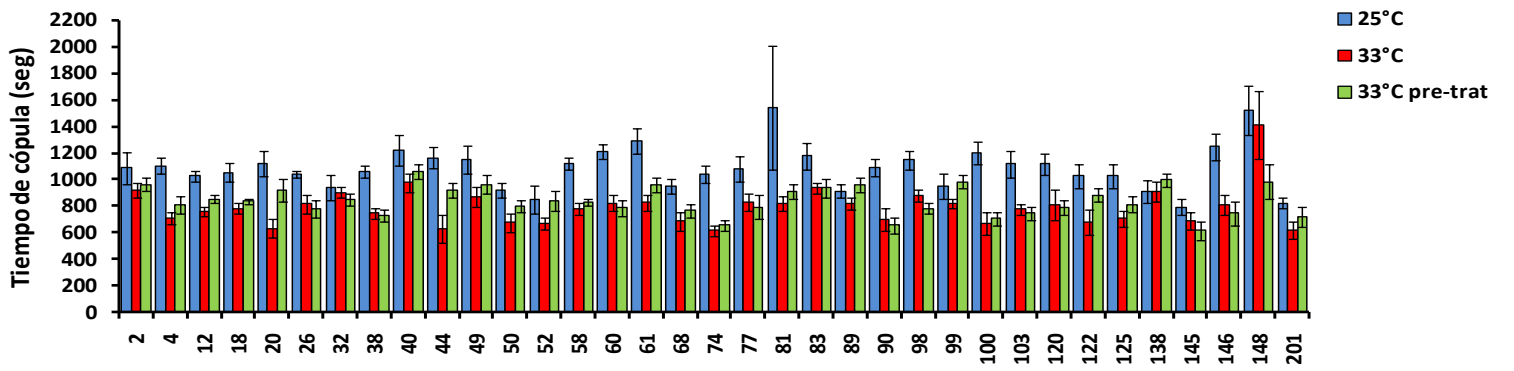
*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

4.5.2 Tiempo de cópula (T2)

La figura 5 muestra las medias, con los errores estándar, de cada una de las líneas en ambos paneles (RIL-D48 y RIL-SH2) para el carácter T2 en las tres condiciones térmicas empleadas: 25°C, 33°C y 33°C con un pre-tratamiento. En la tabla 4 se pueden observar diferencias en los porcentajes de la varianza genética entre los paneles en condiciones de estrés. Las líneas del panel RIL-SH2 muestran porcentajes de varianza mayores que las líneas RIL-D48.



Panel D48



Panel SH2

Figura 5. Valores medios y errores estándar del tiempo total de cópula (T2) medido en segundos a 25°C, 33°C y 33°C con un pre-tratamiento. Los gráficos muestran las líneas de ambos paneles por separado RIL-D48 (a) y RIL-SH2 (b).

Tabla 4. Valores medios del tiempo total de cópula (T2), seguido de los porcentajes de las varianzas genética (%Vg) y ambiental (%Ve), como así también, la heredabilidad en sentido amplio (H²). Los valores informados corresponden a cada uno de los paneles RIL-D48 y RIL-SH2, para los tres tratamientos térmicos por separados.

Tratamiento	Panel	Medias	%V _g	%V _e	H ²
25°C	<i>D48</i>	1107.5	68.5	31.5	0.68
	<i>SH2</i>	1081.7	66.0	34.0	0.66
33°C	<i>D48</i>	825.2	65.8	34.2	0.66
	<i>SH2</i>	788.0	77.8	22.2	0.78
33°C pre-tratamiento	<i>D48</i>	771.1	61.5	38.5	0.61
	<i>SH2</i>	837.3	68.0	32.0	0.68

Para el T2 los resultados del GLM muestran que la interacción entre Temperatura y Panel resultó significativa (Tabla 5), por lo que las diferencias significativas entre los paneles RIL-SH2 y RIL-D48 dependen del tratamiento térmico aplicado. Se observan diferencias significativas entre los paneles para el tratamiento a 33°C con pre-tratamiento. En este caso, el tiempo promedio de cópula fue significativamente mayor en las líneas RIL-SH2 que en las RIL-D48 (Fig 6, GLM con panel como factor fijo: $F_{(1,136)}= 11.45$, $p < 0.001$). En los tratamientos a 25°C y 33°C no se observan diferencias significativas para el carácter entre las líneas de ambos paneles (Fig 6, GLM con panel como factor fijo: $F_{(1,129)}= 0.29$, $p > 0.05$ a 25°C; $F_{(1,138)}= 1.86$, $p > 0.05$ a 33°C).

Con respecto al efecto del pre-tratamiento en cada uno de los paneles RIL por separado, los resultados del GLM muestran que fue significativo en las líneas del panel RIL-SH2 así como también en las del panel RIL-D48. Para las líneas RIL-SH2 el valor medio de T2 resultó mayor en las moscas pre-tratadas que en las moscas sometidas a la condición de estrés térmico sin el tratamiento previo (Fig 6, GLM con temperatura como factor fijo: $F_{(1,702)} = 9.07$, $p < 0.01$). Mientras que para las líneas del panel RIL-D48 el pre-tratamiento tuvo el efecto contrario dado que el valor medio de T2 resultó significativamente mayor en las moscas que no fueron tratadas previamente (Fig 6, GLM con temperatura como factor fijo: $F_{(1,684)} = 8.07$, $p < 0.01$).

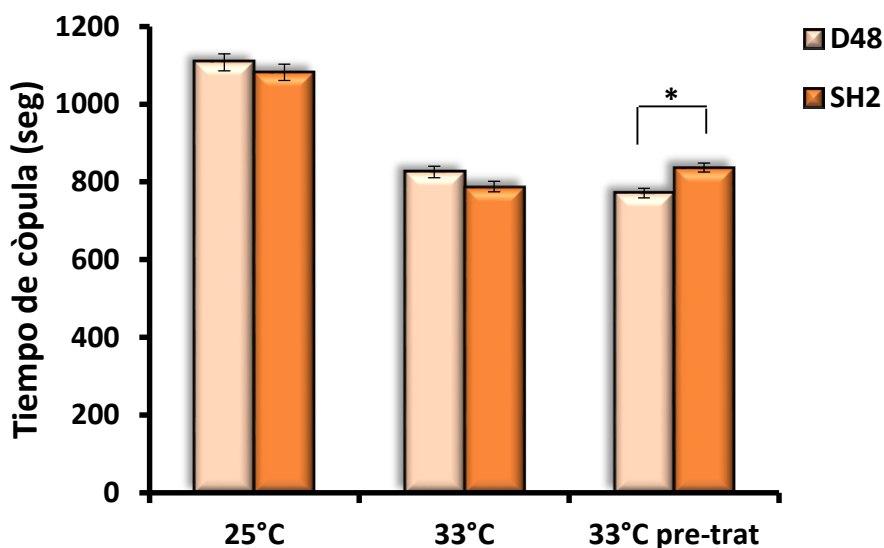


Figura 6. Valores medios (\pm Error estándar) del tiempo de cópula (T2) a 25°C, 33°C y 33°C con un pre-tratamiento térmico para ambos RIL-D48 y RIL-SH2. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.05$).

Tabla 5. Análisis de Modelos Lineales Generalizados (GLM) para la medición del tiempo total de la cópula (T2). El análisis se realizó utilizando Temperatura y Panel (RIL-D48 vs RIL-SH2) como factores fijos.

<i>Factor</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>
Temperatura	2	206.01***
Panel	1	0.08
Temperatura * Panel	2	7.51**

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

4.5.3 Frecuencia de éxito de apareamiento (T3)

La figura 7 muestra las medias de cada una de las líneas RIL de ambos paneles (RIL-D48 y RIL-SH2) para el carácter T3 en las tres condiciones térmicas empleadas: 25°C, 33°C y 33°C con un pre-tratamiento.

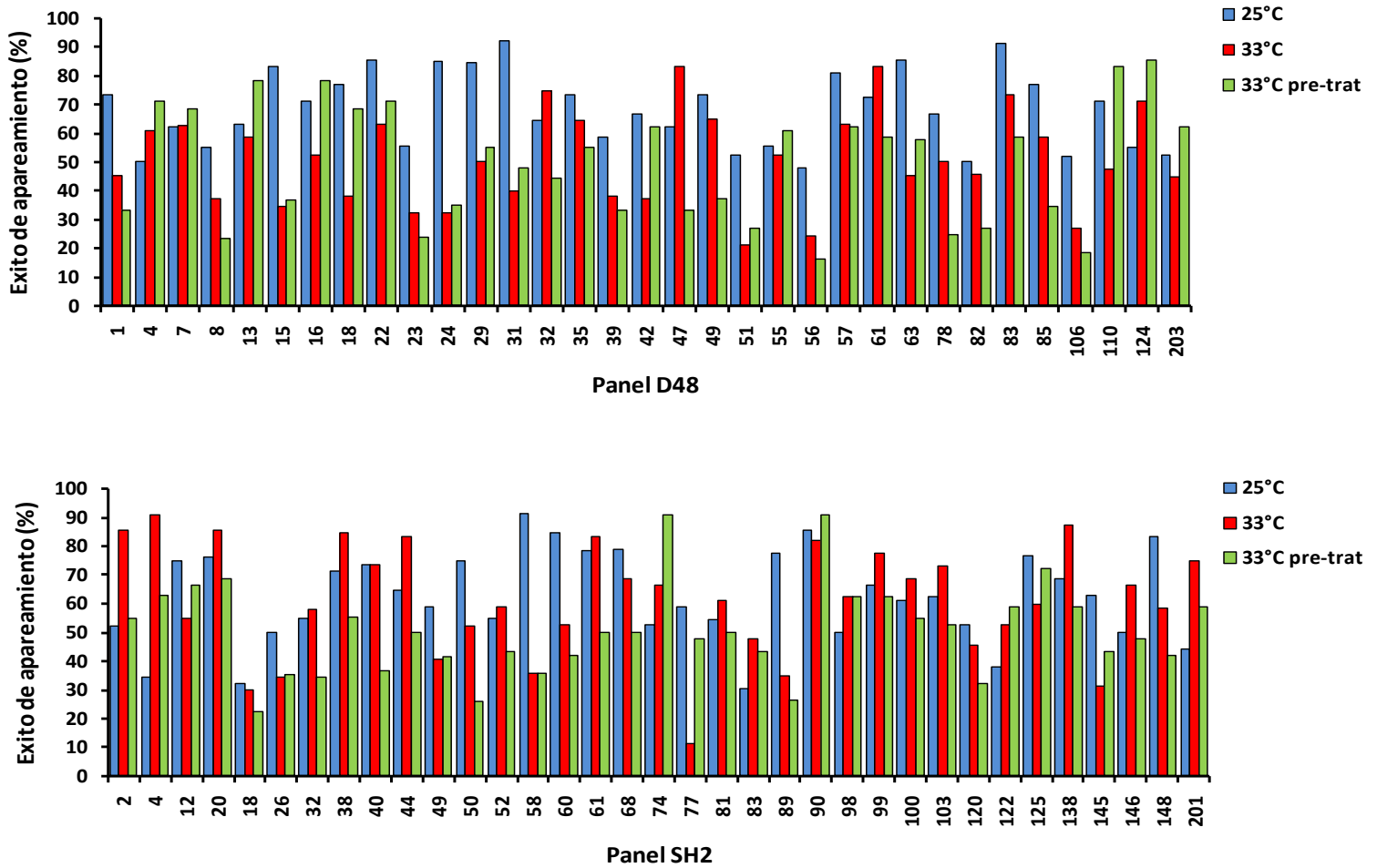


Figura 7. Valores medios del éxito de apareamiento (T3) a 25°C, 33°C y 33°C con un pre-tratamiento. Los gráficos muestran las líneas de ambos paneles por separado, RIL-D48 (a) y RIL-SH2 (b).

Los resultados del GLM para el T3 muestran que la interacción entre Temperatura y Panel también resultó significativa (Tabla 6). Cuando se analizaron las diferencias entre los paneles para cada temperatura por separado, se observaron diferencias significativas entre los paneles en el caso del tratamiento a 33°C. A esta temperatura, el éxito de apareamiento fue significativamente mayor en las líneas del panel RIL-SH2 respecto a las del panel RIL-

D48 (Fig8, GLM con panel como factor fijo: $F_{(1,67)}= 4.57$, $p < 0.05$). Mientras que en los tratamientos a 25°C y 33°C con un pre-tratamiento térmico no se observan diferencias significativas para el éxito de apareamiento entre las líneas de ambos paneles RIL (Fig 8, GLM con panel como factor fijo: $F_{(1,67)}= 2.59$, $p > 0.05$ a 25°C; $F_{(1,67)}= 0.06$, $p > 0.05$ a 33°C con pre-tratamiento).

Además, los resultados del GLM muestran que el efecto del pre-tratamiento solo fue significativo en las líneas del panel RIL-SH2. El valor del éxito de apareamiento resultó significativamente menor en las moscas pre-tratadas que en las moscas sometidas a condición de estrés térmico sin el tratamiento previo (Fig 8, GLM con temperatura como factor fijo: $F_{(1,35)}= 12.68$, $p < 0.001$). Mientras que para las líneas del panel RIL-D48 no se observó un efecto significativo del pre-tratamiento (GLM con temperatura como factor fijo: $F_{(1,33)}= 0.16$, $p > 0.05$)

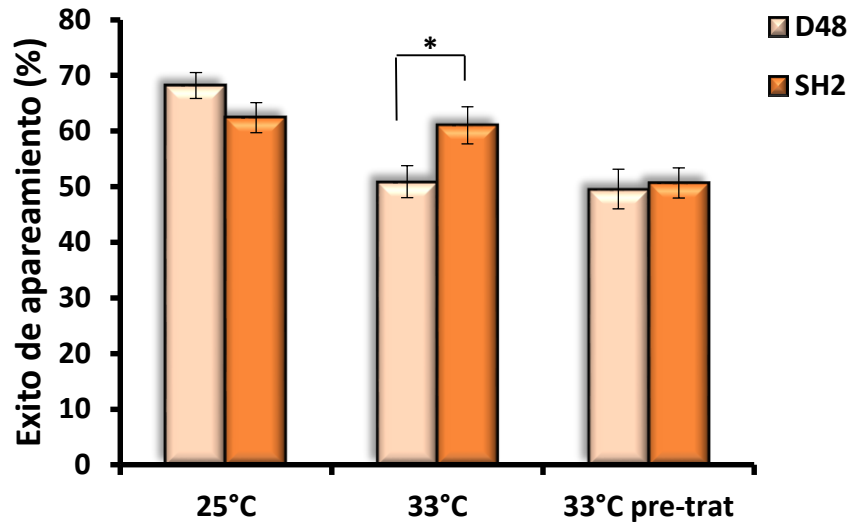


Figura 8. Valores medios (\pm Error estándar) del éxito de apareamiento (T3) medido en porcentajes a 25°C, 33°C y 33°C con un pre-tratamiento térmico para los paneles RIL-D48 y RIL-SH2. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.05$).

Tabla 6. Modelos Lineales Generalizados (GLM) para la medición del éxito de apareamiento (T3).

El análisis se realizó utilizando Temperatura y Panel (RIL-D48 vs RIL-SH2) como factores fijos.

<i>Factor</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>
Temperatura	2	13.50***
Panel	1	0.57
Temperatura * Panel	2	3.65**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.5.4 Correlación de caracteres

Los análisis de correlación entre los tres caracteres (T1, T2 y T3) fueron realizados para cada panel RIL por separado. En las líneas del panel RIL-SH2 se observan correlaciones negativas entre los caracteres T1 - T3 en todas las condiciones térmicas (Tabla 7; Fig 9). Además, se observan correlaciones positivas entre los caracteres T1 - T2, como así también una correlación negativa entre T2 - T3. Es interesante que las correlaciones entre T1 y T2, y entre T2 y T3 solo se observan en la condición de estrés por alta temperatura sin pre-tratamiento (Tabla 7; Fig 10 y 11).

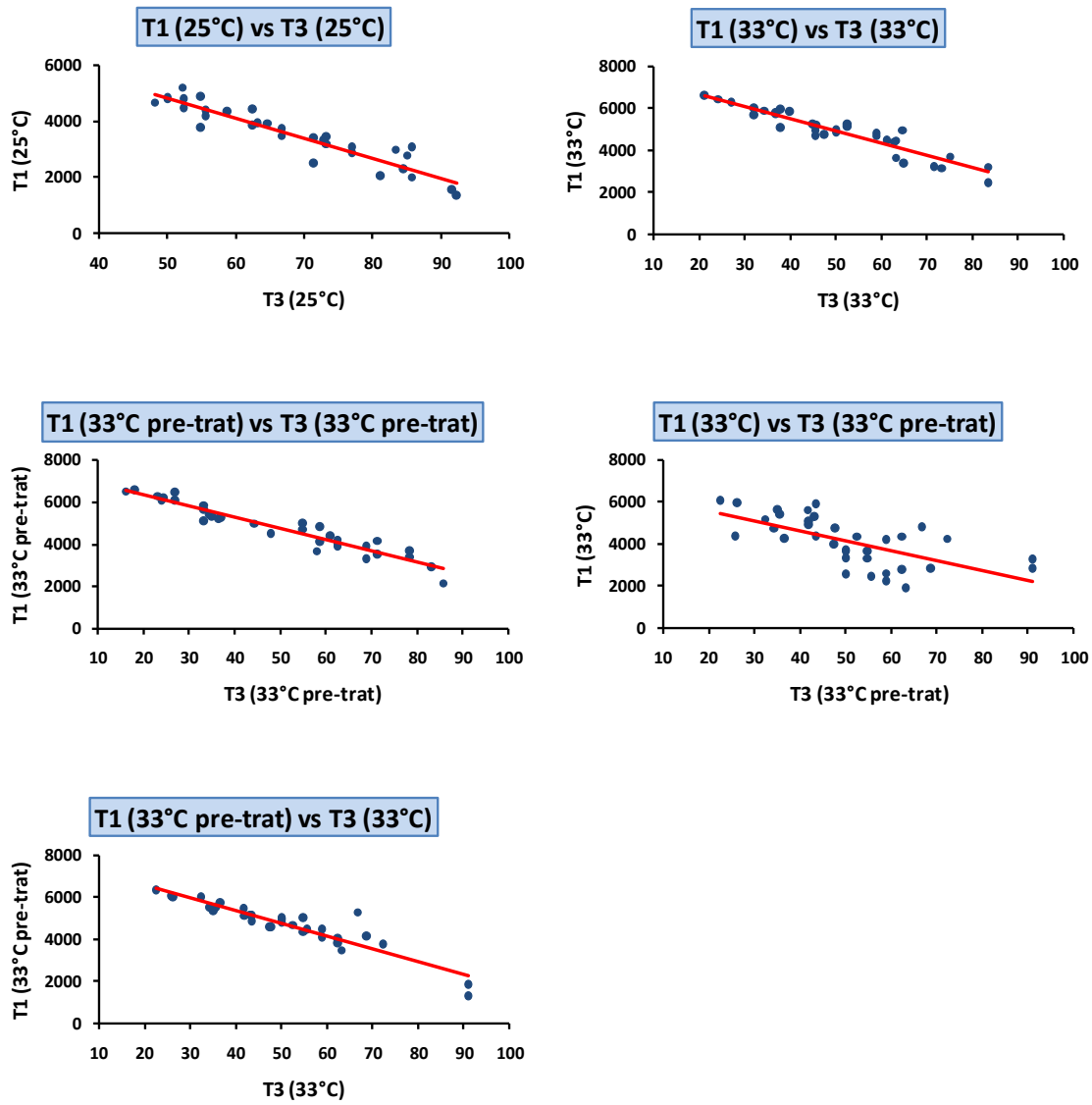


Figura 9. Gráficos de asociación fenotípica (estimadoras de correlaciones genéticas) entre los caracteres T1 y T3 para los tres tratamientos térmicos en las líneas del panel RIL-SH2. Se muestran solo los gráficos de las correlaciones que resultaron estadísticamente significativas.

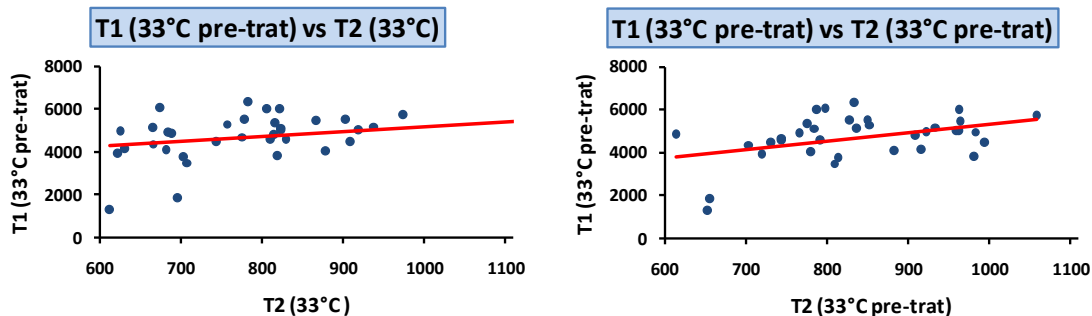


Figura 10. Gráfico de asociación fenotípica (estimadora de la correlación genética) entre los caracteres T1 y T2 para los tres tratamientos térmicos en las líneas del panel RIL-SH2. Se muestran solo los gráficos de las correlaciones que resultaron estadísticamente significativas.

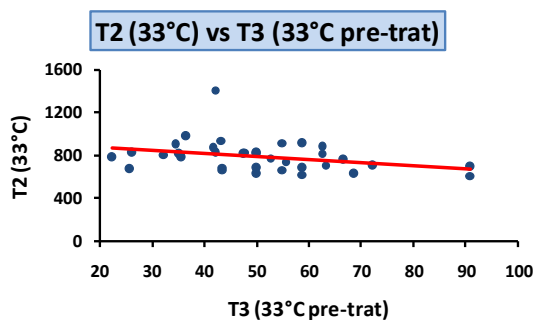


Figura 11. Gráfico de asociación fenotípica (estimadora de la correlación genética) entre los caracteres T2 y T3 para los tres tratamientos térmicos en las líneas del panel RIL-SH2. Se muestran solo los gráficos de las correlaciones que resultaron estadísticamente significativas

Tabla 7. Prueba de correlación de Spearman para el panel RIL-SH2 entre los tres caracteres medidos (T1, T2 y T3) para cada uno de los tres tratamientos térmicos. En cada casilla el número que se encuentra arriba corresponde al valor del coeficiente de correlación de Spearman (ρ), mientras que el número que se encuentra abajo corresponde al valor de p que nos informa si la correlación resulta o no estadísticamente significativa.

	T1 (25°C)	T1 (33°C)	T1 (33°C pre-trat)	T2 (25°C)	T2 (33°C)	T2 (33°C pre-trat)	T3 (25°C)	T3 (33°C)	T3 (33°C pre-trat)
T1 (25°C)	1	0,15	-0,01	-0,11	0,07	-0,04	-0,95***	-0,19	-0,05
T1 (33°C)		1	0,69***	0,01	0,3	0,04	-0,05	-0,9***	-0,7***
T1 (33°C pre-trat)			1	0,06	0,38*	0,35*	0	-0,56**	-0,89***
T2 (25°C)				1	0,35*	0,19	0,07	0,13	-0,07
T2 (33°C)					1	0,57**	-0,0013	-0,15	-0,37*
T2 (33°C pre-trat)						1	0,12	0,1	-0,19
T3 (25°C)							1	0,1	0,02
T3 (33°C)								1	0,65**
T3 (33°C pre-trat)									1

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En las líneas del panel RIL-D48 las correlaciones resultaron significativas entre los caracteres T1 - T3 en todas las condiciones térmicas experimentales (Tabla 8; Fig 12). Para el resto de las asociaciones analizadas (T1-T2 y T2-T3) no se encontraron correlaciones significativas (Tabla 8).

En ambos paneles RIL las correlaciones entre T1-T3 resultaron estadísticamente significativas en las tres condiciones térmicas analizadas lo cual podría indicar que la correlación genética entre estos caracteres no depende de la temperatura en el rango térmico ensayado. En cambio, los caracteres T1-T2 y T2-T3 muestran correlaciones genéticas que aparecen en elevada temperatura y desaparecen cuando a temperatura benigna, lo cual sugiere

un efecto muy interesante de la temperatura sobre la correlación genética entre estos caracteres.

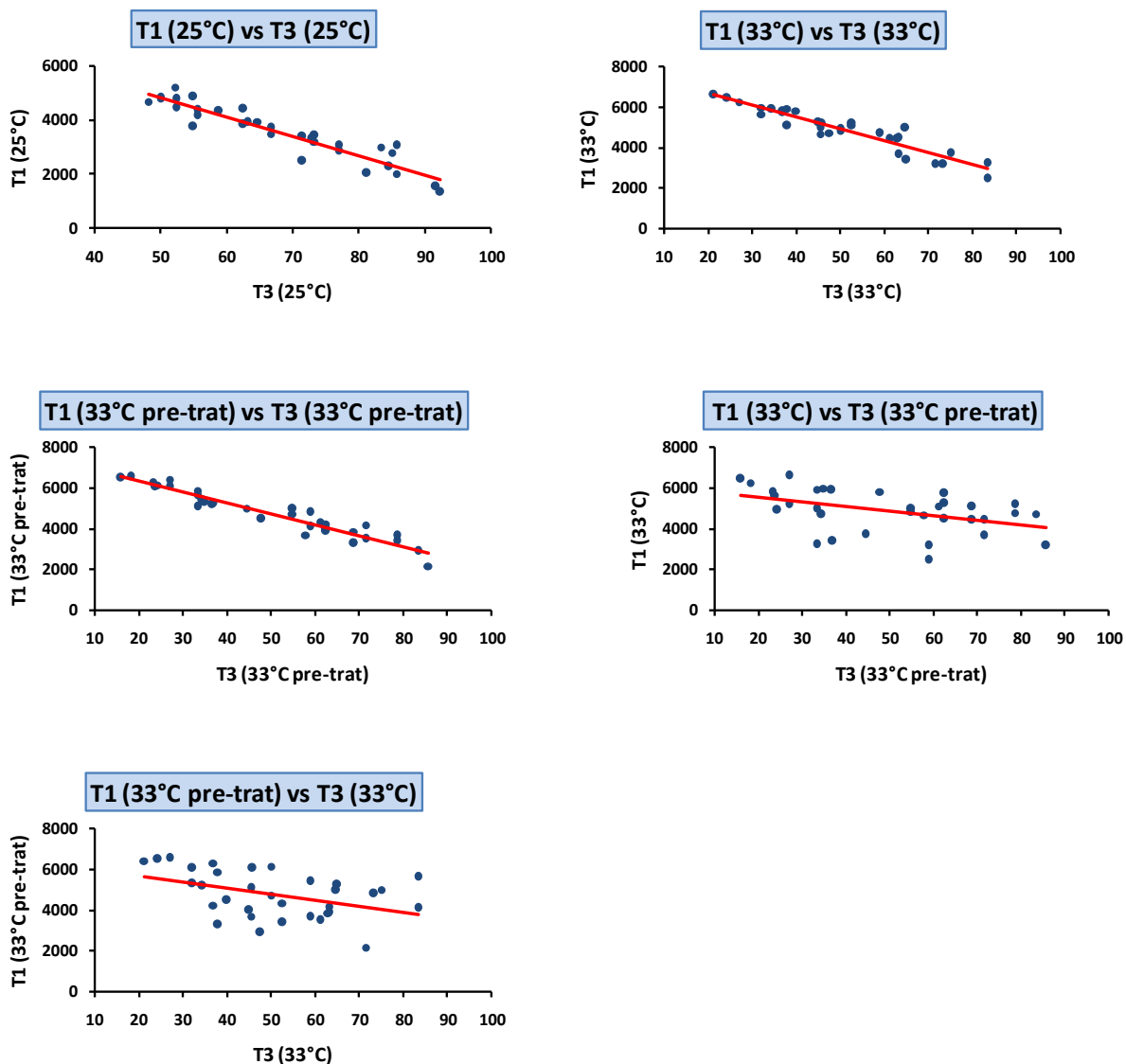


Figura 12. Gráficos de asociación entre los caracteres T1 vs T3 para los tres tratamientos térmicos en las líneas del panel RIL-SH2. Se muestran solo los gráficos para las correlaciones que resultaron significativas.

Tabla 8. Prueba de correlación de Spearman para el panel RIL-D48 entre los tres caracteres medidos (T1, T2 y T3) para cada uno de los tres tratamientos térmicos. En cada casilla el número que se encuentra arriba corresponde al valor del coeficiente de correlación de Spearman (ρ), mientras que el número que se encuentra por debajo corresponde al valor de p que nos informa si la correlación resulta o no estadísticamente significativa.

	T1 (25°C)	T1 (33°C)	T1 (33°C pre-trat)	T2 (25°C)	T2 (33°C)	T2 (33°C pre-trat)	T3 (25°C)	T3 (33°C)	T3 (33°C pre-trat)
T1 (25°C)	1	0,29	0,38*	-0,2	-0,03	-0,13	-0,95***	-0,21	-0,32
T1 (33°C)		1	0,49*	0,11	0,33	-0,04	-0,28	-0,92***	-0,5**
T1 (33°C pre-trat)			1	0,16	0,13	0,22	-0,28	-0,42*	-0,96***
T2 (25°C)				1	0,63***	0,74***	0,31	-0,16	-0,23
T2 (33°C)					1	0,38*	0,1	-0,33	-0,18
T2 (33°C pre-trat)						1	0,32	-0,0017	-0,19
T3 (25°C)							1	0,22	0,25
T3 (33°C)								1	0,48*
T3 (33°C pre-trat)									1

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.6 Discusión

El entendimiento del comportamiento reproductivo de los individuos con respecto al estrés por calor, tanto durante el cortejo como en el apareamiento, resulta importante para la comprensión de la potencial respuesta de organismos ectotermos al incremento de temperatura (Fasolo & Krebs, 2004). En este capítulo se abordó el estudio del comportamiento reproductivo mediante tres caracteres relacionados con el apareamiento:

tiempo de latencia del cortejo (T1), duración total de la cópula (T2) y frecuencia del éxito de apareamiento (T3).

Para el caso del tiempo de latencia del cortejo (T1) se encontró que en condiciones de estrés por calor las líneas del panel RIL-SH2 (que son más resistentes al calor) requirieron un tiempo de cortejo significativamente menor que las líneas más sensibles al calor (RIL-D48) para iniciar la cópula. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para el mencionado carácter T1 a temperaturas benignas. Esto indica que las líneas del panel RIL-SH2 son más resistentes al calor que las del panel RIL-D48, por lo que la temperatura estaría afectando más a las RIL-D48. Además, se observa, que el estrés térmico afecta al comportamiento del individuo durante el cortejo y que influye directamente en el carácter T1, dado que en ausencia de este factor de estrés no se observan las diferencias entre los paneles termo-resistente y termo-sensible de las líneas RIL. Lo cual podría indicar que las diferencias en termotolerancia estaría siendo determinante para el desempeño reproductivo. Trabajos previos demostraron que el éxito de apareamiento se encuentra fuertemente afectado por la temperatura elevada (Dolgin et al., 2006; Sambucetti & Norry, 2015; Stazione et al., 2019), lo cual resulta consistente con los resultados presentes.

El factor de la temperatura también resultó determinante en el caso de T2, cuando las moscas fueron expuestas a un tratamiento térmico previo. En dicha condición, se observa que las líneas del panel RIL-SH2 registraron en promedio un T2 significativamente mayor que las líneas del panel RIL-D48. Además, los análisis de correlación realizados entre T1 y T2 mostraron que en el panel RIL-SH2 existe una asociación positiva entre ambos caracteres. Es decir, las moscas que necesitaron menos tiempo para comenzar el apareamiento también fueron las que menos tiempo se mantuvieron en cópula. Esta relación parece ser consistente

en todos los tratamientos térmicos empleados. Trabajos previos han mostrado que los machos en un contexto de estrés por competencia sexual en presencia de otros machos, disminuyen el tiempo de latencia y duración de la cópula, lo cual lleva a suponer que maximizan las oportunidades de apareamiento en relación a condiciones de menor estrés (Bretman et al., 2009). Además, se sabe que existe una relación directa entre el tiempo de cópula y el volumen de péptidos sexuales presentes en el fluido seminal que el macho transfiere a las hembras (Wigby et al., 2009; Fedorka et al., 2011; Moatt et al., 2014). Otros trabajos, han reportados que estos péptidos sexuales producen efectos perjudiciales a mediano plazo en el desempeño de las hembras (Chapman et al., 1995; Wigby & Chapman, 2005). Por esto podemos sugerir que las líneas que en altas temperaturas logran aparearse más rápidamente y mantenerse menos tiempo en cópula poseen ventajas en el *fitness* reproductivo, si una mayor transferencia de fluido seminal confiere efectos negativos en el desempeño de la hembra a mediano plazo. Esto podría resultar en una ventaja adaptativa frente a condiciones de estrés térmico como es observado en las líneas del panel RIL-SH2. Sin embargo, en el panel RIL-D48 no se observa una correlación significativa entre estos caracteres. En este sentido, algunos trabajos previos reportan que individuos reproductivamente ventajosos en condiciones de estrés no aumentaron el tiempo de latencia hasta iniciar la cópula (Filice & Dukas, 2019). Por otro lado, se puede considerar que la correlación entre estos caracteres, que podría resultar ventajosa en el *fitness* reproductivo, se observa solo en el panel RIL-SH2 dado que estas líneas resultan las más termo-resistentes.

La frecuencia del éxito de apareamiento (T3) mostró diferencias significativas entre las líneas de los paneles RIL-SH2 y RIL-D48 solo en condiciones de estrés térmico sin un pretratamiento previo. Puntualmente, los resultados muestran que las líneas RIL-SH2 (más termotolerantes) resultaron significativamente más exitosas para el apareamiento en alta

temperatura que las RIL-D48. Estas diferencias podrían ser explicadas teniendo en cuenta el diseño de los paneles RIL-SH2 y RIL-D48. Las líneas del panel RIL-D48 derivan de un retrocruzamiento con la línea parental, seleccionada artificialmente para una baja resistencia al coma por calor, proveniente de una población natural de Dinamarca adaptada al frío, mientras que las líneas del panel RIL-SH2 derivan de un retrocruzamiento con la línea parental, seleccionada artificialmente para alta resistencia al coma por calor, proveniente de una población de Australia adaptada a temperaturas más cálidas (Norry et al. 2008). Estudios previos han encontrado que la termotolerancia y el éxito de apareamiento se encuentran fuertemente relacionados (Fasolo & Krebs, 2004; Dolgin et al., 2006; Jørgensen et al., 2006) y que ambos pueden evolucionar como caracteres correlacionados (Sambucetti & Norry, 2015; Stazione et al., 2020). Los resultados presentes en este trabajo sugieren que las líneas RIL-D48, cuyo “*background genético*” corresponde mayormente a las líneas seleccionadas para la resistencia al frío, son menos exitosas para aparearse a 33°C dado que son más sensibles al estrés por alta temperatura que las líneas RIL-SH2. Esto es consistente con estudios previos donde se observó que los genotipos para la termotolerancia afectan directamente a los caracteres relacionados al *fitness* reproductivo (Loeschcke et al., 2011).

Los valores de heredabilidad en sentido amplio fueron de moderada magnitud para los caracteres del apareamiento T1 y T2, analizados en la población de mapeo (Tablas 2; Tabla 4). Ese resultado puede considerarse consistente con caracteres relacionados con la aptitud o *fitness*, que típicamente no presentan altos valores de heredabilidad incluso en poblaciones de mapeo (revisado en Roff, 2002; 2012). El mapeo de QTL revela que los loci responsables de la heredabilidad de los caracteres estudiados se encuentran en todos los cromosomas mayores de la especie, como se detallará en el capítulo 5.

Las correlaciones genéticas (a través de RIL) entre los caracteres T1 y T2 como así también entre T2 y T3 fueron significativas solo en la condición de estrés por alta temperatura. Ese es un resultado muy interesante porque las correlaciones genéticas entre caracteres adaptativos pueden aparecer, desaparecer y re-aparecer a causa del estrés ambiental (Norry & Loeschke, 2002), presumiblemente porque el estrés puede revelar variación oculta por alterar procesos homeostáticos (Hoffmann & Parsons, 1991; Rutherford & Lindquist, 1998; Sgrò & Hoffmann, 2004). Estos cambios en las correlaciones genéticas representan ejemplos de interacción genotipo x ambiente, que resultan de interés para futuros estudios de adaptación térmica porque solo aparecen las asociaciones entre los mencionados caracteres de apareamiento en condiciones de estrés térmico.

Los resultados demuestran que en las líneas RIL más sensibles al estrés térmico (panel RIL-D48) la temperatura provocó una disminución en el desempeño biológico de los individuos. En este caso, la temperatura elevada tuvo un efecto perjudicial tanto durante el cortejo como para el éxito final de apareamiento. Esto resulta consistente con lo observado en estudios previos (Patton & Krebs, 2001; Fasolo & Krebs 2004).

En los tres caracteres se encontraron efectos significativos del pre-tratamiento térmico en las mediciones a alta temperatura (33°C). En la mayoría de los casos el efecto del pre-tratamiento resultó perjudicial, sugiriendo que este fue relativamente severo. En el caso de T1 se observó que las líneas RIL-SH2 pre-tratadas necesitaron en promedio más tiempo para iniciar la copula que cuando no experimentaron el pre-tratamiento. Mientras que, para el T3, las líneas RIL-SH2, resultaron significativamente menos exitosas para aparearse cuando fueron pre-tratadas. Para el caso de las líneas RIL-SH2 las pre-tratadas tuvieron un tiempo de cópula mayor (T2) que las que no recibieron el pre-tratamiento. La pre-exposición a altas temperaturas es un tipo de respuesta plástica de relevancia ecológica en ambientes

térmicamente variables que suele mejorar la respuesta a subsiguientes exposiciones al estrés (Hoffmann et al., 2002, 2003b; Sørensen et al., 2003; Rako & Hoffmann, 2006; Sgrò et al., 2016). En este estudio, la respuesta plástica del pre-tratamiento mostró una disminución en el desempeño de los individuos en la mayoría de las líneas. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que el sentido (beneficioso o perjudicial) de las respuestas plásticas podría depender de la severidad del tratamiento. Sin embargo, a diferencia de lo anterior los resultados de T2 en las líneas RIL-D48 muestran que el efecto del mismo pre-tratamiento fue beneficioso. Las diferencias encontradas en efecto de la respuesta plástica entre los paneles RIL-SH2 y RIL-D48 podrían depender del fondo genético de cada población. Es importante tener en cuenta que como se mencionó previamente estas son líneas endocriadas con un alto grado de homocigosis diseñada a partir de dos poblaciones con respuestas divergentes para la resistencia a altas temperaturas. El resultado del efecto del pre-tratamiento en las líneas RIL-D48, es consistente con estudios anteriores que muestran que previas exposiciones a altas temperaturas pueden mejorar la respuesta al éxito de apareamiento en alta temperatura en *Drosophila* (Stazione et al., 2019). También se conoce que previas exposiciones leves a estrés térmico poseen efectos beneficiosos en otros caracteres relacionados con el *fitness* en *Drosophila* como por ejemplo la localización de recursos de alimento y lugares reproductivos a altas temperaturas en la naturaleza (Loeschcke & Hoffmann, 2007). Teniendo en consideración que los pronósticos de cambio climático global pueden ser más acelerados que lo propuesto previamente (IPCC 2014; 2018), la capacidad de respuestas plásticas que posean las poblaciones frente a ambientes térmicamente cambiantes puede determinar su persistencia y potencial evolutivo en el futuro (Franks & Hoffmann, 2012; Huey et al., 2012).

Capítulo 5: Mapeo de QTL y genes candidatos para el éxito en el apareamiento en alta temperatura en *Drosophila melanogaster*.

5.1 Introducción

Está ampliamente aceptado que el estrés por temperaturas elevadas afecta en forma significativa la reproducción, distribución y la evolución de los seres vivos en ambientes terrestres contemporáneos (Hoffmann & Parsons, 1991; Hoffmann & Daborn, 2007; Hoffmann & Willi, 2008; Kellermann et al., 2009). Un aspecto importante para la adaptación a elevada temperatura es la capacidad de los organismos de aparearse y reproducirse en condiciones de estrés por calor (Loeschcke et al., 2011; Sambucetti & Norry, 2015).

Tradicionalmente, desde el último tercio del siglo XX la base genética de la resistencia al estrés por calor en *Drosophila* había sido investigada solo sobre una base de genes candidatos hasta 2004 (Moehring & Mackay, 2004; Norry et al., 2004). Los loci candidatos primarios para termotolerancia y resistencia al estrés incluyen los genes que codifican para “*heat-shock proteins*” o abreviadamente “Hsps” (revisado en Sørensen et al., 2003, 2007). Los genes de Hsps son muy conservados evolutivamente. Cumplen funciones de limpieza, ensamblado y reparación de proteínas dañadas, muchas son chaperonas y aparecieron muy tempranamente en la historia evolutiva ya que están en todos los organismos vivos y fueron descubiertas en *Drosophila melanogaster*, especie que tiene 4 familias de Hsp como muchos otros organismos: Hsp20, Hsp60, Hsp70 y Hsp90 (donde el número representa el peso de la proteína en KD, Kilo Dalton). La expresión inducible de muchas Hsps está regulada positivamente por el *Heat-shock factor*, que se une a proteínas dañadas y cambia su conformación para volverse activa para unirse a elementos de los promotores de genes *hsps*,

activando la síntesis de Hsps (revisado en Tower, 2009). Pero hoy sabemos que hay muchos otros genes candidatos para termotolerancia al calor que no codifican para Hsps y que cumplen funciones muy diversas, en parte gracias a estudios con micromatrices y *chips* de genes (Ej Sorensen et al., 2005b, 2007, 2019) y estudios de QTL (*Quantitative trait loci*, Norry et al., 2004, 2008; Morgan et al., 2006). Con respecto a los genes candidatos para el apareamiento en *Drosophila* es interesante que algunos de ellos son genes de *heat-shock proteins* o un regulador de su expresión, como ser *hsp27*, *hsp83* y *foxo* (Mackay et al., 2005), siendo *foxo* otro factor de transcripción de genes de Hsps, que a su vez está regulado negativamente por la vía de señalización la insulina (revisado en Tower, 2009). Otros loci candidatos para la actividad de apareamiento en *Drosophila* incluyen genes del ritmo circadiano, de ligandos a proteínas del olfato, de la memoria y aprendizaje, del olfato, de la neurogénesis, catecolaminas, especificación de identidad de segmento, desarrollo de la gónada de la hembra, metabolismo de tirosina, síntesis de triptófano y proliferación celular (Mackay et al., 2005).

En el presente trabajo se aplicará un mapeo de QTL para investigar si existe variación genética para los tres caracteres mencionados en el Capítulo 4 relacionados con la capacidad (o éxito) en el apareamiento en condiciones de estrés por calor. La razón para ello es que el mapeo de QTL puede permitir obtener una estima mínima del número de genes que afectan a cada carácter, así como la localización de genes candidatos en cada cromosoma. Un QTL es un segmento de cromosoma detectable estadísticamente por su efecto sobre el carácter fenotípico estudiado, que generalmente corresponde a una larga región cromosómica que involucra decenas o centenas de genes de los cuales solo al menos uno de ellos afecta al carácter (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998). Los diseños experimentales para estimar los efectos y la posición de QTL están basados en el desequilibrio de ligamiento entre

los alelos de un locus marcador y los alelos de un QTL ligado a dicho marcador. El mapeo de QTL requiere de (i) dos cepas o líneas parentales que sean lo más homocigotas posible y que difieran ampliamente para el carácter (generalmente se obtienen por selección artificial seguida de endocria), (ii) una población de mapeo (F2, retrocruza o líneas recombinantes endocriadas, RIL) (iii) un mapa de ligamiento correspondiente a loci marcadores polimórficos (ej., microsatélites, SNPs, etc), que cubra todo el genoma (Lynch & Waksh 1998). El diseño RIL permite identificar QTL con mayor precisión que otros diseños de mapeo recombinacional de QTL, porque la construcción de RIL implica un gran número de rondas de recombinación en contraposición a los diseños F2 y de retro-cruza (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh,1998). Cada RIL tiene un genotipo de marcador (microsatélites en este estudio) diferente al de otras RIL en diferentes regiones genómicas (Tabla 1; Fig. 1), de modo que la comparación estadística de la medida del carácter cuantitativo entre diferentes RIL permite identificar QTL. En este capítulo se utilizarán las líneas RIL mencionadas en el Capítulo 4. Dichas poblaciones de mapeo (RIL-SH2 y RIL-D48) fueron utilizadas para investigar caracteres de termotolerancia en diferentes estadios del ciclo de vida (Norry et al 2008; Arias et al 2012; Sambucetti et al 2013; Borda et al 2018), pero nunca antes fueron utilizadas para mapear QTLs para el éxito en el apareamiento a elevada temperatura. Dada la gran segregación que presentan estas líneas RIL para caracteres de termotolerancia, sumado a la información disponible sobre las mismas, resulta de especial valor para el estudio presente sobre apareamiento en condiciones de estrés por calor.

5.2 Objetivos

Identificar QTL para el éxito de apareamiento en condiciones de estrés por alta temperatura, utilizando líneas RIL de *D. melanogaster* que segregan gran variación para termotolerancia (descriptas en Norry et al., 2008). Dicho objetivo involucra investigar si el éxito de apareamiento tiene una base genética simple (determinada por solo uno o dos QTL) o si es afectado por múltiples QTL. Asimismo, se plantea comparar los perfiles de QTL de estudios previos sobre resistencia al calor en moscas adultas (Norry et al., 2008) con los QTL del presente estudio que corresponde al éxito en el apareamiento en alta temperatura, con el adicional objetivo de visualizar si solapan o no los diferentes perfiles. Otro objetivo, es buscar genes candidatos dentro de cada región de QTL. Finalmente, se analizarán posibles correlaciones entre cada carácter medido y el nivel de expresión, previamente determinado, para algunos genes candidatos a través de un sub-conjunto de 8 RIL informativas.

5.3 Hipótesis

Se plantea que existen QTL de gran efecto para el éxito de apareamiento en alta temperatura. La segunda hipótesis es que dichos QTL pueden co-localizar con QTL de termotolerancia identificados en estudios previos, evidenciando pleiotropía o ligamiento de los genes candidatos incluidos dentro de los QTL identificados. La tercer hipótesis es que existen genes candidatos dentro de los QTL cuyos efectos son conocidos o predichos sobre fenotipos de estrés y éxito de apareamiento (FlyBase consortium 2003), que fueron sobre-expresados o

sub-expresados como resultado de la selección artificial sobre la resistencia al estrés por calor en estudios previos (Sorensen et al., 2007).

Se plantea adicionalmente como última hipótesis que existe una asociación entre el éxito de apareamiento y el nivel de expresión de algunos genes candidatos estudiados previamente por Norry et al (2009) en un sub-conjunto de las RIL utilizadas en el presente estudio.

5.4 Materiales y métodos

5.4.1 Líneas RIL-SH2 y RIL-D48

Las líneas RIL utilizadas para el mapeo de QTL en este estudio son las mismas RIL-SH2 y RIL-D48 descritas en Norry et al (2008), introducidas y utilizadas en el Capítulo 4, El mapa genético asociado a estas líneas se basa en 36 loci de microsatélites, como se indica en la Tabla 1 y Fig 1.

Tabla 1. Loci de microsatélites sobre el que se basa el mapa genético disponible para las líneas RIL de *D. melanogaster* utilizado en el presente estudio (RIL-D48 y RIL-SH2). Las localizaciones genéticas corresponden al mapa expandido de las RIL (Norry et al. 2008). Las referencias para los loci microsatélites están detalladas en Norry et al (2008).

Marcador	Posición citológica	Posición genética	Nro. De acceso GenBank
AFO47180	1B8	1-0	AFO47180
X2297267gt	3 ^a	1-2	--
DS06577	3C1-C6	1-5	--
DMU56661	4F1-F2	1-15	U56661
DMU96440	7B3	1-21.7	U96440
DROSEV	10A1-A2	1-40	J03158
X11347407ca	10C3	1-45	--
AC010705	12D-E	1-54	C01705
DMTROPINI	16F3-F6	1-71	X58188
AF017777	19F3-F6	1-85	AFO17777
DROEXPAND	21C3	2-1	L14768
DROYANETSB	22C	2-6.44	M97694
AC009392	23A-E	2-10.98	AC009392
DROGPDHA	25F5-26A	2-25	J04567
DRONINAC	28A1-A3	2-37	J03131
AC005889	30A3-A6	2-49	AC005889
AC006302	34C4-D2	2-70	AC006302
AC004759	38E1-E9	2-76	AC004759
DROTG121	42A	2-80	J01139
SU(Z)2	49C	2-97	X56798
DMMMASTER	50C	2-100	X54251
DS00361	54B1-B2	2-115	--
AC004307	56D11-E6	2-129	AC004307
DS08011	59A1-A2	2-142	DS08011
DMRHOb	62 ^a	3-0.1	X52454
AC004658	63D2-F1	3-9	AC004658
3L5235154gt	64D	3-17	--
AC008198	66D10-E2	3-34	AC008198
3L9222187ca	67 ^a	3-45	--
DM22F11T	73A1-B7	3-59	Z83456
DROPROSA	86E3	3-71	D10609
DMEHAB	90B1-B2	3-84	X72303
DRONANOS	90E-F	3-95	M72421
DMTF125	95C6-C8	3-112	X98235
3R23156893gt	97F	3-128	--
DMU43090	99D6-D9	3-140	U43090

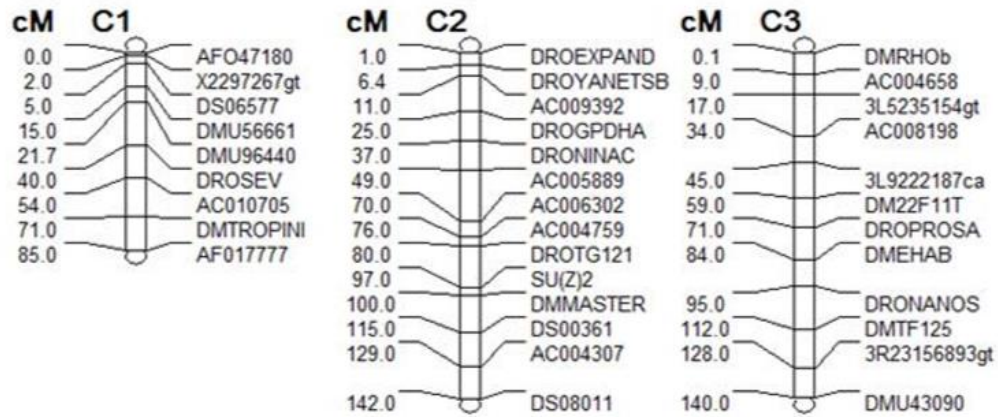


Figura 1. Mapa genético (en centi-Morgan, cM) para los microsatélites indicados en la Tabla 1, para las líneas RIL utilizadas en el presente estudio, como se describe en Norry et al. (2008) para el cromosoma X (C1) y los cromosomas 2 (C2) y 3 (C3).

5.4.2 Mapeo de QTL

Se realizó un mapeo de QTL en los tres cromosomas mayores de *Drosophila melanogaster*, para identificar regiones que expliquen la variabilidad entre las RIL para el éxito de apareamiento en alta temperatura. El mapeo se hizo sobre los tres caracteres analizados en el capítulo 4: el tiempo de latencia del cortejo hasta iniciar la cópula (T1), la duración total de la cópula (T2) y la frecuencia (o éxito) de apareamiento (T3).

Se llevó a cabo un mapeo de intervalo compuesto para probar la hipótesis de que un intervalo flanqueado por dos marcadores adyacentes contiene un QTL. Esta prueba se realizó utilizando el modelo 6 en QTL-Cartographer versión 2.5 (Wang et al. 2007), para el diseño

Ri2 (correspondiente a RIL generadas por apareamiento entre hermanos completos), inicialmente con cinco marcadores control y un tamaño de ventana de 10 cM.

Las posiciones de los QTL estimadas al utilizar 10 cM como tamaño de la ventana y cinco marcadores de control fueron consistentes a través de una amplia gama de combinaciones de parámetros. Los umbrales de significancia fueron determinados por 1000 permutaciones aleatorias. También, se evaluaron las interacciones epistáticas entre pares de marcadores mediante el modelo lineal $y = mx + my + mxmy + e$, donde mx y my son los genotipos de los marcadores x e y , respectivamente (Morgan & Mackay 2006), utilizando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2017).

Para la selección de los genes candidatos en los distintos caracteres evaluados (T1, T2 y T3) se realizó la búsqueda para cada QTL de los genes de función conocida que estuvieran relacionados con el éxito reproductivo, el cortejo sexual y la resistencia al estrés térmico en FlyBase Gene database (FlyBase consortium 2003).

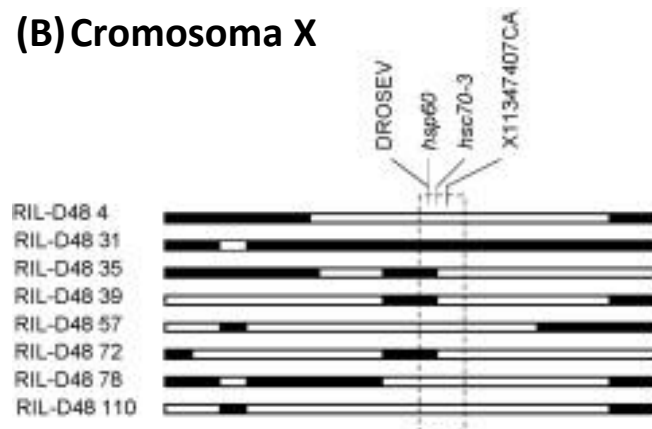
5.4.3 Análisis de nivel de expresión de algunos genes candidatos

El nivel de expresión de siete genes candidatos fue estimado por Norry et al (2009) para moscas de control y para moscas sometidas a un tratamiento de estrés por calor (45 min a 35°C) en 8 líneas RIL-D48 que difieren en termotolerancia. Los datos del nivel de expresión génica disponibles para las 8 RIL a analizar corresponden a moscas sometidas a un estrés por calor (35°C por 45 min), almacenadas a -70°C después de 1 h de recuperación a 25°C, y moscas de control (siempre mantenidas a 25°C hasta el congelamiento a -70°C (Norry et al 2009), Los siete genes candidatos medidos por Norry et al (2009) para el nivel de expresión

fueron: CG10383 (37A1), *catsup* (37B), *ddc* (37C), *trap1* (42C) y *cyp6a13* (44D3) (ligeramente por fuera de la región QTL analizado), unidos en una región central del cromosoma 2. Además, *hsp60* (10A) y *hsc70-3* (10E3) localizados en la banda 10 del cromosoma X. Las ocho líneas RIL utilizadas: D48-4, D48-31, D48-35, D48-39, D48-57, D48-72, D48-78, D48-110 (Fig 2).

Las condiciones para extracción de ARN, *primers* y RT-q-PCR están descritas en Norry et al (2009). Para averiguar si las correlaciones entre nivel de expresión génica y termotolerancia no fueron afectadas desde el estudio de 2009, se midió en el año 2017 el mismo carácter fenotípico que en Norry et al (2009), resistencia al coma por calor (RCC), y la correlación entre nivel de mensajero y KRHT fue prácticamente la misma para todos los genes a través de las 8 RIL-D48 (Fabián Norry, comunicación personal).

(B) Cromosoma X



(A) Cromosoma 2

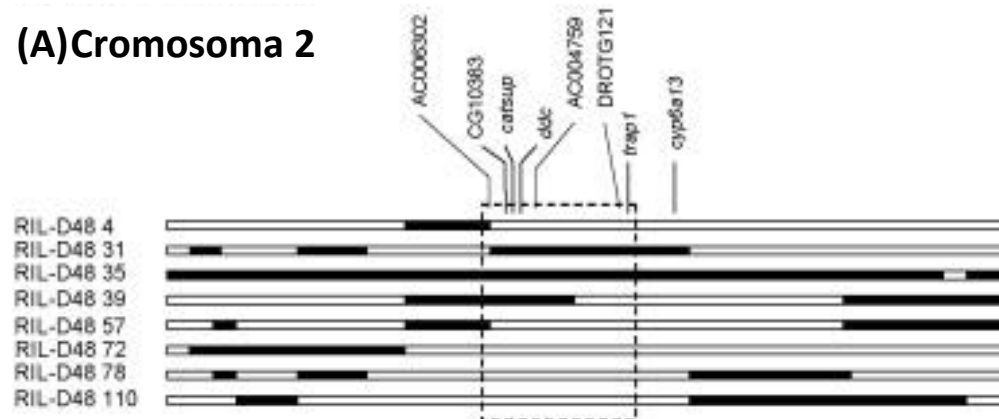


Figura 2. Cromosomas X y 2 (A y B, respectivamente) con la localización de genes candidatos en el mapa físico, regiones QTL (líneas discontinuas) y genotipos (segmentos blanco y negro) para cada RIL. Los segmentos cromosómicos blancos y negros corresponden a los genotipos D48 y SH, respectivamente, como se infiere de los loci de microsatélites. D48 es la línea parental de bajo RCC; SH es la línea parental de alto RCC. Se muestran genes y marcadores probados para cada región QTL (tomado de Norry et, al 2009).

5.4.4 Análisis de correlación

Se evaluaron las posibles asociaciones entre las medias de los tres caracteres estudiados (T1, T2 y T3) y el nivel de expresión para cada uno de los siete genes candidatos en las mismas 8

RIL indicadas en la Figura 2. Las asociaciones fueron analizadas en alta temperatura con el pre-tratamiento de estrés por calor como así también en ausencia del pre-tratamiento (control), mediante la estimación de la correlación de Spearman, utilizando InfoStat (Di Rienzo et al., 2017).

5.5 Resultados

El mapeo del intervalo compuesto reveló la presencia de varios QTL que permiten explicar la variación en los tres caracteres medidos que contribuyen al éxito diferencial en el apareamiento. Para el carácter T1 se identificaron un total de siete QTL localizados en los tres cromosomas mayores de *D. melanogaster* (Tabla 2; Fig 3). En el caso de las mediciones realizadas a 25°C, se encontraron uno QTL en el cromosoma X (rango de posición citológica: 12D-19F6) y otro en el cromosoma 2 (rango: 30A3-38E9). A 33°C se identificó un QTL en el cromosoma 2 (rango: 23A-26A) en el panel RIL-D48. Para el caso del mapeo realizado a 33°C con un pre-tratamiento de estrés por calor se identificaron dos QTL en cada uno de los paneles RIL-D48 y RIL-SH2, dos en el cromosoma 2 (rangos: 25F5-30A6 y 30A3-34D2) y los dos restantes en el cromosoma 3 (rangos: 67A-86E3 y 86E3-90F) (Tabla 2).

Para los distintos tratamientos térmicos se encontraron QTL que co-localizan en dos regiones del cromosoma 2 en el panel RIL-D48. Se detectó una co-localización entre los perfiles de QTL correspondientes a 25°C y 33°C con pre-tratamiento (rango 30A3- 34A2), y una segunda entre los QTL identificados en las mediciones realizadas a 33°C y 33°C con pre-tratamiento, en el rango 25F5-26A.

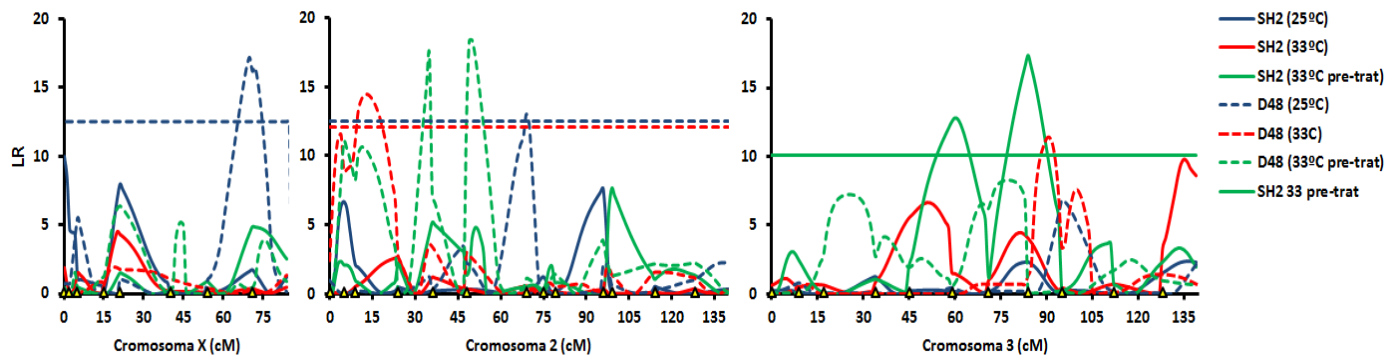


Figura 3. Gráfico de los valores de razón de probabilidad (LR) en función de la posición del mapa genético (cM) para el mapeo de intervalo compuesto del tiempo hasta el inicio de la cópula (T1) en líneas RIL de *D. melanogaster*. Los gráficos muestran los resultados de los paneles RIL-D48 y RIL-SH2 para cada uno de los tres tratamientos térmicos por separados. Los umbrales de significación se determinaron por 1000 permutaciones al azar, y sólo se muestran para los casos en los que un QTL resultó significativo. Los triángulos sobre el eje x representan la ubicación de los marcadores moleculares (microsats) utilizados para el mapeo de intervalo compuesto (Fig 1).

En cuanto al carácter T2 se identificaron un total de seis QTL en las tres condiciones térmicas analizadas (Tabla 2; Fig 4). A 25°C se encontraron dos QTL solo en el panel RIL-D48, uno de ellos en el cromosoma 2 (rango: 28A1-34D2) y el otro en el cromosoma 3 (rango: 86E-90B2; Tabla 2; Fig 4). A 33°C se identificó un único QTL (rango: 49C-50C) en el panel RIL-D48. Mientras que en el mapeo realizado a 33°C con un pre-tratamiento térmico se encontraron tres QTL uno en cada uno de los tres cromosomas estudiados. En el panel RIL-D48 se identificó un único QTL en el cromosoma 3 (rango: 67A-86E3) mientras que en el panel RIL-SH2 se encontraron un QTL en el cromosoma 1 (rango: 7B3-12E) y otro en el cromosoma 2 (rango: 42A-50C; Tabla 2). Por último, se identificó una co-localización entre

los QTL de las mediciones realizadas a 33°C y 33°C con pre-tratamiento, en el rango 49C-50C (Tabla 2; Fig 4).

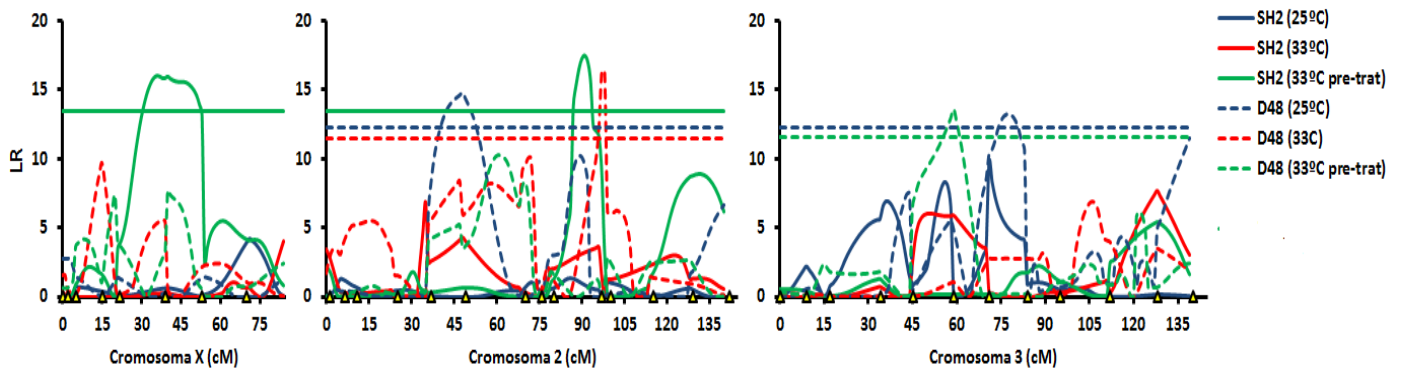


Figura 4. Gráfico de los valores de razón de probabilidad (LR) en función de la posición del mapa genético (cM) para el mapeo de intervalo compuesto del tiempo de cópula (T2) en líneas de *D. melanogaster*. Los gráficos muestran los resultados de los paneles RIL-D48 y RIL-SH2 para cada uno de los tres tratamientos térmicos por separados. Los umbrales de significación se determinaron por 1000 permutaciones al azar, y sólo se muestran para los casos en los que un QTL resultó significativo. Los triángulos sobre el eje x representan la ubicación de los marcadores moleculares (microsats) utilizados para el mapeo de intervalo compuesto (Fig 1).

Para el carácter T3 se identificaron 5 QTL en total (Tabla 2; Fig 5). En las mediciones realizadas a 25°C se identificaron dos QTL, ambos en el cromosoma 3 (rangos: 90E-95C6 y 95C8-97F). A 33°C con un pre-tratamiento térmico se identificó un QTL en el cromosoma 2 (rango: 21C3-26A). Todos estos QTL fueron identificados en el panel RIL-D48 (Tabla 2; Fig 5). Mientras que en las mediciones realizadas a 33°C se encontraron dos QTL, uno en el panel RIL-D48 (rango: 21C3-28A3) y el otro en el panel RIL-SH2 (rango: 97F-D9) (Tabla 2). Además se identificó una co-localización de QTL entre las mediciones a 33°C y 33°C con

pre-tratamiento, en el rango 21C3-26A (Tabla 2). Al igual que para los dos caracteres restantes, los QTL que solaparon fueron identificados en las distintas condiciones térmicas evaluadas para el mapeo.

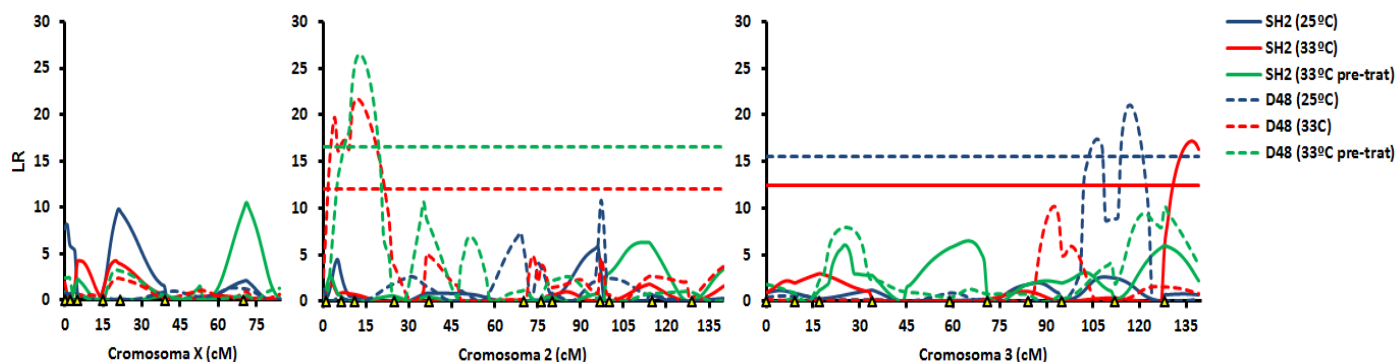


Figura 5. Gráfico de los valores de likelihood ratio (LR) en función de la posición del mapa genético (cM) para el mapeo de intervalo compuesto del éxito de apareamiento (T3) en líneas RIL de *D. melanogaster*. Los gráficos muestran los resultados de los paneles RIL-D48 y RIL-SH2 para cada uno de los tres tratamientos térmicos por separados. Los umbrales de significación se determinaron por 1000 permutaciones al azar, y sólo se muestran para los casos en los que un QTL resultó significativo. Los triángulos sobre el eje x representan la ubicación de los marcadores moleculares (microsats) utilizados para el mapeo de intervalo compuesto (Fig 1).

Tabla 2. QTL para los tres caracteres asociados al apareamiento (T1, T2, T3) identificados por mapeo de intervalo compuesto en los paneles RIL-D48 y RIL-SH2. El mapeo se realizó en cada uno de los paneles para cada uno de los tres tratamientos térmicos utilizados. Se muestra el rango citológico para cada QTL identificado, el efecto de aditividad (a), el porcentaje de la varianza fenotípica total explicado (% Var) y los genes candidatos.

Caracter	QTL	Tratamiento	Panel	Rango QTL	a	% Var	Algunos genes candidatos
T1	Q1	25°C	D48	12D-19F6	-948,5565	9,4	<i>Non A*</i> , <i>disco*</i> ,
T1	Q2	25°C	D48	30A3-38E9	548,6103	20,2	<i>catsup</i> , <i>ppk</i> , CG10383, <i>ddc</i> , <i>stc*</i> , <i>ab*</i> , <i>numb*</i>
T1	Q3	33°C	D48	23A-26 ^a	-724,2194	14	<i>Tim*</i> , <i>cyp4ac2</i> , <i>gpdh1</i> , <i>for*</i>
T1	Q4	33°C pre-trat	D48	25F5-30A6	1104,9626	7,4	<i>Ggpdh2</i>
T1	Q5	33°C pre-trat	D48	30A3-34D2	1095,8081	1,7	<i>hsp60D</i> , <i>ab*</i> , <i>numb*</i>
T1	Q6	33°C pre-trat	SH2	67A-86E3	-563,5192	2,5	<i>spermatocyte arrest (sa)</i> , <i>eagle</i> , <i>hsc70-1 &Cb</i> , <i>hsp26</i> , <i>hsp 22</i> , <i>hsp23</i> , <i>hsp 27*</i> , <i>aay*</i> , <i>fz2*</i>
T1	Q7	33°C pre-trat	SH2	86E3-90F	612,9293	18,9	<i>hsp70</i> , <i>hsc70-2 & 4</i> , <i>foxo*</i> , <i>desat2</i> , <i>desat1</i> , <i>cpo*</i>
T2	Q8	25°C	D48	28A1-34D2	80,4399	14	<i>ab*</i> , <i>numb*</i>
T2	Q9	25°C	D48	86E3-90B2	102,6836	2,5	<i>Foxo*</i> , <i>desat2</i> , <i>desat1</i>
T2	Q10	33°C	D48	49C-50C	-59,9734	14,7	
T2	Q6	33°C pre-trat	D48	67A-86E3	-60,5414	13	<i>spermatocyte arrest (sa)</i> , <i>eagle</i> , <i>hsc70-1 &Cb</i> , <i>Hsp26</i> , <i>hsp 22</i> , <i>hsp23</i> , <i>hsp 27*</i> , <i>aay*</i> , <i>fz2*</i>
T2	Q11	33°C pre-trat	SH2	7B3-12E	64,1482	18,5	<i>hsp60A</i> , <i>dLg1</i> , <i>hsc70-3</i> , CG1561, CG15200, CG11699
T2	Q12	33°C pre-trat	SH2	42A-50C	83,424	20,6	<i>croaker</i> , <i>trap1</i> , CG2065, <i>cyp6a13</i> , <i>pka-R2*</i> , <i>lola*</i>

Tabla 2. Continuación

Caracter	QTL	Tratamiento	Panel	Rango QTL	a	% Var	Algunos genes candidatos
T3	Q13	25°C	D48	90E-95C6	-10,9737	4,2	<i>Fruitless, cpo*, cry*, dl*, pnt*</i>
T3	Q14	25°C	D48	95C8-97F	-10,7643	0,0007	<i>takeout, E(spl), pdf*</i>
T3	Q15	33°C	D48	21C3-28A3	11,976	26,5	<i>tim*, gpdh2, robo*, for*</i>
T3	Q16	33°C	SH2	97F-97D9	13,26	15,1	
T3	Q17	33°C pre-trat	D48	21C3-26 ^a	16,153	17,1	<i>tim*, gpdh2, robo*, for*</i>

* Genes que modificaron su nivel de expresión por selección artificial sobre la velocidad de latencia del cortejo en Mackay et al (2005).

Finalmente, se identificaron co-localizaciones entre los QTL encontrados para los tres caracteres medidos en los cromosomas 2 y 3. Entre T1 y T2 se encontraron tres co-localizaciones, mientras que entre T1 y T3 se encontró un único solapamiento (Tabla 3). Entre T2 y T3 no se identificaron co-localizaciones (Tabla 3).

Tabla 3. Rangos citológicos de solapamiento (co-localización) entre los distintos QTL identificados por mapeo de intervalo compuesto en los tres caracteres medidos (T1, T2 y T3).

Caracteres	Cromosoma	Rango de solapamiento
T1 - T2	2	30A3-34D2
	3	67A-86E3
	3	86E-90B2
T1 - T3	2	23A-26A

Niveles de expresión de algunos genes candidatos

Para las asociaciones analizadas en ausencia de un pre tratamiento térmico se encontró una correlación negativa entre los valores de T2 y el nivel de expresión del cognato *hsc70-3*. Las líneas que mostraron menor tiempo de cópula exhiben un nivel de expresión de *hsc70-3* más elevado que las líneas de estuvieron más tiempo copulando para (Tabla 4; Fig 6). Se detectaron, además, correlaciones significativas entre T3 y el nivel de expresión *catsup*, *ddc* y *trap1*. Todas estas correlaciones también resultaron negativas (Tabla 4; Fig 6). Por último, los valores de T1 no mostraron ninguna correlación significativa con los niveles de expresión de los genes estudiados.

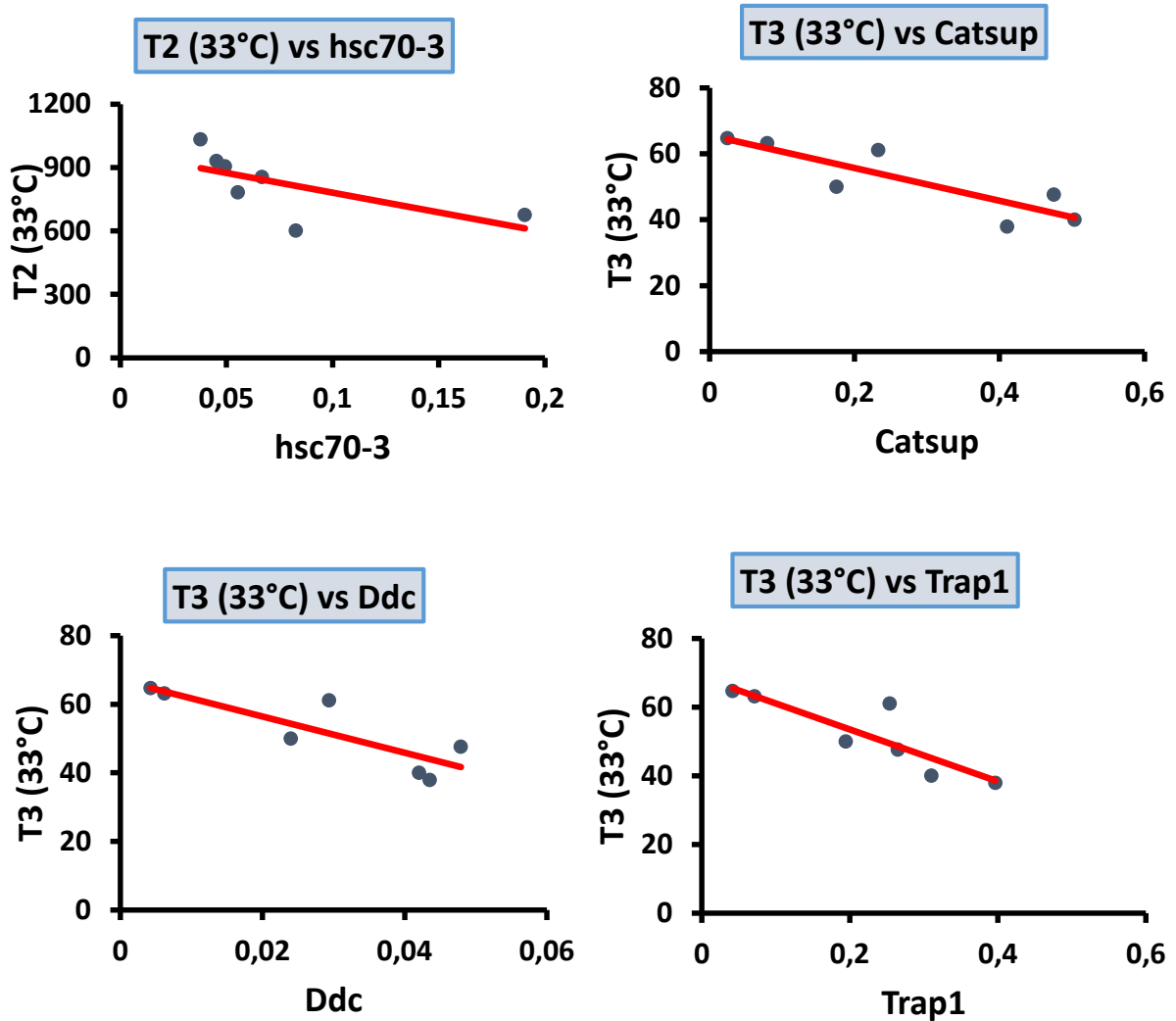


Figura 6. Asociaciones que resultaron significativas para correlaciones de Spearman (dadas en el texto) entre los valores fenotípicos de los tres caracteres de apareamiento medidos a 33°C en ausencia de un pre tratamiento térmico y el nivel de expresión de los genes candidatos analizados en Norry et al, (2009). Las líneas rojas solo indican la relación lineal entre las variables estimadas por cuadrados mínimos.

Tabla 4. Asociaciones por correlación de Spearman entre los niveles de expresión de genes candidatos y los fenotipos de los tres caracteres de apareamiento medidos (T1, T2 y T3) en ausencia de un pre tratamiento térmico. En cada casilla el número que se encuentra arriba corresponde al valor del coeficiente de correlación de Spearman, mientras que el número que se encuentra por debajo corresponde al valor p de significación estadística. Los datos de expresión se basan en mediciones promedio realizadas con q-RT-PCR en ocho de las RIL-D48 analizadas por Norry et al (2009) en moscas que no recibieron un estrés por calor. Los valores p fueron corregidos para múltiples comparaciones con el test de Bonferroni secuencial (Rice 1989).

	catsup	Ddc	trap1	CG10383	cyp6a13	hsp60	hsc70-3
T1 (33°C)	0.29 p=0.48	0.21 p=0.60	0.46 p=0.25	(-0.43) p=0.25	(-0.39) p=0.36	(-0.18) p=0.66	0.18 p=0.66
T2 (33°C)	0.04 p=0.93	(-0.21) p=0.60	0.07 p=0.86	0.04 p=0.93	(-0.04) p=0.93	0.39 p=0.33	(-0.93) p=0.02
T3 (33°C)	(-0.86) p=0.03	(-0.86) p=0.03	(-0.96) p=0.02	(-0.29) p=0.48	(-0.32) p=0.43	(-0.54) p=0.19	(-0.25) p=0.54

Cuando se realizaron los análisis de correlación entre los valores de los tres caracteres, T1, T2 y T3, y los niveles de expresión de los siete genes candidatos estudiados en presencia de un pre-tratamiento térmico, no se observaron correlaciones significativas para ninguno de los caracteres (Tabla 5).

Tabla 5. Asociaciones por correlación de Spearman entre el nivel de expresión de cada uno de los siete genes candidatos analizados en Norry et al (2009), en moscas que recibieron un estrés por calor, y los fenotipos de los tres caracteres de apareamiento medidos en el presente estudio (T1, T2 y T3) en presencia de un pre-tratamiento de calor. En cada casilla el número que se encuentra arriba corresponde al valor del coeficiente de correlación de Spearman (ρ), mientras que el número que se encuentra por debajo corresponde al valor p que nos informa si la correlación es estadísticamente significativa. Los datos de expresión se basan en mediciones promedio de q-PCR en 8 RIL realizados en Norry et al, (2009).

	Cátsup	Ddc	trap1	CG10383	cyp6a13	hsp60	hsc70-3
T1 (33°C) pre-trat	(-0.07) p=0.86	(-0.25) p=0.54	0.04 p=0.93	0.04 p=0.93	(-0.14) p=0.72	(-0.46) p=0.25	0.36 p=0.38
T2 (33°C) pre-trat	(-0.18) p=0.66	(-0.14) p=0.73	(-0.29) p=0.48	(-0.14) p=0.73	(-0.14) p=0.66	(-0.07) p=0.86	(-0.46) p=0.25
T3 (33°C) pre-trat	(-0.07) p=0.86	0.14 p=0.73	(-0.18) p=0.66	(-0.11) p=0.79	0.07 p=0.86	0.21 p=0.60	(-0.29) p=0.48

5.6 Discusión

Si bien la arquitectura genética del apareamiento ha sido estudiada en trabajos previos (Moehring & Mackcay, 2004; Hughes et al., 2006; Etges et al., 2007), hasta el momento se conoce poco sobre su base genética en condiciones de estrés térmico. En este capítulo se analizó la capacidad de los individuos para aparearse mediante el estudio de tres caracteres relacionados con el apareamiento: el tiempo de latencia hasta la cópula (T1), la duración total de cópula (T2) y la frecuencia (o éxito) de apareamiento (T3).

Los tres caracteres, T1, T2 y T3, resultaron genéticamente variables entre las líneas RIL. Se detectaron efectos de QTL significativos para los tres caracteres en todas las condiciones térmicas empleadas.

Los QTL identificados no fueron específicos para el éxito de apareamiento en alta temperatura, dado que todos ellos solaparon, total o parcialmente, con QTL para termotolerancia o bien para el apareamiento a temperatura benigna (Moehring & Mackay, 2004; Mackay et al., 2005; Hughes et al., 2006; Morgan & Mackay, 2006; Norry et al., 2007; 2008). El mencionado solapamiento de perfiles de QTL de diferentes caracteres podría indicar que la capacidad de apareamiento en condición de estrés por calor estaría determinada por una combinación de genes específicos para el apareamiento y otros que son específicos de la tolerancia al calor. Es interesante que la mayoría de los genes que cambiaron de nivel de expresión como resultado de la selección artificial sobre el carácter de latencia del cortejo (T1) en el estudio por Mackay et al, (2005) están incluidos dentro de los QTL detectados en el presente estudio (Tabla 2). Entre de estos genes se encuentran algunos que codifican para proteínas relacionadas con la respuesta a la termotolerancia, como es el caso del gen *foxo*, regulador primario de la expresión de Hsps (revisado en Tower, 2009) y otros genes relacionados con el apareamiento como es el caso del gen *nonA* que codifica para proteínas involucradas en el comportamiento del individuo durante el cortejo sexual, y el canto sexual producidos por el batido de las alas (Rendahl et al., 1992; Greenspan & Ferveur, 2000; Sokolowski, 2001).

Se encontraron tres solapamientos entre los QTL identificados para T1 y T2 en los cromosomas 2 y 3 (Tabla 3). Esto resulta consistente con la correlación significativa entre T1 y T2 mostrada en el capítulo 4. Además, en los tres casos los QTL que se superponen

poseen valores de aditivos (a) de igual signo (Tabla 2). Ello también es consistente con los resultados detallados en el capítulo anterior, donde la correlación entre T1 y T2 resultó positiva. También se halló una co-localización entre dos QTL identificados para T1 y T3 (Tabla 2). En el capítulo anterior se ha mostrado la existencia de una correlación negativa entre ambos caracteres, lo cual resulta consistente con los valores de aditividad de los dos QTL superpuestos que mostraron signos opuestos.

Los QTL detectados para T1 en los tres cromosomas mayores de *D. melanogaster* explican una porción variable de la varianza fenotípica total de entre 1,7% y 20,2%. Se puede suponer que genes con grandes influencias en el desempeño reproductivo de un individuo podrían estar implicados en la determinación de fenotipos de la duración total de la cópula. Por esto se han identificado varios genes candidatos dentro de los QTL significativos para dicho carácter. Particularmente dentro del QTL que explica el mayor porcentaje de varianza (Q2) se identificaron algunos genes relacionados directamente con el apareamiento. Como *catsup* que codifica para proteínas relacionadas con el transporte de células ováricas. *catsup* es un gen pleiotrópico que afecta la esperanza de vida y el comportamiento locomotor (Mackay et al., 2005). Además, se demostró que líneas mutantes de *catsup* presentaron mayor resistencia a la hambruna (O'Donnell et al., 2004). Otro gen candidato es *ddc* que codifica para Dopa descarboxilasa (DDC), que cataliza la descarboxilación de L-dopamina en dopamina y 5-hidroxitriptófano en serotonina. Se requiere DDC para la producción de dopamina y serotonina en el sistema nervioso central y en el hipodermo. Se sabe que la dopamina y la serotonina están fuertemente relacionadas con caracteres que determinan el fitness reproductivo, dado que afectan el comportamiento de apareamiento, la fertilidad, los ritmos circadianos, la secreción endocrina y la agresión (Blenau & Baumann, 2001). Los

genes *stc* y *numb* codifican para proteínas con funciones relevantes en la neurogénesis y formación de órganos sensoriales en etapas tempranas del desarrollo (Uemura et al., 1989; Mackay et al., 2005). Mientras que el gen *ab* (abrupt) codifica para proteínas relacionadas con la formación del sistema nervioso y órganos musculos, como también en el desarrollo de procesos reproductivos (Hu et al., 1995; Li et al., 2004, Sugimura et al., 2004; Mackay et al., 2005). Se identificaron algunos genes candidatos relacionados con la termotolerancia como son, *ppk* que afecta a la percepción sensorial y el comportamiento larval. Se conoce que este gen está vinculado con el comportamiento dependiente de la temperatura (Kim et al. 2002). El gen CG10383 está sobre-expresado en la respuesta de choque térmico en *D. melanogaster* (Sørensen et al., 2005b). Frente a la exposición a una elevada temperatura se observó que los niveles de expresión de este gen se incrementaron significativamente (Norry et al., 2009), lo cual lo convierte en un gen candidato relacionado con estrés térmico.

Mediante el mapeo realizado para T2 se encontraron seis QTL significativos en los tres cromosomas mayores de *D. melanogaster* en los tres tratamientos que explican una porción variable de la varianza fenotípica total de entre 2,5% y 20,6%. Sin embargo, Q11 y Q12 identificados a 33°C con un pre-tratamiento de calor previo fueron los de mayor efecto para el carácter. Por lo cual estas porciones del genoma podrían contener genes altamente determinantes para el *fitness* reproductivo en alta temperatura. Se identificaron varios genes candidatos, dentro de los QTL mencionados, relacionados con la reproducción y la respuesta a la termotolerancia (Tabla 2). Ambos QTL resultaron significativos en condiciones de temperatura elevada, por lo tanto, en estos QTL podría resultar importante la influencia de genes que están relacionados en la respuesta al estrés térmico. Algunos de los genes candidatos identificados dentro del QTL que explica el mayor porcentaje de varianza están

relacionados con la termotolerancia como son *hsp60A* y *hsc70-3*. Se sabe que estos genes cambian en forma negativamente correlacionada sus niveles de expresión frente a la inducción por calor (Norry et al., 2009). Como también el gen *trap1* que codifica para una *heat-shock protein* que tiene propiedades similares a Hsp90 (Felts et al., 2000; Pflanz & Hoch, 2000) y, por lo tanto, se ha propuesto que participa en la respuesta de la defensa general y la respuesta específica no inducibles frente a varios factores de estrés (Flybase consortium 2003; Morgan & Mackay, 2006; Norry et al., 2009). Genes de la familia de Hsp90 han sido identificados como involucrados en la determinación de la velocidad de apareamiento, es decir nuestro carácter T2, en un análisis a nivel del genoma completo de la respuesta transcripcional a la selección para la velocidad de apareamiento en *D. melanogaster* (Mackay et al., 2005).

El gen *cyp6a13* codifica para una proteína con actividad de oxidorreductasa. Estudios previos demostraron que se encuentra regulada negativamente por el estrés térmico. *dLg1* codifica para una proteína con función de receptor en la superficie celular y también está involucrada en el crecimiento de discos imaginales. Este gen tiene relación con la temperatura dado que está sobre-expresado por la exposición a temperaturas elevadas, al menos en embriones (Leemans et al., 2000). El gen GC2065 codifica para una proteína con actividad Oxidoreductasa. Este gen se encuentra relacionado con los factores de estrés térmicos. En estudios previos se observó que está regulado positivamente en líneas seleccionadas para la resistencia a bajas temperaturas respecto a las líneas control (Telonis-Scott et al., 2009). Dentro de estos QTL también se identificaron genes candidatos que influyen en el *fitness* reproductivo, como es el caso de *croacker* cuyos efectos en el comportamiento de cortejo del macho y la producción de cantos de cortejo producidos por

las alas, que lo relacionan directamente con el desempeño del cortejo sexual. Se vio que mutantes para el gen *croacker* presentaron aberraciones puntuales en la frecuencia y la forma de los ciclos de intrapulsos, menor vigor sexual en machos y una notable disminución en el éxito de cortejo (Yokokura et al., 1995). Otro gen candidato relacionado con la reproducción es *lola* que codifica para proteínas involucradas en la generación de gametas, tanto en la oogénesis como en la espermatogénesis (Tripathy et al., 2014). Además, se identificó el gen *pka-R2* involucrado en la regulación de la actividad neuronal en el cerebro y en el mantenimiento del ritmo circadiano en individuos adultos (Park et al., 2000; Mackay et al., 2005).

Para T3 se han identificado QTL para distintas regiones de los cromosomas 2 y 3. Estos QTL explican una porción variable de la varianza fenotípica total de entre 4,2 y 26,5% (Tabla 2). Como en el resto de los caracteres, se encontraron QTL para todas las condiciones térmicas experimentadas, incluyendo la temperatura benigna (25°C). Por ello es probable que tales QTL estén relacionados con el *fitness* reproductivo (Mackay et al., 2005). Pero también los caracteres encontrados en condiciones de estrés térmico podrían contener genes determinantes para la respuesta a los cambios térmicos. Particularmente en este caso el QTL de mayor efecto (Q15) fue detectado a 33°C (Tabla 2). Dentro de los QTL significativos se han identificado varios genes candidatos (Tabla 2). Algunos de estos genes están implicados directamente en procesos relacionados con la reproducción, tales como el gen *tim* que está involucrado en la respuesta a distintos tipos de estímulos y procesos metabólicos (Mackay et al., 2005). Este gen codifica para proteínas ampliamente relacionadas con el comportamiento y el mantenimiento del ritmo circadiano en *Drosophila* (Dunlap, 1999). Se sabe que mutantes del gen *tim* presentaron interrupción del ritmo circadiano y mostraron una reducción en la

cantidad de espermatozoides liberados de los testículos a las vesículas seminales en los dos primeros días del adulto y la fertilidad en las hembras (Giebultowicz et al., 1990). También se conocen mutaciones en el gen *tim* que determinaron una disminución de la actividad en el conducto eyaculador y los testículos superiores. Mientras que el gen candidato *gpdh2* se encuentra asociado con resistencia al calor (van Delden & Kamping, 1989; Bettencourt et al., 2002). Se identificaron también genes candidatos relacionados con el comportamiento tales como *for* que codifica para proteínas involucradas en la locomoción, y el desarrollo del olfato (Engel et al., 2000). Además, este gen tiene influencia en comportamiento social (Pereira & Sokolowski, 1993).

Los resultados sobre genes candidatos en este estudio requieren futuros análisis genéticos de mapeo a escala fina, y cada QTL puede contener múltiples nuevos candidatos ya que aún se desconoce la función de muchos de los genes del genoma anotado de *Drosophila melanogaster*. A pesar de todo ello, es interesante destacar una observación en el estudio presente. Específicamente, que las únicas correlaciones significativas observadas entre el nivel de expresión no inducida de genes candidatos y caracteres del apareamiento analizados (T2 y T3 en alta temperatura), fueron de signo negativo e involucraron genes de la respuesta al estrés por calor o de adaptación a la temperatura (*hsc70-3*, *trap1*, *cátsup* y *ddc*; Tabla 4). Este resultado sugiere que la mayor expresión de estos genes es ventajosa para la resistencia al calor (como en Norry et al 2009), pero es perjudicial para el apareamiento en los machos, disminuyendo la duración de la cópula y el éxito para el apareamiento en alta temperatura (Tabla 4). Ese resultado es muy interesante porque sugiere un *trade-off* entre la capacidad para resistir al calor en un nuevo episodio de estrés y el éxito en el apareamiento bajo dicha condición de estrés. Este *trade-off* desaparece a temperatura benigna. Esta relación

será de interés en futuros estudios de adaptación a la temperatura dado que podría involucrar muchos más genes de la respuesta al calor que los analizados en este primer estudio.

Conclusión General

En este trabajo se estudió el efecto de la temperatura ambiental sobre el éxito en el apareamiento en el modelo *Drosophila*, mediante selección artificial en *Drosophila buzzatii* y mapeo de QTL en *D. melanogaster*.

Luego del capítulo 1 de introducción, en el segundo capítulo se evaluó la respuesta directa de la selección para el éxito de apareamiento en alta temperatura en *D. buzzatii*. Como primera conclusión se puede mencionar que el éxito de apareamiento respondió significativamente al régimen de selección artificial practicado. En las líneas seleccionadas de *D. buzzatii*, la respuesta a este carácter en alta temperatura aumentó considerablemente después de 15 generaciones de selección artificial. Ello indica que el éxito de apareamiento en alta temperatura es un carácter genéticamente heredable en *D. buzzatii*. La evolución del éxito de apareamiento como blanco de la selección en alta temperatura podría beneficiar el proceso de adaptación al estrés térmico (Candolin & Heuschele, 2008).

La selección para el éxito de apareamiento en alta temperatura mostró consecuencias importantes en la resistencia a ambos extremos térmicos. Se registró un efecto negativo sobre RCF mientras que el efecto sobre RCC resultó positivo. Esto demuestra que efectivamente la selección provocó una respuesta correlacionada significativa en los caracteres de termotolerancia. Además, las respuestas correlacionadas revelaron una asociación de *trade-off* entre RCC y RCF. Estos resultados son consistentes con estudios de QTL previos los cuales mostraron un *trade-off* entre RCC y RCF asociado a un QTL en el medio del cromosoma 2 en diversas poblaciones de mapeo en *D. melanogaster* (Morgan & Mackay, 2006; Norry et al., 2007, 2008). Sin embargo, dicha respuesta antagónica en la resistencia a

ambos extremos de la escala térmica no había sido reportada previamente en experimentos de selección artificial sobre RCC y RCF en *D. buzzatii* (Bertoli et al., 2010; Sambucetti et al., 2010; Mori & Kimura, 2008; Gerken et al., 2016). Además, es importante destacar que en este estudio se muestra por vez primera una relación elocuente entre el éxito del apareamiento en alta temperaturas y RCF.

En el tercer capítulo se evaluaron los efectos de la selección en caracteres de historia de vida. Como conclusión principal se destaca que la selección tuvo un efecto significativo tanto en la longevidad como en la fecundidad en *D. buzzatii*. Particularmente, en la longevidad el efecto fue significativamente negativo en machos. Los machos de las líneas seleccionadas para mayor éxito de apareamiento resultaron menos longevos. Esto resulta consistente con la idea de que la reproducción puede causar una disminución en la longevidad (revisado en Kirkwood & Austand, 2000), lo que se relaciona con el conocido "*costo de la reproducción*" postulado por la teoría de pleiotropía antagonista (Williams, 1966). En el caso de la medición de fecundidad en condición ELM, el régimen de selección tuvo efectos positivos significativos sobre dicho carácter solo bajo condiciones de estrés térmico. Los resultados muestran, en alta temperatura, una asociación entre la longevidad y la fecundidad, lo cual resulta consistente con estudios previos donde se observaron correlaciones negativas entre la longevidad y fecundidad (Luckinbill et al., 1984; Rose, 1992; Rose, 1999; Partridge & Mangel, 1999). En este mismo sentido, las teorías del envejecimiento proponen una relación de compensación entre un desempeño beneficioso en la reproducción temprana y el costo de disminución de la reproducción y supervivencia más adelante en la vida, mediante el concepto de "*compromiso evolutivo*" (Williams, 1957; Partridge y Barton, 1993).

En el cuarto capítulo se abordó el comportamiento reproductivo de los individuos mediante caracteres relacionados con el cortejo y el apareamiento, en condiciones de estrés

por calor en *Drosophila melanogaster*. Los resultados muestran que los tres caracteres estudiados: tiempo de latencia del cortejo hasta iniciar la cópula (T1), tiempo total de cópula (T2) y frecuencia (o éxito) de apareamiento (T3), resultaron afectados por el estrés térmico. En dicha condición de estrés los tres caracteres presentaron diferencias significativas entre ambos paneles de líneas RIL de *D. melanogaster*. En el caso de T1, en condiciones de estrés por calor las líneas del panel RIL-SH2 (más termo-resistentes) requirieron un tiempo de cortejo significativamente menor que las del panel RIL-D48 (más termo-sensibles) para iniciar la cópula. Mientras que a temperatura benigna no se observaron diferencias significativas entre los paneles de líneas RIL. Esto podría indicar que el comportamiento de los machos durante el cortejo estaría afectado significativamente por el estrés térmico, donde la diferencia de termotolerancia entre las líneas RIL estaría siendo determinante de la capacidad de aparear en alta temperatura. El carácter T2 registró diferencias significativas entre las líneas en condición de pre-tratamiento térmico. Las líneas del panel RIL-SH2 registraron en promedio un T2 significativamente mayor que las líneas del panel RIL-D48, en condiciones de estrés con un pre-tratamiento. Mientras que para T3 se observaron diferencias entre las líneas de los paneles RIL en condición de estrés térmico. Las líneas RIL-SH2 (termo-tolerantes) resultaron significativamente más exitosas para el apareamiento en alta temperatura que las RIL-D48 (termo-sensibles) en alta temperatura. Esto resulta consistente con los resultados del capítulo 2 obtenidos para las mediciones del éxito de apareamiento como respuesta al régimen de selección en alta temperatura, donde las líneas seleccionadas resultaron más exitosas para el apareamiento y exhibieron una mayor resistencia al estrés por calor, como así también resultaron más sensibles a las bajas temperaturas en comparación con las líneas control. Es importante resaltar que tanto en las líneas de selección de *D. buzzatii* como en las líneas RIL de *D. melanogaster* se verificó una correlación genética

entre la termotolerancia y el éxito de apareamiento en alta temperatura (Fasolo & Krebs, 2004; Dolgin et al., 2006; Jørgensen et al., 2006).

Los análisis de correlación entre los caracteres estudiados en las RIL resultaron estadísticamente significativos. Se observó una fuerte asociación positiva entre T1 y T2 en las líneas del panel RIL-SH2. Las moscas que necesitaron menos tiempo para comenzar el apareamiento también fueron las que menos tiempo se mantuvieron en cópula. Esto resulta consistente con estudios previos donde se mostró que los machos en un contexto de estrés por competencia sexual en presencia de otros machos, disminuyen el tiempo de latencia (T1) y duración de la cópula (T2) (Bretman et al., 2009). Mientras que entre T2 y T3 se hallaron correlaciones negativas en el panel RIL-SH2. Ambas correlaciones resultaron significativas solo en condiciones de estrés térmico. Esto último es interesante en estudios de estrés térmico, ya que las correlaciones genéticas entre caracteres adaptativos pueden aparecer, desaparecer y re-aparecer a causa del estrés ambiental (Norry & Loeschcke 2002). Estos cambios en las correlaciones genéticas representan ejemplos de interacción genotipo x ambiente, pudiendo influir en la adaptación y distribución de las poblaciones en ambientes naturales en constantes cambios. Finalmente, las correlaciones entre T1 y T3 resultaron positivas en ambos paneles de líneas RIL. Estos resultados dan cuenta de posibles asociaciones comportamentales durante el cortejo y la cópula, siendo elocuente en todas las condiciones térmicas.

En el capítulo 5 se estudió la base genética del apareamiento en condiciones de estrés térmico mediante un mapeo de QTL en caracteres que determinan el éxito de apareamiento (T1, T2 y T3). Los tres caracteres estudiados resultaron genéticamente variables entre las líneas RIL de *D. melanogaster*. Se detectaron efectos de QTL significativos para los tres

caracteres en todas las condiciones térmicas empleadas. Sin embargo, en contraposición a la hipótesis principal establecida en el capítulo, no se encontraron QTL específicos para el éxito de apareamiento en alta temperatura, ya que todos los QTL identificados co-localizaron, total o parcialmente, con QTL para termotolerancia o bien para el apareamiento en temperatura benigna (Moehring & Mackay, 2004; Mackay et al., 2005; Hughes et al., 2006; Morgan & Mackay, 2006; Norry et al., 2007; 2008). Dichas co-localizaciones podrían indicar que la capacidad de aparearse en altas temperaturas está determinada por la combinación de genes específicos para el apareamiento y otros que son específicos de la tolerancia al calor. Esto evidencia de manera elocuente la estrecha relación que existe entre la termotolerancia y el apareamiento, como fue mencionado en los capítulos anteriores.

Finalmente, se descubrieron asociaciones significativas entre los caracteres de apareamiento (T2 y T3), en alta temperatura, y el nivel de expresión no inducida de algunos genes candidatos para la respuesta al estrés por calor o la adaptación a la temperatura (*hsc70-3*, *trap1*, *cátsup* y *ddc*). Todas las correlaciones significativas resultaron de signo negativo, lo cual sugiere que una mayor expresión de estos genes podría asociarse a una mayor termotolerancia (como en Norry et al., 2009), pero resultaría perjudicial para el desempeño de los individuos en el apareamiento.

Este trabajo demuestra que la capacidad de los individuos para tolerar el estrés térmico está genéticamente correlacionada con el éxito en el apareamiento en alta temperatura en el insecto modelo estudiado. Esta relación puede ser de gran interés en el estudio de la evolución y adaptación térmica en ectotermos, dado que ambos mencionados caracteres pueden evolucionar de manera inter-dependiente en condiciones de estrés por calor.

Referencias

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., & Amanatides, P.G. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Anderson, W. W., Levine, L., Olvera, O., Powell, J. R., De La Rosa, M. E., Salceda, V. M., & Guzman, J. (1979). Evidence for selection by male mating success in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(3), 1519-1523.
- Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Angilletta Jr, M. J., Niewiarowski, P. H., & Navas, C. A. (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, 27(4), 249-268.
- Antonovics, J. (1976). The nature of limits to natural selection. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 224-247.
- Angilletta Jr, M. J. (2009). Looking for answers to questions about heat stress: researchers are getting warmer. *Functional Ecology*, 23(2), 231-232.
- Arias, L. N., Sambucetti, P., Scannapieco, A. C., Loeschcke, V., & Norry, F. M. (2012). Survival of heat stress with and without heat hardening in *Drosophila melanogaster*: interactions with larval density. *Journal of Experimental Biology*, 215(13), 2220-2225.
- Arnqvist, G., & Nilsson, T. (2000). The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*, 60(2), 145-164.

- Averhoff, W. W., & Richardson, R. H. (1976). Multiple pheromone system controlling mating in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(2), 591-593.
- Bernardo, J., Ossola, R. J., Spotila, J., & Crandall, K. A. (2007). Interspecies physiological variation as a tool for cross-species assessments of global warming-induced endangerment: validation of an intrinsic determinant of macroecological and phylogeographic structure. *Biology Letters*, 3(6), 695-699.
- Bertoli, C. I., Scannapieco, A. C., Sambucetti, P., & Norry, F. M. (2010). Direct and correlated responses to chill-coma recovery selection in *Drosophila buzzatii*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 134, 154–159.
- Bettencourt, B. R., Kim, I., Hoffmann, A. A., & Feder, M. E. (2002). Response to natural and laboratory selection at the *Drosophila hsp70* genes. *Evolution*, 56(9), 1796-1801.
- Blenau, W., & Baumann, A. (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 48(1), 13-38.
- Borda, M., Sambucetti, P., Gomez, F. H., & Norry, F. M. (2018). Genetic variation for egg-to-adult survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) in a set of recombinant inbred lines reared under heat stress in a natural thermal environment. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 166, 863–872.

- Bowler, K., & Terblanche, J. S. (2008). Insect thermal tolerance: what is the role of ontogeny, ageing and senescence? *Biological Reviews*, 83(3), 339-355.
- Bretman, A., Fricke, C., & Chapman, T. (2009). Plastic responses of male *Drosophila melanogaster* to the level of sperm competition increase male reproductive fitness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1662), 1705-1711.
- Brooks, R., & Endler, J. A. (2001). Female guppies agree to differ: phenotypic and genetic variation in mate-choice behavior and the consequences for sexual selection. *Evolution*, 55(8), 1644-1655.
- Candolin, U., & Heuschele, J. (2008). Is sexual selection beneficial during adaptation to environmental change? *Trends in Ecology and Evolution*, 23, 446–452.
- Chapman, T., Liddle, L. F., Kalb, J. M., Wolfner, M. F., & Partridge, L. (1995). Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature*, 373(6511), 241-244.
- Chapman, T. (2001). Seminal fluid-mediated fitness traits in *Drosophila*. *Heredity*, 87(5), 511.
- Chown, S. L., Hoffmann, A. A., Kristensen, T. N., Angilletta Jr, M. J., Stenseth, N. C., & Pertoldi, C. (2010). Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Climate research*, 43(1-2), 3-15.
- Condon, C., Acharya, A., Adrian, G. J., Hurliman, A. M., Malekooti, D., Nguyen, P., & Angilletta, M. J., Jr. (2015). Indirect selection of thermal tolerance during experimental evolution of *Drosophila melanogaster*. *Ecology and Evolution*, 5, 1873–1880.
- Darwin, C. (1871). *The descent of man, and selection in relation to sex*. London: Murray.

- David J.R., Allemand R., Van Herrewege J., Cohet Y. (1983). Ecophysiology: abiotic factors. In: Ashburner, M., Carson, H. L., Thompson Jr., J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, London, 3d: 105–170.
- Denny, M. W., Miller, L. P., & Harley, C. D. (2006). Thermal stress on intertidal limpets: long-term hindcasts and lethal limits. *Journal of Experimental Biology*, 209(13), 2420-2431.
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Sheldon, K. S., Ghalambor, C. K., Haak, D. C., & Martin, P. R. (2008). Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6668-6672.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2017). InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Retrieved from [http:// www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)
- Djawdan, M., Sugiyama, T. T., Schlaeger, L. K., Bradley, T. J., & Rose, M. R. (2004). Metabolic aspects of the trade-off between fecundity and longevity in *Drosophila melanogaster*. In *Methuselah Flies: A Case Study in the Evolution of Aging* (pp. 145-164).
- Dolgin, E. S., Whitlock, M. C., & Agrawal, A. F. (2006). Male *Drosophila melanogaster* have higher mating success when adapted to their thermal environment. *Journal of evolutionary biology*, 19(6), 1894-1900.
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), 271-290.
- Elandt-Johnson, R. C., & Johnson, N. L. (1980). *Survival models and data analysis* (Vol. 110). John Wiley & Sons.

- Etges, W. J., De Oliveira, C. C., Gragg, E., Ortíz-Barrientos, D., Noor, M. A., & Ritchie, M. G. (2007). Genetics of incipient speciation in *Drosophila mojavensis*. I. Male courtship song, mating success, and genotype x environment interactions. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 61(5), 1106-1119.
- Etterson, J. R., & Shaw, R. G. (2001). Constraint to adaptive evolution in response to global warming. *Science*, 294(5540), 151-154.
- Falconer D.S., Mackay T.F.C. (1996). *Introducción a la genética cuantitativa*. Cuarta edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España
- Fasolo, A. G., & Krebs, R. A. (2004). A comparison of behavioural change in *Drosophila* during exposure to thermal stress. *Biological Journal of the Linnean Society*, 83, 197–205. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00380.x>
- Feder, M. E., Cartaño, N. V., Milos, L. U. K. A. S. Z., Krebs, R. A., & Lindquist, S. L. (1996). Effect of engineering Hsp70 copy number on Hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. *Journal of experimental biology*, 199(8), 1837-1844.
- Feder M.E., Hofmann G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243 – 282.
- Fedorka, K. M., Winterhalter, W. E., & Ware, B. (2011). Perceived sperm competition intensity influences seminal fluid protein production prior to courtship and mating. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 65(2), 584-590.

- Felts, S. J., Owen, B. A., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D. B., & Toft, D. O. (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3305-3312.
- Filice, D. C., & Dukas, R. (2019). Winners have higher pre-copulatory mating success but losers have better post-copulatory outcomes. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1900), 20182838.
- Finch, C. E., Pike, M. C., & Witten, M. (1990). Slow mortality rate accelerations during aging in some animals approximate that of humans. *Science*, 249(4971), 902-905.
- Finley, K. D., Edeen, P. T., Foss, M., Gross, E., Ghbeish, N., Palmer, R. H. & McKeown, M. (1998). Dissatisfaction encodes a tailless-like nuclear receptor expressed in a subset of CNS neurons controlling *Drosophila* sexual behavior. *Neuron*, 21(6), 1363-1374.
- Flatt, T., & Heyland, A. (Eds.). (2011). *Mechanisms of life history evolution: the genetics and physiology of life history traits and trade-offs*. OUP Oxford.
- Flint, J., & Mackay, T. F. (2009). Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome research*, 19(5), 723-733.
- FlyBase Consortium. (2003). The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic acids research*, 31(1), 172-175.
- Fontdevila A., Pla C., Hasson E., Wasserman M., Sanchez A., Naveira H., Ruiz A. (1988). *Drosophila koepferae*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera-Drosophilidae) superspecies taxon. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 81: 380-385.
- Fowler, K., & Partridge, L. (1989). A cost of mating in female fruitflies. *Nature*, 338(6218), 760.

- Franks, S. J., & Hoffmann, A. A. (2012). Genetics of climate change adaptation. *Annual review of genetics*, 46.
- Fry, F.E.J. (1957) The lethal temperature as a tool in taxonomy. *Annales Biologiques* 33, 205-219.
- Gerken, A. R., Mackay, T. F. C., & Morgan, T. J. (2016). Artificial selection on chill-coma recovery time in *Drosophila melanogaster*: Direct and correlated responses to selection. *Journal of Thermal Biology*, 59, 77–85.
- Gibert, P., Moreteau, B., Pétavy, G., Karan, D., & David, J. R. (2001). Chillcoma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species. *Evolution*, 55, 1063–1068.
- Giebultowicz, J. M., Ridgway, R. L., & Imberski, R. B. (1990). Physiological basis for sterilizing effects of constant light in *Lymantria dispar*. *Physiological entomology*, 15(2), 149-156.
- Gomez, F. H., Sambucetti, P., & Norry, F. M. (2016). Elevated extension of longevity by cyclically heat stressing a set of recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster* throughout their adult life. *Biogerontology*, 17(5-6), 883-892.
- Gomez, F. H., Stazione, L., Sambucetti, P., & Norry, F. M. (2020). Negative genetic correlation between longevity and its hormetic extension by dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 21(2), 191-201.
- Greenspan, R. J. (1995). Understanding the genetic construction of behavior. *Scientific American*, 272(4), 72-78.
- Greenspan, R. J., & Ferveur, J. F. (2000). Courtship in drosophila. *Annual review of genetics*, 34(1), 205-232.

- Hall, G. C. N., & Hirschman, R. (1994). The relationship between men's sexual aggression inside and outside the laboratory. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 62(2), 375.
- Hall, J. C., Siegel, R. W., Tompkins, L., & Kyriacou, C. P. (1980). Neurogenetics of courtship in *Drosophila*. In *Proceedings-Stadler Genetic Symposium (USA)*.
- Hasson E., Naveira H., Fontdevila H. (1992). The breeding sites of the Argentinian species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). *Revista Chilena de Historia Natural* 65: 319-326.
- Helmuth, B. (2009). From cells to coastlines: how can we use physiology to forecast the impacts of climate change?. *Journal of Experimental Biology*, 212(6), 753-760.
- Hoekstra, L. A., & Montooth, K. L. (2013). Inducing extra copies of the Hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* increases energetic demand. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 68.
- Hoffmann, A. A., & Parsons, P. A. (1991). *Evolutionary genetics and environmental stress*. Oxford University Press.
- Hoffmann, A. A. (1995). Acclimation: increasing survival at a cost. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(1), 1-2.
- Hoffmann, A. A., Hallas, R., Sinclair, C., & Partridge, L. (2001). Rapid loss of stress resistance in *Drosophila melanogaster* under adaptation to laboratory culture. *Evolution*, 55(2), 436-438.
- Hoffmann A.A., Anderson A., Hallas R. (2002). Opposing clines for high and low temperature resistance in *D. melanogaster*. *Ecology Letters* 5: 614-618.

- Hoffmann, A. A., Hallas, R. J., Dean, J. A., & Schiffer, M. (2003a). Low potential for climatic stress adaptation in a rainforest *Drosophila species*. *Science*, 301(5629), 100-102.
- Hoffmann, A. A., Sørensen, J. G., & Loeschcke, V. (2003b). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: Bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28, 175–216.
- Hoffmann, A. A., & Daborn, P. J. (2007). Towards genetic markers in animal populations as biomonitors for human-induced environmental change. *Ecology Letters*, 10(1), 63-76.
- Hoffmann, A. A., & Willi, Y. (2008). Detecting genetic responses to environmental change. *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 421-432.
- Hoffmann, A. A., & Sgro, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470(7335), 479-485.
- Hoffmann, A. A., Chown, S. L., & Clusella-Trullas, S. (2013). Upper thermal limits in terrestrial ectotherms: how constrained are they?. *Functional Ecology*, 27(4), 934-949.
- Hollingsworth, M. J., & Bowler, K. (1966). The decline in ability to withstand high temperature with increase in age in *Drosophila subobscura*. *Experimental Gerontology*, 1(4), 251-257.
- Hollis, B., Koppik, M., Wensing, K. U., Ruhmann, H., Genzoni, E., Erkosar, B., ... & Keller, L. (2019). Sexual conflict drives male manipulation of female postmating responses in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(17), 8437-8444.

- Hu, S., Fambrough, D., Atashi, J. R., Goodman, C. S., & Crews, S. T. (1995). The *Drosophila* abrupt gene encodes a BTB-zinc finger regulatory protein that controls the specificity of neuromuscular connections. *Genes & Development*, 9(23), 2936-2948.
- Huey, R. B., Crill, W. D., Kingsolver, J. G., & Weber, K. E. (1992). A method for rapid measurement of heat or cold resistance of small insects. *Functional Ecology*, 6, 489–494.
- Huey, R. B., Wakefield, T., Crill, W. D., & Gilchrist, G. W. (1995). Within-and between-generation effects of temperature on early fecundity of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 74(2), 216-223.
- Huey, R. B., Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Vitt, L. J., Hertz, P. E., Álvarez Pérez, H. J., & Garland Jr, T. (2009). Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1664), 1939-1948.
- Huey, R. B., Kearney, M. R., Krockenberger, A., Holtum, J. A., Jess, M., & Williams, S. E. (2012). Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1596), 1665-1679.
- Hughes, K. A., & Leips, J. (2006). Quantitative trait locus analysis of male mating success and sperm competition in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 60(7), 1427-1434.
- IPCC, AR WGII. (2014) "Fifth assessment report—impacts, adaptation and vulnerability. Retrieved November 11, 2014."
- IPCC. (2018). Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in

the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. V. Masson-Delmotte et al (Eds.). Geneva: World Meteorological Organization.

Janicke, T., Häderer, I. K., Lajeunesse, M. J., & Anthes, N. (2016). Darwinian sex roles confirmed across the animal kingdom. *Science Advances*, 2, e1500983.

Johnson, T. K., Cockerell, F. E., Carrington, L. B., Rako, L., Hoffmann, A. A., & McKechnie, S. W. (2009). The capacity of *Drosophila* to heat harden associates with low rates of heat-shocked protein synthesis. *Journal of Thermal Biology*, 34, 327–331.

Jørgensen, K. T., Sørensen, J. G., & Bundgaard, J. (2006). Heat tolerance and the effect of mild heat stress on reproductive characters in *Drosophila buzzatii* males. *Journal of Thermal Biology*, 31(3), 280-286.

Kellermann, V., Van Heerwaarden, B., Sgrò, C. M., & Hoffmann, A. A. (2009). Fundamental evolutionary limits in ecological traits drive *Drosophila* species distributions. *Science*, 325(5945), 1244-1246.

Kellermann, V., Overgaard, J., Hoffmann, A. A., Fløjgaard, C., Svenning, J. C., & Loeschcke, V. (2012). Upper thermal limits of *Drosophila* are linked to species distributions and strongly constrained phylogenetically. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), 16228-16233.

Kengeri, S. S., Maras, A. H., Suckow, C. L., Chiang, E. C., & Waters, D. J. (2013). Exceptional longevity in female Rottweiler dogs is not encumbered by investment in reproduction. *Age*, 35(6), 2503-2513.

- Khazaeli, A. A., & Curtsinger, J. W. (2010). Life history variation in an artificially selected population of *Drosophila melanogaster*: pleiotropy, superflies, and age-specific adaptation. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 64(12), 3409-3416.
- Khazaeli, A. A., & Curtsinger, J. W. (2014). Heterogeneity's ruses: how hidden variation affects population trajectories of age-dependent fecundity in *Drosophila melanogaster*. *Demographic Research*, 30, 313-332.
- Kim, K. S., Rao, N. N., Fraley, C. D., & Kornberg, A. (2002). Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7675-7680.
- Kingsolver, J. G., Arthur Woods, H., Buckley, L. B., Potter, K. A., MacLean, H. J., & Higgins, J. K. (2011). Complex life cycles and the responses of insects to climate change.
- Kirkwood, T. B. (1977). Evolution of ageing. *Nature*, 270(5635), 301-304.
- Kirkwood T.B., Austad S.N. (2000). Why do we age? *Nature* 408: 233-238.
- Klepsatel, P., Gáliková, M., De Maio, N., Huber, C. D., Schlotterer, C., & Flatt, T. (2013). Variation in thermal performance and reaction norms among populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 67:3573–3587.
- Krebs R.A., Loeschcke V. (1994). Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* 8: 730-737.
- Kristensen, T. N., Hoffmann, A. A., Overgaard, J., Sørensen, J. G., Hallas, R., & Loeschcke, V. (2007). Costs and benefits of cold acclimation in field-released *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 216–221.

- Lande, R., Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 37(6), 1983, pp. 1210-1226.
- Le Bourg, E., Thon, B., Légaré, J., Desjardins, B., & Charbonneau, H. (1993). Reproductive life of French-Canadians in the 17–18th centuries: a search for a trade-off between early fecundity and longevity. *Experimental Gerontology*, 28(3), 217-232.
- Le Bourg, E. (2007). Does reproduction decrease longevity in human beings? *Ageing research reviews*, 6(2), 141-149.
- Leemans, R., Egger, B., Loop, T., Kammermeier, L., He, H., Hartmann, B., Certa, U., Hirth, F., Reichert, H. (2000). Quantitative transcript imaging in normal and heat-shocked *Drosophila* embryos by using high-density oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97: 12138-12143
- Leroi, A. M., Kim, S. B., & Rose, M. R. (1994). The evolution of phenotypic life-history trade-offs: an experimental study using *Drosophila melanogaster*. *The American Naturalist*, 144(4), 661-676.
- Li, W., Wang, F., Menut, L., & Gao, F. B. (2004). BTB/POZ-zinc finger protein abrupt suppresses dendritic branching in a neuronal subtype-specific and dosage-dependent manner. *Neuron*, 43(6), 823-834.
- Lindquist, S. (1981). Regulation of protein synthesis during heat shock. *Nature*, 293(5830), 311-314.
- Lithgow, G. J., & Kirkwood, T. B. (1996). Mechanisms and evolution of aging. *Science*, 273(5271), 80-80.

- Loeschcke, V., Krebs, R. A., Dahlgard, J., & Michalak, P. (1997). High-temperature stress and the evolution of thermal resistance in *Drosophila*. In Environmental stress, adaptation and evolution (pp. 175-190). Birkhäuser, Basel.
- Loeschcke, V., & Hoffmann, A. A. (2007). Consequences of heat hardening on a field fitness component in *Drosophila* depend on environmental temperature. *The American Naturalist*, 169, 175–183.
- Loeschcke, V., Kristensen, T. N., & Norry, F. M. (2011). Consistent effects of a major QTL for thermal resistance in field-released *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, 57(9), 1227-1231.
- Logan, C. A., & Buckley, B. A. (2015). Transcriptomic responses to environmental temperature in eurythermal and stenothermal fishes. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1915-1924.
- Luckinbill, L. S., Arking, R., Clare, M. J., Cirocco, W. C., & Buck, S. A. (1984). Selection for delayed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 38(5), 996-1003.
- Lynch, M., & Walsh, B. (1998). *Genetics and analysis of quantitative traits* (Vol. 1, pp. 535-557). Sunderland, MA: Sinauer.
- Mackay, T. F., Heinsohn, S. L., Lyman, R. F., Moehring, A. J., Morgan, T. J., & Rollmann, S. M. (2005). Genetics and genomics of *Drosophila* mating behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (suppl 1), 6622-6629.
- Manenti, T., Sørensen, J. G., Moghadam, N. N., & Loeschcke, V. (2016). Few genetic and environmental correlations between life history and stress resistance traits affect adaptation to fluctuating thermal regimes. *Heredity* 117:149–154.
- Markow, T. A. (1996). Evolution of *Drosophila* mating systems. *Evolutionary biology*, 29, 73-106.

- Martins, F., Kruuk, L., Llewelyn, J., Moritz, C., & Phillips, B. (2019). Heritability of climate-relevant traits in a rainforest skink. *Heredity*, 122(1), 41-52.
- Maynard Smith J. (1956). Acclimatization to high temperatures in inbred and outbred *Drosophila subobscura*. *J. Genet.* 54: 497-505
- McCabe, J., & Partridge, L. (1997). An interaction between environmental temperature and genetic variation for body size for the fitness of adult female *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 51(4), 1164-1174.
- McColl, G., Hoffmann, A. A., & McKechnie, S. W. (1996). Response of two heat shock genes to selection for knockdown heat resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 143(4), 1615-1627.
- Medawar P.B. (1952). An unsolved problem of biology: The uniqueness of the individual. Dover, New York, pp28 -55.
- Messina, F. J., & Slade, A. F. (1999). Expression of a life-history trade-off in a seed beetle depends on environmental context. *Physiological Entomology*, 24(4), 358-363.
- Miwa, Y., Koganezawa, M., & Yamamoto, D. (2018). Antennae sense heat stress to inhibit mating and promote escaping in *Drosophila* females. *Journal of neurogenetics*, 32(4), 353-363.
- Miyatake, T. (1997). Genetic trade-off between early fecundity and longevity in *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Heredity*, 78(1), 93-100.
- Moatt, J. P., Dytham, C., & Thom, M. D. (2014). Sperm production responds to perceived sperm competition risk in male *Drosophila melanogaster*. *Physiology & behavior*, 131, 111-114.

- Moehring, A. J., & Mackay, T. F. (2004). The quantitative genetic basis of male mating behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167(3), 1249-1263.
- Moore, A. J., Brodie III, E. D., & Wolf, J. B. (1997). Interacting phenotypes and the evolutionary process: I. Direct and indirect genetic effects of social interactions. *Evolution*, 51(5), 1352-1362.
- Morgan T.J., Mackay T.F.C. (2006). Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 96: 232-242.
- Mori, N., & Kimura, M. T. (2008). Selection for rapid and slow recovery from chill-and heat-coma in *Drosophila melanogaster*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95, 72–80.
- Moritz, C., & Agudo, R. (2013). The future of species under climate change: resilience or decline? *Science*, 341(6145), 504-508.
- Müller, H. G., Carey, J. R., Wu, D., Liedo, P., & Vaupel, J. W. (2001). Reproductive potential predicts longevity of female Mediterranean fruitflies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1466), 445-450.
- Ni, L., Bronk, P., Chang, E. C., Lowell, A. M., Flam, J. O., Panzano, V. C., & Garrity, P. A. (2013). A gustatory receptor paralog controls rapid warmth avoidance in *Drosophila*. *Nature*, 500, 580–584.
- Norry, F. M., Vilardi, J. C., Fanara, J. J., & Hasson, E. (1994). Courtship success and multivariate analysis of sexual selection on morphometric traits in *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of insect behavior*, 8(2), 219-229.

- Norry, F. M., & Loeschcke, V. R. (2002). Longevity and resistance to cold stress in cold-stress selected lines and their controls in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(5), 775-783.
- Norry F.M, Dahlgaard J., Loeschcke V. (2004). Quantitative trait loci affecting knockdown resistance to high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* 13: 3585-3594.
- Norry F.M., Sambucetti P., Scannapieco A.C., Loeschcke V. (2006). Altitudinal patterns for longevity, fecundity and senescence in *Drosophila buzzatii*. *Genetica* 128: 8193.
- Norry, F. M., Gomez, F. H., & Loeschcke, V. (2007). Knockdown resistance to heat stress and slow recovery from chill coma are genetically associated in a central region of chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 16, 3274–3284.
- Norry, F. M., Scannapieco, A., Sambucetti, P., Bertoli, C., & Loeschcke, V. (2008). QTL for the thermotolerance effect of heat hardening, knockdown resistance to heat and chill-coma recovery in an intercontinental set of recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 20, 4570–4581.
- Norry, F. M., Larsen, P. F., Liu, Y., & Loeschcke, V. (2009). Combined expression patterns of QTL-linked candidate genes best predict thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, 55(11), 1050-1057.
- O'Donnell, J.M., Wang, Z., Chaudhuri, A. (2004). Effects of perturbation of catecholamine regulation on resistance of *Drosophila melanogaster* to environmental stress.

N. Blau, B. Thony (Eds.), Pterins, Folates, and Related Biogenic Amines, SPS Publications, Heilbronn, pp. 94-100

Orozco-Terwengel, P., Kapun, M., Nolte, V., Kofler, R., Flatt, T., & Schlotterer, C. (2012). Adaptation of *Drosophila* to a novel laboratory environment reveals temporally heterogeneous trajectories of selected alleles. *Molecular Ecology*, 21, 4931–4941.

Overgaard, J., & Sørensen, J. G. (2008). Rapid thermal adaptation during field temperature variations in *Drosophila melanogaster*. *Cryobiology*, 56, 159–162.

Overgaard, J., Kristensen, T. N., Mitchell, K. A., & Hoffmann, A. A. (2011). Thermal tolerance in widespread and tropical *Drosophila* species: Does phenotypic plasticity increase with latitude? *The American Naturalist*, 178, 80–96

Overgaard, J., Kearney, M. R., & Hoffmann, A. A. (2014). Sensitivity to thermal extremes in Australian *Drosophila* implies similar impacts of climate change on the distribution of widespread and tropical species. *Global change biology*, 20(6), 1738-1750.

Papadopoulos, N. T., Liedo, P., Müller, H. G., Wang, J. L., Molleman, F., & Carey, J. R. (2010). Cost of reproduction in male medflies: the primacy of sexual courting in extreme longevity reduction. *Journal of Insect Physiology*, 56(3), 283-287.

Park, S. K., Sedore, S. A., Cronmiller, C., & Hirsh, J. (2000). Type II cAMP-dependent Protein Kinase-deficient *Drosophila* Are Viable but Show Developmental, Circadian, and Drug Response Phenotypes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20588-20596.

Parsell, D. A., Taulien, J., & Lindquist, S. (1993). The role of heat-shock proteins in thermotolerance. In *Molecular chaperones* (pp. 23-30). Springer, Dordrecht.

- Parsons, P. A. (1964). A diallel cross for mating speeds in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 35(1), 141-151.
- Partridge, L. (1980). Mate choice increases a component of offspring fitness in fruit flies. *Nature*, 283(5744), 290-291.
- Partridge, L., & Harvey, P. H. (1985). Evolutionary biology: costs of reproduction. *Nature*, 316(6023), 20-20.
- Partridge, L., Fowler, K., Trevitt, S., & Sharp, W. (1986). An examination of the effects of males on the survival and egg-production rates of female *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 32(11), 925-929.
- Partridge L., Hoffmann A., Jones J.S. (1987). Male size and mating success in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila pseudoobscura* under field conditions. *Anim Behav* 35: 468–476.
- Partridge L., Barton N.H. (1993). Optimally, mutation and evolution of aging. *Nature* 362: 305-311.
- Partridge L., Mangel M. (1999). Messages from mortality: the evolution of death rates in the old. *Trends Ecol. Evol.* 14: 438–442.
- Partridge, L., Gems, D., & Withers, D. J. (2005). Sex and death: what is the connection? *Cell*, 120(4), 461-472.
- Parratt, S. R., Walsh, B., Metelmann, S., White, N., Manser, A., Bretman, A., & Price, T. (2020). Temperatures that sterilise males better predict global distributions of species than lethal temperatures. *bioRxiv*.

- Patton, Z. J., & Krebs, R. A. (2001). The effect of thermal stress on the mating behavior of three *Drosophila* species. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74(6), 783-788.
- Pflanz, R., & Hoch, M. (2000). *dtrap-1* encodes a novel member of the heat shock super family of proteins and is expressed in derivatives of all three germ layers during *Drosophila* embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 96(2), 219-222.
- Pletcher, S. D. (1999). Model fitting and hypothesis testing for age-specific mortality data. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(3), 430-439.
- Rako, L., & Hoffmann, A. A. (2006). Complexity of the cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, 52(1), 94-104.
- Rako, L., Blackett, M. J., McKechnie, S. W., & Hoffmann, A. A. (2007). Candidate genes and thermal phenotypes: Identifying ecologically important genetic variation for thermotolerance in the Australian *Drosophila melanogaster* cline. *Molecular Ecology*, 16, 2948–2957.
- Rebaudo, F., & Rabbi, V. B. (2018). Modeling temperature dependent development rate and phenology in insects: Review of major developments, challenges, and future directions. *Entomologia Experimentalis*.
- Rendahl, K. G., Jones, K. R., Kulkarni, S. J., Bagully, S. H., & Hall, J. C. (1992). The dissonance mutation at the no-on-transient-A locus of *D. melanogaster*: genetic control of courtship song and visual behaviors by a protein with putative RNA-binding motifs. *Journal of Neuroscience*, 12(2), 390-407.
- Rice, W. R. (1989). The sequential Bonferroni test. *Evolution*, 43, 223-225.

- R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing
- Roff, D. A. (2002). Life history evolution (No. 576.54 R6).
- Roff, D. A. (2012). Evolutionary quantitative genetics. Springer Science & Business Media.
- Rohner, P. T., Pitnick, S., Blanckenhorn, W. U., Snook, R. R., Bächli, G., & Lüpold, S. (2018). Interrelations of global macroecological patterns in wing and thorax size, sexual size dimorphism, and range size of the Drosophilidae. *Ecography*, 41(10), 1707-1717.
- Rose, M., & Charlesworth, B. (1980). A test of evolutionary theories of senescence. *Nature*, 287(5778), 141.
- Rose M.R. (1984). Laboratory evolution of postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 38: 1004-10.
- Rose M.R., Vu L.N., Park S.U., Graves J.L. (1992). Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 27: 241-250.
- Rose, M. R. (1999). Genetics of aging in *Drosophila*. *Experimental gerontology*, 34(5), 577-585.
- Rutherford, S. L., & Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396(6709), 336-342.
- Sadowska, E. T., Labocha, M. K., Baliga, K., Stanisz, A., Wróblewska, A. K., Jagusiak, W., & Koteja, P. (2005). Genetic correlations between basal and maximum metabolic rates in a wild rodent: consequences for evolution of endothermy. *Evolution*, 59(3), 672-681.

- Sales, K., Vasudeva, R., Dickinson, M. E., Godwin, J. L., Lumley, A. J., Michalczyk, Ł., & Gage, M. J. (2018). Experimental heatwaves compromise sperm function and cause transgenerational damage in a model insect. *Nature Communications*, 9(1), 1-11.
- 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.
- Sambucetti, P., Loeschcke, V., & Norry, F. M. (2006). Developmental time and size related traits in *Drosophila buzzatii* along an altitudinal gradient from Argentina. *Hereditas*, 143, 77–83.
- Sambucetti, P., Scannapieco, A. C., & Norry, F. M. (2010). Direct and correlated responses to artificial selection for high and low knockdown resistance to high temperature in *Drosophila buzzatii*. *Journal of Thermal Biology*, 35, 232–238.
- Sambucetti, P., Scannapieco, A. C., Loeschcke, V., & Norry, F. M. (2013). Heat-stress survival in the pre-adult stage of the life cycle in an intercontinental set of recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 216(15), 2953-2959.
- Sambucetti, P., Loeschcke, V., & Norry, F. M. (2015). Patterns of longevity and fecundity at two temperatures in a set of heat-selected recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 16(6), 801-810.
- Sambucetti, P., & Norry, F. M. (2015). Mating success at high temperature in highland-and lowland-derived populations as well as in heat knock-down selected *Drosophila buzzatii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 154(3), 206-212.

- Saxon, A. D., O'Brien, E. K., & Bridle, J. R. (2018). Temperature fluctuations during development reduce male fitness and may limit adaptive potential in tropical rainforest *Drosophila*. *Journal of evolutionary biology*, 31(3), 405-415.
- 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(4), 738-748.
- Scheiner, S. M., & Berrigan, D. (1998). The genetics of phenotypic plasticity. VIII. The cost of plasticity in *Daphnia pulex*. *Evolution*, 52(2), 368-378.
- Schou, M. S., Mouridsen, M. B., Sørensen, J. G., & Loeschcke, V. (2017). Linear reaction norms of thermal limits in *Drosophila*: Predictable plasticity in cold but not in heat tolerance. *Functional Ecology*, 31, 934–945.
- Schutt, C., & Nothiger, R. (2000). Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development*, 127(4), 667-677.
- Scott, M., Berrigan, D., & Hoffmann, A. A. (1997). Costs and benefits of acclimation to elevated temperature in *Trichogramma carverae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 85(3), 211-219.
- Serradilla, J. M., & Ayala, F. J. (1983). Effects of allozyme variation on fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 62(2), 139-146.
- Sgrò, C. M., & Hoffmann, A. A. (2004). Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity*, 93(3), 241-248.

- Sgrò, C. M., Terblanche, J. S., & Hoffmann, A. A. (2016). What can plasticity contribute to insect responses to climate change? *Annual Review of Entomology*, 61, 433–451.
- Singh, A., & Punzalan, D. (2018). The strength of sex specific selection in the wild. *Evolution*, 72, 2818–2824.
- Sisodia, S., & Singh, B. N. (2002). Effect of temperature on longevity and productivity in *Drosophila ananassae*: evidence for adaptive plasticity and trade-off between longevity and productivity. *Genetica*, 114(1), 95-102.
- Sørensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6: 1025–1037.
- Sørensen J.G., Norry F.M., Scannapieco A.C., Loeschcke V. (2005a). Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *J. Evol. Biol.* 18: 829-837
- Sørensen J.G., Nielsen M.M., Kruhøffer M., Justesen J., Loeschcke V. (2005b). Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chap.* 10: 312-328.
- Sørensen J.G., Nielsen M.M., Loeschcke V. (2007) Gene expression profile analysis of *Drosophila melanogaster* selected for resistance to environmental stressors. *J. Evol. Biol.* 20: 1624–1636.
- Sørensen, J. G., Giribets, M. P., Tarrío, R., Rodríguez-Trelles, F., Schou, M. F., & Loeschcke, V. (2019). expression of thermal tolerance genes in two *Drosophila* species with different acclimation capacities. *Journal of thermal biology*, 84, 200-207.

- Sokolowski, M. B. (2001). *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nature Reviews Genetics*, 2(11), 879-890.
- Soto, I. M., Soto, E. M., Carreira, V. P., Hurtado, J., Fanara, J. J., & Hasson, E. (2010). Geographic patterns of inversion polymorphism in the second chromosome of the cactophilic *Drosophila buzzatii* from northeastern Argentina. *Journal of Insect Science*, 10, 181.
- Stazione, L., Norry, F. M., & Sambucetti, P. (2017). Thermal-specific patterns of longevity and fecundity in a set of heat-sensitive and heat-resistant genotypes of *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 165(2-3), 159-168.
- Stazione, L., Norry, F. M., & Sambucetti, P. (2019). Heat-hardening effects on mating success at high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Thermal Biology*, 80, 172–177.
- Stazione, L., Norry, F. M., Gomez, F. H., & Sambucetti, P. (2020). Heat knockdown resistance and chill-coma recovery as correlated responses to selection on mating success at high temperature in *Drosophila buzzatii*. *Ecology and evolution*, 10(4), 1998-2006.
- Sugimura, K., Satoh, D., Estes, P., Crews, S., & Uemura, T. (2004). Development of morphological diversity of dendrites in *Drosophila* by the BTB-zinc finger protein abrupt. *Neuron*, 43(6), 809-822.
- Tatar M., Promislow D.E.L., Khazaeli A.A., Curtsinger J.W. (1996). Age-specific patterns of genetic variance in *Drosophila melanogaster*. II Fecundity and its genetic covariance with age-specific mortality. *Genetics* 143: 849-858.
- Tatar, M., & Promislow, D. E. (1997). Fitness costs of female reproduction. *Evolution*, 1323-1326.

- Telonis-Scott, M., Hallas, R., McKechnie, S. W., Wee, C. W., & Hoffmann, A. A. (2009). Selection for cold resistance alters gene transcript levels in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, 55(6), 549-555.
- Tower, J. (2009). Hsps and aging. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(5), 216-222.
- Tripathy, R., Kunwar, P. S., Sano, H., & Renault, A. D. (2014). Transcriptional regulation of *Drosophila* gonad formation. *Developmental biology*, 392(2), 193-208.
- Turner, M. E., & Anderson, W. W. (1983). Multiple mating and female fitness in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution*, 714-723.
- Uemura, T., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1989). numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell*, 58(2), 349-360.
- Van Delden, W., & Kamping, A. (1989). The association between the polymorphisms at the Adh and α Gpdh loci and the In (2L) t inversion in *Drosophila melanogaster* in relation to temperature. *Evolution*, 43(4), 775-793.
- Van Heerwaarden, B., & Sgrò, C. M. (2014). Is adaptation to climate change really constrained in niche specialists? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1790), 20140396.
- van Heerwaarden, B., Kellermann, V., & Sgrò, C. M. (2016). Limited scope for plasticity to increase upper thermal limits. *Functional Ecology*, 30(12), 1947-1956.

- Walsh, B. S., Parratt, S. R., Hoffmann, A. A., Atkinson, D., Snook, R. R., Bretman, A., & Price, T. A. (2019). The impact of climate change on fertility. *Trends in ecology & evolution*, 34(3), 249-259.
- Wang, S. C. J. B. (2007). Windows QTL cartographer 2.5. <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.html>.
- Weeks A.R., Mckechnie S.W., Hoffmann A.A. (2002). Dissecting adaptive clinal variation: markers, inversions and size/stress associations in *Drosophila melanogaster* from a central field population. *Ecology letters* 5: 756-763.
- Welte, M. A., Tetrault, J. M., Dellavalle, R. P., & Lindquist, S. L. (1993). A new method for manipulating transgenes: engineering heat tolerance in a complex, multicellular organism. *Current Biology*, 3(12), 842-853.
- Wigby, S., & Chapman, T. (2005). Sex peptide causes mating costs in female *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 15(4), 316-321.
- Wigby, S., Sirot, L. K., Linklater, J. R., Buehner, N., Calboli, F. C., Bretman, A., & Chapman, T. (2009). Seminal fluid protein allocation and male reproductive success. *Current Biology*, 19(9), 751-757.
- Williams G.C. (1957). Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411.
- Williams, G. C. (1966). Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist*, 100(916), 687-690.

- Williams, S. E., Shoo, L. P., Isaac, J. L., Hoffmann, A. A., & Langham, G. (2008). Towards an integrated framework for assessing the vulnerability of species to climate change. *PLoS Biol*, 6(12), e325.
- Wit, J., Kristensen, T. N., Sarup, P., Frydenberg, J., & Loeschcke, V. (2013). Laboratory selection for increased longevity in *Drosophila melanogaster* reduces field performance. *Experimental Gerontology*, 48(11), 1189-1195.
- Yamamoto, D., & Nakano, Y. (1999). Sexual behavior mutants revisited: molecular and cellular basis of *Drosophila* mating. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 56(7-8), 634-646.
- YOKOKURA, T., UEDA, R., & YAMAMOTO, D. (1995). Phenotypic and molecular characterization of croaker, a new mating behavior mutant of *Drosophila melanogaster*. *The Japanese Journal of Genetics*, 70(1), 103-117.
- Zwaan B., Bijlsma R., Hoekstra R.F. (1995). Direct selection on life-span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 49: 649-659.
- Zwaan B.J. (1999). The evolutionary genetics of ageing and longevity. *Heredity*, 82: 589-597.

Anexo

RCC

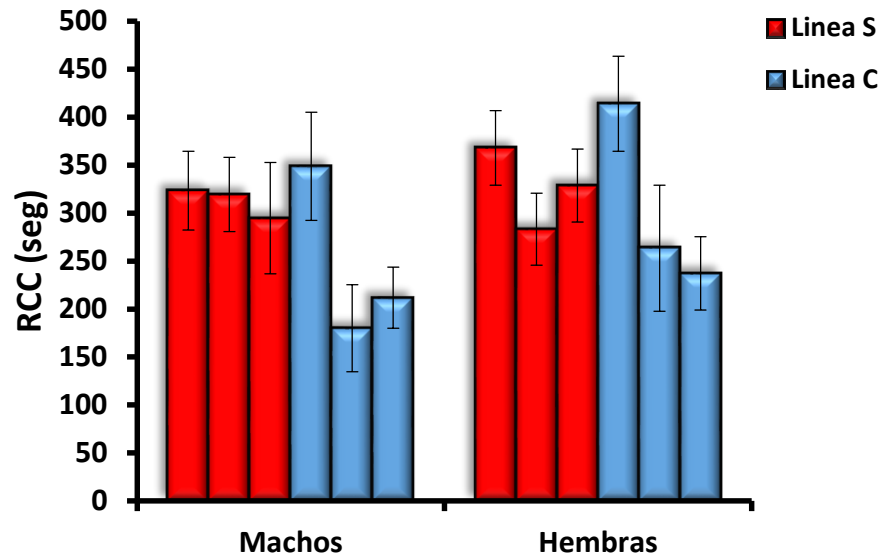


Figura 1. Valores medios (\pm Error estándar) de RCC observados en las seis réplicas pertenecientes a las líneas S y C de *D. Buzzatii* para cada uno de los sexos por separado.

Tabla 1. ANOVA para RCC, con Línea (S vs C) y Sexo como factores fijos y Réplica dentro de Línea como factor aleatorio, tanto en la condición de pre-tratamiento como así también sin pre-tratamiento. También se muestran los resultados del análisis para el efecto del pre-tratamiento para ambas líneas (S y C) por separado. Todos los valores corresponden a estadístico F.

Tratamientos		Factor		
		Línea	Sexo	Línea*sexo
Sin pre-tratamiento		6,01*	0,91	0,19
Pre-tratamiento		11,94***	2,98	0,03
Efecto del pre-tratamiento	<i>Línea S</i>	5,43*	0,86	0,44
	<i>Línea C</i>	0,09	2,81	0,32

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

RCF

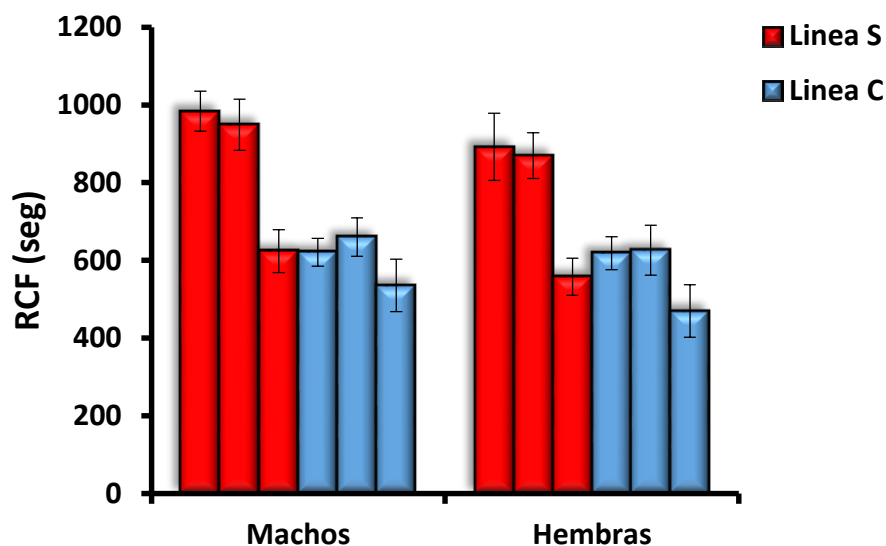


Figura 2. Valores medios (\pm Error estándar) de RCF observados en las seis réplicas pertenecientes a las líneas S y C de *D.Buzzatii* para cada uno de los sexos por separado.

Tabla 2. ANOVA para RCF, con Linea (S vs C) y Sexo como factores fijos y Réplica dentro de Línea como factor aleatorio, tanto en la condición de pre-tratamiento como así también sin pre-tratamiento. También se muestran los resultados del análisis para el efecto del pre-tratamiento para ambas líneas (S y C) por separado. Todos los valores corresponden a estadístico F.

Tratamientos		Factor			
		Linea	Sexo	Linea*sexo	
Sin pre-tratamiento		39,58***	7,5**	1,16	
Pre-tratamiento		44,5***	12,97***	0,09	
Efecto del pre-tratamiento		Linea S	139,43***	13,42***	0,17
		Linea C	106,60***	9,77**	0,16

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Longevidad

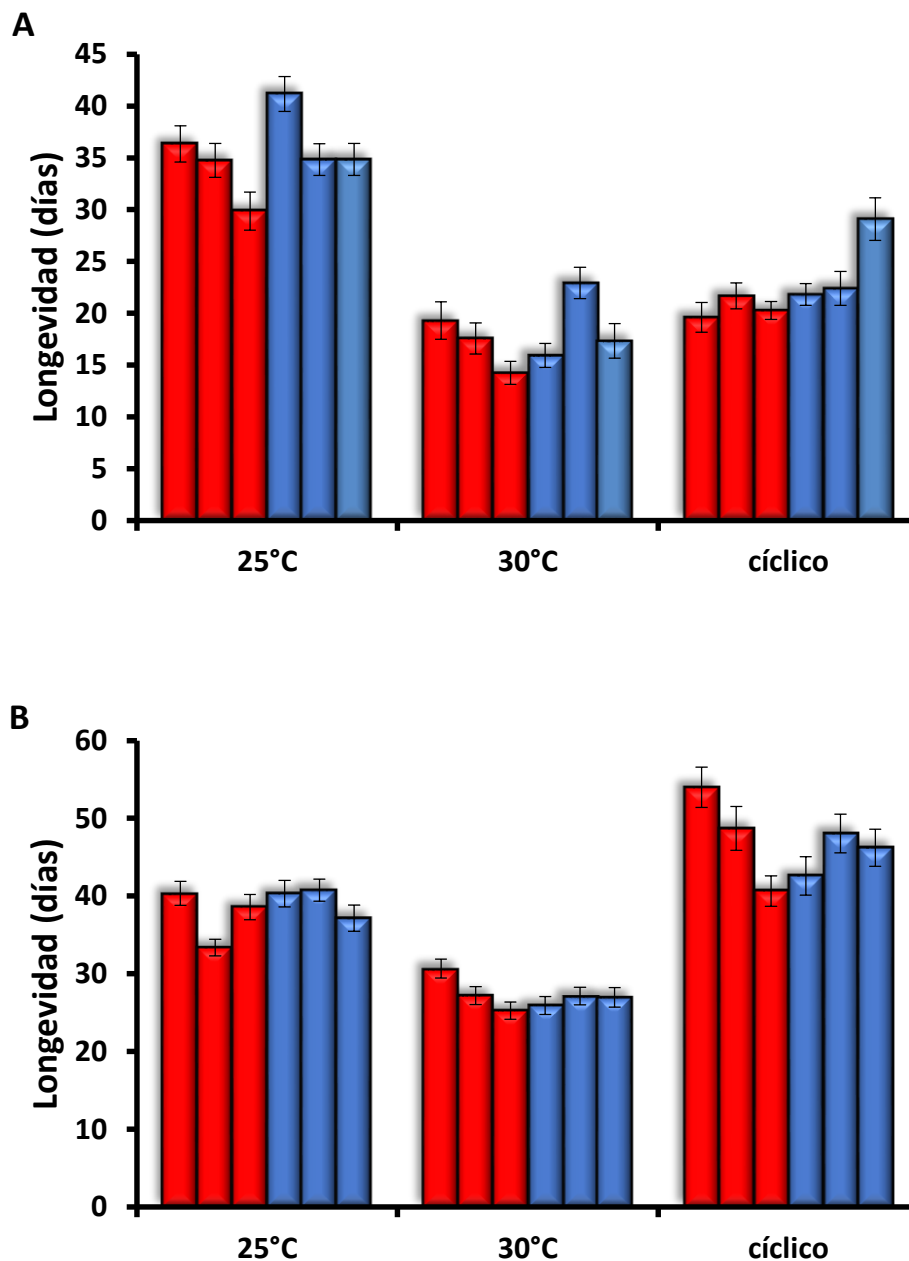


Figura 3. Valores medios (\pm Error estándar) de longevidad (días) en (A) machos y (B) hembras de las seis réplicas pertenecientes a las líneas S y C de *Drosophila buzzatii* para cada uno de los tres tratamientos térmicos: 25°C, 30°C y tratamiento cíclico.

Tabla 3. ANOVA para longevidad (días), con Tratamiento y Linea (S vs C) como factores fijos. Los análisis se realizaron para cada sexo por separado. Todos los valores corresponden a estadístico F.

Factor	Machos		Females	
	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>
Tratamiento	2	151.16***	2	63.11***
linea	1	17.77***	1	0.03
Tratamiento x Linea	2	0.11	2	0.54

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Fecundidad

Tabla 4. ANOVA para la fecundidad temprana y la fecundidad total en exposición constante de machos (ECM), usando Línea (S y C) como factor fijo y Réplica como factor aleatorio dentro de Línea. Los análisis se realizaron para 25°C y 30°C, por separado. Todos los valores corresponden al estadístico F.

Temperatura	Fecundidad temprana	Fecundidad
	<i>Valor F</i>	
25°C	1,24	0,47
30°C	0,09	0,38

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Tabla 5. ANOVA para la fecundidad temprana y la fecundidad total en exposición limitada de machos (ELM), usando Línea (S y C) como factor fijo y Réplica como factor aleatorio dentro de Línea. Los análisis se realizaron para 25°C y 30°C, por separado. Todos los valores corresponden al estadístico F.

Temperatura	Fecundidad temprana	Fecundidad
	<i>Valor F</i>	
25°C	0,25	0,23
30°C	7.26**	5.14*

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

